



HAL
open science

Développement d'une seconde génération de nanoparticules AGuIX pour des applications théranostiques en oncologie

Eloise Thomas

► **To cite this version:**

Eloise Thomas. Développement d'une seconde génération de nanoparticules AGuIX pour des applications théranostiques en oncologie. Cancer. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1121 . tel-01674228

HAL Id: tel-01674228

<https://theses.hal.science/tel-01674228>

Submitted on 2 Jan 2018

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.

N° d'ordre NNT :
2017LYSE1121



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Chimie, procédés, environnement

Institut Lumière Matière, UMR5306

Spécialité : Chimie

Soutenue publiquement le 11/07/2017, par :

Eloïse Thomas

Développement d'une seconde génération de nanoparticules AGuIX pour des applications théranostiques en oncologie

Devant le jury composé de :

Mignet Nathalie, Directrice de Recherche, CNRS, Université Paris Descartes
Denat Franck, Professeur, Université de Bourgogne
Mornet Stéphane, Chargé de Recherche, HDR, CNRS, ICMCB
Barberi-Heyob Muriel, Professeure, Université de Lorraine
Frochot Céline, Directrice de Recherche, CNRS, Université de Lorraine
Tillement Olivier, Professeur, Université Lyon1
Lux François, Maître de Conférences, HDR, Université Lyon1

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de thèse
Co-encadrant de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Ces trois années de thèse ont représenté pour moi un très grand enrichissement aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan personnel. Je tiens ici à remercier et à témoigner ma plus grande reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont conseillé et soutenu.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier Franck Denat, Professeur à l'Université de Bourgogne, et Stéphane Mornet, Chargé de Recherche à l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Nathalie Mignet, Directrice de Recherche à l'Université Paris Descartes, Muriel Barberi-Heyob, Professeure à l'Université de Lorraine et Céline Frochot, Directrice de Recherche à l'Université de Lorraine, d'avoir accepté de faire partie du jury.

J'adresse un grand merci à Olivier Tillement et François Lux pour avoir co-encadré ce travail doctoral et pour la confiance qu'ils m'ont accordée durant plus de trois ans. Votre disponibilité, votre complémentarité et vos conseils m'ont permis d'aller beaucoup plus loin que ce que je ne l'avais imaginé. Olivier, merci pour ton dynamisme et tes idées. François, merci pour ta patience et ton écoute ainsi que pour toutes les corrections minutieuses de mes présentations.

Ce travail de thèse et ses résultats sont le fruit de nombreuses collaborations en France et à l'international. Je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance envers les personnes avec lesquelles j'ai pu travailler.

Je remercie tout d'abord Alexandre Detappe et Ross Berbeco de Harvard pour leur réactivité et leur implication dans le développement des particules bismuth.

Une pensée particulière à toute l'équipe de Nancy : Muriel Barberi-Heyob, Céline Frochot, Magali Toussaint, Ludovic Colombeau, Noémie Thomas, Cédric Boura, Mickaël Gries,... Merci pour votre patience et pour nos nombreux échanges qui nous ont permis de faire avancer les projets PDT. Travailler avec vous fut très enrichissant et agréable.

Je tiens aussi à remercier tous les collaborateurs qui ont participé au radiomarquage des particules AGuIX. Je pense notamment à Sandrine Huclier et David Kryza qui m'ont accueillie à Arronax ou au Lumen et donné la possibilité de me former au radiomarquage ; Penelope Bouziotis de l'institut Demokritos pour tous les résultats avec les particules NODAGA ; Carolyn J. Anderson et Marie-Caline Abadjian de l'université de Pittsburgh qui ont rendu notre collaboration très agréable et fructueuse ; Mickaël J. Evans de l'université de San Francisco pour le marquage au zirconium ; Charles Truillet pour tout son travail et tous ses conseils, que ce soit à l'ILM, à San Francisco ou à Paris. Travailler et discuter avec toi est toujours un plaisir.

Je n'oublie pas toutes les personnes avec lesquelles j'ai été amenée à échanger à un moment ou un autre au cours de ma thèse : Jérôme Randon et Agnès Hagège de l'ISA pour le dosage du gadolinium ; Frédéric Boschetti de CheMatech pour tous les ligands ; Didier Fournier de l'Université de Lyon pour le travail de chromatographie ionique ; Amina Bensalah-Ledoux pour les mesures de dichroïsme circulaire ; ainsi que tous ceux qui m'ont aidée dans mes recherches.

Un très grand merci à tous les membres de l'équipe FENNEC. Sans eux et la bonne ambiance qui règne au sein du laboratoire, ma thèse n'aurait pas été la même. Merci Arthur pour ton amitié et toutes nos grandes discussions ; de nombreuses questions existentielles n'ont toujours pas de réponse mais il nous reste du temps pour les trouver. Merci Fabien d'avoir été là pour m'aider et me soutenir quand j'en avais besoin. Merci Hélène pour ta bonne humeur, tes conseils et tes précieuses relectures. Merci Mahmoud, Mattéo, Vu Long, Shady, Thomas, Huang, Marie, Dalila, Lionel,... Merci à vous tous pour ces bons moments passés ensemble. Une pensée aussi pour tous les stagiaires que j'ai pu encadrer et particulièrement pour Clélia et Myléva. Grâce à vous mon bureau a été beaucoup plus vivant et ma fin de thèse bien plus facile.

Enfin, j'adresse un immense merci à tous mes amis. Merci aux poitevins (Lucie, Swann, Charlotte, Vincent, Flo...) qui restent présents malgré les années et me permettent de me retrouver. Merci Clémence de toujours trouver les mots pour me booster et me donner envie de partir à l'assaut du monde. Merci à tous mes amis de l'ENS, grâce à eux mes années à Lyon sont passées bien trop vite ! Merci à la bande de chimistes (Maëlle, Pierrick, Arthur, Romain, Mathilde, Apollos, Benjamin) avec qui nous avons surmonté des périodes difficiles, très vite effacées par d'excellents instants. Merci aux scientifiques de tous bords (Sarah, Diane, Pauline, Arthur, Paco, Nathalie, Jean-Loup, Baptiste, Amélie, Aude, Jérémy, Léo, Hélène, Nicolas, Mathilde, Tanguy, Nathalie, Yoann,...) pour ces moments riches et inoubliables. J'attends avec impatience de compléter notre collection de souvenirs en vous retrouvant aux quatre coins du monde !

Merci enfin à ma famille, mes parents, mes grands-parents, Guillaume, Claire. Merci de m'avoir soutenue sans faille durant toutes ces années, d'avoir su m'écouter patiemment et me remotiver quand il le fallait. C'est grâce à vous que je suis là aujourd'hui et que je continue.

RESUME

Avec 8,8 millions de morts en 2015, le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde et le nombre de nouveaux cas ne devrait cesser d'augmenter dans les décennies à venir. Il est donc primordial de développer de nouveaux outils pour le diagnostic et la thérapie de ces maladies. Dans ce contexte, l'Institut Lumière Matière a développé une nanoparticule appelée AGuIX® (*Activation et Guidage de l'Irradiation X*). De taille inférieure à 5 nm, elle est constituée d'une matrice de polysiloxane, à la surface de laquelle sont greffés de manière covalente des complexes de gadolinium. La présence de ces complexes lui permet d'être utilisée comme agent de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie (effet radiosensibilisant).

Cette thèse traite du développement d'une deuxième génération de nanoparticules AGuIX® afin d'améliorer et d'ajouter des fonctionnalités de diagnostic ou de thérapie. Pour cela, on a cherché : (i) à augmenter l'effet radiosensibilisant de cette nanoplateforme en ajoutant des complexes de bismuth à sa surface ; (ii) à complexer des radiométaux variés pour permettre la détection des particules en scintigraphie ; (iii) à fonctionnaliser les particules pour la photothérapie dynamique guidée par IRM. Dans tous les cas, après avoir optimisé les synthèses, différentes techniques de caractérisation ont été mises en place afin d'obtenir une description précise des particules. L'efficacité de ces nano-objets pour le diagnostic et/ou le traitement des cancers a ensuite été évaluée grâce à de nombreuses collaborations, en France ou à l'international.

ABSTRACT

With 8.8 million deaths in 2015, cancer is the second leading cause of death in the world and the number of new cases should continue to increase in the decades to come. It is therefore essential to develop new tools for the diagnosis and therapy of this disease. In this context, the Institute of Light and Matter has developed a nanoparticle called AGuIX® (*Activation and Guidance of Irradiation X*). It is made of gadolinium chelates covalently grafted to a polysiloxane core and display a hydrodynamic diameter under 5 nm. Thanks to these complexes, the nanoparticle can be used as a contrast agent for Magnetic Resonance Imaging (MRI) and can improve the radiotherapy efficacy (radiosensitizing effect).

The goal of this PhD is to develop a second generation of AGuIX® nanoparticles to improve or add modalities for diagnosis or therapy. For this, we focused on: (i) increasing the radiosensitizing effect of this nanoplateform by adding bismuth complexes to its surface; (ii) complexing various radiometals to enable the NPs detection by scintigraphy; (iii) functionalizing the NPs for MRI-guided photodynamic therapy. In all cases, after optimization of the syntheses, various characterization techniques were put in place to obtain an accurate description of the particles. The effectiveness of these new nano-objects for the diagnosis and/or treatment of cancers was then evaluated thanks to several collaborations, in France or internationally.

ABREVIATIONS

A

A : Alanine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGuIX : Activation et Guidage de l'Irradiation X

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

APTES : 3-Aminopropyltriéthoxysilane

Au : Or

B

B : Bore

Bi : Bismuth

Bq : Becquerel (unité de radioactivité)

C

C : Carbone

Ca : Calcium

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

Ci : Curie (unité de radioactivité)

CT : *Computed Tomography*, tomodensitométrie

Cu : Cuivre

D

D : Aspartate

Da : Dalton

DEG : Diéthylène glycol

DFO : Desferrioxamine

D_H : Diamètre hydrodynamique

DLS : *Dynamic Light Scattering*, diffusion dynamique de la lumière

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique

DOTAGA : Acide 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triyl)triacétique

DTPA : Acide diéthylènetriaminepentaacétique

E

EPR : Enhanced Permeability and Retention

ESI-MS : *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, spectrométrie de masse par électrospray

eV : electron-Volt

F

F : Fluor

FDA : Food and Drug Administration

G

G : Glycine

Ga : Gallium

GBM : Glioblastome multiforme

Ge : Germanium

Gd : Gadolinium

GMP : *Good Manufacturing Practices*, bonnes pratiques de fabrication

Gy : Gray (unité de dose absorbée)

H

H : Hydrogène

Hf : Hafmium

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*, chromatographie liquide à haute performance

HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, cellules endothéliales humaine de la veine de cordon ombilical

I

I : Iode

ICP-OES : *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, spectrométrie à plasma induit et émission optique

ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, spectrométrie à plasma induit et de masse

ID/g : Dose de radioactivité mesurée dans un organe exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe

ILM : Institut Lumière Matière

In : Indium

iPDT : PDT interstitielle

IR : Infrarouge

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISA : Institut des Sciences Analytiques

K

K : Lysine

L

L : Leucine

$t_{1/2}$: Largeur à mi-hauteur

LIBS : *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*, spectroscopie sur plasma induit par laser

M

MS : Mass Spectrometry, spectrométrie de masse

MGd : Motexafin® de gadolinium

N

N : Azote

NCT : *Neutron Capture Therapy*, thérapie par capture de neutrons

NFS : *Nefrogenic Systemic Fibrosis*, Fibrose Néphrogénique Systémique

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NMRD : *Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion*, relaxation de résonance magnétique nucléaire

NODAGA : acide diacétique 2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)

NOTA : acide 1,4,7-triazacyclonane-N,N',N''-triacétique

NP : Nanoparticule

NRP-1 : Neuropiline-1

O

O : Oxygène

P

P : Proline

PBS : *Phosphate Buffered Saline*, tampon phosphate salin

PDT : *Photodynamic Therapy*, photothérapie dynamique

PEG : polyéthylène glycol

PES : Polyéthersulfone

PET : *Positron Emission Tomography*, tomographie par émission de positons

PS : Photosensibilisateur

R

R : Arginine

r₁ : Relaxativité ou relaxivité longitudinale

r₂ : Relaxativité ou relaxivité transversale

RES : *Reticulo-Endothelial System*, Système réticulo-endothélial

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : *Reactive Oxygen Species*, dérivés réactifs de l'oxygène

S

S : Soufre

SAXS : *Small-Angle X-ray Scattering*, diffusion des rayons X aux petits angles

SDS : Sodium DodécylSulfate

SER : *Sensitizing Enhancement Ratio*, facteur traduisant l'augmentation de la radiosensibilité en présence d'agent radiosensibilisant

SPECT : *Single Photon Emission Computed Tomography*, tomographie par émission monophotonique

Si : Silicium

T

T : Thréonine

T₁ : Temps de relaxation longitudinal

T₂ : Temps de relaxation transversal

t_{1/2} : temps de demi-vie

Tc : Technétium

TCEP : tris(2-carboxyéthyl)phosphine

TEM : *Transmission Electron Microscopy*, microscopie électronique à transmission

TEOS : Tétrahéoxysilane

TFA : acide trifluoroacétique

TNBS : acide 2,4,6 Trinitrobenzènesulfonique

t_R : Temps de rétention

U

UV : Ultraviolet

V

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VTP : *Vascular-Targeted PDT*, PDT ciblée du système vasculaire des tumeurs

W

W : Tryptophane

Z

Z : Numéro atomique

Zr : Zirconium

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Résumé	7
Abstract	8
Abréviations	9
Table des matières	13
Introduction générale	17
1 Chapitre 1 : Les NPs à base de Gd en oncologie	21
1.1 Le Gadolinium en médecine	21
1.1.1 Intérêt en imagerie.....	21
1.1.2 Intérêt en thérapie	24
1.2 Développement de NPs à base de Gd	26
1.2.1 Structure des NPs.....	26
1.2.2 Elimination des NPs.....	27
1.2.3 Ciblage des zones tumorales	28
1.3 Utilisation des NPs à base de Gd en imagerie	30
1.3.1 Intérêt des NPs à base de Gd en IRM	30
1.3.2 Multimodalité	32
1.4 Utilisation des NPs à base de Gd en thérapie, vers le théranostic	34
1.4.1 Effet thérapeutique dû au Gd	34
1.4.2 Vers le théranostic.....	35
1.4.3 Vers un passage en clinique des NPs pour l'oncologie	36

1.5	La nanoplateforme AGuIX®	38
1.5.1	Synthèse et structure	38
1.5.2	Biocompatibilité et biodistribution.....	40
1.5.3	Utilisation en radiothérapie guidée par IRM	42
1.6	Objectifs de thèse.....	45
2	Chapitre 2 : Optimisation de l'effet radiosensibilisant des NPs AGuIX	49
2.1	Introduction	49
2.1.1	L'utilisation des NPs pour la radiothérapie.....	49
2.1.2	Exemples de NPs de haut Z pour la radiosensibilisation.....	52
2.1.3	Le cas des AGuIX.....	54
2.1.4	Objectifs	55
2.2	Synthèse des particules AGuIX@DOTA	56
2.2.1	Stratégies	56
2.2.2	Modification de la synthèse des AGuIX	57
2.2.3	Greffage de DOTA-NHS sur les AGuIX.....	65
2.2.4	Conclusion.....	71
2.3	Synthèse et caractérisation des AGuIX@DOTA@Bi ³⁺	72
2.3.1	Synthèse	72
2.3.2	Caractérisations.....	73
2.3.3	Stabilité.....	74
2.4	Résultats <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> , publication.....	77
2.4.1	Résumé des résultats <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	77
2.4.2	Publication	79
2.5	Conclusion.....	87
3	Chapitre 3 : Développement de NPs AGuIX pour la scintigraphie	91
3.1	Introduction	91
3.1.1	La scintigraphie	91
3.1.2	Les radioisotopes.....	93
3.1.3	Différents type de NPs inorganiques pour la scintigraphie.....	95

3.1.4	Projets de thèse.....	98
3.2	Complexation de radioisotopes variés par le DOTAGA.....	100
3.2.1	⁶⁷ Ga.....	100
3.2.2	¹¹¹ In.....	102
3.2.3	Radioisotopes pour la PET	103
3.2.4	Conclusion	103
3.3	Complexation de ⁶⁴ Cu et ⁶⁸ Ga par le NODAGA.....	104
3.3.1	Synthèse et caractérisations	104
3.3.2	Radiomarquage par du ⁶⁴ Cu : biodistribution quantitative.....	107
3.3.3	Radiomarquage par du ⁶⁸ Ga : biodistribution et métabolisation, publication	109
3.4	Complexation de ⁸⁹ Zr par le DFO	126
3.4.1	Synthèse	126
3.4.2	Caractérisations.....	127
3.4.3	Radiomarquage et biodistribution, publication.....	130
3.5	Conclusion.....	138
4	Chapitre 4 : Développement de NPs AGuIX pour la PDT guidée par IRM	143
4.1	Introduction	143
4.1.1	Principe de la PDT	143
4.1.2	Exemple de photosensibilisateurs.....	146
4.1.3	Utilisation de la PDT pour le traitement des glioblastomes.....	148
4.1.4	Intérêt des NPs pour la PDT	149
4.1.5	Projets de thèse.....	149
4.2	PDT et ciblage passif des tumeurs.....	151
4.2.1	Synthèse des AGuIX@PS.....	151
4.2.2	Caractérisations.....	152
4.2.3	Propriétés photophysiques.....	155
4.2.4	Résultats <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> , publication	156
4.2.5	Conclusion.....	175
4.3	PDT et ciblage actif des tumeurs.....	175
4.3.1	PDT ciblée de la vasculature des tumeurs (VTP)	175

4.3.2	Stratégies de synthèse envisagées.....	177
4.3.3	Synthèse et caractérisations des AGuIX@SH.....	178
4.3.4	Synthèse des AGuIX@PS@peptide.....	180
4.3.5	Publication	183
4.4	Conclusion.....	209
Conclusion générale		213
5	Annexes.....	219
5.1	Annexe A.1 : les NPs AGuIX et AGuIX fonctionnalisées. Synthèse et caractérisations.	219
5.1.1	Techniques de synthèse et de caractérisation	219
5.1.2	Quantification du nombre d'amines libres sur les NPs AGuIX.....	222
5.2	Annexe A.2 : passage des NPs AGuIX en clinique.....	224
5.2.1	Stabilité des NPs AGuIX.....	224
5.2.2	Le gadolinium libre dans les lots de NPs AGuIX.....	227
5.2.3	Conclusion.....	233
5.3	Annexe A.3 : fonctionnalisations des NPs AGuIX par des fluorophores	234
5.3.1	Greffage de fluorophores sur les NPs AGuIX	234
5.3.2	Mode opératoire et caractérisations des NPs	235
5.3.3	Etude de la biodistribution des NPs AGuIX fluorescentes, publication	236
5.4	Annexe A.4 : liste de publications et brevets	251
Bibliographie.....		255

INTRODUCTION GENERALE

Malgré de grandes avancées en médecine, le cancer reste l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2012 on comptait approximativement 14 millions de nouveaux cas et ce nombre devrait augmenter de 70 % environ au cours des 2 prochaines décennies. De plus, avec 8,8 millions de morts en 2015, près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer ce qui en fait la deuxième cause de mortalité dans le monde. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils permettant de détecter et de traiter les cancers plus efficacement. L'une des solutions serait d'utiliser des nanomatériaux.

En 2011, La Food and Drug Administration (FDA) les a définis comme des matériaux ayant au moins l'une de leurs dimensions à l'échelle nanométrique (c'est-à-dire comprise entre 1 et 100 nm environ).^[1] A cette échelle, des propriétés uniques apparaissent et permettent des applications nouvelles non réalisables avec de simples molécules ou avec des matériaux massifs. Au cours des dernières années, de nombreux nanomatériaux ont été décrits dans la littérature pour des applications en médecine et varient tant par leur structure que par leur composition (voir **Figure 1**).^[2] Dans ce manuscrit on s'intéressera principalement aux nanoparticules (NPs) hybrides (inorganiques/organiques) même si les autres catégories pourront être mentionnées, notamment dans le chapitre 1.

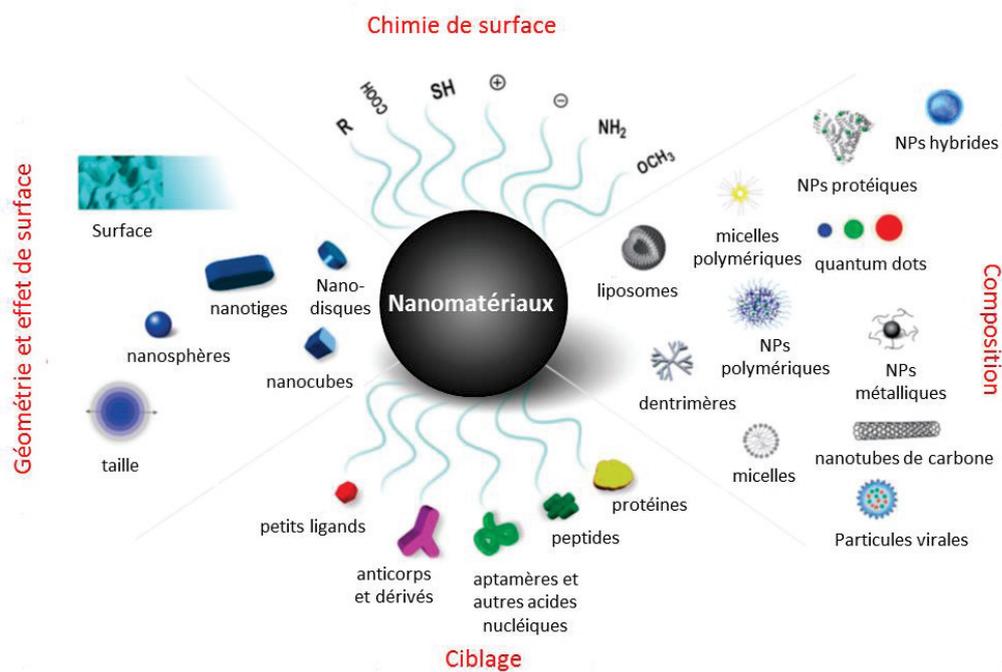


Figure 1 : Une grande variété de nanomatériaux proposés pour la nanomédecine. Figure adaptée de Kamaly et al.^[2]

L'utilisation de nanoparticules en oncologie présente plusieurs avantages notamment pour le diagnostic. Il est en effet possible d'augmenter le signal par objet en ajoutant un nombre important d'agents d'imagerie sur la particule. On peut aussi réunir au sein d'une même nanoplateforme des agents de nature différente associés à plusieurs techniques d'imagerie afin de combiner leurs avantages et de palier leurs défauts. Enfin, du fait de l'échelle nanométrique, de nouvelles propriétés peuvent se manifester chez certains matériaux. Par exemple, lorsque les oxydes de fer sont mis sous forme de nanoparticules, un nouvel état magnétique apparaît : le superparamagnétisme. Il permet d'utiliser ces nanostructures comme agents de contraste négatifs en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).^[3,4]

Les nanoparticules peuvent aussi être utilisées en thérapie. Ainsi plusieurs types de nanoparticules ont montré leur intérêt pour la délivrance de médicaments. Elles permettent d'obtenir une grande concentration d'agents thérapeutiques dans un seul objet, elles protègent ces agents du milieu extérieur durant le transport et elles peuvent éventuellement libérer ces agents en fonction de stimuli externes (pH par exemple).^[3] On peut aussi utiliser des propriétés intrinsèques liées aux matériaux à des fins thérapeutiques. Ainsi, l'hyperthermie consiste à utiliser un stimulus physique pour échauffer les nanoparticules qui à leur tour vont faire augmenter la température des cellules, entraînant finalement la mort cellulaire. L'échauffement peut se faire grâce à des lasers (absorption par le plasmon des particules d'or)^[5] ou à des champs magnétiques oscillants (particules d'oxyde de fer).^[3,4] De plus, on peut facilement envisager la synthèse de nanoparticules comportant une modalité d'imagerie et une autre de thérapie. On obtient alors des structures multimodales pouvant être utilisées simultanément en diagnostic et en thérapie, on parle de théranostic. Cette propriété est très intéressante dans l'optique d'une médecine personnalisée. Tous les patients ne réagissent pas forcément de la même manière à un traitement ou ne développent pas une maladie à la même vitesse. Ces structures permettraient donc d'adapter le traitement en fonction de chaque patient en pouvant notamment visualiser la biodistribution de l'agent thérapeutique.

D'autre part, en jouant sur la structure des particules (taille, forme, ligand de surface,...), il est possible d'optimiser leur biodistribution : augmenter le temps de circulation dans l'organisme, cibler les cellules cancéreuses,...^[2]

Si de nombreuses nanoparticules ont été étudiées en oncologie, seul un très petit nombre atteint finalement des applications cliniques. Cela peut s'expliquer par des préoccupations des autorités régulatrices concernant la toxicité potentielle liée aux nanoparticules, à des intérêts commerciaux fluctuant des industriels ou encore à une incapacité à démontrer une augmentation significative de l'efficacité par rapport aux méthodes de cliniques « classiques ». Malgré tout, un nombre croissant d'essais cliniques est reporté ce qui souligne bien l'espoir apporté par ces objets pour le diagnostic et le traitement des cancers.^[6,7]

Dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressés au développement de nanoparticules hybrides à base de gadolinium (Gd) pour des applications théranostics en oncologie. Le premier chapitre présentera ce type de particules et leurs intérêts que ce soit pour le diagnostic ou la thérapie.

Chapitre 1

Les nanoparticules à base de gadolinium en oncologie

1 CHAPITRE 1 : LES NPS A BASE DE Gd EN ONCOLOGIE

1.1 LE GADOLINIUM EN MEDECINE

Le gadolinium (Gd) fait partie de la famille des lanthanides. Il possède un numéro atomique élevé ($Z = 64$), est en général rencontré sous le degré d'oxydation stable +III et a un nombre de coordination variant entre 8 et 10.^[8] C'est l'un des lanthanides les plus couramment utilisés en médecine en raison de son emploi comme agent de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Ainsi, dans le monde, plus de 10 millions d'études IRM utilisent des composés à base de Gd^{3+} par an.^[9]

1.1.1 Intérêt en imagerie

1.1.1.1 L'IRM

L'IRM est une technique d'imagerie fréquemment utilisée en clinique et présente l'avantage d'avoir une bonne résolution. Elle est basée sur l'étude de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des protons de l'eau présents dans les tissus, et plus exactement sur la relaxation de leur spin nucléaire. On distingue le temps de relaxation longitudinal (T_1) et le temps de relaxation transversal (T_2). Le contraste d'une image IRM dépend notamment de la densité de l'eau et des temps de relaxation des spins des protons, qui varient selon les tissus comme le montre la **Figure 1-1**.^[4,10] Une image IRM est en quelque sorte une représentation en nuance de gris des temps de relaxation des différents tissus.

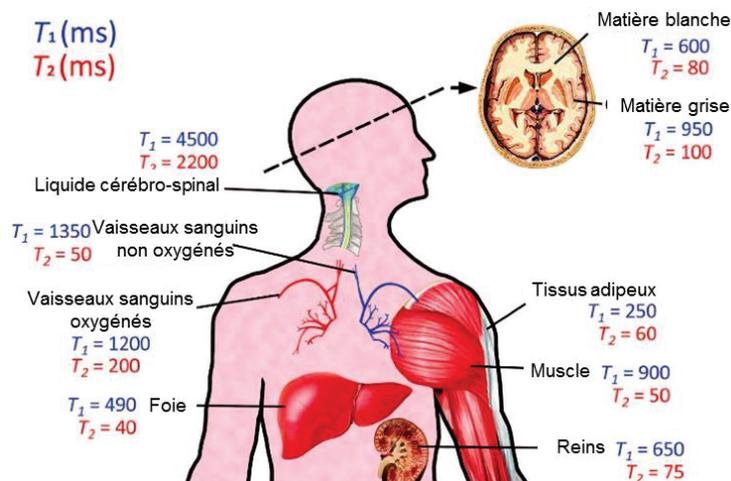


Figure 1-1 : Les temps de relaxation longitudinaux (T_1) et transversaux (T_2) sont différents selon les tissus. Figure issue de Mahmoudi et al.^[11]

Un des défauts de l'IRM réside dans son manque de contraste entre les tissus sains et les tumeurs. Pour pallier cela des agents de contraste sont fréquemment utilisés, ceux à base de Gd^{3+} sont les plus utilisés en raison de ses sept électrons non appariés et de son temps de relaxation électronique relativement long.^[11] Ils permettent de raccourcir les temps de relaxation des protons entraînant alors un éclaircissement des zones où ils se trouvent et donc une amélioration du contraste entre les tissus, comme cela est présenté sur la **Figure 1-2**. Ces agents sont appelés agents de contraste positifs. L'IRM réalisée avec des agents de contraste à base de Gd^{3+} est devenue la technique d'imagerie de choix pour identifier le nombre, la taille, l'hétérogénéité ou encore la localisation des tumeurs et des métastases.^[11]

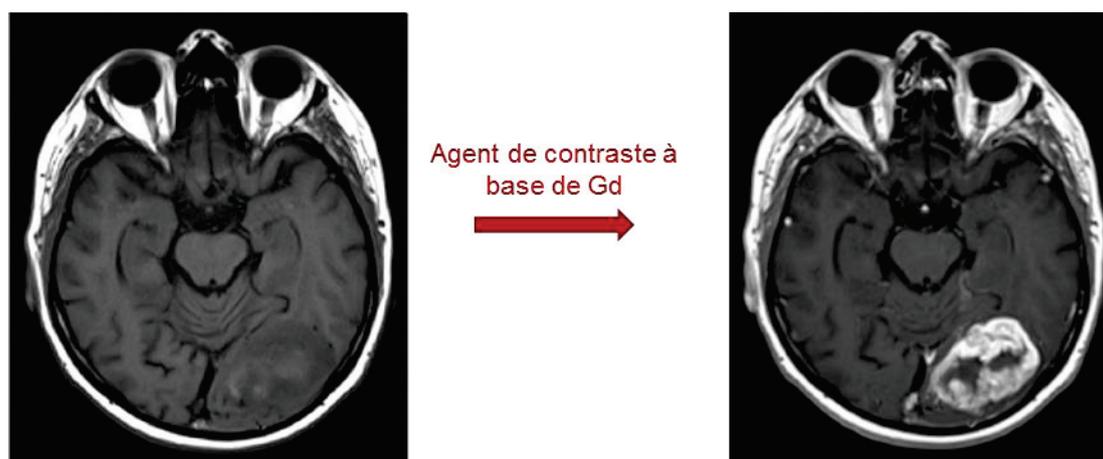


Figure 1-2 : Images IRM, pondérées en T_1 , du cerveau d'un homme de 77 ans souffrant d'un astrocytome anaplasique occipital gauche (cancer du cerveau). Les images sont enregistrées avant après l'injection intraveineuse d'un agent de contraste à base de gadolinium (DOTAREM® 0,1mmol/kg). Grâce à celui-ci, la tumeur apparaît en blanc et est facilement détectée. Figure issue de Vaneckova et al.^[12]

Les différents agents sont caractérisés par leurs relaxivités transversale r_2 et longitudinale r_1 , qui permettent de quantifier leur efficacité. L'équation suivante permet de relier les temps de relaxations des protons à la concentration en agent de contraste :

$$\frac{1}{T_{i,mesuré}} = \frac{1}{T_{i,0}} + r_i \cdot [Gd^{3+}]$$

où r_i ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$) est la relaxivité, $[Gd^{3+}]$ (mM) est la concentration en gadolinium, $T_{i,mesuré}$ (s) est le temps de relaxation mesuré en présence de l'agent de contraste et $T_{i,0}$ (s) est le temps de relaxation en l'absence de l'agent de contraste.

1.1.1.2 Les complexes de gadolinium en IRM

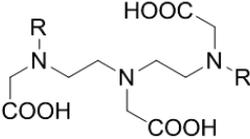
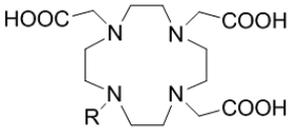
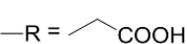
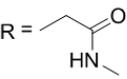
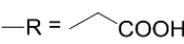
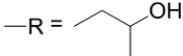
Les ions Gd^{3+} libres présentant une toxicité,^[13-15] on les utilise en imagerie sous forme de complexes, certains sont présentés sur le **Tableau 1-1**. Leurs relaxivités sont relativement faibles avec un r_1 autour de 3,5 et un ratio r_2/r_1 autour de 1,2 pour un champ de 1,0 Tesla. La plupart de ces agents moléculaires se

répartissent dans l'espace intravasculaire (dans les vaisseaux sanguins) et interstitiel (entre les vaisseaux sanguins et les cellules) et sont éliminés rapidement par voie rénale.^[16]

Une des différences importantes entre ces complexes vient du ligand qui peut être linéaire ou cyclique ce qui a un impact sur la toxicité liée à ces composés. En effet, plusieurs études ont montré que des patients avec une insuffisance rénale et ayant reçu des injections d'agents de contraste acycliques, comme l'Omniscan®, ont développé une Fibrose Systémique Néphrogénique (NFS en anglais, *Nefrogenic Systemic Fibrosis*), une maladie potentiellement mortelle.^[14,17] Plus récemment, des augmentations de signal IRM associées à des dépôts de gadolinium dans le cerveau ont aussi été observées.^[15] Cela peut s'expliquer par un échange du gadolinium avec d'autres ions dans l'organisme après injection des agents de contraste acycliques. Cet échange (transmétallation) peut notamment avoir lieu avec les ions Ca^{2+} qui ont un rayon ionique similaire et il conduit à la libération d'ions Gd^{3+} .^[9]

Les ligands cycliques ont une meilleure stabilité thermodynamique et cinétique^[14], ils permettraient d'éviter ce phénomène de transmétallation et sont donc maintenant privilégiés. Les dérivés du DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) sont ainsi utilisés par exemple pour le Dotarem® ou le Prohance®.

Tableau 1-1 : Quelques agents de contraste à base de gadolinium. Les valeurs de relaxivité sont données pour un champ de 1,0 T.^[9]

	Magnevist®	Omniscan®	Dotarem®	Prohance®
Ligand				
				
r₁ (s⁻¹.mM⁻¹)	3,4	3,9	3,4	3,7
r₂ (s⁻¹.mM⁻¹)	3,8	4,3	4,8	4,8

Si la plupart des complexes de Gd^{3+} ont été étudiés pour des applications en imagerie IRM, d'autres agents à base de Gd ont été utilisés en radiothérapie.

1.1.2 Intérêt en thérapie

1.1.2.1 Irradiation par des rayons X

La radiothérapie est l'un des piliers des traitements actuels contre le cancer. Environ 50 à 60 % des patients atteints d'un cancer reçoivent en effet une radiothérapie au cours de leur parcours médical, le plus souvent en combinaison avec de la chirurgie ou de la chimiothérapie. Différents types d'irradiation ont été utilisés en clinique : rayonnements électromagnétiques (rayons X ou γ) ou rayonnements corpusculaires (neutrons, protons ou ions tels que carbone, hélium...). Néanmoins, à ce jour, l'utilisation de rayons X de haute énergie prédomine notamment en raison d'un coût plus faible de production.^[18]

Le but de la radiothérapie est de détruire les cellules cancéreuses par irradiation, il faut cependant veiller à préserver les tissus sains environnants ce qui limite les doses d'irradiation envisageables. Différentes techniques ont été développées pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie : (i) jouer sur les techniques d'irradiation comme la radiothérapie avec modulation d'intensité ou la modulation d'intensité volumétrique par arc thérapie ; (ii) utiliser des agents chimiques pour augmenter la dose d'irradiation délivrée localement ou augmenter les effets biologiques liés à l'irradiation.^[19-21] On appellera ce phénomène *radiosensibilisation* et les agents *radiosensibilisateurs*. Ils peuvent être des molécules de synthèse, des complexes, des acides nucléiques, des anticorps...^[18]

Le Motexafin[®] de gadolinium (MGd) représenté **Figure 1-3** est un complexe macrocyclique. Même si son efficacité est aujourd'hui discutée,^[22] ce composé a été évalué au cours de plusieurs essais cliniques (phase I à phase III) comme agent radiosensibilisant pour le traitement de tumeurs, métastases cérébrales ou cancers tête et cou par exemple. Le composé MGd peut être injecté par voie intraveineuse ce qui lui permet de s'accumuler dans les tumeurs avant une irradiation par des rayons X. Le mécanisme d'action du MGd impliquerait la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) et des processus biochimiques complexes.^[23-26]

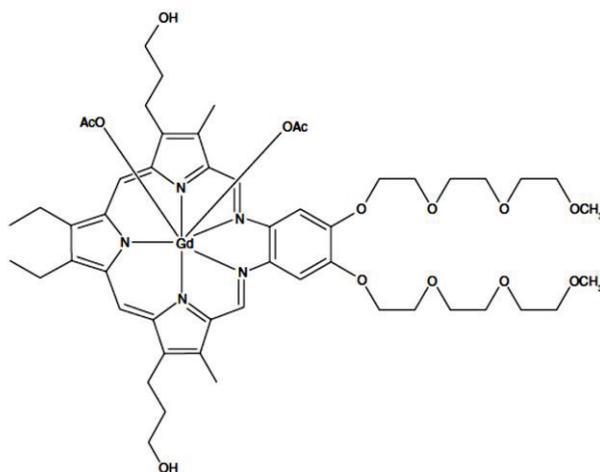


Figure 1-3 : Structure du Motexafin[®] de gadolinium (MGd), agent radiosensibilisant.^[26]

1.1.2.2 Irradiation par des neutrons

La thérapie par capture de neutron (NCT en anglais, *Neutron Capture Therapy*) est basée sur une irradiation des tumeurs par des neutrons de faible énergie, ceux-ci sont ensuite absorbés par des composés ce qui entraîne l'émission de particules de haute énergie et la destruction des cellules cancéreuses.^[27] Ces composés sont en général des molécules contenant du bore ^{10}B notamment en raison de sa grande section efficace d'absorption par rapport aux autres éléments présents dans les tissus comme cela est présenté dans le **Tableau 1-2**. L'absorption des neutrons par le ^{10}B entraîne l'émission d'ions lithium $^7\text{Li}^{3+}$ et de particules α qui causent des dommages important sur une distance de 5 à 8 μm .^[28]

L'utilisation de composés à base de Gd a aussi été envisagée pour la NCT. Leur intérêt réside dans le fait que leur biodistribution et leur accumulation dans les tumeurs peuvent être suivies par IRM et que les sections efficaces du ^{155}Gd et du ^{157}Gd sont élevées (voir **Tableau 1-2**). L'absorption des neutrons par ces isotopes conduit à l'émission d'électrons et de rayonnement γ qui induisent des dommages à courte distance (quelques nm) et longue distance (dixième de cm).^[29,30] Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont ainsi montré l'intérêt de composés à base de Gd pour la NCT.^[30] Par exemple Khokhlov *et al.* ont observé l'influence d'une injection intratumorale de Magnevist® sur des rats porteurs de tumeur (sarcome de Jensen) au niveau de la cuisse. Pour les deux groupes contrôles (injection ou non de Magnevist®, sans irradiation neutron) la tumeur a continué de croître. L'irradiation par des neutrons, sans Magnevist®, a elle entraîné une inhibition transitoire de la croissance tumorale avec une régression totale dans 15 % des cas. L'irradiation par des neutrons en présence de Magnevist® a permis d'augmenter les effets tumoricides en permettant une régression complète des tumeurs dans environ 80 % des cas.^[31] Malgré des résultats prometteurs, ce type de thérapie est encore peu développé, notamment car les sources de neutrons sont assez peu communes.^[32]

Tableau 1-2 : Sections efficaces de différents éléments ou isotopes pour la capture de neutrons. 1 barn correspond à 10^{-24} cm^2 .^[27]

	^{10}B	^{157}Gd	^{155}Gd	N	Na	H	Mg	C	O
Section efficace (barns)	3 838	255 000	61 000	1,82	0,43	0,332	0,053	0,0034	0,00018

Comme nous venons de le voir, le gadolinium est un élément très intéressant pour le diagnostic et la thérapie des cancers. Afin d'améliorer les propriétés des agents à base de Gd (biodistribution, relaxivité,...) et donc leur intérêt en oncologie, de nombreuses nanoparticules ont été développées. ^[9,16]

1.2 DEVELOPPEMENT DE NPs A BASE DE Gd

1.2.1 Structure des NPs

Les nanoparticules à base de Gd peuvent être classées en deux catégories. La première regroupe des nanoparticules avec un cœur inorganique contenant du gadolinium. On retrouve ainsi des nanoparticules d'oxyde de Gd (Gd_2O_3),^[33-35] de fluorure de Gd (GdF_3 , $NaGdF_4$, $KGdF_4$),^[16,36,37] de carbonate de gadolinium ($GdO(CO_3)_2$)^[38] ou de phosphate de Gd ($GdPO_4$).^[39] D'autres nanoparticules inorganiques ont été développées puis dopées avec du Gd pour obtenir des structures pour l'IRM. C'est le cas pour des particules de $NaYF_4$.^[40] Des relaxivités élevées peuvent être atteintes pour ces nanostructures. Par exemple, des nanoparticules d'oxyde de Gd de 1 nm de diamètre ont été obtenues et présentent une relaxivité longitudinale r_1 de $9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (par atome de gadolinium) et un ratio r_2/r_1 de 1,06 à 1,5 T.^[34] Cette valeur r_1 , plus élevée que celle des complexes présentés dans la **partie 1.1.1.2** précédente, peut s'expliquer par un effet coopératif des nombreux atomes de Gd en surface de la particule.

A ce jour, les complexes de Gd (présentés précédemment) restent les agents de contraste IRM les plus utilisés en clinique. Pour améliorer leurs propriétés (relaxivité, biodistribution), de nombreuses études s'intéressent à les combiner à d'autres structures par encapsulation ou greffage^[9,16,41] (dendrimères,^[42] nanoparticules polymériques,^[43,44] micelles,^[45] nanofibres,^[46] nanotubes de carbone,^[9]...). Par exemple, De Smet *et al.* ont développé des liposomes avec un diamètre hydrodynamique d'environ 70 nm et encapsulant un complexe de Gd^{3+} , le Prohance®.^[47] Cabral *et al.* ont eux synthétisé des micelles d'environ 30 nm de diamètre pour lesquelles l'ajout de Magnevist® (Gd-DTPA) est réalisé par formation de complexes (voir **Figure 1-4**). Ceci contribue à diminuer la mobilité du Magnevist® et par suite à augmenter sa relaxivité. Ainsi, les micelles obtenues présentent une relaxivité longitudinale r_1 de $80,5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ (par atome de gadolinium) contre $3,5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ pour le Magnevist® (à 37°C et 0,59 T).^[48,49]

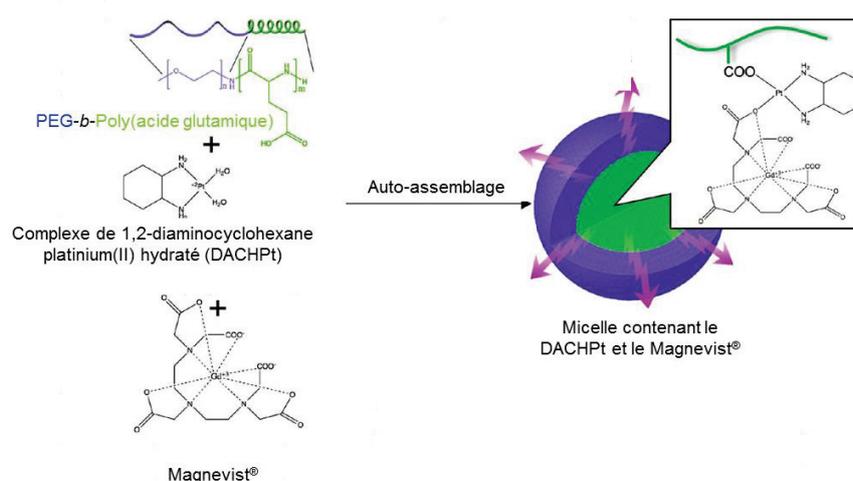


Figure 1-4 : Schéma représentant la formation de micelles contenant du Magnevist® (Gd-DTPA). Les micelles s'auto-assemblent par formation de complexes métalliques entre le DACHPt et les acides carboxyliques. Figure issue de Cabral *et al.*^[48]

Concernant les nanoparticules inorganiques ou hybrides, les complexes ont été incorporés au sein de particules de silice poreuses^[9,50] ou encore greffés à la surface de nanoparticule de silice^[51] ou d'or.^[52] Par exemple, Laurent *et al.* ont développé des nanoparticules d'or portant en surface des complexes de gadolinium.^[53] Dans ce cas, les complexes sont des dérivés du DOTA, le chélate utilisé pour le Dotarem[®]. A 60 MHz, pour les nanoparticules, un ratio r_2/r_1 proche de 1 (1,5 environ) est obtenu. Il est similaire au ratio du Dotarem[®] et est cohérent avec l'utilisation de ces particules comme agent de contraste positif en IRM. Cependant, la valeur de r_1 par gadolinium est beaucoup plus élevée. En effet, elle est d'environ $15 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ avec les particules contre $2,9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ pour le Dotarem[®] dans les mêmes conditions. Ceci s'explique par une augmentation du temps de corrélation rotationnel liée à une augmentation de la masse et de la rigidité de la structure.^[16]

Afin de pouvoir utiliser les nanoparticules à base de Gd en clinique, que ce soit pour le diagnostic ou le traitement des cancers, leur biodistribution doit être optimisée. En jouant sur la structure ou la composition de ces particules, il est alors possible de contrôler leur élimination ou leur accumulation dans les tumeurs.

1.2.2 Elimination des NPs

Après injection dans l'organisme, trois voies principales d'élimination des nanoparticules existent : la voie rénale (urine), hépatique (bile) ou la digestion par les macrophages du système réticulo-endothélial (RES). Celui-ci est constitué du foie, de la rate, de la moelle osseuse, des surrénales et des ganglions lymphatiques.^[54] Une élimination rénale semble préférable pour minimiser les risques potentiels à long terme pour la santé provenant de l'accumulation non spécifique et de la métabolisation des particules. Pour cela une petite taille (inférieure à environ 10 nm) ainsi qu'une surface et une forme adaptées sont nécessaires.^[18]

En effet, les particules de diamètre hydrodynamique d'environ 200 nm seraient éliminées par un processus d'opsonisation. Il correspond à la fixation de protéines présentes dans le sang et appelées opsonines sur les nanoparticules, les opsonines sont ensuite reconnues par des macrophages mobiles et l'assemblage nanoparticule-opsonine est éliminé. Les nanoparticules de diamètre supérieur à environ 10 nm sont éliminées par le RES ou par voie hépatique relativement lentement. Par contre, celles dont le diamètre est inférieur à environ 5 nm vont être éliminées par les urines grâce aux reins relativement rapidement. Enfin, pour les particules dont la taille est légèrement supérieure à 5 nm la voie d'élimination est variable et dépend de la nanoparticule considérée.^[54,55]

Ces résultats sont à considérer avec précaution, entre autres car ils ont été acquis en étudiant des Quantum Dots (nanoparticules à base de semi-conducteur) sphériques et que de nombreux facteurs autres que la taille jouent un rôle dans l'élimination des particules de l'organisme. Ainsi la charge des particules a une influence directe puisque des protéines du plasma peuvent s'associer aux particules augmentant alors leur diamètre hydrodynamique et diminuant l'élimination par les reins. La forme des nanoparticules, leur surface (hydrophile/hydrophobe), leur rugosité et leur flexibilité sont aussi des paramètres à prendre en

compte.^[54] La **Figure 1-5** schématise l'influence sur l'élimination des particules de leur taille (a), forme (b) et charge de surface (c).

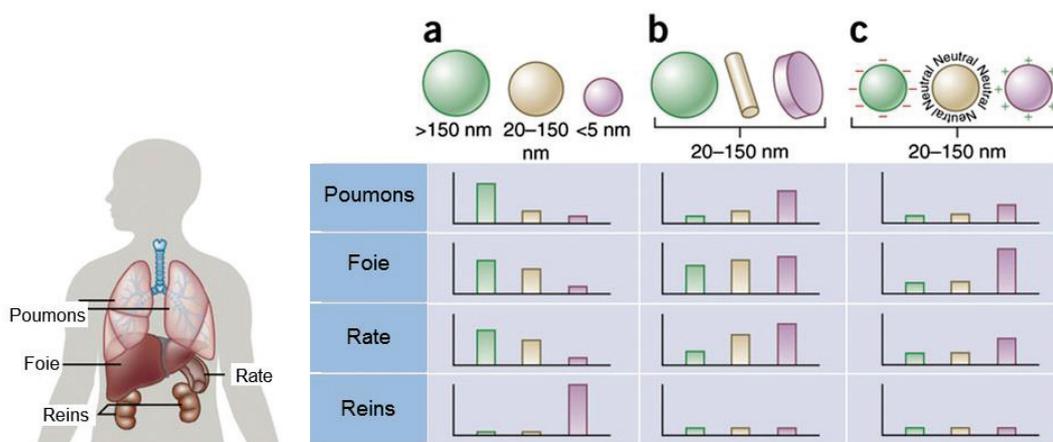


Figure 1-5 : Influence de la taille (a), de la forme (b) et de la charge (c) des particules sur leur élimination. L'élimination rénale est favorisée pour des particules de petites tailles (diamètre inférieur à 5-6 nm). Figure issue de Blanco et al.^[56]

Il est aussi envisageable de contrôler la biodistribution des particules, par exemple en modifiant leur surface. Ainsi, il a été montré que l'ajout de polymères biocompatibles ou de polyéthylène glycol (PEG) permet de réduire l'opsonisation (en raison d'interactions stériques entre ceux-ci et les opsonines) et donc entraîne une augmentation du temps de vie dans le sang des nanoparticules.^[54]

1.2.3 Ciblage des zones tumorales

Une tumeur est une masse de cellules supplémentaire dans un tissu donné. Dans certains cas les cellules peuvent envahir les tissus voisins ou passer dans le sang ou la lymphe pour atteindre des tissus plus lointains (c'est le phénomène de métastase). On parle alors de tumeur maligne. Par contre si ce n'est pas possible, on dit que la tumeur est bénigne. C'est un processus long et complexe résultant de l'accumulation progressive de mutations génétiques dans les cellules qui va rompre l'équilibre naturel existant entre la prolifération des cellules et leur mort (apoptose). Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une insensibilité à l'apoptose, une capacité de reproduction illimitée et une invasion des tissus voisins ou plus lointains entraînant alors le dysfonctionnement de ces derniers. Elles nécessitent généralement un grand apport en oxygène, on a alors une angiogenèse importante, c'est-à-dire la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà existants.^[57]

En exploitant les différences morphologiques entre les tissus sains et tumoraux, il est possible de détecter et de traiter les cancers.

1.2.3.1 Ciblage passif : effet EPR

Dans le cas d'un tissu sain, les petites molécules se propagent par diffusion à travers les petits interstices de la paroi endothéliale, le drainage lymphatique permet de replacer dans le sang les molécules présentes dans le milieu extracellulaire (voir **Figure 1-6**). Dans le cas des tumeurs, à cause de leur croissance rapide et désordonnée et de l'angiogenèse importante, les pores dans la paroi endothéliale sont plus grands et le volume interstitiel est plus important. De plus, le système de drainage lymphatique est défectueux dans l'environnement de la tumeur.^[2,58,59] Ainsi les nanoparticules peuvent entrer dans les tissus tumoraux et y rester, alors que ce ne sera pas le cas dans les tissus sains. C'est l'effet EPR : Enhanced Permeability and Retention, également appelé ciblage passif et mis en évidence dans les années 80 par Matsumura et Maeda.^[60] En modifiant la taille ou la forme des nanoparticules, on peut optimiser cet effet et l'accumulation des NPs dans les tumeurs. Ceci est extrêmement intéressant, car en accumulant les nanoparticules uniquement dans les tumeurs on va améliorer le diagnostic (diminution du bruit de fond par exemple) et améliorer les effets thérapeutiques (augmentation de l'efficacité et diminution des effets secondaires).

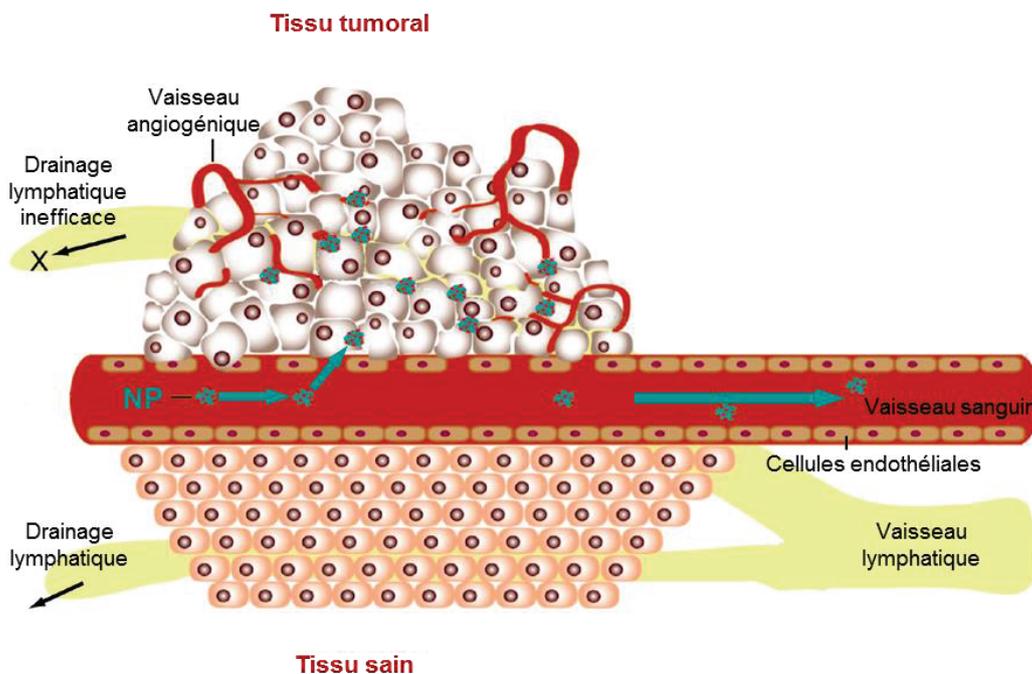


Figure 1-6 : Accumulation des nanoparticules dans les tumeurs par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).
Figure adaptée de Fox et al.^[58]

Cependant l'effet EPR présente certaines limites telles qu'une vascularisation tumorale irrégulière, un faible flux sanguin dans certaines tumeurs et une pression intratumorale élevée pouvant empêcher l'accumulation et/ou une distribution homogène des nanoparticules dans la tumeur. Cette pression est due (i) aux fluides interstitiels ; (ii) à une forte densité cellulaire à cause de la croissance tumorale ; (iii) à une matrice extracellulaire dense ; (iv) à un drainage lymphatique altéré.^[2,18,56,59]

1.2.3.2 Ciblage actif

Afin de compléter et renforcer le ciblage passif, on peut utiliser le ciblage actif, c'est-à-dire le greffage sur la nanostructure de ligands ciblant spécifiquement des marqueurs tumoraux. Ces ligands sont variés, ce peut être des anticorps, des fragments d'anticorps, des peptides ou de petites molécules organiques. Ces deux derniers ligands présentent des avantages par rapport aux anticorps comme leur petite taille, leur facilité de synthèse et leur coût plus faible.^[2,61] Le choix du ligand ciblant utilisé doit tout de même être réalisé avec soin car celui-ci peut éventuellement être reconnu par le système immunitaire entraînant alors l'élimination de la nanoparticule avant qu'elle n'ait atteint sa cible.^[62]

Il semblerait que le ciblage actif n'augmente pas l'accumulation dans les tumeurs mais qu'il permette aux nanoparticules de rester plus longtemps ou de se répartir de manière plus homogène dans la tumeur.^[2] Deux stratégies sont étudiées pour ce type de ciblage. Dans le premier cas, on cherche à cibler directement les cellules cancéreuses en visant les récepteurs surexprimés en surface. Dans le deuxième cas, on veut cibler les cellules endothéliales des néovaisseaux des tumeurs. Cela permet éventuellement d'inhiber l'angiogenèse, donc de limiter l'apport en dioxygène et en nutriments et de détruire les cellules tumorales.^[61] Cette deuxième stratégie présente des avantages par rapport à la première. Tout d'abord, les risques éventuels de résistance sont réduits grâce à la stabilité génétique des cellules endothéliales par rapport aux cellules tumorales. De plus, la plupart des récepteurs des cellules endothéliales sont exprimés quel que soit le type de tumeur, ce qui permet de traiter un grand nombre de cancers.

Grâce à la biodistribution originale des nanoparticules et au ciblage des tumeurs, il est possible d'employer les particules à base de Gd pour le diagnostic des cancers ou le suivi des traitements.

1.3 UTILISATION DES NPs A BASE DE GD EN IMAGERIE

1.3.1 Intérêt des NPs à base de Gd en IRM

La présence de gadolinium permet à ces nanoparticules d'être utilisées comme agent de contraste positif en IRM et de détecter les tumeurs comme présenté sur la **Figure 1-7**. La tumeur apparaît ainsi en blanc après injection intraveineuse de nanoparticules à base de Gd.

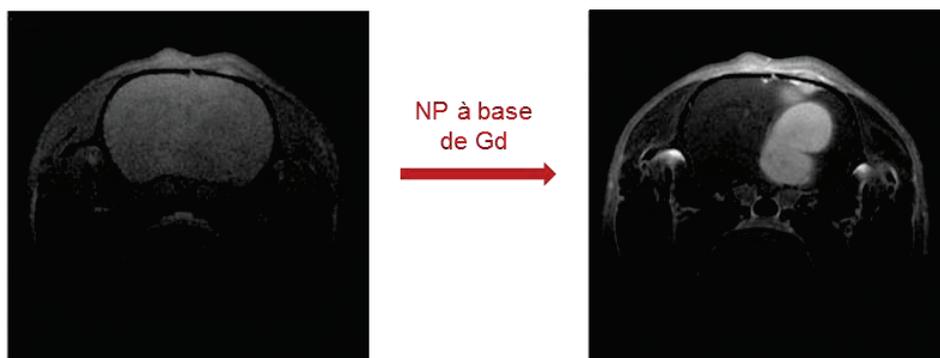


Figure 1-7 : Images IRM, pondérées en T_1 , de cerveaux de rats présentant des gliosarcomes 9L. Les images sont enregistrées avant et 17 minutes après l'injection intraveineuse d'un agent de contraste à base de gadolinium (nanoparticules AGuIX[®]). Grâce à celui-ci, la tumeur apparaît en blanc et est facilement détectée. Figure issue de Sancey et al.^[11]

Par rapport aux complexes de Gd utilisés en cliniques, les nanoparticules offrent plusieurs avantages. L'augmentation du signal par objet permet d'améliorer la sensibilité de la technique. Grâce à leur rapport surface/volume important, il est en effet possible de greffer un grand nombre d'agents de contraste sur un même objet augmentant ainsi le signal. De plus, on a vu précédemment (voir la **partie 1.2.1**) que la relaxivité par atome de gadolinium est augmentée avec les particules en raison d'une augmentation de la taille ou de la rigidité de la structure. On augmente donc le contraste, par rapport aux complexes libres.^[4,9,16] Un exemple est donné sur la **Figure 1-8**. Le greffage de complexes DTPA@Gd³⁺ en surface de nanoparticules de disulfure de molybdène est associé en effet à un contraste IRM plus important.^[63]

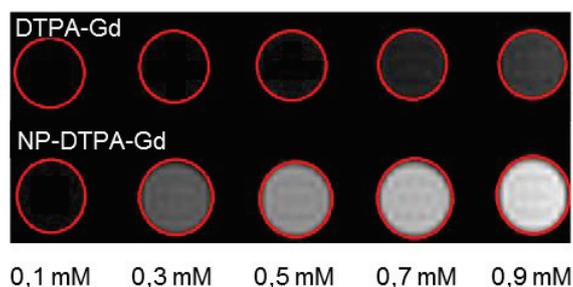


Figure 1-8 : Le greffage de complexes DTPA-Gd à la surface de nanoparticule de disulfure de molybdène permet d'avoir un meilleur contraste en IRM. Les images, pondérées T_1 , ont été acquises à 7 T (Bruker Biospec 70/30) pour des concentrations en ions Gd³⁺ variant de 0,1 à 0,9 mM. Figure adaptée de Anbazhagan et al.^[63]

De plus, les nanoparticules ont une plus grande taille que les composés moléculaires, ce qui limite leur diffusion en dehors des vaisseaux sanguins, et elles peuvent avoir un temps de circulation dans le sang plus long.^[9,64] Par exemple Zheng *et al.* ont montré que des liposomes encapsulant du Prohance[®] avaient un temps de demi-vie dans le sang de 18 heures chez des souris ce qui est supérieur au temps de demi-vie du complexe libre (7,6 min).^[65] Il est ainsi envisageable d'utiliser les NPs à base de Gd comme agents de

contraste intravasculaires et de réaliser des acquisitions d'images plus longues, diminuant alors le rapport signal/bruit.^[43,66]

On peut noter que d'autres types de nanoparticules ont été étudiés en tant qu'agents de contraste en IRM notamment les NPs d'oxyde de fer qui ont obtenues des autorisations pour une utilisation clinique (Feridex®, Sinerem®,...)^[67] Elles sont principalement utilisées dans la détection de ganglions lymphatiques métastatiques ou de lésions au foie. De manière générale, les NPs à base d'oxyde de fer semblent moins attractives que les NPs de Gd pour une utilisation en clinique. En effet, ce sont des agents de contraste négatifs, c'est-à-dire qu'ils assombrissent les zones où ils se situent. Ce contraste est plus difficile à percevoir qu'un éclaircissement comme dans le cas des agents à base de Gd et peut être du à d'autres paramètres tels que des dépôts de calcium, des saignements ou la présence d'autres métaux.^[68]

1.3.2 Multimodalité

Plusieurs techniques d'imagerie sont disponibles pour les chercheurs ou les cliniciens comme présenté dans le **Tableau 1-3** : (i) l'IRM ; (ii) la scintigraphie réunissant la tomographie par émission de positons (PET en anglais, *Positron Emission Tomography*) et la tomographie par émission monophotonique (SPECT en anglais, *Single Photon Emission Computed Tomography*) ; (iii) l'imagerie optique ; (iv) l'échographie ; (v) la tomodensitométrie (CT en anglais, *Computed Tomography*). Toutes présentent des avantages et des inconvénients. Ainsi l'IRM est très intéressante en raison de sa grande résolution mais elle est peu sensible contrairement à la scintigraphie ou à l'imagerie optique.^[69-72]

Tableau 1-3 : Présentation des différentes techniques d'imagerie. La sensibilité est indiquée en mol.L⁻¹ d'agent d'imagerie. ^[69-72]

Technique	Détection	Sensibilité	Résolution	Profondeur	-	+
IRM	RMN 1H	10 ⁻³ -10 ⁻⁹	10-100 µm	Pas de limite	Contraste	Résolution spatiale
Scintigraphie (PET et SPECT)	Photons γ	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻¹⁵	0,5-5 mm	Pas de limite	Irradiation, Résolution spatiale	Sensibilité, Quantification
Imagerie optique	Lumière visible ou proche infrarouge	10 ⁻⁹ -10 ⁻¹²	1-2 mm	cm	Limité en profondeur	Résolution temporelle
Echographie	Ondes ultrasonores	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁸	50-500 µm	cm	Contraste	Résolution temporelle
Tomodensimétrie (CT)	Rayons X	10 ⁻³ 10 ⁻⁶	50 µm	Pas de limite	Contraste, Irradiation	Résolution spatiale

Beaucoup de diagnostics sont établis après l'utilisation de plusieurs techniques d'imagerie. Pour avoir une meilleure corrélation spatiale et temporelle entre les images, des appareils combinant différentes modalités d'imagerie sont ainsi développés. Par exemple en 2001, un instrument rassemblant PET et CT est arrivé sur le marché. D'autres appareils combinant SPECT/CT, PET/IRM ou PET/ultrasons ont aussi été développés. Ils permettent d'obtenir simultanément des informations fonctionnelles et anatomiques et facilitent le diagnostic.^[73,74]

En parallèle de ces appareils, un effort est fourni pour développer des agents multimodaux combinant les avantages respectifs de chaque modalité d'imagerie. Les nanoparticules sont très intéressantes dans cette optique. Pour développer des particules multimodales, deux stratégies peuvent être envisagées : (i) utiliser une propriété intrinsèque de la nanoparticule pour une modalité d'imagerie donnée et ensuite greffer un agent d'un autre type imagerie ; (ii) greffer sur une matrice inerte différents agents d'imagerie ou de contraste. Dans tous les cas, un soin particulier doit être apporté concernant le ratio des différents agents d'imagerie ou de contraste au vue des sensibilités de chaque technique afin d'avoir des informations exploitables. De plus, il faut veiller à ce que les propriétés pharmacocinétiques des nanoparticules (biodistribution, élimination, ciblage de tumeurs,...) restent adaptées malgré l'ajout de constituants qui peut conduire à une augmentation de la taille des structures.

Nous avons déjà vu que les nanoparticules à base de gadolinium pouvaient être utilisées en IRM. L'ajout d'agents pour l'imagerie optique ou la scintigraphie sur ces particules pourrait constituer des combinaisons intéressantes. Des Quantum Dots ont ainsi été fonctionnalisés par des complexes de Gd^{3+} et utilisés en imagerie cellulaire.^[75] Dans ce cas, les propriétés intrinsèques des Quantum Dots, un cœur fluorescent, sont utilisées pour l'imagerie optique. Pour d'autres nanoparticules, ne présentant pas de fluorescence intrinsèque, il est possible d'accéder à cette modalité d'imagerie en ajoutant des fluorophores organiques en surface. C'est la stratégie qui a été suivie durant cette thèse (voir **Annexe A.3.**). La combinaison IRM/imagerie optique trouverait aussi sa place dans l'aide à la chirurgie. Dans un premier temps, l'IRM permettrait de détecter et délimiter la tumeur et donc de préparer l'opération tandis que la fluorescence pourrait être utilisée pendant la chirurgie pour confirmer l'ablation totale des tissus tumoraux et éviter les récurrences.

La réunion de la scintigraphie et de l'IRM serait quant à elle intéressante afin d'allier au sein d'une même plateforme quantitatité (apportée par la scintigraphie) et résolution (apportée par l'IRM). Cet intérêt est souligné à la fois par un nombre croissant de références bibliographiques mais aussi par la commercialisation d'appareils dédiés. Un travail important doit cependant encore être fourni concernant la mise au point de protocoles standardisés^[76] ou encore le développement d'agents bimodaux adaptés. Cet aspect a justement été étudié au cours de la thèse et sera présenté dans le **chapitre 3**.

Après avoir présenté quelques exemples et les intérêts des NPs à base de Gd pour l'imagerie, nous allons maintenant nous focaliser sur leur utilisation en thérapie.

1.4 UTILISATION DES NPs A BASE DE GD EN THERAPIE, VERS LE THERANOSTIC

1.4.1 Effet thérapeutique dû au Gd

Il a été montré que certains agents moléculaires à base de Gd présentaient des propriétés thérapeutiques en combinaison avec une irradiation. Une meilleure biodistribution du Gd, notamment une plus grande accumulation dans les tumeurs, permettrait d'améliorer ces propriétés. Dans ce contexte, l'irradiation de nanoparticules à base de Gd a aussi été étudiée.

Bridot *et al.* ont développé une nanoparticule pour améliorer l'irradiation par des neutrons.^[77] Elle est constituée d'un cœur d'oxyde de Gd encapsulé dans une couche de polysiloxane. Afin d'améliorer la biodistribution de ces particules, des chaînes PEG ont été ajoutées en surface. L'efficacité de ces particules comme agent radiosensibilisant a ensuite été étudiée *in vitro* avec des cellules de lymphomes (EL4) bioluminescentes (transfection du gène codant pour la luciférase). Aucune modification de l'activité métabolique des cellules n'est observée après incubation avec des particules jusqu'à une concentration d'au moins 0,30 mM (concentration exprimée en Gd). De même, après une irradiation, sans nanoparticule, aucun effet n'est observé jusqu'à des doses de 3 gray (un gray, Gy, correspond à 1 joule absorbé par kilogramme de tissu). Cependant, une irradiation de 3 Gy en présence de particules conduit à une altération drastique de la prolifération des cellules comme le montre la **Figure 1-9**. Celle-ci représente l'évolution dans le temps de la bioluminescence de cultures cellulaires après incubation avec différentes concentrations de NPs et irradiation. Dès une concentration de 0,01 mM, la bioluminescence croît plus doucement, on a donc une prolifération cellulaire plus faible. A partir de 0,05 mM, la bioluminescence tend vers une valeur nulle, les cellules meurent. Ainsi, ces NPs sont capables d'augmenter l'efficacité de l'irradiation et permettraient d'améliorer le traitement des cancers.

Comme on l'a énoncé précédemment, d'autres types d'irradiation peuvent être utilisés en thérapie. Mon laboratoire d'accueil a développé une nanoparticule appelée AGuIX® (pour *Activation et Guidage de l'Irradiation X*) qui permet d'augmenter l'efficacité d'une irradiation par des hadrons^[78] ou des rayons X.^[19,79] Cette nanoparticule et ses propriétés d'agent radiosensibilisant seront présentées plus en détail dans la partie suivante de ce chapitre et dans le **chapitre 2**.

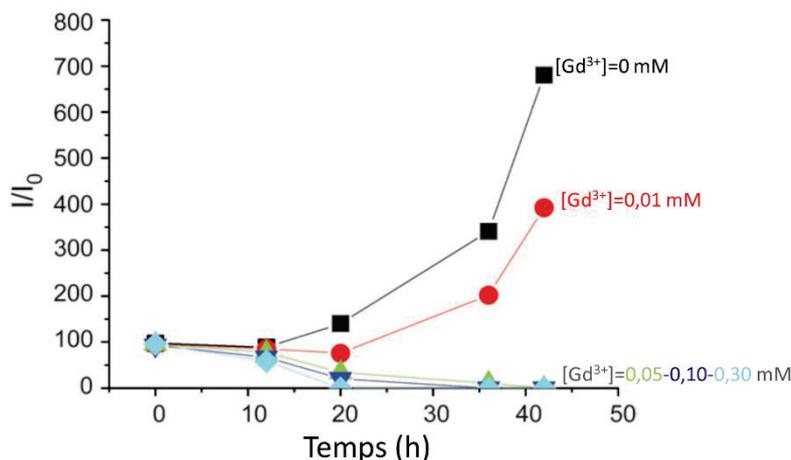


Figure 1-9 : Après incubation de cellules luminescentes (EL4-Luc) avec différentes concentrations en nanoparticules et irradiation (3 Gy), l'évolution temporelle de la bioluminescence des cultures cellulaires a été suivie. On constate un fort effet radiosensibilisant des nanoparticules d'oxyde de gadolinium qui permettent la mort des cellules dès 0,05 mM. Figure adaptée de Bridot et al.^[77]

1.4.2 Vers le théranostic

De même qu'on peut combiner sur une même nanoplateforme plusieurs modalités d'imagerie, on peut utiliser ces objets à la fois pour le diagnostic et la thérapie des cancers. C'est ce qu'on appelle le théranostic. Par exemple, Hu *et al.* ont développé des nanotubes de silice pouvant contenir un agent anticancéreux, la doxorubicine, et portant des complexes DOTA@Gd³⁺ ($r_1 = 33 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ à 3 T).^[80] Les complexes de Gd³⁺ permettraient de suivre *in vivo* la biodistribution de ces nanostructures, de vérifier leur accumulation dans les tumeurs et donc la délivrance du médicament dans les zones malades.

Le théranostic est une propriété très intéressante dans l'optique d'une médecine personnalisée. En effet, il existe une grande hétérogénéité des tumeurs entre les patients mais aussi au sein d'une même tumeur (développement de la maladie, accumulation des NPs au sein des tumeurs, efficacité des traitements,...). L'idée serait de n'utiliser qu'un seul nano-objet pour la détection et la délimitation des tumeurs, la sélection des patients, l'optimisation du traitement et son suivi. Cette stratégie permettrait de limiter les coûts ainsi que les effets secondaires de traitements inopérants pour certains patients.^[19,20]

Miladi *et al.*, ont ainsi développé des nanoparticules d'or portant en surface des chélates DTPA@Gd³⁺ et ont évalué l'intérêt de telles structures *in vivo* sur des rats portant des tumeurs du système nerveux central (gliosarcome 9L) dans l'hémisphère droit de leur cerveau.^[81] Grâce aux chélates de Gd³⁺, les particules peuvent être utilisées comme agents de contraste en IRM et, grâce à l'or, elles présentent aussi un effet radiosensibilisant. Leur accumulation dans la tumeur peut être suivie par IRM. Les images permettent de délimiter la tumeur et donc la zone cible de l'irradiation. Elles permettent aussi de déterminer le moment optimal pour irradier les tumeurs, il correspond à celui où les dommages causés aux tumeurs seront élevés mais où l'on épargnera les tissus sains. Lors de cette étude, il a été déterminé à 5 min après l'injection intraveineuse des nanoparticules d'or. L'utilisation conjointe de la radiothérapie et des particules permet une augmentation de la durée de vie des animaux de 473 % par rapport à des animaux non traités et de

78 % par rapport à des animaux uniquement traités par irradiation. Ceci illustre l'intérêt de ces particules, et de manière plus générale de ces stratégies théranostiques, pour le traitement des cancers.

1.4.3 Vers un passage en clinique des NPs pour l'oncologie

Malgré de nombreuses recherches et articles publiés, très peu de nanoparticules sont actuellement utilisées en clinique, seulement une dizaine en oncologie et aucune à base de Gd. On retrouve essentiellement des liposomes et des nanoparticules polymériques. Concernant les nanoparticules inorganiques, seules certaines à base d'oxyde de fer ont obtenu des autorisations de mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis. Nous avons déjà mentionné l'application de ces NPs pour l'IRM (Ferridex®, Sinerem®,...), même si des retraits du marché ont ensuite été observés en raison de compétitions avec d'autres agents moléculaires.^[67,82] Une solution colloïdale de NPs d'oxyde de fer, NanoTherm® de MagForce, a reçu une certification européenne (CE) pour le traitement des glioblastomes (cancer du cerveau), voir **Figure 1-10**. Après injection intratumorale de ces nanoparticules, l'application d'un champ magnétique oscillant permet d'augmenter la température et de détruire les cellules cancéreuses environnantes (hyperthermie). Elles sont actuellement en cours d'essais cliniques pour d'autres types de cancer (prostate et pancréas).^[6]



Figure 1-10 : Structure des nanoparticules NanoTherm®. Image adaptée de de www.magforce.de.

Les raisons faisant qu'il y a peu de NPs en clinique sont multiples. Elles sont liées au fait que la nanomédecine est un domaine relativement nouveau, interdisciplinaire et impliquant des structures hybrides multimodales complexes avec des applications originales (diagnostic, thérapie).^[6,7,82,83]

- Tout d'abord, un manque existe concernant les techniques liées aux nanoparticules que ce soit pour leur synthèse à grande échelle, leur caractérisation ou l'étude de leurs propriétés biologiques. Il serait ainsi nécessaire de développer des protocoles standardisés *in vitro* et *in vivo* adaptés aux NPs pour évaluer leur efficacité par rapport aux méthodes cliniques « classiques » et leur toxicité.^[6,82] Nous manquons d'ailleurs encore de recul quant à la toxicité des particules qui doit être évaluée à la fois sur

le court et le long terme.^[6,82,83] Ces études sont complexes car elles dépendent de nombreux paramètres tels que les matériaux utilisés, les sous-produits résultants de la dégradation des particules dans l'organisme, la stabilité de la suspension colloïdale en milieu physiologique, etc.

- Un autre frein au passage des nanoparticules en clinique est lié aux autorités régulatrices. Il leur est en effet difficile de réglementer ces nouvelles nanotechnologies alors même que tous les mécanismes biologiques liés aux NPs ne sont pas encore élucidés et que les paramètres clés à contrôler pour un passage en clinique ne sont pas définis. La grande variété de structures ou compositions des NPs rend cette tâche d'autant plus difficile. Chaque agence a ainsi ses propres recommandations et experts et peut ne pas arriver aux mêmes conclusions que les autres (concernant la poursuite des essais cliniques ou les domaines d'application par exemple).
- Finalement, il est nécessaire de convaincre les investisseurs de l'apport des NPs en oncologie par rapport aux méthodes cliniques déjà utilisées. Pour les NPs à base de Gd, il semble difficile de convaincre avec uniquement des propriétés en IRM puisque il y a un faible intérêt des industriels pour le développement de nouveaux agents de contraste alors que le coût engendré serait élevé.^[83] De plus, une barrière supplémentaire est apparue avec la toxicité liée au Gd³⁺ libre et la mise en lumière des cas de NFS chez des insuffisants rénaux.^[14] Le rapport bénéfice sur risque pour une application en imagerie seule pourrait donc paraître trop faible pour des investisseurs et le développement de nanoparticules à base de Gd gagnerait à se diriger vers des applications en théranostic.

Malgré ces freins, de plus en plus de nanoparticules reçoivent l'accord pour passer en essai clinique, et pas uniquement des NPs polymériques ou des liposomes. On constate en effet une augmentation du nombre de micelles, de NPs à base de protéine, ou de NPs inorganiques.^[82] Ceci apporte un grand espoir concernant l'utilisation des nanoparticules en médecine. Concernant les nanoparticules inorganiques ou hybrides en oncologie, des essais cliniques sont rapportés pour des nanoparticules d'oxyde de fer (Feraheme®, imagerie des ganglions lymphatiques et des cancers de la tête et du cou), de silice (C Dots®, aide à la chirurgie des ganglions lymphatiques), d'or (Aurimmune®, destruction du système vasculaire des tumeurs pour une meilleure délivrance de médicaments), de silice encapsulée dans une couche d'or (Auroshell®, hyperthermie) ou encore d'oxyde d'hafnium (NBTXR3®, amélioration de la radiothérapie). En 2016, les nanoparticules AGuIX® à base de Gd, développées par mon laboratoire d'accueil, ont reçu l'accord de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) pour démarrer un essai clinique de phase I utilisant ces nanoparticules en combinaison de la radiothérapie pour le traitement des métastases cérébrales. Dans la partie suivante, nous allons présenter plus en détails ces particules et leurs propriétés.^[6,83]

1.5 LA NANOPATEFORME AGuIX®

La nanoplateforme AGuIX® est une nanoparticule hybride à base de polysiloxane et de gadolinium. Développée depuis une dizaine d'année, d'abord à l'Université Claude Bernard puis par la startup NhTherAguix, elle peut être utilisée à la fois comme agent de contraste positif en IRM et comme agent radiosensibilisant. Après avoir présenté la synthèse et les principales caractéristiques physico-chimiques de cette nanoplateforme, nous allons faire un tour d'horizon de ces propriétés biologiques et de son utilisation en IRM et en radiothérapie.

1.5.1 Synthèse et structure

La synthèse des particules AGuIX® comporte des étapes de type « bottom-up » (voie montante) puis « top-down » (voie descendante) et est détaillée sur la **Figure 1-11**.^[51,84]

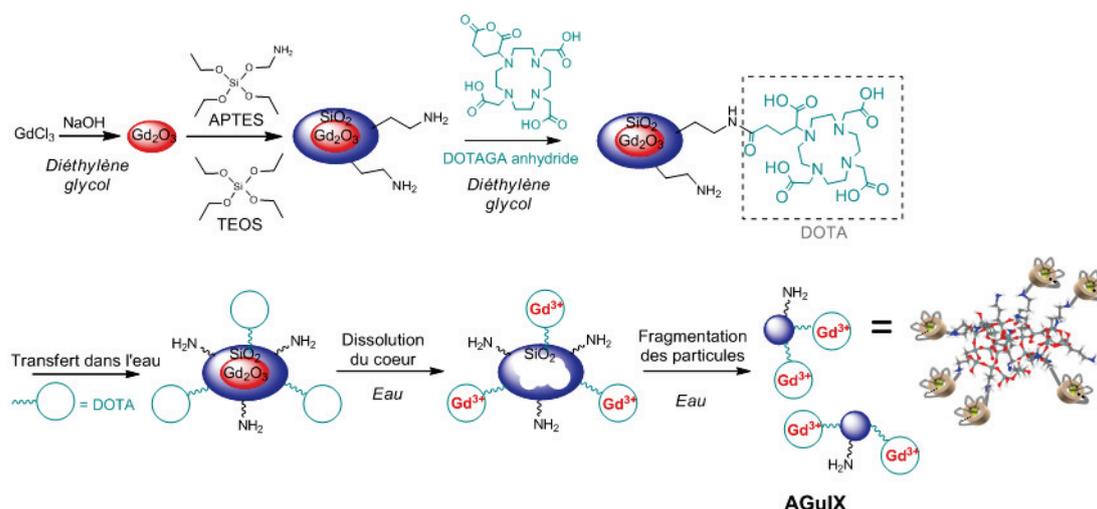


Figure 1-11 : Synthèse des nanoparticules AGuIX®. Figure adaptée de Anna Mignot et al.^[51] et Le Duc et al.^[84]

- Après avoir synthétisé un cœur d'oxyde de gadolinium, on l'encapsule dans une couche de polysiloxane. Celle-ci est obtenue par hydrolyse-condensation de tétraéthoxysilane (TEOS) et de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). Le TEOS a été choisi pour réticuler et densifier le réseau polysiloxane et l'APTES a été choisi en raison des groupements amines qu'il introduit en surface de la particule et qui vont être utiles pour des greffages ultérieurs.^[51,85,86]
- La troisième étape consiste en le greffage de DOTAGA (acide 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triyl)triacétique) à la surface par formation d'une liaison amide. Ce dernier a été préféré au DOTA classique (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) car il permet l'accès à cinq acide carboxyliques au lieu de quatre, après greffage il reste donc huit sites de coordination libres pour la chélation de l'ion Gd³⁺.^[51] Ce ligand macrocyclique

possède une très grande constante de complexation pour l'ion Gd^{3+} ($\log K = 25,6$) et une cinétique de dissociation lente.^[14] Il permettra donc d'éviter toute libération d'ions Gd^{3+} dans l'organisme après injection des particules, ce qui induirait un effet toxique. Enfin, ces groupements vont augmenter l'hydrosolubilité et la stabilité colloïdale des nanoparticules.

- Finalement, les nanoparticules sont transférées dans l'eau, on observe alors la dissolution du cœur d'oxyde de gadolinium à cause de la présence des chélatants. Ceci entraîne la fragmentation de la couche de polysiloxane, donnant naissance à des nanoparticules ultrafines : les nanoparticules AGuIX®.^[51] Après leur synthèse et purification, les nanoparticules AGuIX® sont stockées à température ambiante sous forme de poudre lyophilisée et sont stables pendant plus d'un an (voir **Annexe A.2**).

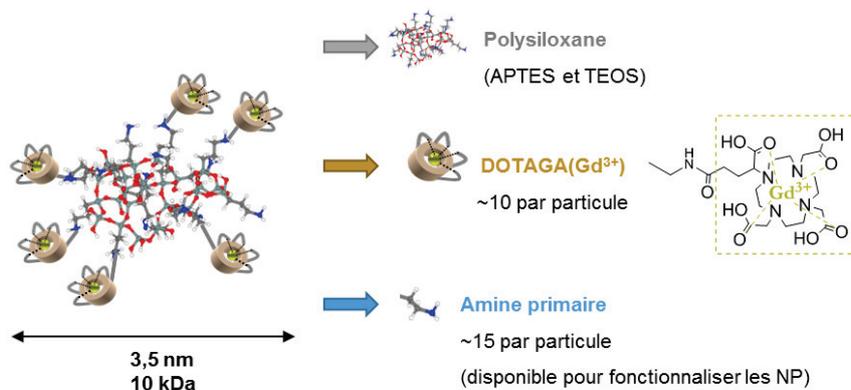


Figure 1-12 : Représentation schématique des nanoparticules AGuIX®.

Comme représenté sur la **Figure 1-12**, les particules AGuIX® sont composées d'un squelette de polysiloxane entouré par une dizaine de ligands DOTAGA. 98-99 % de ces ligands complexent des ions Gd^{3+} . Les particules présentent aussi une quinzaine de fonctions amines primaires en surface pouvant être utilisées pour des fonctionnalisations ultérieures. D'autre part, ces particules présentent un diamètre hydrodynamique moyen d'environ $3,5 \pm 1,0$ nm, laissant présager une élimination rénale, et une masse d'environ 10 kDa.^[51,87,88] Plus de détails concernant les conditions de caractérisation sont donnés en **Annexe A.1** et dans les chapitres suivants.

Les particules sont maintenant produites à grande échelle de manière reproductible au sein du laboratoire (~ 50 g de particules par synthèse correspondant à ~ 50 mmol de Gd^{3+}). Un lot a aussi été produit dans des conditions de bonnes pratiques de fabrication (GMP, *Good Manufacturing Practices*) en partenariat avec la société Carbogen AMCIS (600 g) pour toutes les manipulations liées à l'essai clinique. Durant la thèse, différents lots de synthèse ont pu être utilisés ; dans tout le manuscrit les caractérisations indiquées correspondront donc au lot utilisé pour l'expérience décrite.

1.5.2 Biocompatibilité et biodistribution

1.5.2.1 Biocompatibilité

Le squelette des nanoparticules AGuIX[®] est composé de polysiloxane ce qui leur confère une bonne biocompatibilité. De plus, leur dégradation conduit à des sous-produits non toxiques. En effet, ce sont de petits fragments (APTES-DOTAGA@Gd³⁺, TEOS-APTES-DOTAGA@Gd³⁺,...) résultant de l'hydrolyse progressive du cœur de polysiloxane dans l'eau.^[89] On peut noter que ces particules sont stabilisées en solution acide ou concentrée ce qui permet de les conserver pendant plusieurs mois dans l'eau sans modifications de leurs propriétés physico-chimiques (voir **Annexe A.2**). D'autre part, le choix des ligands DOTAGA pour la complexation du gadolinium permet de minimiser les risques de décomplexation ou de transmétallation après injection dans l'organisme (voir l'**Annexe A.2** pour une présentation des techniques de quantification des ions Gd³⁺ libres).

De nombreuses études ont été réalisées que ce soit sur des souris, des rats ou des singes (macaques de Buffon). Certaines études ont utilisé des animaux sains, d'autres des animaux porteurs de tumeurs orthotopiques (situées à leur emplacement anatomique habituel) ou hétérotopiques.^[9,11,19] Aucun signe de toxicité n'a été observé même pour des concentrations en gadolinium supérieures à celles utilisées en clinique pour des agents à base de Gd. Par exemple, des injections intraveineuses répétées de particules à des singes (12 injections en 6 semaines) et pour des concentrations variant de 100 à 500 mg.kg⁻¹ n'ont pas révélé d'effets secondaires.^[11]

1.5.2.2 Biodistribution

Les nanoparticules peuvent être injectées par voie intraveineuse ou par les voies aériennes et sont ensuite éliminées par voie rénale comme le laissait présager leur petite taille.^[9,11,19] La **Figure 1-13** présente une étude de biodistribution réalisée en imagerie optique sur des souris saines après injection intraveineuse de nanoparticules AGuIX[®].^[87] Dans ce cas, un fluorophore, la Cyanine 5.5, a été ajouté aux particules pour pouvoir les détecter. Les images montrent qu'elles ne sont présentes que dans les reins (K) et l'urine (U), le signal dans l'estomac (S) provenant de l'alimentation des souris. D'autres études *ex vivo* ou *in vivo* ont montré que l'accumulation des particules AGuIX[®] dans les autres organes (foie, cerveau, cœur,...) était très faible.^[11] D'autre part, les particules AGuIX[®] présentent un temps de vie dans le sang plus long que des composés moléculaires ($\tau_{1/2} \sim 0,3$ et 2,2 h pour les souris et les singes respectivement).^[79,84,88]

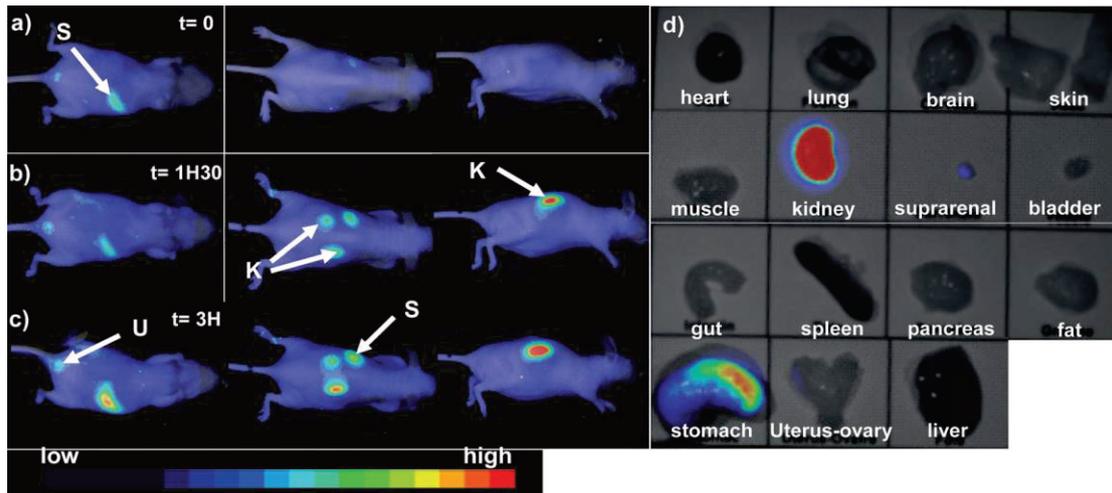


Figure 1-13 : Suivi de la biodistribution des nanoparticules AGuIX® par imagerie optique après injection intraveineuse à des souris nude montrant leur accumulation dans les reins et la vessie uniquement. Les images sont enregistrées (a) avant, (b) 1 h 30 et (c) 3 h après administration ($[Gd^{3+}] = 10 \text{ mM}$) de particules portant un fluorophore, la Cyanine5.5. S : estomac, K : reins et U : urine. (d) Fluorescence de certains organes après dissection des souris 24 h après injection. La fluorescence détectée dans l'estomac provient de l'alimentation de des animaux. Figure issue de Lux et al.^[87]

Plus récemment, une étude a été réalisée pour étudier plus précisément l'élimination et l'impact sur les reins des nanoparticules après une injection intraveineuse sur des souris saines, elle est présentée en détail dans l'**Annexe A.3**.^[88] Pour cette étude, j'ai fonctionnalisé les NPs AGuIX® en ajoutant à leur surface des fluorophores permettant d'étudier la biodistribution par microscopie intravital à deux photons. Pour obtenir des informations complémentaires, d'autres techniques ont été utilisées telles que la spectroscopie sur plasma induite par laser, la spectrométrie à plasma induit et émission optique, la microscopie électronique à transmission, la spectrométrie de masse par électrospray et l'histologie.

Les résultats ont montré une accumulation rapide dans les reins dès les 5 premières minutes après injection intraveineuse, la plus grande accumulation ayant lieu 4 h après. Le mécanisme d'élimination se fait en deux temps. Tout d'abord on assiste à une élimination rapide des plus petites nanoparticules ainsi que de leurs produits de dégradation (fragments). Au bout de quelques minutes, des nanoparticules entières et de tailles plus importantes sont alors éliminées. Seule 0,5 % de la dose de particules injectée demeure dans les reins 4 semaines après administration, ce qui souligne l'efficacité de l'élimination. Finalement, des analyses ont montré que l'impact de multiples injections sur la fonction rénale et la microstructure des reins reste faible et temporaire. Ceci illustre bien la grande biocompatibilité des particules et est très prometteur dans le cadre d'un passage en clinique.

Pour finir, de nombreuses études ont été réalisées sur des animaux porteurs de tumeurs et ont permis de mettre en évidence une accumulation dans les tumeurs par effet EPR quel que soit le mode d'administration (aérosol ou injection). Un exemple est donné avec la **Figure 1-15** que nous allons présenter dans le paragraphe suivant.

1.5.3 Utilisation en radiothérapie guidée par IRM

1.5.3.1 Un excellent agent de contraste en IRM

La présence de gadolinium permet aux nanoparticules d'être utilisées comme agents de contraste positifs en IRM. Ainsi à 60 MHz et 37°C, la relaxivité longitudinale est de $12,5 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ (par gadolinium) et le ratio r_2/r_1 de 1,4. De plus, cette valeur est 2 à 3 fois plus élevée que celle de composés moléculaires comme le montrent les mesures de Relaxation de Résonance Magnétique Nucléaire de la **Figure 1-14**.^[51] Les nanoparticules AGuIX® permettent ainsi d'obtenir un meilleur contraste en IRM par rapport aux agents de contraste moléculaires « classiques » (Dotarem®, Magnévist®,...).

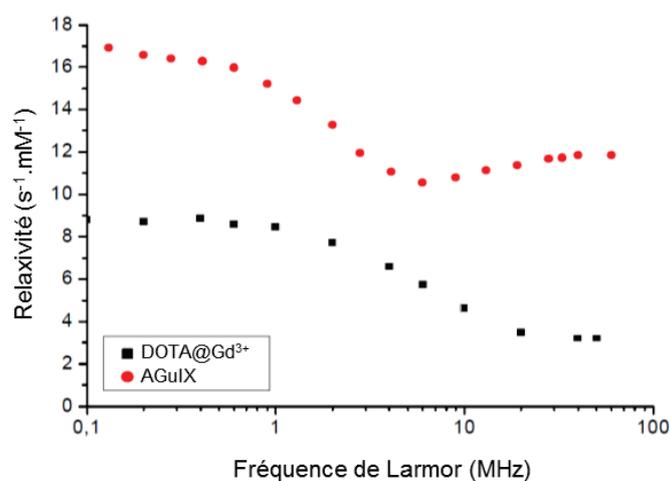


Figure 1-14 : Mesures de Relaxation de Résonance Magnétique Nucléaire montrant une plus grande relaxivité pour les particules AGuIX que pour les chélates DOTA@Gd³⁺. Figure issue de Mignot et al. ^[51]

La **Figure 1-15** représente les images IRM réalisées après injection d'AGuIX® à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées au niveau du flan (cancer du pancréas). En s'accumulant dans la tumeur (et les reins), les nanoparticules entraînent l'apparition d'une zone plus blanche. Elles facilitent donc bien la détection et la délimitation des tumeurs.

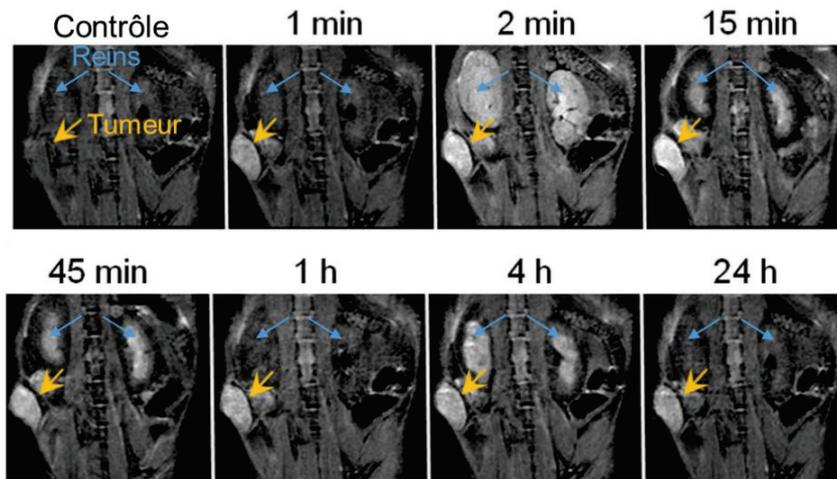


Figure 1-15 : Images IRM pondérées T_1 (7 T, Bruker BioSpec, US) de souris porteuses de tumeurs capan-1-pancréatiques. La flèche jaune indique la tumeur, les flèches bleues indiquent les reins. Les images sont enregistrées avant injection intraveineuse de nanoparticules AGuIX® (0,25 mg/g) et jusqu'à 24 h après. L'apparition d'une zone plus blanche indique une accumulation dans la tumeur rapide, dès 1 min-post injection, suivie d'une accumulation croissante jusqu'à 15 minutes. Au-delà, la quantité de nanoparticules dans la tumeur diminue. Figure adaptée de Detappe et al.^[79]

1.5.3.2 Un effet radiosensibilisant

Comme souligné dans les parties précédentes, la présence de gadolinium permet d'utiliser les particules AGuIX® comme agent radiosensibilisant en radiothérapie, et ce même dans des conditions cliniques.^[9,11,19,79] L'étude présentée dans le paragraphe précédent (**Figure 1-15**) avec les souris porteuses de tumeurs pancréatiques, a été poussée plus loin en étudiant l'influence des particules sur la radiothérapie. La **Figure 1-16** présente les courbes de survie pour des animaux non traités (marron), recevant des AGuIX® (bleu), recevant une irradiation seule (vert) ou recevant une irradiation 15 minutes après injection intraveineuse des nanoparticules (rouge). Le moment de l'irradiation correspond à celui pour lequel l'accumulation des nanoparticules est maximale dans les tumeurs. On constate bien que les AGuIX® possèdent un fort pouvoir radiosensibilisant et permettaient d'augmenter significativement la survie des animaux par rapport à une irradiation seule. L'effet radiosensibilisant sera présenté plus en détails dans le **chapitre 2** de ce manuscrit.

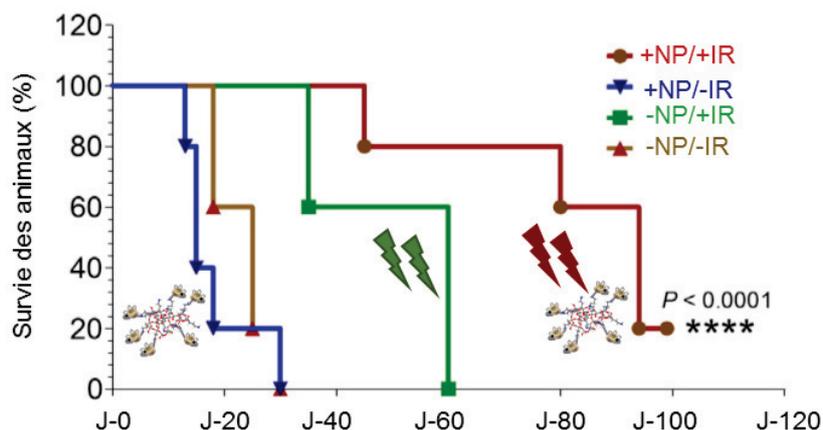


Figure 1-16 : Courbes de survie de Kaplan-Meier obtenues pour des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées (cancer du pancréas) et montrant l'efficacité d'un traitement combiné AGuIX®-irradiation. Chaque groupe comporte 5 animaux. L'irradiation est réalisée dans des conditions cliniques (6 MV) et une dose de 10 Gy est déposée. La quantité de nanoparticules AGuIX® injectée est de 0,25 mg/g. Dans le cas où l'irradiation a lieu en présence de particules, elle est réalisée 15 min post-injection. Figure adaptée de Detappe et al.^[79]

1.5.3.3 Essai clinique

En 2016, les nanoparticules AGuIX® ont reçu l'accord de l'ANSM pour un essai clinique de phase I concernant le traitement de métastases cérébrales par radiothérapie en association avec ces nanoparticules. Cet essai est référencé sur le site [clinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) sous le numéro NCT02820454. Son principe est représenté sur la **Figure 1-17**. Après injection intraveineuse (1), les nanoparticules s'accumulent dans les tumeurs par effet EPR (2) et permettent de mieux détecter et délimiter les métastases par IRM (3). L'effet radiosensibilisant des NPs permettrait d'améliorer le traitement et de détruire les métastases (4 et 5). Les NPs sont ensuite éliminées complètement par voie rénale (6).

Les études de phases I sont actuellement en cours au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. Dans un premier temps, le but est d'évaluer les propriétés pharmacocinétiques des particules et de vérifier qu'elles sont bien tolérées par les patients. Pour le moment, onze patients ont reçu une injection intraveineuse de particules et aucun effet secondaire n'a été détecté.

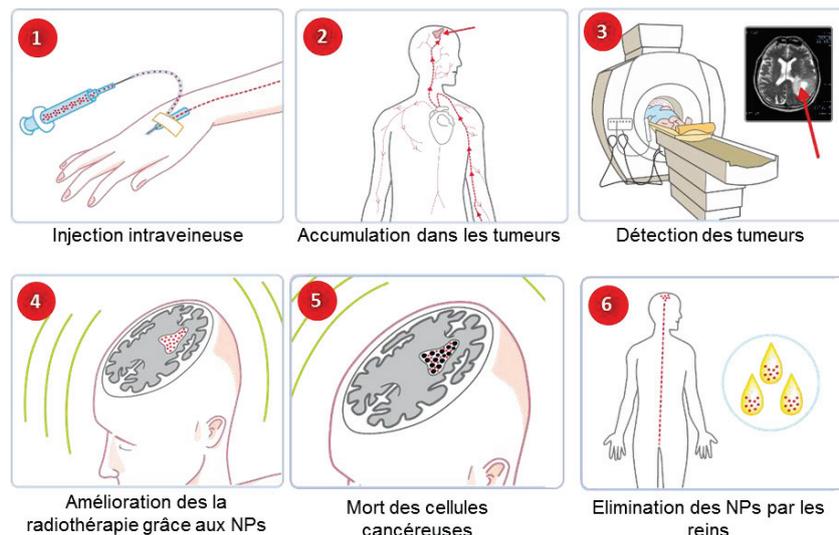


Figure 1-17 : Utilisation des nanoparticules AGuIX® pour la radiothérapie guidée par IRM. Figures provenant de www.nano-h.com.

1.6 OBJECTIFS DE THESE

Le but de cette thèse est de développer une deuxième génération de particules AGuIX® afin de permettre des diagnostics encore plus précis ou des thérapies encore plus performantes en oncologie. Pour cela on a cherché d'une part à améliorer une propriété déjà existante de cette nanoplatforme, l'effet radiosensibilisant, et d'autre part à y ajouter de nouvelles fonctionnalités en se dirigeant à chaque fois vers des techniques déjà utilisées en clinique, la scintigraphie et la photothérapie dynamique (voir **Figure 1-18**).

Plusieurs projets ont donc été menés en parallèle et sont présentés dans les différents chapitres de ce manuscrit. Dans tous les cas, un travail important a été réalisé pour fonctionnaliser la surface des particules et caractériser le plus finement possible les nano-objets obtenus. De nombreuses collaborations, en France ou à l'international, ont ensuite été mises en place pour évaluer les effets biologiques et l'intérêt de ces objets pour le diagnostic et le traitement des cancers.

Ce manuscrit se compose de trois chapitres traitant des résultats obtenus au cours de la thèse. A la fin de chacun, les expériences *in vitro* et *in vivo* sont présentées brièvement et les publications issues de ces résultats sont insérées pour plus de détails.

- **Chapitre 2** : Le premier projet consiste à améliorer l'effet radiosensibilisant des particules, c'est-à-dire leur capacité à améliorer la radiothérapie. Pour cela nous avons ajouté des complexes de bismuth (DOTA@Bi³⁺) à la surface des particules. Après une caractérisation complète, leur efficacité comme agent radiosensibilisant a été évaluée *in vitro* et *in vivo* à Harvard aux Etats-Unis pour un modèle de cancer du poumon.

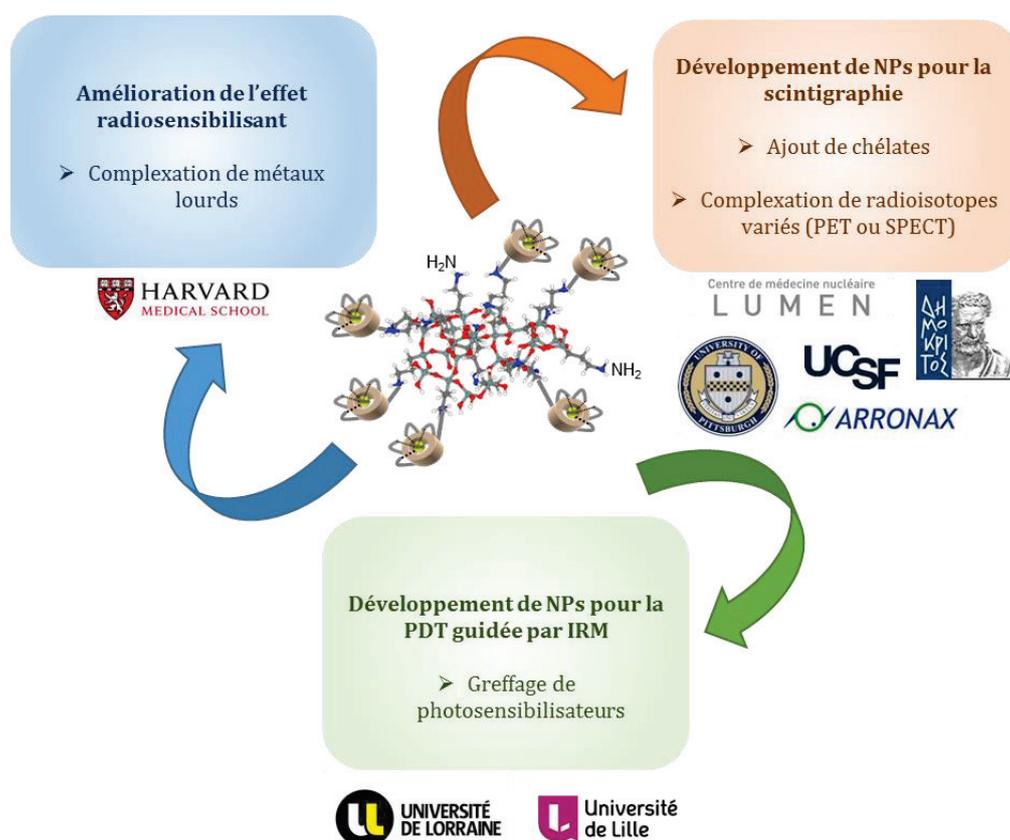


Figure 1-18 : Développement d'une deuxième génération de particules AGuIX®.

- Chapitre 3 :** Un deuxième volet de mes projets a consisté à améliorer la détection des particules. On a vu en effet que l'IRM était une technique d'imagerie peu sensible contrairement à la scintigraphie. Nous avons donc développé et caractérisé une série de nanoplateformes de type AGuIX® présentant à leur surface différents ligands (DOTA, NODA, DFO). Cette série nous permet de complexer des isotopes radioactifs variés (^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{111}In , ^{67}Ga ,...) selon leur disponibilité, leur coût ou les applications visées. L'ajout des radioisotopes et les études *in vivo* ont été réalisés grâce aux collaborations développées en France (Nantes, Lyon) ou à l'étranger (Athènes en Grèce, Pittsburgh et San Francisco aux Etats-Unis).
- Chapitre 4 :** Le dernier projet a consisté à développer une plateforme AGuIX® pour le traitement des glioblastomes, des cancers du cerveau pour lesquels les thérapies ne sont pas encore assez efficaces. La photothérapie dynamique (PDT) pourrait se révéler très intéressante dans ce contexte. Nous avons alors fonctionnalisé la surface des particules AGuIX® avec des molécules pour la PDT, appelées photosensibilisateurs. Grâce à une collaboration avec les universités de Lorraine et de Lille, l'intérêt de cette nanoplateforme pour la PDT guidée par IRM a pu être évalué *in vivo*.

Chapitre 2

Optimisation de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules AGuIX

2 CHAPITRE 2 : OPTIMISATION DE L'EFFET RADIOSENSIBILISANT DES NPs AGUIX

2.1 INTRODUCTION

Comme cela a été mentionné dans le chapitre précédent, la radiothérapie est l'un des piliers des traitements actuels contre le cancer.^[18] Cette technique consiste à irradier les tumeurs, en général par des rayons X, tout en préservant au maximum les tissus sains environnants. Pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie, on peut utiliser des agents radiosensibilisants qui permettent d'augmenter la dose d'irradiation délivrée localement ou d'augmenter les effets biologiques liés à l'irradiation.^[20]

Au cours des dernières années, l'intérêt des nanoparticules pour la radiosensibilisation a fortement augmenté. On peut en effet imaginer les utiliser pour améliorer la biodistribution des agents radiosensibilisants en les délivrant spécifiquement dans les tumeurs (par ciblage passif ou actif). De plus, les nanoparticules avec un haut numéro atomique (Z) constituent une nouvelle classe d'agents radiosensibilisants. C'est à ces dernières que nous allons nous intéresser dans ce chapitre.^[18-21]

2.1.1 L'utilisation des NPs pour la radiothérapie

2.1.1.1 Interaction des rayons X et de la matière

L'interaction des rayons X avec la matière dépend de l'énergie incidente (E), voir **Figure 2-1-a**. Pour de faibles énergies ($E < 100$ keV), l'effet photoélectrique est prépondérant (**Figure 2-1-b**). Il consiste en l'absorption d'un photon X par un atome, entraînant l'expulsion d'un électron situé dans les couches électroniques internes de l'atome. L'énergie du photon incident est presque entièrement transmise à l'électron expulsé et celui-ci peut se déplacer sur quelques microns causant des dommages aux molécules environnantes par ionisation. La lacune de la couche électronique est ensuite comblée par un électron d'énergie plus élevée. Finalement, cette énergie est libérée sous forme de photons et/ou d'autres électrons appelés électrons Auger qui peuvent se déplacer sur une dizaine de nanomètres. L'effet photoélectrique dépend du matériau et varie en Z^4 ou Z^5 , on comprend donc l'intérêt d'utiliser des matériaux avec un haut

numéro atomique. De plus, il décroît rapidement avec l'énergie du faisceau incident selon un facteur $1/E^3$.^[89,90]

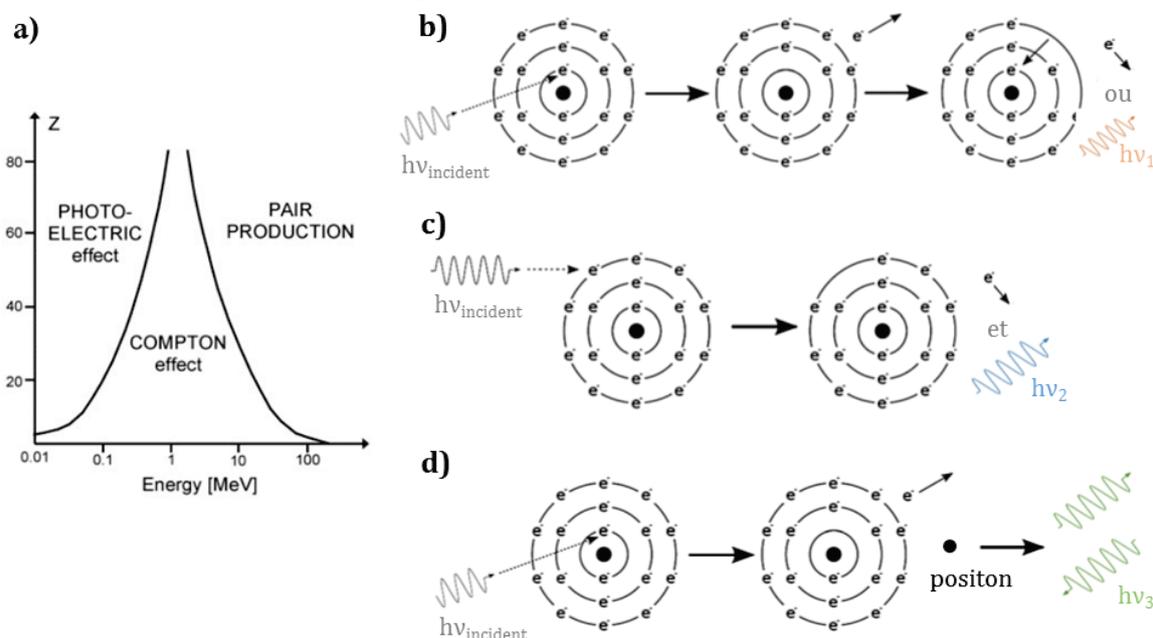


Figure 2-1 : Interaction des rayons X avec la matière. **(a)** Prédominance des effets selon l'énergie et le numéro atomique^[90]. Schéma illustrant l'effet photoélectrique **(b)**, l'effet Compton **(c)** et la création d'une paire électron-positon **(d)**. Figure adaptée de Butterworth et al.^[91]

Pour des énergies moyennes (100 keV à quelques MeV), l'effet Compton apparaît, il est indépendant de Z (**Figure 2-1-c**). Il consiste en la collision d'un photon incident avec un électron des couches externes. Seule une partie de l'énergie incidente est transmise à l'électron, le reste est libéré par la diffusion d'un photon (d'énergie plus faible que l'énergie incidente). Le photon diffusé va pouvoir à son tour, et selon son énergie, entraîner un effet photoélectrique ou un effet Compton.^[90]

Pour des énergies élevées (E supérieure à quelques MeV), le photon incident interagit avec le noyau de l'atome (**Figure 2-1-d**). Une paire électron-positon est créée. Après avoir parcouru une courte distance, le positon rencontre un électron provoquant leur annihilation et l'émission de deux photons γ d'énergie 511 keV. Cet effet varie en Z^2 .

2.1.1.2 NPs et radiosensibilisation

Plusieurs modélisations ont montré un effet radiosensibilisant pour des nanoparticules composées d'éléments lourds. Les résultats indiquaient des concentrations en nanoparticules nécessaires difficilement atteignables *in vivo* et des énergies de l'ordre de la dizaine de keV ne correspondant pas à une utilisation clinique.^[19] La plupart des radiothérapies sont en effet réalisées avec des irradiateurs 6 MV (accélérateurs linéaires d'électrons) qui permettent de produire des rayons X de haute énergie pénétrant profondément

sous la peau.^[79] Cependant, de nombreuses études expérimentales apparaissent en contradiction avec ces résultats théoriques puisque des effets étaient observés avec des concentrations de particules plus faibles et pour des énergies plus élevées que celles prédites par ces modélisations. Cela semble indiquer que d'autres aspects sont à prendre en compte avec les nanoparticules.^[19,91]

En réalité, les faisceaux utilisés en routine en clinique sont toujours poly-énergétiques. La composante de faible énergie peut donc interagir préférentiellement avec les nanoparticules de haut Z par effet photoélectrique.^[90] En cas d'émission d'électrons, en présence de nanoparticules et en raison de la proximité des atomes lourds entre eux, un électron émis par un atome peut exciter un atome voisin entraînant alors une cascade d'électrons. Une énergie élevée est ainsi déposée dans l'environnement immédiat de la particule.^[11] Pour des nanoparticules d'or par exemple, McMahan *et al.* ont montré que l'énergie déposée autour des particules, sur quelques centaines de nanomètres, était de plusieurs centaines de gray (Gy), voir **Figure 2-2**.^[92] L'effet radiosensibilisant des particules provient de ces spots d'intense ionisation de taille nanométrique.

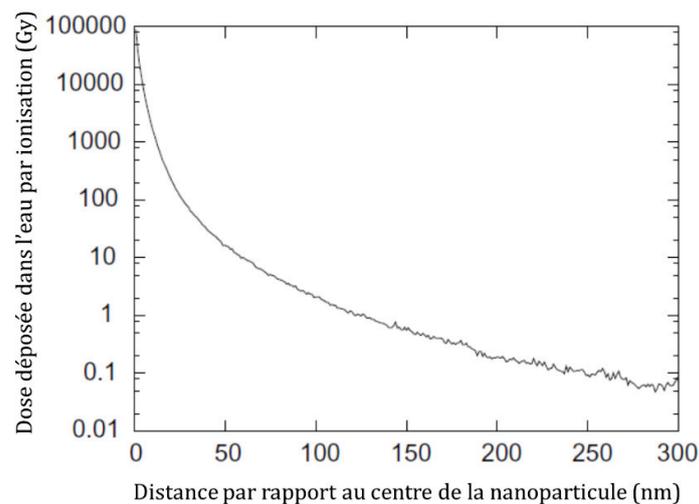


Figure 2-2 : Dose radiale moyenne déposée à la suite d'un unique évènement ionisant pour une nanoparticule d'or de 2 nm. Irradiation : 6 MV Linac. Les doses sont présentées ici en couches concentriques centrées sur la nanoparticule. Durant l'irradiation, de nombreux électrons de faible énergie sont générés et déposent des doses élevées à proximité des particules d'or. La distribution de dose est donc inhomogène dans le milieu. Figure issue de Mc Mahon *et al.*^[92]

2.1.1.3 Effets biologiques

La présence des nanoparticules entraîne une augmentation de la dose d'énergie déposée dans leur environnement immédiat, leur localisation semble donc particulièrement importante pour avoir un effet. Les dommages causés aux cellules tumorales peuvent se faire par l'intermédiaire d'altérations des membranes, ou des mitochondries si les particules sont internalisées, etc.^[93] L'irradiation des nanoparticules peut aussi entraîner la formation de radicaux comme des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) qui à leur tour peuvent induire des dommages aux cellules environnantes.^[18,90]

Différents effets sur les cellules ont été observés lorsqu'elles sont irradiées en présence de particules, par exemple une augmentation de l'apoptose, de la nécrose ou de l'autophagie.^[20] De plus, des dommages ont été observés sur les vaisseaux sanguins, ce qui diminuerait l'apport en sang aux tumeurs et jouerait un rôle important dans leur destruction.^[32] A ce jour, les mécanismes biologiques impliqués dans l'effet radiosensibilisant des particules ne sont toujours pas complètement élucidés et des études supplémentaires sont nécessaires.^[20,79]

2.1.2 Exemples de NPs de haut Z pour la radiosensibilisation

Plusieurs types de particules, composées de matériaux à haut Z ont été étudiés pour améliorer la radiothérapie.^[18,20] On a déjà présenté dans le **chapitre 1** l'intérêt des nanoparticules à base de gadolinium (Gd) pour ces applications (Z = 64). Elles présentent l'avantage de pouvoir être détectées en IRM.^[20] C'est à cette catégorie qu'appartiennent les particules AGuIX qui sont actuellement en essai clinique de phase I pour l'amélioration du traitement de métastases cérébrales par radiothérapie, après injection intraveineuse des particules.

- **Les nanoparticules d'or**

En 2004, Hainfeld *et al.* ont étudié l'utilisation de nanoparticules d'or (Z = 79) de 1,9 nm diamètre pour la radiosensibilisation sur des souris portant des tumeurs sous-cutanées EMT-6 (carcinome du sein).^[94] Après injections intraveineuse des particules, les souris ont été irradiées par rayons X (quelques minutes à 250 kVp), ce qui a permis d'augmenter leur taux de survie. En effet, le taux de survie à 1 an est de 86 % avec irradiation en présence de particules contre 20 % et 0 % avec uniquement une irradiation ou uniquement des nanoparticules, respectivement. Depuis, les nanoparticules d'or ont été très étudiées pour la radiosensibilisation^[20] car elles présentent de nombreux avantages (facilité de synthèse, taille et forme variables, fonctionnalisation possible pour améliorer la biodistribution, suivi en CT...). Récemment, Roux et son équipe ont développés différents types de nanoparticules d'or pour la radiosensibilisation, l'imagerie IRM et la scintigraphie.^[53,81,95] Pour assurer la stabilité colloïdale des particules dans les conditions physiologiques, ils ont greffé des dérivés du chélate DTPA (acide diéthylènetriaminopentaacétique) sur des particules d'or de 2,4 nm. Des études de biodistribution ont montré que ces particules s'accumulent par effet EPR dans les tumeurs et sont éliminées rapidement par voie rénale. De plus, elles peuvent complexer des ions Gd³⁺ ce qui leur permet d'être détectées à la fois par CT et par IRM. Des expériences de radiosensibilisation *in vivo* ont été réalisées sur des souris portant des xénogreffes pour un modèle de cancer de la prostate (PC3). Les particules ont été injectées par voie intratumorale avant irradiation (220 keV). La durée de survie médiane était de 38 jours avec particules et irradiation contre 29 jours avec irradiation seule. Cela traduit une augmentation de 31 % de la survie médiane avec les particules et souligne bien l'intérêt de ces particules pour la radiosensibilisation. Malgré les nombreuses études montrant l'intérêt des particules d'or pour l'amélioration de la radiothérapie, aucun essai clinique n'évalue leur effet à ce jour.

- **Les nanoparticules d'hafmium**

Des nanoparticules d'oxyde de hafmium ($Z = 72$) ont aussi montré un effet radiosensibilisant *in vitro* et *in vivo*.^[20] Elles sont appelées NBTXR3[®], ont un diamètre d'environ 50 nm et une surface négativement chargées en solution aqueuse à pH physiologique. Leur utilisation est actuellement évaluée au cours de plusieurs essais cliniques pour des applications en radiothérapie, principalement après injection intratumorale. Les études portent sur des sarcomes des tissus mous (phase I, II/III), des cancers du foie (phase I/II), des cancers de la prostate (phase I/II) et des cancers de la tête et du cou (phase I).^[20] Cependant, une injection intratumorale limite les applications à des tumeurs faciles d'accès.^[21] Pour des tumeurs moins accessibles, pour un accès simultané à plusieurs sites tumoraux ou pour limiter le caractère invasif de l'injection, une voie intraveineuse est préférable.

- **Les nanoparticules de bismuth**

Le bismuth ($Z = 83$) est un métal lourd qui présente une toxicité faible par rapport à d'autres métaux proches dans le tableau périodique comme le plomb ($Z = 82$).^[96] En raison de cette faible toxicité, le bismuth est utilisé depuis longtemps en médecine. Des composés à base de Bi, comme des complexes de citrate de Bi, sont ainsi utilisés pour le traitement de problèmes gastro-intestinaux ou d'infections bactériennes.^[97] Des nanoparticules de Bi ont été synthétisées à base d'oxyde,^[98] de sulfure^[99] ou de séléniure^[100] pour des applications comme agent de contraste en CT, pour la photothérapie ou pour la radiothérapie. Récemment elles ont attiré beaucoup d'intérêt dans ce cadre et certaines études ont montré qu'elles pourraient concurrencer les autres matériaux présentés précédemment.^[101] Cependant, pour améliorer leur biodistribution ces particules doivent être recouvertes d'une couche hydrophile (polymère, polysiloxane,...) avant d'être utilisées ce qui augmente alors leur diamètre hydrodynamique.^[97] Dans tous les cas, les tailles finales obtenues dépassent la dizaine de nanomètres nécessaire pour une élimination par voie rénale ce qui pourrait limiter leurs applications.

- **Conclusion**

Cette partie a permis d'introduire quelques exemples de nanoparticules de haut Z pour l'amélioration de la radiothérapie. La liste n'est évidemment pas exhaustive et d'autres éléments ont été étudiés (platine,^[102] argent,^[20]...). Quoi qu'il en soit, beaucoup d'études montrent l'intérêt de nanoparticules pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie et cependant très peu se poursuivent par des études cliniques. La grande variabilité entre les études (type de particules, modèles biologiques, irradiation...) complique leur comparaison et rend difficile la détermination des paramètres clés pour leur utilisation en radiothérapie. De plus, les mécanismes (physiques, chimiques et biologiques) impliqués ne sont pas encore bien compris et nécessitent des études plus approfondies.^[20,90]

2.1.3 Le cas des AGuIX

Plusieurs études ont montré que les particules AGuIX peuvent agir comme un agent radiosensibilisant. *In vitro*, l'effet a été prouvé pour différentes lignées cellulaires, même sur des lignées radiorésistantes, avec différents types d'irradiation (rayon X, neutron, ions), à différentes énergies et pour de faibles concentrations en particules comme indiqué dans le **Tableau 2-1**.^[11,19]

Tableau 2-1 : Effet radiosensibilisant des particules AGuIX sur différents type de cellules tumorales. SER : « Sensitizing Enhancement Ratio », cela correspond au ratio du taux de survie sans NP et avec NPs pour le même dépôt de dose. Un ratio supérieur à 1 indique donc un meilleur effet de la radiothérapie en présence de NPs. FFF: « Flattening-Filter-Free » ; STD : « standard».^[11,19]

Cellules tumorales	Irradiateur	NPs / temps d'incubation	Efficacité	Equipe de recherche
Gliome				
U87MG	6 MV	0,01 – 0,50 mM / 24 h	SER2Gy = 1,1 – 1,5	M. Barberi-Heyob (Nancy)
T98G	200 – 250 kV	0,1 – 5 mM / 1 h	SER2Gy = 1,1 – 1,3	K. Prise (Belfast)
Prostate				
DU145	200-250 kV	0,1 – 5 mM / 1 h	SER2Gy = 1,17 – 2,5	K. Prise (Belfast)
PC3	200-250 kV	0,1 – 5 mM / 1 h	SER2Gy = 1,25 – 1,33	
Carcinome cervical				
HeLa	200-250 kV	0,5 mM / 1 h	SER4Gy = 1,54	R. Berbeco (Boston)
	6 MV	0,5 mM / 1 h	SER4Gy = 1,28	
Carcinome des voies aérodigestives supérieures				
SQ20B	250 kV	0,6 mM / 1 h	SER2Gy = 2,14	C. Rodriguez-Lafrasse (Lyon)
	C6 ⁺ (33,6 keV.μm ⁻¹)	0,3 mM / 1 h	SER = 1,33	
		0,6 mM / 1 h	SER = 1,59	
Pancréas				
Panc1	200-250 kV	0,5 mM / 1 h	SER4Gy = 1,41	R. Berbeco (Boston)
	6 MV FFF	0,5 mM / 1 h	SER4Gy = 1,2	
	6 MV STD	0,5 mM / 1 h	SER4Gy = 1,12	
Lymphome (souris)				
EL4	Neutron, cyclotron	0,05 – 0,30 mM	SER3Gy > 2,0 (estimé)	G. Blondiaux (Orléans)
Carcinome ovarien (hamster)				
CHO	C6 ⁺ (200 MeV/uma)	1,0 mM / 6h	SER4Gy = 1,50	S. Lacombe (Paris)
	He ²⁺	1,0 mM / 6h	SER = 1,14	

Les particules agiraient suite à des émissions d'électrons liées aux interactions avec les rayonnements ionisants.^[32,93] La proximité des atomes de Gd sur les particules permettrait la création d'une cascade d'électrons Auger qui entraînerait ensuite un fort dépôt de dose dans l'environnement des particules (**Figure 2-3**). Des modélisations ont été réalisées pour une irradiation par rayons X avec une énergie de 80 keV. Elles ont montré que des doses de 2 Gy sont déposées à 200 nm de la NP, 10 Gy à 100 nm et de 1000 Gy à proximité immédiate de la particule.^[11] Expérimentalement, on assiste à une augmentation des

cassures des doubles brins de l'ADN,^[11] une production massive de ROS et une altération des fonctions des mitochondries.^[103] *In vivo*, de nombreuses études ont été réalisées après injection intratumorale, intraveineuse ou par voie respiratoire sur des souris ou des rats.^[11,19] Dans tous les cas, une augmentation de la survie des animaux a été observée.

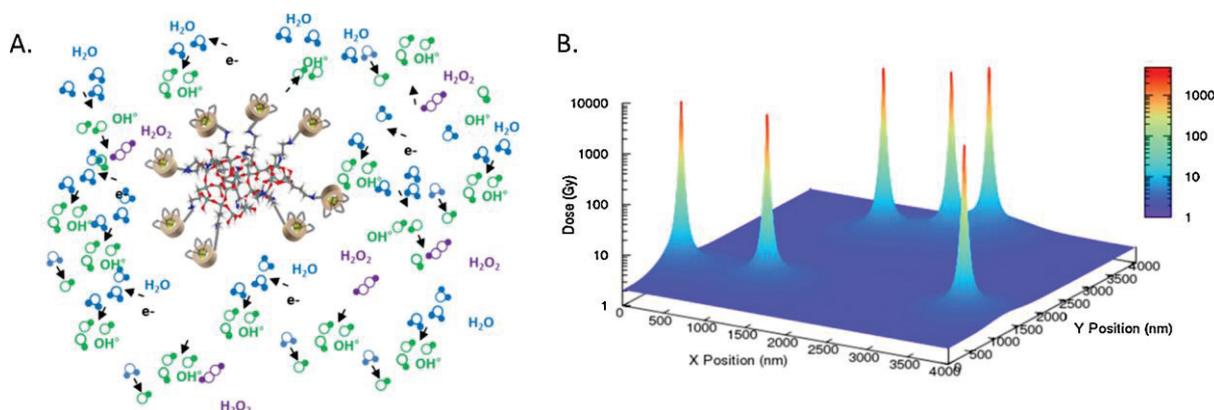


Figure 2-3 : (A) La formation d'une cascade d'électrons Auger après irradiation des particules AGuIX suivie de la formation d'espèces réactives de l'oxygène augmente l'efficacité de la radiothérapie. (B) La simulation de la dose locale déposée après irradiation des nanoparticules à 2 Gy fait apparaître des nano-spots de haute énergie. Figure issue de Lux et al.^[19]

2.1.4 Objectifs

Le but de ce chapitre est de développer une deuxième génération de particules AGuIX avec un effet radiosensibilisant amélioré. On a vu que l'effet photoélectrique joue un rôle important dans leur mécanisme d'action et que celui-ci varie en Z^4 ou Z^5 . L'objectif a donc été d'ajouter des éléments plus lourds sur la particule AGuIX. Cela permettra aussi d'améliorer leur capacité d'agent de contraste en CT. Le bismuth a été choisi pour plusieurs raisons : (i) parmi les éléments présentés précédemment (Au, Hf, Pt, Ag,...) il est celui avec le Z le plus élevé, (ii) il est relativement peu toxique (iii) et il peut facilement être complexé par exemple par le DOTA ($\log K = 30,3$), chélate déjà utilisé pour les particules AGuIX.^[104]

Cependant, les particules AGuIX présentent très peu de chélates libres en surface (1-2 %). Dans un premier temps, nous avons donc cherché à augmenter leur nombre afin de les utiliser ensuite pour complexer des ions Bi^{3+} , comme présenté sur la **Figure 2-4**.

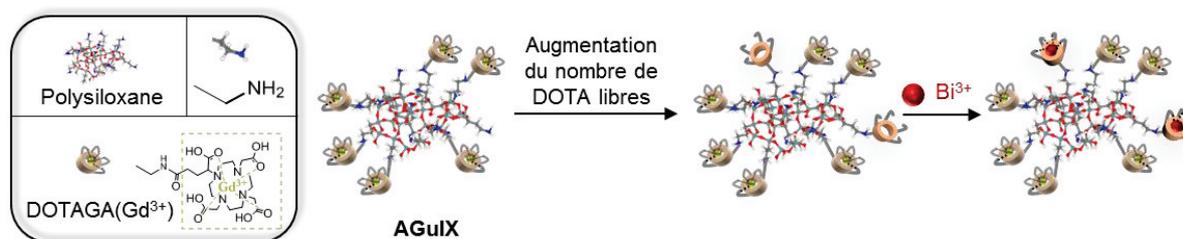


Figure 2-4 : Stratégie mise en place pour améliorer l'efficacité des particules AGuIX en radiothérapie : augmentation du nombre de DOTA libres à la surface des particules et complexation de bismuth.

2.2 SYNTHÈSE DES PARTICULES AGuIX@DOTA

2.2.1 Stratégies

Afin d'augmenter le nombre de chélates libres en surface de la particule AGuIX, deux stratégies ont été étudiées et sont représentées sur la **Figure 2-5**.

- **Modification de la synthèse des particules AGuIX**

La première stratégie consiste à modifier la synthèse des particules AGuIX. Une des modifications les plus simples est de modifier les étapes de la maturation dans l'eau et de purification des particules AGuIX. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la variation du pH des solutions lors de ces étapes, comme nous le verrons en détail ci-après.

- **Fonctionnalisation des particules AGuIX par des DOTA**

La deuxième stratégie consiste à fonctionnaliser les particules AGuIX déjà formées en ajoutant à leur surface des chélates DOTA. Pour cela, on va utiliser les amines primaires provenant des molécules d'APTES du réseau de polysiloxane. En effet, on a vu dans le **chapitre 1** que les particules présentaient une quinzaine d'amines primaires libres par particule. Cette valeur a été déterminée notamment par l'utilisation du 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate (TNBS), un composé utilisé depuis les années 60 pour détecter les amines libres présentes sur les protéines, que ce soit de manière quantitative ou qualitative (voir **Annexe A.1**).^[105] Les amines primaires présentes sur les particules AGuIX peuvent donc être utilisées pour fonctionnaliser les particules par formation d'une liaison covalente amide avec le chélate DOTA.

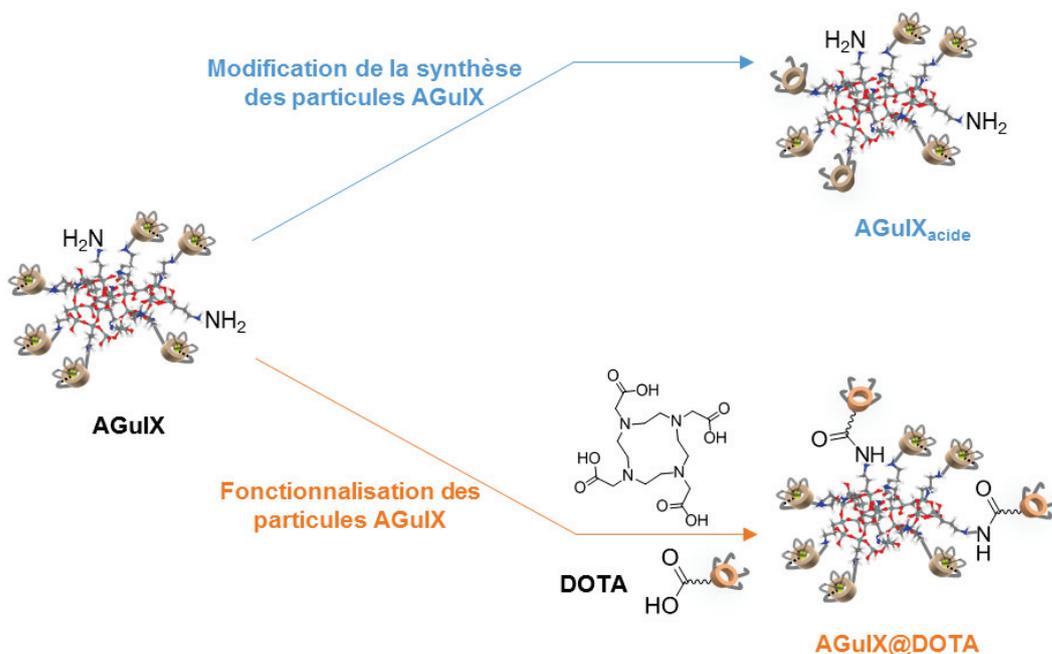


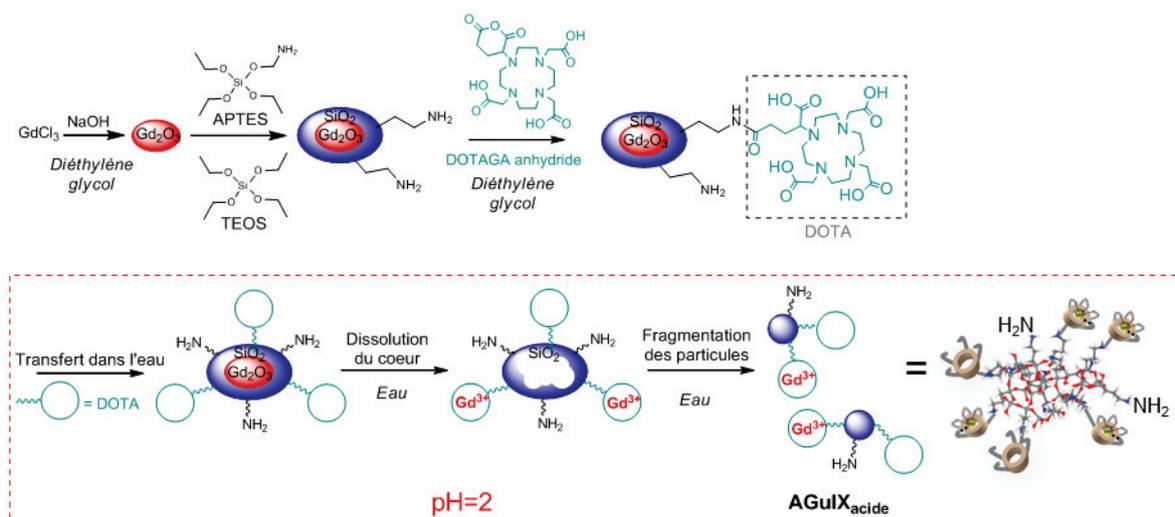
Figure 2-5 : Stratégies étudiées pour augmenter le nombre de chélates libres disponibles en surface des particules AGuIX pour la complexation de bismuth.

Les deux stratégies que nous avons choisies pour augmenter le nombre de chélates libres en surface des particules AGuIX sont présentées successivement dans la suite du manuscrit.

2.2.2 Modification de la synthèse des AGuIX

2.2.2.1 Synthèse

La synthèse des particules AGuIX a été présentée dans le chapitre précédent (**partie 1.5**). La dernière étape correspond au passage des particules du DEG dans l'eau suivi d'une étape de maturation et de purification. Au cours de ces étapes, le pH est ajusté à 5 afin de favoriser la dissolution du cœur d'oxyde de gadolinium et la complexation des ions Gd³⁺ par les DOTAGA. Ces étapes sont cruciales pour l'obtention des AGuIX. Afin d'augmenter le nombre de DOTAGA libres à la surface des particules, nous avons effectué les premières étapes de maturation et de purification en milieu plus acide (**Figure 2-6**). Toutes les autres étapes de synthèse et de purification sont restées inchangées. La dissolution du cœur d'oxyde de Gd devrait être favorisée à un pH de 2 mais la cinétique de complexation des ions Gd³⁺ étant plus lente,^[106] le nombre de DOTAGA libres sur les particules finales devrait être augmenté.


 Figure 2-6 Synthèse des particules AGuIX_{acide}

2.2.2.2 Caractérisations

Les particules ont été caractérisées par plusieurs techniques complémentaires présentées ci-dessous dans le **Tableau 2-2**. Ces techniques ainsi que les modes opératoires utilisés sont identiques pour toutes les synthèses présentées dans ce manuscrit et sont présentées dans l'**Annexe A.1**.

 Tableau 2-2 : Caractérisations de particules AGuIX et AGuIX_{acide}.

Caractérisations	AGuIX	AGuIX _{acide}
Taille : -DLS	$D_H = 3,3 \pm 0,8$ nm	$D_H = 2,5 \pm 0,5$ nm
-SAXS	$R_g = 1,36$ nm; $D_{sphère} = 3,5$ nm	$R_g = 1,13$ nm; $D_{sphère} = 2,9$ nm
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	$r_1 = 12,5$ s ⁻¹ mM ⁻¹ ; $r_2/r_1 = 1,4$	$r_1 = 11,7$ s ⁻¹ mM ⁻¹ ; $r_2/r_1 = 1,2$
HPLC (A = 295 nm)	Pureté de 97,5 % $t_R = 12,9$ min $l_{1/2} = 0,8$ min	Pureté de 96,6 % $t_R = 12,5$ min $l_{1/2} = 0,8$ min
Point isoélectrique	pH = $8,2 \pm 0,2$	pH = $8,6 \pm 0,2$
Spectroscopie IR	Pas d'épaulement à 1720 cm ⁻¹	Bande de vibration à 1720 cm ⁻¹

- **Taille des nanoparticules**

La taille des particules peut être évaluée par diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*) qui fournit le diamètre hydrodynamique des particules en supposant que ce sont des sphères. Les tailles obtenues sont très petites et proches des limites de sensibilité de l'appareil. Afin de valider ces résultats, des expériences supplémentaires ont été réalisées par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, *Small-angle X-ray Scattering*) par Vu Long Tran, étudiant en thèse au laboratoire. Nous avons ainsi pu obtenir le diamètre des particules $D_{\text{sphère}}$ (toujours en les assimilant à des sphères), ces résultats sont comparables à ceux obtenus en DLS et confirme donc l'utilisation de cette technique pour l'étude des particules de type AGuIX. La modification de la synthèse des particules ne modifie pas sensiblement leur taille qui demeure inférieure à 5 nm laissant présager une élimination rénale. D'autre part, la SAXS nous permet d'obtenir le rayon de giration (R_g) des particules qui nous donne des indications sur leur structure. Un ratio proche de 0,775 pour $\frac{2 R_g}{D_{\text{sphère}}}$ est synonyme d'une sphère homogène. Un ratio de 1 est synonyme d'une coquille sphérique. Pour les AGuIX et AGuIX_{acide}, le ratio se situe entre ces deux limites ce qui est cohérent avec la structure présentée précédemment : un cœur de polysiloxane et des atomes de Gd lourds en surface des particules. Un ratio supérieur à 1 aurait été l'indice d'une structure cylindrique, étendue.^[107]

- **Relaxométrie**

Les propriétés magnétiques des particules sont capitales pour leur utilisation comme agent de contraste positif en IRM et ont été évaluées au laboratoire à 37°C et 1,4 T. Les valeurs de r_1 et r_2 restent similaires malgré la modification de la synthèse.

- **Chromatographie**

La pureté des particules a été évaluée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) sur une colonne C4 apolaire et hydrophobe. Les composés sont donc séparés selon leur taille et leur polarité puis détectés grâce à leur absorbance à 295 nm. Les chromatogrammes sont présentés sur la **Figure 2-7-a**. Les particules AGuIX et AGuIX_{acide} ont un temps de rétention équivalent ($t_R \sim 12,5$ min) et une largeur à mi-hauteur similaire ($l_{1/2} \sim 0,8$ min) ce qui indique qu'il n'y a pas d'altération drastique des particules par modification du pH lors de la synthèse. De petits pics sont détectés autour de 3 min et correspondent à des fragments (APTES-DOTAGA@Gd³⁺, TEOS-APTES-DOTAGA@Gd³⁺,...) venant de l'hydrolyse des liaisons Si-O-Si du cœur de polysiloxane (voir la **partie 1.5.2**).^[108]

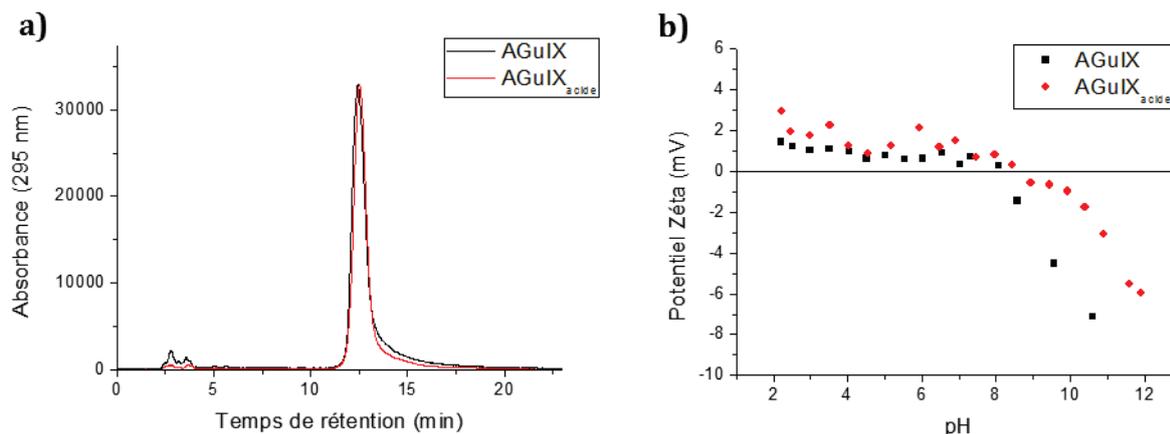


Figure 2-7 : Caractérisations des AGuIX et AGuIX_{acide} **(a)** Chromatogramme HPLC. **(b)** Evolution du potentiel zéta avec le pH.

- **Potentiel zéta et point isoélectrique**

L'évolution du potentiel des particules avec le pH est représentée sur la **Figure 2-7-b**. Elle est identique pour les AGuIX et AGuIX_{acide} jusqu'à un pH de 8. Pour des solutions basiques des différences apparaissent mais la tendance reste similaire. Jusqu'ici, toutes les caractérisations effectuées semblent indiquer que les particules AGuIX_{acide} ne présentent pas de grande différence avec les AGuIX.

- **Spectroscopie infrarouge (IR)**

Des solutions de particules AGuIX et AGuIX_{acide} ont été acidifiées avant d'évaporer l'eau à l'étuve. Les spectres IR obtenus sur les poudres récupérées sont présentés sur la **Figure 2-8**. Contrairement au spectre des AGuIX, celui des AGuIX_{acide} présente un épaulement à 1720 cm⁻¹ qui correspond à la vibration d'élongation des liaisons C=O des acides carboxyliques des DOTAGA non coordonnés au Gd³⁺. Cela corrobore le fait que les DOTAGA des AGuIX complexent tous (ou presque) du Gd³⁺ tandis que les AGuIX_{acide} présentent des DOTAGA libres en surface.

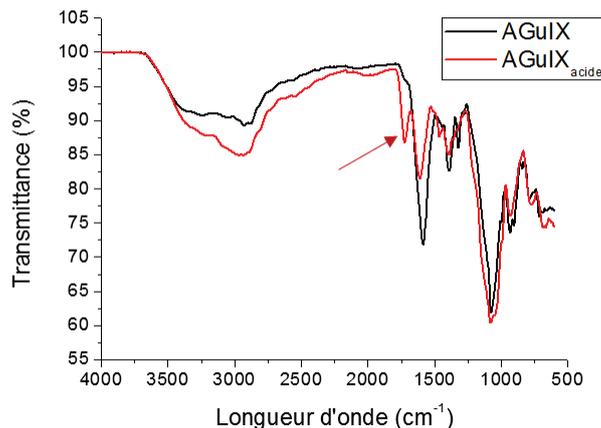


Figure 2-8 : Spectres infrarouges des particules AGuIX et AGuIX_{acide}. 1720 cm⁻¹ : élongation des C=O des acides carboxyliques ; 1600 cm⁻¹ : élongation asymétrique des C=O des carboxylates, des C=O des amides et déformation des N-H de l'amide ; 1440 cm⁻¹ : déformation des acides carboxyliques ; 1390 cm⁻¹ : élongation symétrique des C=O des carboxylates ; 1080 cm⁻¹ : élongation asymétrique des Si-O-Si ; 930 cm⁻¹ : élongation des Si-O.^[109,110]

Nous allons maintenant nous intéresser à la quantification de ces DOTAGA libres, pour laquelle plusieurs méthodes ont été mises en place.

2.2.2.3 Quantification du nombre de DOTAGA libres

- **Luminescence des ions europium Eu³⁺**

Cette technique de dosage a été mise en place dans le cadre de la thèse d'Anna Mignot, effectuée à l'ILM, et a été publiée.^[51] Lorsque les ions Eu³⁺ sont libres en solution aqueuse, leur luminescence est presque entièrement inhibée par l'eau. Ce n'est pas le cas quand ils sont complexés par le DOTAGA (logK = 26,2 pour le DOTA).^[111] En effet, pour une excitation à 395 nm, on observe deux pics d'émission : l'un à 593 nm correspondant à une transition ⁵D₀-⁷F₁ et l'autre à 616 nm correspondant à une transition ⁵D₀-⁷F₂ (voir **Figure 2-9-a**). L'idée du dosage est donc d'ajouter des quantités croissantes d'ions Eu³⁺ aux nanoparticules et de mesurer la phosphorescence des solutions. Tant qu'il reste des DOTAGA libres, elle augmente linéairement. Quand tous les DOTAGA sont saturés, soit par les Gd³⁺ déjà présents sur les particules soit par les Eu³⁺ ajoutés, un palier est alors atteint (voir la **Figure 2-9-b**).

Mode opératoire : On prépare différents échantillons contenant la même quantité de particules donc de complexes DOTAGA@Gd³⁺ (en général V = 1 mL et n_{Gd3+} = 3 μmol) mais des quantités croissantes de chlorure d'europium hexahydraté. Les solutions sont agitées pendant 48 h à 80°C à un pH de 5-6, de manière à assurer la complexation totale des ions Eu³⁺ sans former d'hydroxyde d'europium. On mesure ensuite la phosphorescence à 593 nm et 616 nm pour une excitation à 395 nm.

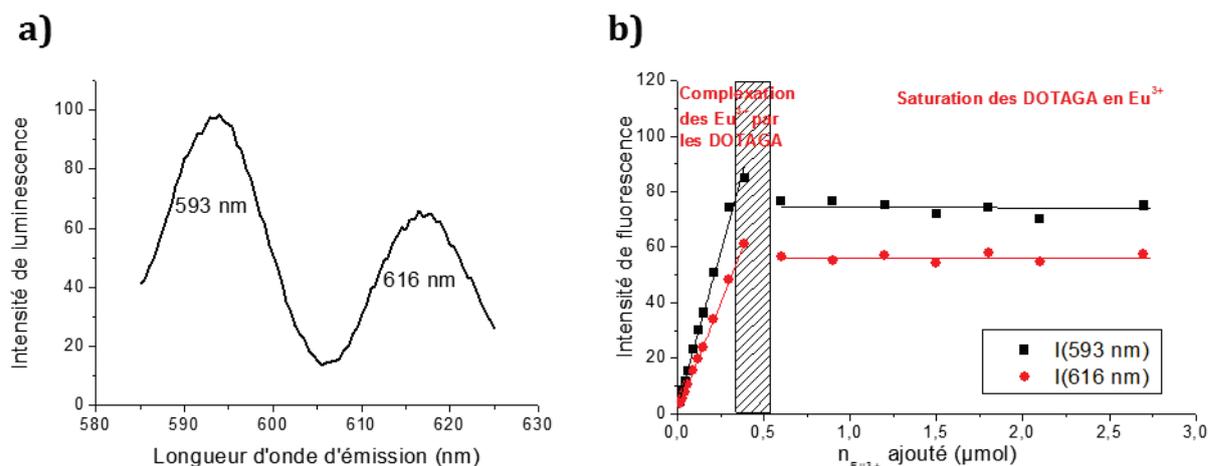


Figure 2-9 : (a) Spectre de luminescence des complexes DOTAGA@Eu³⁺ pour $\lambda_{excitation} = 395 \text{ nm}$, $\sim 0,4 \mu\text{mol}$, $V = 1 \text{ mL}$. (b) Quantification du nombre de DOTAGA libres par phosphorescence des ions europium Eu³⁺ pour les particules AGuIX_{acide}. $\lambda_{excitation} = 395 \text{ nm}$, $n_{Gd^{3+}} = 3 \mu\text{mol}$. La rupture de pente a lieu pour $n_{Eu^{3+}} = 0,3 \mu\text{mol}$.

Pour les particules AGuIX_{acide}, on trouve qu'il faut ajouter 0,3 µmol de Eu³⁺ pour 3 µmol de Gd³⁺ avant d'atteindre le palier. Ceci correspond à $\frac{3}{3+0.3} = 9,1 \%$ de DOTAGA libres. Avec la même technique, environ 1-2 % de DOTAGA libres en surface des particules AGuIX ont pu être quantifiés.

- **Complexation de Gd³⁺ et utilisation l'orange de xylénol**

L'orange de xylénol est une molécule dont le spectre d'absorbance est modifié en présence d'ion Gd³⁺. Comme le montre la **Figure 2-10-a**, le pic à 433 nm diminue et celui à 573 nm augmente en présence de Gd³⁺. Barge *et al*^[112] ont ainsi montré qu'à un pH de 5,8, le ratio des absorbances à 573 et 433 nm est proportionnel à la concentration de Gd³⁺ libre dans la solution. L'idée du dosage est d'ajouter une quantité croissante d'ions Gd³⁺ aux nanoparticules AGuIX_{acide} en présence d'un excès d'orange de xylénol et d'enregistrer les spectres UV-visible des solutions. Les ions Gd³⁺ ajoutés vont dans un premier temps être complexés par les DOTAGA libres présents sur les particules ($\log K = 25$ pour le DOTA^[51] et 5,8 pour l'orange de xylénol^[112]). Le spectre de l'orange de xylénol n'est pas modifié et le ratio des absorbances à 573 et 433 nm est constant. Quand tous les DOTAGA complexent du Gd³⁺, les ions ajoutés sont chélatés par l'orange de xylénol. Cela induit une modification spectrale : le ratio des intensités des absorbances à 573 et 433 nm augmente linéairement avec la concentration (voir la **Figure 2-10-b**).

Mode opératoire : Le spectre d'absorbance de l'orange de xylénol dépendant fortement du pH, les manipulations sont réalisées dans un tampon acétate de pH = 5,8. Différents échantillons sont préparés qui contiennent la même quantité de particules AGuIX_{acide} (en général $V = 1 \text{ mL}$ et $n_{Gd^{3+}, particules} = 0,2-0,3 \mu\text{mol}$) mais auxquels on ajoute une quantité croissante de chlorure de Gd³⁺ hexahydraté ($n_{Gd^{3+}, ajouté} = 0 - 70 \text{ nmol}$). Les échantillons sont chauffés à 80°C durant 24 à 48 h. Une solution de sel de sodium d'orange de xylénol est

préparée juste avant utilisation pour éviter sa dégradation. A 1 mL de celle-ci, on ajoute 100 μL de chaque solution de AGuIX_{acide}. Les échantillons sont laissés sous agitation et à l'abri de la lumière durant 30 min. Le spectre UV-visible est ensuite enregistré, et le ratio des absorbances à 573 et 433 nm mesurés.

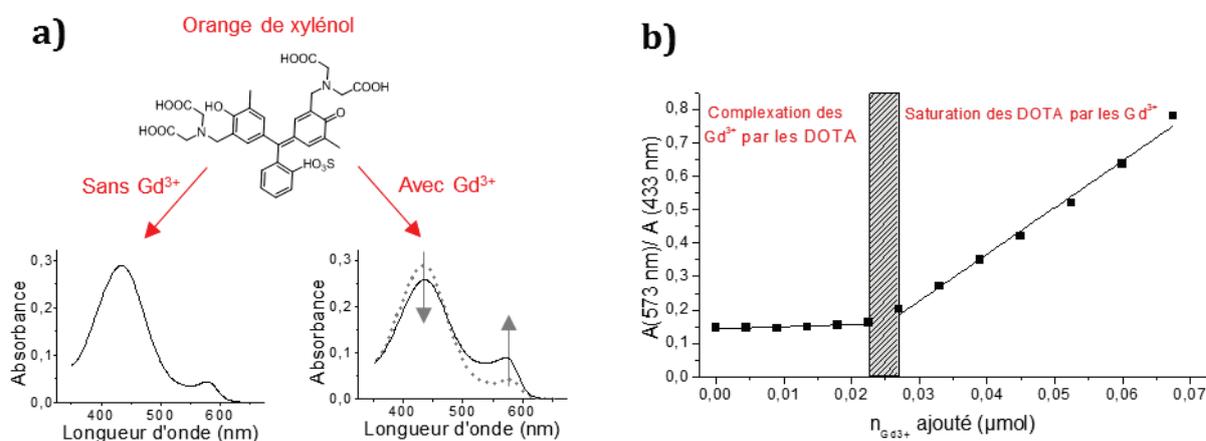


Figure 2-10 : Utilisation de l'orange de xylénol pour la quantification du nombre de DOTAGA libres sur les particules AGuIX_{acide}. **(a)** Influence des ions Gd³⁺ sur le spectre UV-visible de l'orange de xylénol (solvant : tampon acétate, pH=5,8). **(b)** Quantification du nombre de DOTAGA libres sur les AGuIX_{acide}. Tampon acétate, pH=5,8. $n_{\text{Gd}^{3+}, \text{particule}} = 0,233 \mu\text{mol}$. La rupture de pente a lieu pour $n_{\text{Gd}^{3+} \text{ ajouté}} = 25 \text{ nmol}$.

Pour les particules AGuIX_{acide}, avant d'atteindre le palier, il faut ajouter 25 nmol d'ions Gd³⁺ pour 233 nmol de Gd³⁺ déjà présent sur les particules, ce qui fait $\frac{25}{25+233} = 9,6 \%$ de DOTAGA libres. Avec la même technique, on trouve environ 1,5 % de DOTA libres en surface des particules AGuIX.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment. Par rapport à la quantification utilisant l'euprotium, la rupture de pente est en générale plus nette, et la quantification avec l'orange de xylénol est donc plus précise. Avec cette technique, chaque échantillon nécessite au moins 10 fois moins de quantité de particules que celle utilisant l'euprotium ce qui est très avantageux lorsque l'on travaille sur de faibles quantités de matière.

• Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire permet d'obtenir les pourcentages massiques en gadolinium (Gd), silicium (Si), carbone (C) et azote (N). Cela nous permet de proposer une structure pour les nanoparticules et donc de vérifier la quantité de chélates libres. Ces pourcentages massiques sont déterminés par l'entreprise Filab (Dijon, France) avec une erreur de 0,4 %. La teneur en Gd est en générale déterminée aussi au laboratoire par spectrométrie à plasma induit et émission optique (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). Les résultats pour les particules AGuIX_{acide} sont indiqués ci-dessous dans le **Tableau 2-3**.

Tableau 2-3 : Pourcentages massiques pour les particules AGuIX_{acide} obtenus expérimentalement (Filab).

Gd	Si	C	N
10,42	12,97	28,46	8,2

Les particules AGuIX_{acide} sont constituées d'un réseau de polysiloxane, provenant de TEOS et d'APTES, et fonctionnalisées par des DOTAGA ou des DOTAGA@Gd³⁺. Les constituants réellement présents au sein de la particule sont notés APTES*, TEOS* et DOTAGA* dans la suite. Comme indiqué dans le **Tableau 2-4**, on peut déterminer la formule et la masse molaire de chaque constituant. On peut proposer une structure pour la particule en prenant en compte ces constituants. Dans le cas des AGuIX_{acide} la structure proposée est la suivante : (Gd₁APTES*_{4,5}TEOS*_{2,5}DOTAGA*_{1,13})_n.

Tableau 2-4 : Constituants des particules AGuIX et AGuIX_{acide}.

	Gadolinium	APTES*	TEOS*	DOTAGA*
Formule	Gd	SiO _{1,5} C ₃ NH ₈	SiO ₂	C ₁₉ H ₃₁ N ₄ O ₉
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	157	110	60	459,5

Les particules lyophilisées sur lesquelles les analyses sont effectuées contiennent aussi de l'eau et des ions (Na⁺, Cl⁻...) qui représentent pour le moment une masse non identifiée mais qu'il faut prendre en compte pour calculer les pourcentages massiques avec la structure proposée et ainsi la vérifier. La masse totale (particules obtenues avec la structure proposée, eau et sels) est calculée en utilisant le pourcentage massique en Gd obtenu expérimentalement par Filab. Ensuite, il est possible de calculer pour le Si, C et N les pourcentages massiques associés avec la structure proposée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2-5**.

Tableau 2-5 : Comparaison des pourcentages massiques obtenus expérimentalement par Filab ou calculés à partir de la structure proposée pour les particules AGuIX_{acide}.

	Gd	Si	C	N
%massique exp	10,42	12,97	28,46	8,2
%massique calc	10,42	13,21	28,07	8,46
Différence absolue	0	0,24	0,39	0,26

La structure proposée (Gd₁APTES_{4,5}TEOS_{2,5}DOTAGA_{1,13})_n nous informe notamment sur le nombre de DOTAGA libres en surface de la particule. On a ici $\frac{1,13-1}{1,13} = 11,5$ % de DOTAGA libres ce qui est cohérent avec les méthodes de quantifications présentées précédemment. Pour comparaison, la structure pour les particules AGuIX classique est la suivante : (Gd₁APTES*_{2,5}TEOS*_{2,1}DOTAGA*_{1,02})_n. On a donc $\frac{1,02-1}{1,02} = 1,9$ % de DOTAGA libres.

L'analyse élémentaire est très intéressante car elle nous permet d'avoir une description précise de la particule, mais elle reste une technique longue et coûteuse, nécessite la destruction d'une grande quantité de matière (au moins 100 μmol de Gd^{3+} de particules) et les résultats ne sont obtenus qu'au bout de plusieurs mois. L'analyse élémentaire ne peut donc pas être utilisée pour chaque lot de particules d'où l'intérêt d'utiliser en routine des techniques de quantification plus accessibles comme l'utilisation de l'orange de xylénol.

2.2.2.4 Conclusion

La modification de la synthèse des particules AGuIX par une acidification lors des premières étapes de maturation et de purification a permis d'obtenir des particules AGuIX_{acide} aux propriétés similaires (taille, pureté, relaxivité). Comme désiré, les AGuIX_{acide} présentent plus de DOTAGA libres en surface que les AGuIX (environ 10 % contre 1-2 %). L'intérêt de cette technique réside dans le fait qu'elle n'augmente pas le nombre d'étapes de synthèse par rapport à des particules AGuIX classiques. Cependant, elle ne permet pas de moduler à souhait le nombre de DOTAGA libres en surface. Ainsi, au maximum, on pourrait ajouter environ 10 % de bismuth sur les particules ce qui n'est pas suffisant pour espérer avoir une amélioration notable de l'efficacité de la radiothérapie par rapport à des AGuIX. Une autre voie a donc été mise en place et est détaillée dans la partie suivante, elle consiste en la fonctionnalisation des particules AGuIX par des chélates DOTA.

2.2.3 Greffage de DOTA-NHS sur les AGuIX

2.2.3.1 Synthèse des particules AGuIX@DOTA

Afin d'obtenir des particules avec un grand nombre de DOTA libres en surface, l'idée était de greffer sur les particules AGuIX des chélates DOTA en formant une liaison amide covalente entre les amines des particules et les acides carboxyliques des chélates. Au vu des pKa (2,2, 4,3, 4,5, 9,72 et 11,9 ^[113]), le DOTA en présence d'une amine donnerait lieu dans l'eau à une réaction acido-basique formant un carboxylate d'ammonium. Pour effectuer la modification désirée, on a donc utilisé un chélate DOTA (fourni par l'entreprise ChemaTech, Dijon, France) dont l'un des acides carboxyliques a été activé sous forme d'ester NHS (*N*-hydroxysuccinimide), voir la **Figure 2-11**. Introduits dans les années 70 comme agents de réticulation homobifonctionnels, les esters NHS font actuellement partis des réactifs les plus courants pour modifier des fonctions amines, leur réactivité augmente avec le pH des solutions. Cependant, ces esters sont hydrolysés en solution aqueuse et leur réactivité vis-à-vis de l'eau augmente elle aussi avec le pH. Les ester NHS ont une demi-vie de l'ordre de quelques heures à pH neutre mais de quelques minutes à un pH de 8,6 par exemple. Pour maximiser la modification des amines et minimiser l'hydrolyse par l'eau, on a donc travaillé à un pH de 7,5 et avec une grande concentration en particules.^[105]

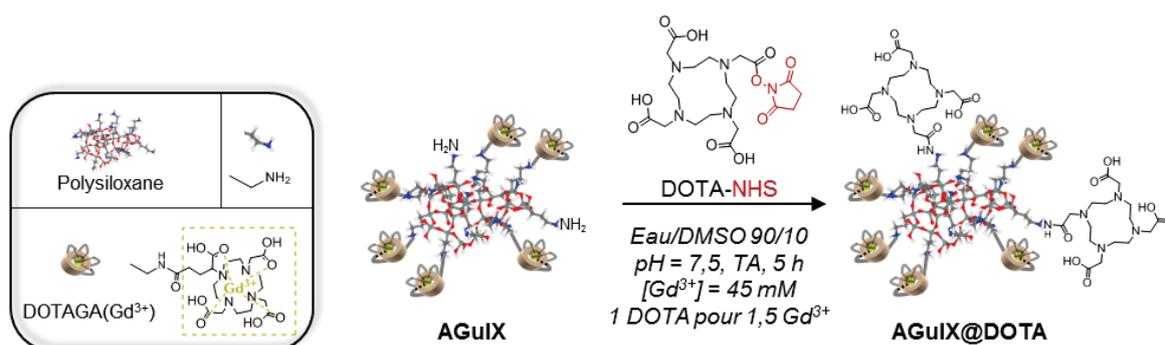


Figure 2-11 : Schéma de synthèse des particules AGuIX@DOTA.

Mode opératoire : Les particules AGuIX sont dispersées dans de l'eau ultrapure pendant 1 h et à un pH de 7,5 ($[Gd^{3+}] \sim 60 \text{ mM}$). Le DOTA-NHS est dissout dans du DMSO anhydre (ratio $Gd^{3+}/DOTA = 1,5$, 250 mg/mL) et immédiatement ajouté à la solution de nanoparticules goutte à goutte, sous agitation et à température ambiante. Au cours de l'ajout le pH est ajusté à 7,4 par une solution de soude à 1 M. La solution est laissée sous agitation durant 5 h ($[Gd^{3+}] \sim 45 \text{ mM}$; DMSO:eau v:v 13:87).

2.2.3.2 Purification

Après la synthèse, il est nécessaire de purifier les particules et d'éliminer tous les chélates qui ne seraient pas greffés à leur surface. La taille des particules AGuIX étant d'environ 10 kDa,^[51] on peut les purifier par filtration tangentielle sur des membranes ayant un seuil de coupure de 5 kDa. Les particules sont conservées au-dessus des membranes et les petites molécules passent au travers et sont éliminées. Plusieurs cycles de filtration tangentielle sont effectués pour atteindre des taux de purification satisfaisants.

Cependant, à un pH proche de 7, des interactions ioniques peuvent exister entre les carboxylates des DOTA ($-COO^-$) et les ammoniums des AGuIX ($-NH_3^+$), voir **Figure 2-12**. Des chélates, qui ne seraient pas greffés de manière covalente aux particules, pourraient donc rester fixés à leur surface et ne seraient pas éliminés par filtration tangentielle. Pour rappel, l'objectif de la synthèse des AGuIX@DOTA est ensuite d'ajouter du bismuth pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Les acides carboxyliques des DOTA doivent donc être disponibles pour complexer les ions Bi^{3+} , les chélates qui ne sont pas greffés de manière covalente aux particules AGuIX doivent être éliminés. Pour cela, il suffit de diminuer le pH, on favorise alors la présence des acides carboxyliques (COOH) pour les chélates. Ceux uniquement liés aux particules par des interactions ioniques se décrochent et sont éliminés par filtration tangentielle (voir **Figure 2-12**). Pour purifier les particules AGuIX@DOTA nous avons donc réalisé plusieurs cycles de filtration tangentielle à pH acide.

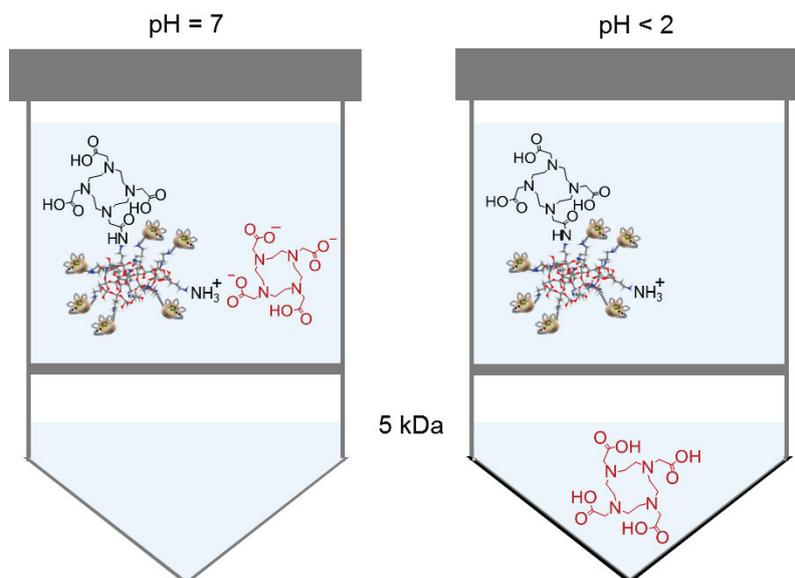


Figure 2-12 : Représentation simplifiée de la purification des particules AGuIX@DOTA par filtration tangentielle. Une diminution du pH est nécessaire pour éliminer les chélates qui ne sont pas greffés sur les particules.

Mode opératoire : Après la synthèse, les nanoparticules sont diluées dans l'eau afin d'avoir un taux de DMSO inférieur à 4 % et purifiées par filtration tangentielle sur une membrane en PES avec un seuil de coupure de 5 kDa. Cette étape est effectuée pour des pH inférieurs à 2 et en maintenant une concentration en nanoparticules supérieure à 30 mM. Lorsque tous les chélates non greffés ont été éliminés (pour un taux de purification supérieur à 6 000 en général), le pH est ajusté à 7,4. Puis, les particules sont filtrées sur 0,2 μm (élimination des poussières, bactéries,...) et lyophilisées. Le rendement en Gd de cette synthèse est déterminé par ICP-OES au laboratoire et est d'environ 50 %. Celui de DOTA est d'environ 40 % (voir paragraphes suivants).

Afin de s'assurer de l'efficacité des étapes de purifications, c'est-à-dire de vérifier que tous les chélates non greffés soient bien éliminés, nous avons mis au point une méthode spécifique. Cette méthode est basée sur la complexation d'ions Cu^{2+} et la séparation des différents composants des solutions colloïdales par HPLC, comme détaillé dans ce qui suit.

2.2.3.3 Méthode de suivi de purification des particules AGuIX@DOTA

On cherche à suivre la purification des particules AGuIX@DOTA. Pour cela, l'objectif est à la fois de séparer les différents constituants des solutions colloïdales (les chélates non greffés et les particules) et de les détecter pour les quantifier.

Les chélates DOTA en présence de cuivre Cu^{2+} peuvent former un complexe ($\log K = 22,3$)^[113] absorbant fortement à 700 nm ce qui permet de les détecter très facilement. Pour vérifier la présence des différents

constituants des solutions colloïdales, on prélève un échantillon des solutions, on y ajoute un excès d'ions Cu^{2+} et on étudie ensuite l'absorbance à 700 nm.

Mode opératoire : La complexation de Cu^{2+} est effectuée pour un pH de 3 environ afin d'éviter la présence d'hydroxyde de cuivre ($pK_s = 19,3$).^[114] Les solutions sont préparées pour une concentration en particules supérieure à 30 mM en Gd^{3+} . Elles sont ensuite chauffées à l'étuve à 80°C pendant 1 h 30 - 2 h.^[115] Il a été vérifié que ces conditions ne modifient pas la structure des particules AGuIX (taille, HPLC, relaxivité,...).

Une fois les échantillons préparés, il est possible de séparer les ions Cu^{2+} libres, les DOTA@Cu^{2+} et les $\text{AGuIX@DOTA@Cu}^{2+}$ par HPLC. La colonne et la méthode utilisées sont identiques à celles présentées précédemment pour vérifier la pureté des particules (colonne C4 et gradient d'acétonitrile dans l'eau). La seule différence est que cette fois on enregistre l'absorbance à 700 nm (et non plus 295 nm). Comme présenté sur la **Figure 2-13**, les ions Cu^{2+} ont un temps de rétention d'environ 2,5 min et les complexes DOTA@Cu^{2+} d'environ 3 min. Les particules ayant un temps de rétention d'environ 12,5 min, cette technique permettra bien de séparer les différents constituants des mélanges et donc de suivre les étapes de purification.

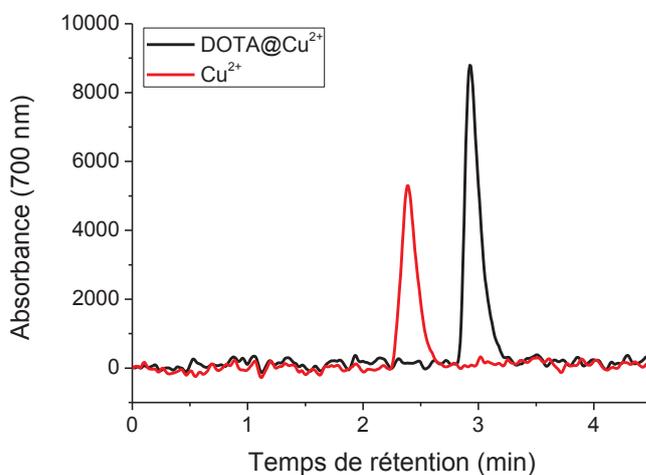


Figure 2-13 : Chromatogramme des ions Cu^{2+} et des complexes DOTA@Cu^{2+} (détection par absorbance à 700 nm).

Afin de mieux comprendre ces étapes, nous avons comparé les chromatogrammes obtenus à 700 nm lorsqu'un excès d'ions Cu^{2+} est ajouté à différents échantillons : des particules AGuIX (non fonctionnalisées), des particules AGuIX mises en contact de DOTA, des particules AGuIX mises en contact de DOTA-NHS avant et après purification acide. Les chromatogrammes sont présentés sur la **Figure 2-14**).

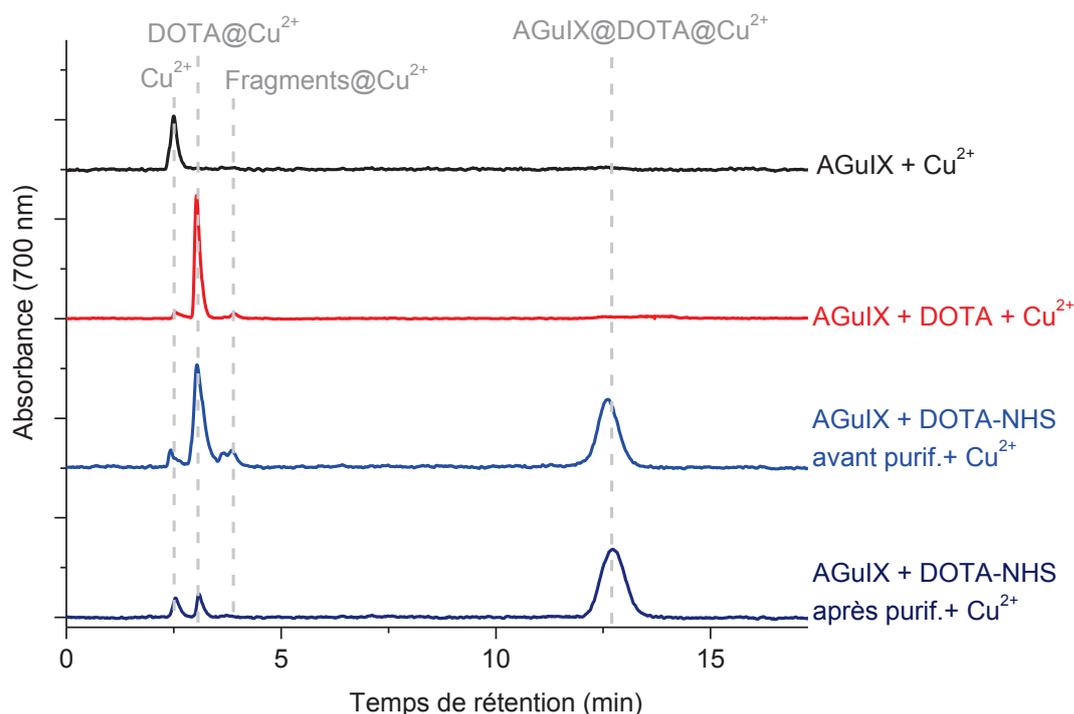


Figure 2-14 : Chromatogrammes HPLC ($A = 700 \text{ nm}$) obtenus pour différents échantillons de particules en présence d'un excès d'ions Cu^{2+} (par rapport aux DOTA libres) : particules AGuIX (noir), AGuIX mises en contact de DOTA (rouge) et AGuIX mises en contact de DOTA-NHS avant (bleu clair) et après (bleu foncé) purification. Complexation 1 h 30 à 80°C et un $\text{pH} = 3$, $[\text{Gd}^{3+}] = 22,5 \text{ mM}$,

- Le chromatogramme noir correspond aux particules AGuIX complexant un excès de cuivre. Seul un pic à 2,5 min est visible ce qui correspond aux ions Cu^{2+} . Ceci est cohérent avec le fait qu'on n'a presque pas de DOTA libres sur ces particules (1-2 %) et pas de chélates non greffés.
- Le chromatogramme rouge correspond aux particules AGuIX mises en contact de DOTA. Seules des interactions ioniques avec les particules peuvent avoir lieu, on observe un pic pour l'excès d'ions Cu^{2+} et un pic pour les complexes DOTA@Cu^{2+} non greffés.
- Les chromatogrammes bleus correspondent aux particules AGuIX mises en contact de DOTA-NHS avant et après purification acide (bleu clair et bleu foncé respectivement). Dans ce cas, des liaisons amides covalentes peuvent aussi se former (présence du groupement NHS), et on observe un pic supplémentaire à environ 12,5 min correspondant aux $\text{AGuIX@DOTA@Cu}^{2+}$. On constate de plus que le pic à 3 min, correspondant aux complexes DOTA@Cu^{2+} non greffés, diminue après purification. Le passage à pH acide permet bien d'éliminer les chélates DOTA non greffés et cette méthode permet de suivre les purifications. Il existe aussi de petits pics autour de 4 minutes qui correspondent à des fragments provenant de la dégradation du cœur de polysiloxane des particules.

On a ensuite réalisé des courbes étalons en Cu^{2+} et DOTA@Cu^{2+} . Cela nous a permis de quantifier à tout moment de la purification la proportion de DOTA-NHS greffés sur les particules et ceux qui ne l'étaient pas. Malgré tout, compte tenu d'un bruit de fond relativement important, cette technique se révèle être moins précise que celles présentées précédemment (luminescence des ions Eu^{3+} ou orange de xylénol) pour le dosage du nombre global de DOTA libres en solution. Notons aussi que même si la méthode HPLC permet bien de détecter les différents constituants, elle pourrait être optimisée (composition de l'éluant, gradient,...) afin de mieux séparer les ions Cu^{2+} , les complexes DOTA@Cu^{2+} et les fragments et ainsi d'avoir une plus grande précision pour la quantification.

Cette technique de caractérisation (complexation d'ions Cu^{2+} et séparation par HPLC) nous a permis de suivre la purification des particules AGuIX@DOTA et de vérifier que des filtrations tangentielle en milieu acide nous permettaient bien d'éliminer les chélates non greffés sur les particules. On a ainsi pu d'obtenir un produit propre, utilisable ensuite pour la complexation d'ions Bi^{3+} . Avant de passer à cette étape de complexation, nous allons présenter les caractérisations obtenues pour les particules AGuIX@DOTA .

2.2.3.4 Caractérisations

Le **Tableau 2-6** réunit les différentes caractérisations physico-chimiques réalisées sur les particules AGuIX@DOTA .

Tableau 2-6 : Caractérisations des particules AGuIX et AGuIX@DOTA .

Caractérisations	AGuIX	AGuIX@DOTA
DLS	$D_H = 3,6 \pm 0,8 \text{ nm}$	$D_H = 4,1 \pm 0,8 \text{ nm}$
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	$r_1 = 12,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; $r_2/r_1 = 1,3$	$r_1 = 18,0 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; $r_2/r_1 = 1,5$
HPLC (A = 295 nm)	Pureté de 96 % $t_R = 12,6 \text{ min}$ $l_{1/2} = 0,9 \text{ min}$	Pureté de 99 % $t_R = 12,5 \text{ min}$ $l_{1/2} = 1,0 \text{ min}$
Point isoélectrique	$\text{pH} = 7,6 \pm 0,2$	$\text{pH} = 5,6 \pm 0,2$
Spectroscopie IR	Pas d'épaulement à 1720 cm^{-1}	Bande de vibration à 1720 cm^{-1}

Les valeurs données par la DLS et la relaxométrie indiquent une légère augmentation de la taille des particules cohérente avec un greffage de DOTA. La présence d'une bande de vibration à 1720 cm^{-1}

(élongation des C=O des acides carboxyliques des DOTA libres) en spectroscopie IR confirme aussi la fonctionnalisation des AGuIX. Enfin, la diminution du point isoélectrique des particules peut s'expliquer par le remplacement de fonctions ammoniums positivement chargées par des carboxylates négativement chargés en surface de la particule.

Le nombre de DOTA libres a été quantifié à l'aide des techniques présentées précédemment : l'utilisation de la luminescence de l'euporium, de l'orange de xylénol, du cuivre/HPLC. On trouve respectivement 37, 36,5 et 37,7 % de DOTA libres ($\frac{DOTA \text{ libres}}{DOTA \text{ libres} + DOTA@Gd^{3+}}$), tous les résultats sont donc cohérents. Les particules AGuIX@DOTA obtenues présentent un nombre de DOTA libres en surface de l'ordre de 37 % ce qui permettrait de complexer un nombre important d'ions Bi³⁺ comparativement à la précédente méthode de synthèse (**partie 2.2.2**).

Les résultats de l'analyse élémentaire (présentés dans le **Tableau 2-7**) nous permettent de proposer la structure suivante pour les particules AGuIX@DOTA : (Gd₁APTES*_{3,4}TEOS*_{4,3}DOTAGA*_{1,02}DOTA*_{0,56})_n. Elle donne un pourcentage de DOTA libres en surface de 37 %. D'autre part, la différence de composition, notamment la quantité de TEOS* et APTES*, par rapport à des particules AGuIX indique un changement dans la structure des particules. Cela peut venir des étapes de synthèse et de purification au cours desquelles on éliminerait les plus petites particules.

Tableau 2-7 : Comparaison des pourcentages massiques obtenus expérimentalement par Filab ou calculés à partir de la structure proposée pour les particules AGuIX@DOTA.

	Gd	Si	C	N
%massique exp	8,1	11,3	23,48	7,05
%massique calc	8,1	11,1	23,84	7,01
Différence absolue	0	0,2	0,36	0,04

2.2.4 Conclusion

Afin de complexer du bismuth, il nous a fallu dans un premier temps augmenter le nombre de DOTA libres sur les particules AGuIX. La première étude a consisté à diminuer le pH lors des étapes de maturation et de purification de la synthèse. Les particules AGuIX_{acide} obtenues ont des propriétés physico-chimiques similaires aux AGuIX avec environ 10 % de DOTAGA libres en surface. Cette valeur n'étant pas assez importante pour espérer une amélioration significative de l'efficacité de la radiothérapie grâce au bismuth, une autre voie a ensuite été développée. Elle consiste à fonctionnaliser les particules AGuIX par des DOTA-NHS et nous a permis d'obtenir des taux de DOTA libre de près de 40 %. Cette technique présente trois avantages : (i) le matériau de départ, la particule AGuIX, est déjà produit en grande quantité en condition GMP, cette voie ne représente donc qu'une seule étape de synthèse supplémentaire, rapide et simple à mettre en œuvre ; (ii) en fonction du ratio initial entre les particules et les DOTA-NHS, il est possible de moduler facilement la quantité finale de DOTA libres ; (iii) on peut aisément utiliser un autre chélate,

choisi spécifiquement pour d'autres applications, par exemple le NODAGA-NHS comme cela sera présenté dans le **chapitre 3**.

2.3 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES AGuIX@DOTA@Bi³⁺

2.3.1 Synthèse

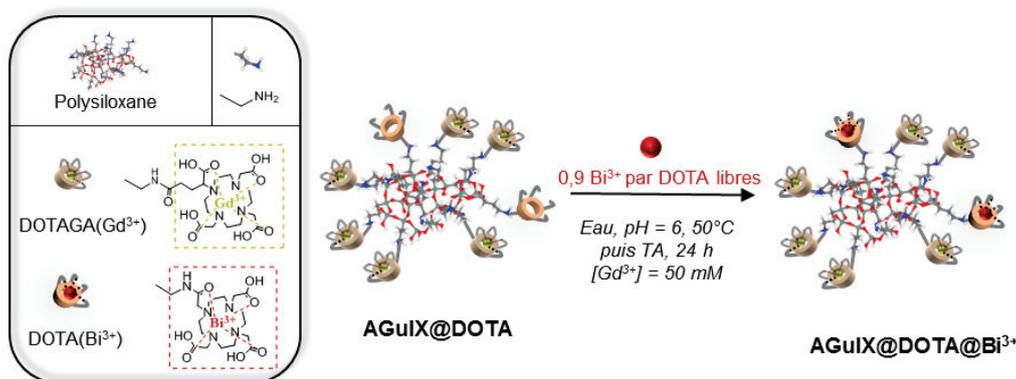


Figure 2-15 : Synthèse des particules AGuIX@DOTA@Bi³⁺ par complexation d'ions Bi³⁺ sur les AGuIX@DOTA

La synthèse des particules AGuIX@DOTA@Bi³⁺ est représentée sur la **Figure 2-15**. La difficulté réside dans la formation d'hydroxyde de bismuth et ce même pour de faibles valeurs de pH ou de concentrations (pKs ~ 30 pour Bi(OH)₃).^[116,117] Pour éviter cela, la solution mère de bismuth est préparée en milieu très acide (HCl à 6 M) et l'ajout se fait très progressivement sur les particules. Pour favoriser la complexation des particules, le pH est fixé à 6 et la température à 50°C durant environ 6 h, puis à température ambiante toute la nuit.^[116-118] La stabilité des particules est vérifiée au cours de la synthèse en mesurant leur taille par DLS et leurs relaxivités r_1 et r_2 ; elles ne montrent aucune évolution significative. De plus, la complexation peut être suivie par spectroscopie UV-visible comme indiqué sur la **Figure 2-16**, en effet le complexe DOTA@Bi³⁺ absorbe fortement à 310 nm.^[117]

Mode opératoire : Les particules AGuIX@DOTA sont dispersées dans l'eau pendant 1 h à pH = 7,4 et une concentration en DOTA libres d'environ 50 mM. Une solution de Bi³⁺ à 250 mM est préparée en dissolvant du BiCl₃ dans une solution d'acide chlorhydrique à 6 M. 0,3 équivalent de Bi³⁺ (par rapport aux DOTA libres) sont ensuite ajoutés goutte à goutte aux nanoparticules, sous agitation et à 50°C et le pH est ajusté à 6 par ajout d'une solution de NaOH à 10 M. Au bout de 2 h et 4 h, deux ajouts supplémentaires sont réalisés afin d'atteindre une quantité totale de Bi³⁺ de 0,9 équivalent (par rapport aux DOTA libres). La solution est ensuite laissée toute la nuit sous agitation à température ambiante. A la suite de cela, la solution est diluée dans l'eau et purifiée

par filtration tangentielle sur une membrane en PES avec un seuil de coupure de 50 kDa afin d'éliminer l'hydroxyde de bismuth éventuel. Les particules sont ensuite purifiées sur une membrane de seuil de coupure de 5 kDa comme présenté auparavant et le pH est fixé à 7,4. Après une étape de filtration sur 0,2 μm , les particules sont lyophilisées. Le rendement en Gd est déterminé par ICP-OES au laboratoire et est d'environ 70 %. Celui de Bi³⁺ est d'environ 68 %.

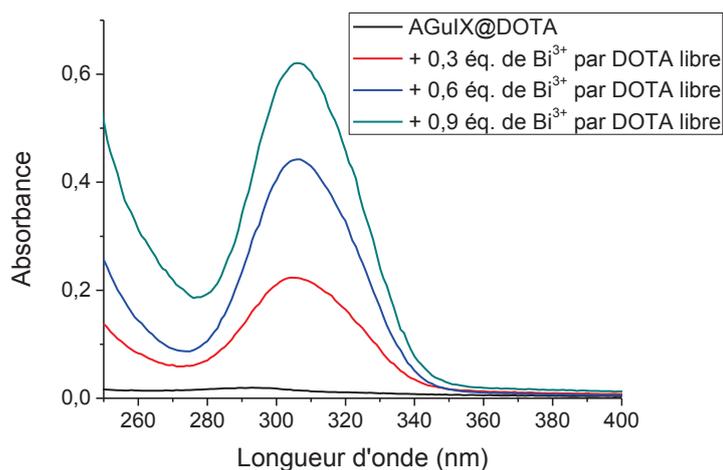


Figure 2-16 : Absorbance des particules au cours de l'ajout de Bi³⁺. Les solutions sont diluées par 450 environ dans l'eau ultra-pure avant d'effectuer la mesure. L'augmentation du signal à 310 nm est due à la formation de complexes DOTA@Bi³⁺.

2.3.2 Caractérisations

Les différentes caractérisations réalisées sur les particules AGuIX@DOTA@Bi³⁺ sont présentées dans le **Tableau 2-8**. La pureté des particules (déterminée par mesure d'absorbance à 295 nm en HPLC) est toujours très bonne, on conserve une petite taille ce qui laisse présager une élimination rénale et les valeurs de relaxivité restent en accord avec une utilisation comme agent de contraste positif en IRM. L'évolution du potentiel zéta des particules à un pH de 7 correspond à ce qui était attendu puisque la complexation d'ions Bi³⁺ diminue la charge globale négative des particules. De même la disparition de la bande de vibration d'élongation des liaisons C=O des acides carboxyliques à 1720 cm⁻¹ indique que la complexation du bismuth a bien eu lieu et que la quantité de DOTA libres a diminué. Ceci a été quantifié en complexant des ions Cu²⁺ et en séparant les constituants par HPLC (voir la **partie 2.2.3.3**), on passe ainsi de 37,7 % de DOTA libres pour les AGuIX@DOTA à 6,5 % de DOTA libres pour les AGuIX@DOTA@Bi³⁺.

Tableau 2-8 : Caractérisations des particules AGuIX@DOTA et AGuIX@DOTA@Bi³⁺.

Caractérisations	AGuIX@DOTA	AGuIX@DOTA@Bi ³⁺
DLS	D _H = 4,1 ± 0,8 nm	D _H = 4,5 ± 0,9 nm
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	r ₁ = 18,0 s ⁻¹ mM ⁻¹ ; r ₂ /r ₁ = 1,5	r ₁ = 22,0 s ⁻¹ mM ⁻¹ ; r ₂ /r ₁ = 1,6
HPLC (A = 295 nm)	Pureté de 99 % t _R =12,5 min l _{1/2} = 1,0 min	Pureté de 97 % t _R =12,0 min l _{1/2} = 0,6 min
Potentiel zéta pour pH = 7	-7,5 mV	-3,6 mV
Spectroscopie IR	Bande de vibration à 1720 cm ⁻¹	Pas d'épaulement à 1720 cm ⁻¹
Nombre de DOTA libres (Cu ²⁺ et HPLC)	37,7 %	6,5 %

Les résultats de l'analyse élémentaire présentés dans le **Tableau 2-9** sont cohérents avec la structure suivante pour les AGuIX@DOTA@Bi³⁺ : (Gd₁APTES*_{3,0}TEOS*_{6,2}DOTAGA*_{1,0}DOTA*_{0,62}Bi_{0,52})_n. Elle reflète la présence de 6,2 % DOTA libres, ce qui est cohérent avec la détermination par complexation de Cu²⁺ et utilisation de l'HPLC. La différence de quantité de TEOS* et APTES* par rapport au AGuIX@DOTA peut encore s'expliquer par les différentes étapes de purification mises en place.

Tableau 2-9 : Comparaison des pourcentages massiques obtenus expérimentalement par Filab ou calculés à partir de la structure proposée pour les particules AGuIX@DOTA@Bi³⁺.

	Gd	Si	C	N	Bi
%massique exp	8,31	14	23,7	6,9	6,1
%massique calc	8,31	13,7	24,0	7,0	5,7
Différence	0	0,3	0,3	0,1	0,4

2.3.3 Stabilité

Avant d'évaluer l'efficacité des particules AGuIX@DOTA@Bi³⁺ comme agent radiosensibilisant, leur stabilité en solution dans l'eau a été étudiée. Les expériences ont été réalisées pour une concentration [Gd³⁺] = 25 mM, à 37°C et sur 48 h. Le pH des solutions a été maintenu à 7 pour mimer des tissus sains ou à 5 pour mimer des tissus tumoraux dont l'environnement est en général plus acide.^[119,120] L'évolution des propriétés magnétiques, la libération de Gd³⁺ et la libération de Bi³⁺ ont été étudiées.

L'instant où les particules lyophilisées sont redispersées dans l'eau correspond au temps $t = 0$ de l'expérience. Le pH est ajusté immédiatement avec une solution de HCl suffisamment concentrée pour négliger les variations de volume.

- **Relaxométrie**

L'évolution des temps de relaxation T_1 et T_2 des solutions non diluées a été évaluée au cours du temps. Cela nous informe sur une modification potentielle de la structure (taille, rigidité, décomplexation de Gd^{3+} ...) des particules. Aucune évolution dans le temps ou différence entre les pH n'est constatée comme le montre le **Tableau 2-10**. Pour comparaison, si les particules étaient complètement dégradées, c'est-à-dire si le cœur de polysiloxane était complètement hydrolysé, les valeurs de T_1 et T_1/T_2 seraient environ de 7,5 ms et 1.2 respectivement.

Tableau 2-10 : Stabilité des particules : évolution du temps de relaxation T_1 et du ratio T_1 / T_2 en fonction du temps pour les particules AGuIX@DOTA@Bi³⁺ dans l'eau à pH = 5 ou pH = 7, 37°C, $[Gd^{3+}] = 25$ mM.

	Temps (h)	1	3	5	7	24	48
T_1 (ms)	pH = 7	1,87 ± 0,03	1,92 ± 0,03	1,92 ± 0,04	1,93 ± 0,05	1,84 ± 0,03	1,81 ± 0,03
	pH = 5	1,85 ± 0,03	1,88 ± 0,03	1,90 ± 0,04	1,91 ± 0,05	1,86 ± 0,03	1,82 ± 0,03
T_1/T_2	pH = 7	1,52 ± 0,04	1,55 ± 0,04	1,56 ± 0,05	1,60 ± 0,05	1,56 ± 0,04	1,56 ± 0,04
	pH = 5	1,50 ± 0,04	1,53 ± 0,04	1,53 ± 0,05	1,54 ± 0,06	1,49 ± 0,04	1,48 ± 0,04

- **Décomplexation de Gd^{3+}**

Comme nous l'avons vu dans le **chapitre 1**, les ions Gd^{3+} non complexés sont toxiques, leur décomplexation doit donc être surveillée. Pour cela nous avons utilisé l'orange de xylénol présenté dans la **partie 2.2.2.3**. Pour différents intervalles de temps, un échantillon des solutions à pH = 7 ou pH = 5 est prélevé et ajouté à une solution d'orange de xylénol dans un tampon acétate (pH = 5,8). Au bout de 30 minutes les spectres d'absorbance UV-visible sont enregistrés et le ratio des absorbances à 573 et 433 nm calculés. Les résultats présentés dans le **Tableau 2-11** ne montrent pas de différence significative entre les deux pH étudiés ou dans le temps. Aucune présence de Gd^{3+} n'est détectable. Pour comparaison, un ajout volontaire de Gd^{3+} (0,25 % de la quantité totale de Gd^{3+} des particules) a été réalisé, dans ce cas, le ratio des absorbances est de $0,45 \pm 0,02$.

Tableau 2-11 : Etude de la libération potentielle d'ions Gd^{3+} pour les particules $AGuIX@DOTA@Bi^{3+}$ dans l'eau à $pH = 5$ ou $pH = 7$, $37^{\circ}C$, $[Gd^{3+}] = 25$ mM. Entre 1 h et 48 h des échantillons sont ajoutés à une solution d'orange de xylénol et l'évolution du ratio des absorbances à 573 et 433 nm étudiée.

	Temps (h)	1	3	5	7	24	48
$A(573\text{ nm})$	$pH = 7$	$0,30 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$
$A(433\text{ nm})$	$pH = 5$	$0,29 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$

- **Décomplexation de Bi^{3+}**

Même si le bismuth présente une toxicité relativement faible,^[96] il est nécessaire de vérifier la stabilité des complexes $DOTA@Bi^{3+}$ et donc l'intégrité des particules au cours du temps. Nous avons analysé leur comportement en absorption UV-visible. L'orange de xylénol peut en effet être utilisé pour détecter les ions Bi^{3+} .^[121] Le complexe formé absorbe à 500 nm et sa formation s'accompagne d'une modification des absorbances à 573 et 433 nm (voir la **Figure 2-17**).

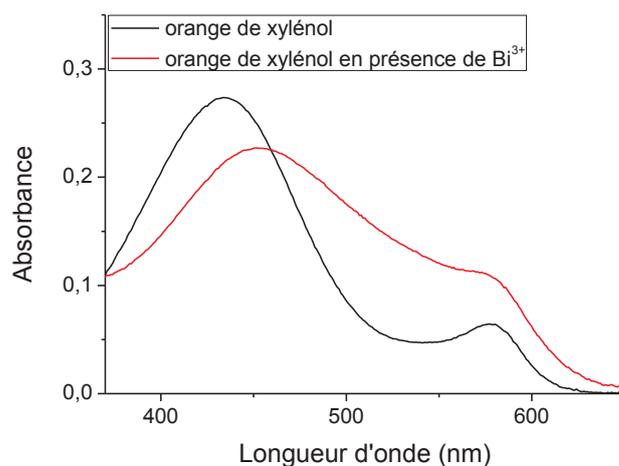


Figure 2-17 : Spectre d'absorbance d'une solution d'orange de xylénol dans un tampon acétate ($pH = 5,8$) en présence ou non d'ions Bi^{3+} .

Les spectres enregistrés pour étudier la décomplexation de Gd^{3+} peuvent donc être aussi utilisés pour étudier la décomplexation de Bi^{3+} . Comme cela est représenté sur le **Tableau 2-12**, aucune décomplexation de Bi^{3+} n'est détectée. Pour comparaison, un ajout volontaire de Bi^{3+} (0,25 % de la quantité totale de Bi^{3+} des particules) a été réalisé, dans ce cas, l'absorbance est de $0,118 \pm 0,008$.

Tableau 2-12 : Etude de la libération potentielle de Bi^{3+} pour les particules $\text{AGuIX@DOTA@Bi}^{3+}$ dans l'eau à $\text{pH} = 5$ ou $\text{pH} = 7$, 37°C , $[\text{Gd}^{3+}] = 25 \text{ mM}$. Entre 1 h et 48 h des échantillons de nanoparticules sont ajoutés à une solution d'orange de xylénol et l'évolution de l'absorbance à 500 nm est étudiée.

Temps (h)		1	3	5	7	24	48
$A(500 \text{ nm})$	$\text{pH} = 7$	0,082	0,081	0,083	0,081	0,081	0,082
$\pm 0,008$	$\text{pH} = 5$	0,083	0,083	0,082	0,084	0,081	0,081

Tous ces résultats illustrent la stabilité des particules $\text{AGuIX@DOTA@Bi}^{3+}$ que ce soit concernant leur taille ou l'encapsulation de Gd^{3+} et de Bi^{3+} . Cependant, la quantité de gadolinium ou de bismuth libres ainsi que leur décomplexation gagneraient à être quantifiées de manière plus précise ce qui nécessiterait la mise en place de nouvelles techniques.

2.4 RESULTATS IN VITRO ET IN VIVO, PUBLICATION

Afin de valider l'intérêt des particules $\text{AGuIX@DOTA@Bi}^{3+}$ pour la radiothérapie nous avons travaillé en collaboration avec l'université d'Harvard aux Etats-Unis. Des expériences sur cellules cancéreuses puis sur animaux porteurs de tumeurs ont été réalisées par Alexandre Detappe sous la supervision de Ross Berbeco.

Nous avons travaillé sur un modèle de cancer du poumon pour lequel des augmentations de dose d'irradiation entraînent une toxicité pour les tissus sains environnant (poumon, cœur). Le but était de montrer que les particules pouvaient améliorer la radiothérapie pour des conditions d'irradiations cliniques. Cela signifie qu'elles permettaient d'augmenter la mort des cellules tumorales par rapport à une irradiation seule, tout en préservant les tissus sains.

Les résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Nano Letters* en 2017. Dans cette publication, les particules $\text{AGuIX@DOTA@Bi}^{3+}$ sont notées SiGdBiNP.

2.4.1 Résumé des résultats in vitro et in vivo

In vitro, 24 h après incubation de 0,5 mM (en Gd) de nanoparticules SiGdBiNP avec des cellules cancéreuses (A549 NSCLC) aucune toxicité n'a été observée. D'autre part, les expériences ont montré la possibilité d'utiliser les particules comme agent de contraste en IRM et en CT, le contraste CT étant du même ordre de grandeur que celui des agents utilisés en clinique. Les expériences de radiosensibilisation ont été réalisées avec un irradiateur de 6 MV clinique. Comme le montre la **Figure 2-18-a**, la présence de nanoparticule SiBiGdNP permet bien d'augmenter de manière significative la mort des cellules cancéreuses par rapport à une irradiation seule. Le facteur d'augmentation de dose a pu être déterminé, il est de 1,99 ($P < 0,001$).

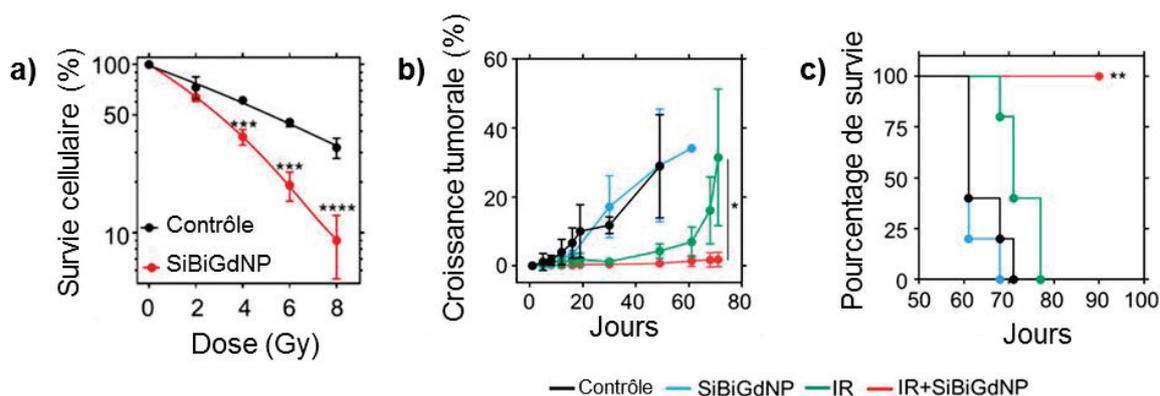


Figure 2-18 : (a) Efficacité *in vitro* des particules SiGdBINP en radiothérapie (cellules A459 NSCLC). Trois astérisques correspondent à une valeur $P < 0,001$ et quatre astérisques correspondent à une valeur $P < 0,0001$. (b) et (c) Test *in vivo* de l'efficacité des particules SiGdBINP en radiothérapie. (b) Volume tumoral moyen de chaque groupe ($n = 5$ pour chaque groupe). (c) Survie globale de chaque groupe ($n = 5$ pour chaque groupe). Un seul astérisque correspond à une valeur $P < 0,05$ et deux astérisques à une valeur $P < 0,01$.

Les expériences *in vivo* sur souris, ont été réalisées pour un modèle d'adénocarcinome du poumon (A459, xénotransplante sous-cutanée) avec une chronologie imagerie-irradiation imitant celle utilisée en clinique. Après injection intraveineuse des nanoparticules SiGdBINP (420 mg/kg), leur propriétés pharmacocinétiques ont été évaluées par imageries CT et IRM. Elles ont montré que les particules s'accumulent dans les tumeurs par ciblage passif. Elles sont d'ailleurs toujours présentes dans la tumeur 6 h post injection (0,49 % de la dose injectée). Elles sont éliminées majoritairement et rapidement par voie rénale ce qui était attendu au vu de leur petite taille. La radiothérapie a été réalisée 30 min post-injection avec un irradiateur 6 MV. Ce moment a été choisi car il correspond à celui où l'accumulation des particules dans la tumeur est maximale. Les **Figure 2-18-b et c** montrent que le groupe traité avec les particules SiGdBINP présente une amélioration significative du contrôle de la croissance tumorale et de la survie par rapport aux groupes contrôles. Les dommages induits aux tumeurs et aux tissus sains ont été évalués en quantifiant les ruptures des doubles brins d'ADN 30 min après irradiation. Dans les tissus sains comme dans les tumeurs, une augmentation significative des ruptures double brins est observée pour les groupes irradiés par rapport aux groupes témoins non irradiés.

Les résultats de cette étude sont donc très encourageants pour l'utilisation de ces particules pour la radiothérapie guidée par imagerie. Les particules SiGdBINP permettraient de mieux contrôler la croissance tumorale et d'augmenter la durée de vie des patients.

2.4.2 Publication

Ultrasmall Silica-Based Bismuth Gadolinium Nanoparticles for Dual Magnetic Resonance–Computed Tomography Image Guided Radiation Therapy

Alexandre Detappe,^{*,†,‡,§} Eloise Thomas,[§] Mark W. Tibbitt,^{||} Sijumon Kunjachan,^{†,‡} Oksana Zavidij,[⊥] Nishita Parnandi,[†] Elizaveta Reznichenko,[†] François Lux,[§] Olivier Tillement,[§] and Ross Berbeco^{*,†,‡}

[†]Department of Radiation Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, United States

[‡]Department of Radiation Oncology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, United States

[§]Institut Lumière Matière, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5306, 69622 Villeurbanne, France

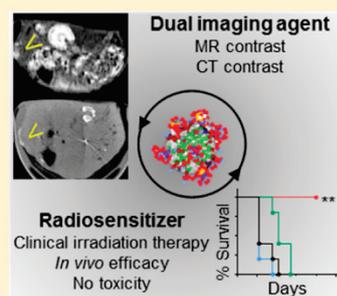
^{||}David H. Koch Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139, United States

[⊥]Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Broad Institute at Harvard and MIT, Boston, Massachusetts 02142, United States

Supporting Information

ABSTRACT: Selective killing of cancer cells while minimizing damage to healthy tissues is the goal of clinical radiation therapy. This therapeutic ratio can be improved by image-guided radiation delivery and selective radiosensitization of cancer cells. Here, we have designed and tested a novel trimodal theranostic nanoparticle made of bismuth and gadolinium for on-site radiosensitization and image contrast enhancement to improve the efficacy and accuracy of radiation therapy. We demonstrate in vivo magnetic resonance (MR), computed tomography (CT) contrast enhancement, and tumor suppression with prolonged survival in a non-small cell lung carcinoma model during clinical radiation therapy. Histological studies show minimal off-target toxicities due to the nanoparticles or radiation. By mimicking existing clinical workflows, we show that the bismuth–gadolinium nanoparticles are highly compatible with current CT-guided radiation therapy and emerging MR-guided approaches. This study reports the first in vivo proof-of-principle for image-guided radiation therapy with a new class of theranostic nanoparticles.

KEYWORDS: Radiosensitization, image-guided radiation therapy, bismuth, nanoparticle, nanomedicine



Clinical radiation therapy is a noninvasive means of killing cancer cells and effectively reducing tumor burden. This method of treatment is prescribed for more than 50% of cancer patients. Although radiation therapy is highly effective for the majority of cancer patients,^{1,2} the nonspecificity of irradiation can result in toxicity for surrounding tissues.³ This is especially problematic for patients with tumors that require high radiation doses or are difficult to target with image-guidance.^{4,5} For example, it has been demonstrated that dose escalation for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients improves the overall survival but at the risk of toxicity in the lungs and heart.^{6–8} For centrally located early-stage NSCLC, proximity of the mediastinum can preclude the use of ablative radiation techniques like stereotactic body radiation therapy (SBRT).⁹ This is exacerbated by the large movements exhibited by some lung tumors due to respiration during therapy.^{10,11} Noninvasive imaging modalities can be used to improve the precision and the accuracy of clinical radiation treatment.¹² To mitigate off-target toxicity, image-guided radiation therapy (IGRT) has

been developed to localize tumors with cone-beam computed tomography (CBCT) images acquired just prior to the therapeutic irradiation.¹³ More recently, the use of magnetic resonance (MR) image-guided radiation therapy has enabled more-precise and accurate localization and treatment, especially for tumors embedded within soft tissues.^{14,15} Although these methods increase dose conformity to the target, some irradiation of healthy tissues is unavoidable.

Radiosensitizers have been developed to amplify the effects of radiation within tumor cells; however, some nontargeted chemical radiosensitizers have resulted in some severe toxicities.^{16,17} To solve this problem, high-atomic-number nanoparticles have been proposed as next-generation radiosensitizers or radiation-dose-amplification agents. These nanoparticles are only activated when irradiated.¹⁸ In this approach,

Received: December 5, 2016

Revised: January 31, 2017

Published: February 1, 2017

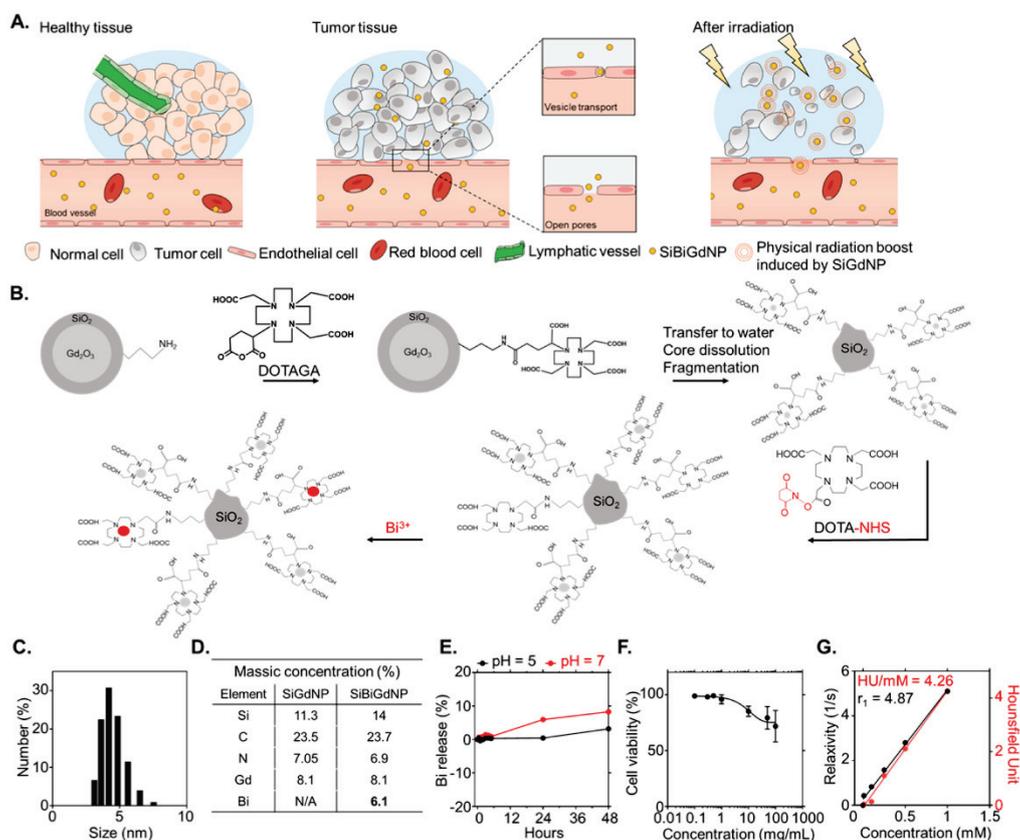


Figure 1. Design and synthesis of SiBiGdNP. (a) Schematic representation of the SiBiGdNP uptake in a tumor and efficacy upon external radiation. (b) (Not to scale) The Gd_2O_3 core and its polysiloxane network are grafted to DOTAGA ligands before being transferred to water to dissolve the core. The final fragmentation into sub-5 nm silica-based gadolinium nanoparticles (SiGdNP) was then performed based on the method from Mignot et al.³⁸ At this stage of the synthesis, the Gd^{3+} atoms were complexed by the DOTAGA ligands. After, DOTA-NHS ligands were grafted to the surface to entrap free Bi^{3+} atoms into the final complex. (c) Dynamic light scattering measurements show a SiBiGdNP size of 4.5 ± 0.9 nm. (d) Elemental characterization by ICP-OES of the nanoparticle composition before and after the grafting of Bi^{3+} . (e) Percent release of free Bi^{3+} atoms measured by absorbance (305 nm) at pH = 5 and pH = 7 over 48 h. (f) Toxicity of the SiBiGdNP as a function of the concentration 24 h post-incubation. (g) MRI (relativity) and CT (Hounsfield units) linear relation with concentration of nanoparticles (metal) in aqueous solution.

photons from the clinical radiation beam interact with high-atomic-number atoms in the nanoparticles, generating secondary photoelectrons or Auger electrons, which deposit a local boost of energy (within a few microns of the nanoparticle).^{19,20} This induces biological stress in nearby cells and may also increase the local efficacy of the therapy.²¹ Coupling this novel therapy concept with quantitative volumetric image guidance will enable further optimization and individualization of radiation delivery to maximize therapeutic effect.

Looking toward clinical translation, focus should be put on nanoparticles that are compatible with clinical imaging techniques. Although many investigators have explored nanoparticles with optical agents, this modality is very limited clinically.^{22,23} To overcome this limitation, gadolinium-based nanoparticles have been designed and tested.^{24–26} Gadolinium atoms can provide both magnetic resonance imaging (MRI) contrast and radiation dose amplification. However, the probability for photoelectric interaction with a given atom is proportionate to Z^3 , where Z is the atomic number of the atom.

Therefore, gadolinium ($Z_{Gd} = 64$) has a much lower probability of interaction than gold ($Z_{Au} = 79$) or bismuth ($Z_{Bi} = 83$), for example. Investigators have exploited this property of bismuth in the design of nanoparticles for computed tomography (CT) contrast and radiation sensitization.^{27–30} A shortcoming of previous studies of the latter application has been the use of low-energy photons that are not suitable for the vast majority of clinical radiation therapy procedures.

In the present study, we present a new theranostic nanoparticle that is suitable for MR and CT contrast as well as amplification of radiation dose under clinical irradiation conditions. This silica-based nanoparticle (SiBiGdNP) contains gadolinium and bismuth atoms that are sequestered by pendant DOTA ligands. The gadolinium atoms provide MRI T_1 contrast, while both metals (gadolinium and bismuth) provide CT contrast. In addition, both the gadolinium and bismuth atoms enable radiation dose amplification (Figure 1A).

Nanoparticle Characterization and in Vitro Proof of Concept. The preparation of the silica-based bismuth–

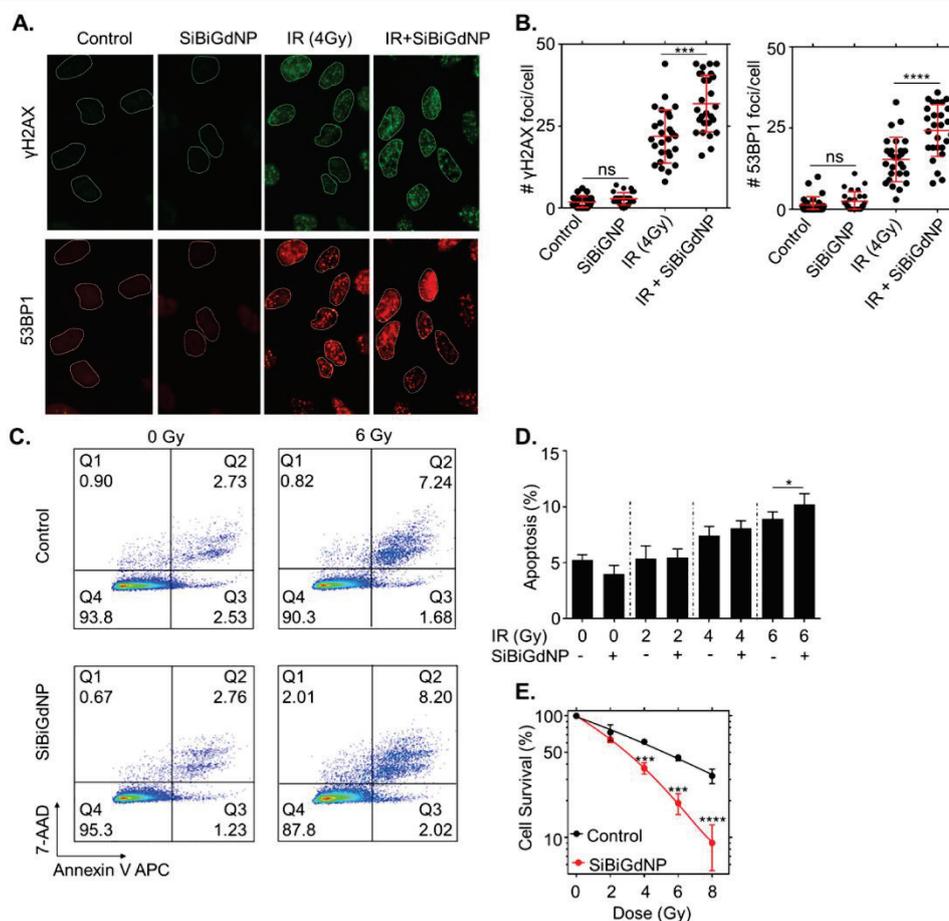


Figure 2. In vitro radiation dose amplification by SiBiGdNP and clinical 6 MV irradiation. (a) Qualitative representation of γ H2AX and 53BP1 foci formation, with and without 4 Gy irradiation, with and without nanoparticles, 15 min post-irradiation. (b) Number of γ H2AX foci and 53BP1 foci per cell ($n = 3$). (c) Qualitative flow cytometry data plot indicating the increase in apoptosis caused by the presence of SiBiGdNP under 6 MV irradiation. (d) Results of the FACS study show the increasing apoptosis induced by SiBiGdNP and irradiation. (e) Clonogenic assay ($n = 3$) showing the long-term effect induced by the presence of the nanoparticles during irradiations. All data are represented as a mean \pm SD. P values were calculated using two-tailed t test. A single asterisk indicates $P < 0.05$, three asterisks indicate $P < 0.001$, and four asterisks indicate $P < 0.0001$.

gadolinium nanoparticles (SiBiGdNP) was based on a top-down process leading first to the synthesis of a precursor polysiloxane core DOTA–Gd complex (Figure 1B and the Supporting Information). Afterward, the surface of the polysiloxane network was modified by grafting additional DOTA chelates to the surface followed by the complexation of Bi^{3+} ions. The attenuated total reflectance Fourier transform infrared, UV–vis absorbance, and high-performance liquid chromatography spectrum confirmed the complexation of the Bi^{3+} by the DOTA chelates on the nanoparticle (Figure S1). The choice of the DOTA as the complexation agent was made because of its high stability, as described by its log K values, DOTA–Gd = 23.6^{31} and DOTA–Bi = 30.3^{32} .

The hydrodynamic diameter (4.5 ± 0.9 nm) of the nanoparticle (Figure 1C) is below the 10 nm kidney filtration threshold, minimizing potential off-target side effects.³³ The ζ potential of the SiBiGdNP at pH = 7 was measured as -3.6

mV. The polysiloxane base of the nanoparticle was covalently bound to an average of ~ 10 DOTA ligands complexed with gadolinium atoms and an average of approximately five DOTA ligands complexed with bismuth atoms (Figure 1D). The absorbance measurements demonstrated that more than 95% of the bismuth remains attached under physiological conditions during the period of greatest blood (Figure 1E). Cytotoxicity is measured in vitro 24 h post-incubation, with the nanoparticles at a concentration ~ 30 times higher than the in vivo injected dose (420 mg/kg) used in this study (Figure 1F). Phantom measurements of MRI and CT contrast demonstrated detectability down to a concentration of 0.1 mg/mL (Figure 1G). The SiBiGdNP acted as a T_1 positive contrast agent with a longitudinal relaxivity (r_1) and a transverse relaxivity (r_2) measured, at 7 T, to be $r_1 = 4.87 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ and $r_1/r_2 = 1.46$, which is slightly higher than other FDA-approved MR contrast

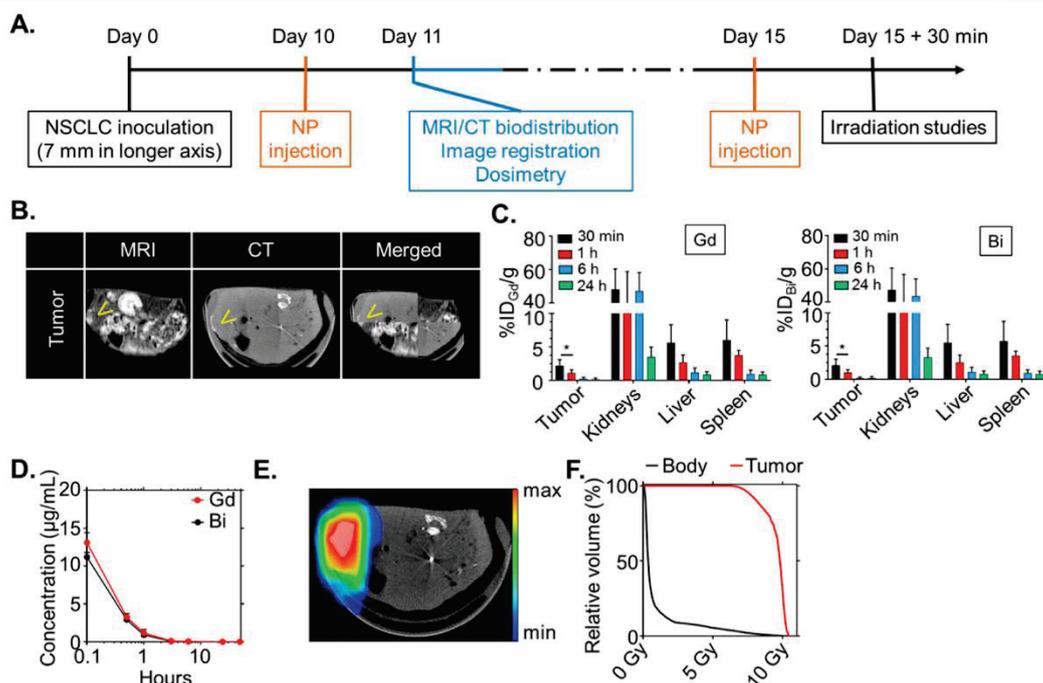


Figure 3. Preclinical experimental workflow based on a clinical workflow. (a) Experimental timeline based on a current clinical workflow for MR-guided radiation therapy. (b) Fusion of the CT and MRI images. Yellow arrows indicate the increased contrast in the tumor. (c) Biodistribution study performed by ICP-MS in six animals per time point after intravenous injection of 420 mg/kg of SiBiGdNP. Separate analysis of Bi and Gd shows strong colocalization in each organ. (d) Pharmacokinetic study (n = 5) of SiBiGdNP in blood samples. (e) Dosimetry study performed from a single fraction of 10 Gy irradiation delivered from a clinical linear accelerator (6 MV). (f) Dose-volume histogram showing the radiation dose distribution in the tumor and in the rest of the body. A single asterisk indicates $P < 0.05$.

agents.³⁴ The CT contrast was measured as 4.26 HU mM^{-1} , which is in the range of clinically used CT contrast agents.³⁵

Both gadolinium ($Z = 64$) and bismuth ($Z = 83$) produced photoelectrons and Auger electrons when irradiated by clinical 6 MV beam.¹⁸ This local radiation dose amplification was confirmed by an increase in γH2AX and S3BP1 foci ($P = 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively) (Figure 2A,B). A significant increase in apoptosis was observed after coadministration of clinical radiation and SiBiGdNP ($10.2 \pm 0.8\%$ versus $8.9 \pm 5\%$, $n = 3$, $P = 0.047$) (Figure 2C,D). The effect combined treatment on clonogenic cell survival results in a dose enhancement factor of 1.99 ($P < 0.001$) (Figures 2E and S2).

In Vivo Theranostic Applications. Animal experiments were performed under protocols approved by the DFCI Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). To demonstrate in vivo efficacy, a fast-growing subcutaneous xenograft solid tumor model (A549 lung adenocarcinoma) was treated with clinical radiation therapy after intravenous administration of SiBiGdNP. In vivo experiments were performed with a timeline that mimics a typical clinical workflow (Figure 3A). The pharmacokinetics of SiBiGdNP were measured in blood samples over 24 h, and the kinetic of the nanoparticles was assessed at 15 min and 3, 6, and 24 h post-injection by MRI and CT acquisitions (Figures 3B–D and S3).

Due to the tumor's fast growth and its poor vascularization, nanoparticles were still visible 6 h post-injection with 0.49% ID

in the tumor (Figure S3). Accumulation was observed in kidneys, liver, and spleen (Figure 3C), with rapid clearance as expected on the basis of the small size of the nanoparticles. Only 0.39% ID of the SiBiGdNP remained in the blood after 24 h (Figure 3D), and no organs other than the kidneys had more than 2% ID 6 h post-injection (Figure 3C). Toxicity was assessed by hematoxylin and eosin (H&E) staining of kidney, liver, spleen, and heart samples 24 h after systemic injection (Figure S4).

A radiation dosimetry study was performed based on an MR-guided radiation therapy clinical workflow. Organs were segmented on the MR images and then registered with the CT scan (Figure 3B) to calculate the radiation dose distribution, as is performed in the clinic for similar procedures (Figure 3E,F). Clinical treatment planning and radiation dose calculation software were used to simulate a single 10 Gy fraction delivered by a clinical linear accelerator (Varian Medical Systems, Inc.) (Figure S5).

Therapeutic efficacy was studied with radiation therapy delivered at the time of maximum nanoparticle uptake in the tumor, as determined by the preceding imaging study. This timing was found to be 30 min post-injection (3.54% ID) and was similar to that of a previous study²⁴ conducted with nanoparticles of comparable size (Figures 3C and S3). A total of 10 cm of water-equivalent material was placed between the mice and the radiation source to provide clinically realistic scatter conditions (Figure S5). Body-weight was monitored

post-irradiation (Figure 4A) as one assessment of the safety of the treatment. To examine the long-term efficacy, a tumor

— Control — SiBiGdNP — IR — IR+SiBiGdNP

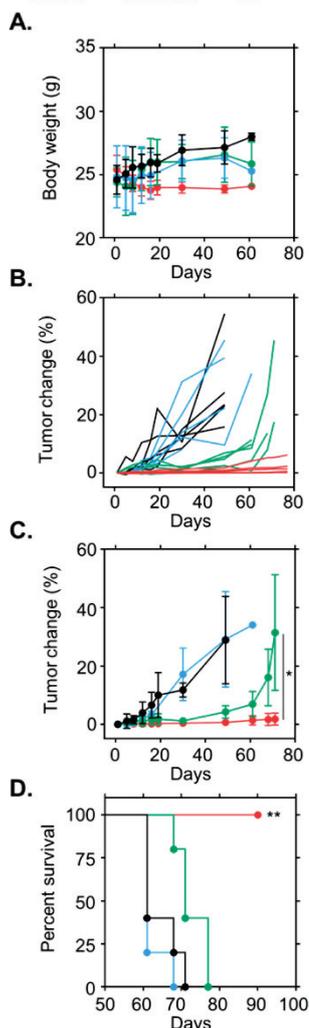


Figure 4. In vivo therapeutic efficacy SiBiGdNP. (a) Body weight measurements demonstrate no gross toxicity. (b) Spider plot of the tumor size evolution as a function of time. (c) Mean tumor volume of each group ($n = 5$ per group). (d) Overall survival of each treatment cohort ($n = 5$ per group). All data are represented as a mean \pm SD; a single asterisk indicates $P < 0.05$, and two asterisks indicate $P < 0.01$.

growth (Figure 4B,C) and survival (Figure 4D) study was performed. Both control groups showed a rapid progression of the tumor burden with no mice surviving more than 70 days after therapy. Mice treated with 10 Gy irradiation only (no nanoparticles) showed a limited response during the first 30 days followed by rapid tumor growth, with no mice in this group surviving more than 80 days. The group treated with SiBiGdNP followed by radiation showed statistically significant

improvement in both tumor growth delay ($P = 0.045$) (Figure 4B,C) and survival compared to the irradiation control group ($P = 0.0059$) (Figure 4D).

Damage to tumor and healthy tissues were evaluated by quantification of double-strand DNA breaks by γ H2AX staining 30 min post-irradiation³⁶ (Figure 5A). In the healthy tissues, no significant increase of DNA double-strand breaks was observed for the irradiated groups compared to both control (non-irradiated) groups. In the tumors, a significant increase in DNA damage was observed in the tumor when the irradiation was performed with ($89.33 \pm 14.3\%$) and without SiBiGdNP ($67.31 \pm 11.36\%$) compared to the control groups ($8.1 \pm 4.3\%$ and $5 \pm 1.3\%$, respectively) (Figure 5B).

Conclusions. Radiation therapy is entering a new era with the emergence of new clinical concepts for image-guided radiation therapy (IGRT), exemplified by the recent commercial development of the MR-Linac. With these techniques, clinicians can image tumors during radiation delivery and modify the treatment beam accordingly.

The design, synthesis, and application of multifunctional nanoparticles provide a chemical route to complement the hardware advances in IGRT. Specifically, theranostic nanoparticles that enable dual-modality tumor imaging and radiation-dose enhancement will provide clinicians with more options for precise tumor localization while mitigating toxicity in surrounding healthy tissue. In this vein, high-atomic-number nanoparticles have been developed that improve contrast during noninvasive imaging and amplify the radiation dose, enabling more accurate and effective cancer therapy, simultaneously.

Few nanotechnologies for radiation therapy have progressed to clinical trials. A hafnium colloid is under investigation for radiation-dose amplification following intratumoral injection (NCT01433068). Gadolinium NPs (NCT02820454) are being tested for MR imaging and radiation-dose amplification after systemic intravenous injection.

We have described a novel SiBiGdNP for dual-modality (MR and CT) contrast enhancement and clinical radiation dose amplification. The Gd atoms serve as a positive MR T_1 contrast agent, and the inclusion of Gd and Bi atoms enables CT imaging contrast. The synthesis of the SiBiGdNP employs a top-down process based on a silica construct bearing DOTA-Gd, which has been shown to be safe for routine intravenous injection.^{25,37} Surface modification with additional DOTA ligands enables the inclusion of gadolinium and bismuth atoms while remaining ultrasmall (~ 5 nm). Experimental confirmation of safety and colocalization of Bi and Gd post administration indicates that the DOTA chelation strategy is effective in retaining these elements. Systemically administered SiBiGdNP provide significant in vivo radiation dose amplification, as demonstrated in vitro and in vivo during clinical radiation therapy delivery, resulting in greater tumor control and longer survival in mouse models of lung cancer.

Methods. Silica-Based Bismuth-Gadolinium Nanoparticles. The SiGdNP (no bismuth) nanoparticles were synthesized by a top-down process described by Mignot et al.³⁸ (see the Supporting Information). Sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38%), dimethyl sulfoxide (DMSO, > 99.5%), and BiCl₃ (>W98%) were purchased from Aldrich Chemical. Acetonitrile (CH₃CN, > 99.9%) was purchased from Carlo Erba. Trifluoroacetic acid (TFA, > 99%) was purchased from Alfa Aesar. Copper sulfate pentahydrate (CuSO₄·5H₂O, 98%) was purchased from Merck.

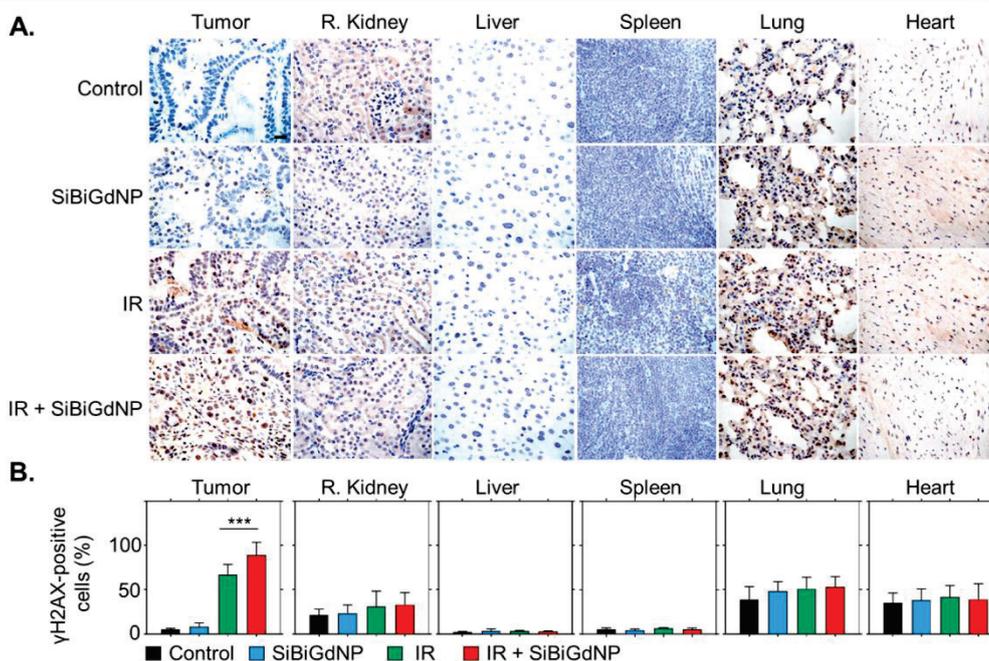


Figure 5. Radiation-induced DNA damage study. (a) γ H2AX staining representing the DNA double-strand breaks in the tumor and healthy organs. Damaged cells are brown and viable cells are blue. Magnification 63 \times ; scale bar = 20 μ m. (b) The positive γ H2AX cells were quantified across $n = 30$ images randomly chosen ($n = 3$ per group). Data are shown as mean \pm STD. Triple asterisks indicate $P < 0.001$.

Gd and Bi (1000 mg/mL \pm 0.2%) ICP single element standard solutions were purchased from Carl Roth.

The derivative DOTA chelate (2,2',2''-(10-(2-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid) was purchased from ChemaTech (France). All products were used without further purification. Only Milli-Q water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) was used for the aqueous solution preparation.

Dynamic Light Scattering. Direct dynamic light scattering (DLS) measurements of the hydrodynamic diameter distribution of the nanoparticles were performed via a Zetasizer NanoS DLS instrument (laser He–Ne 633 nm) from Malvern Instruments. Lyophilized particles were first dispersed in water for 1 h at room temperature, $[\text{Gd}^{3+}] = 100 \text{ mM}$ and pH = 7.4. The nanoparticles were diluted to $[\text{Gd}^{3+}] = 10 \text{ mM}$, and measurements were taken immediately.

Elemental Characterization. The determination of the accurate concentration of gadolinium and bismuth in the nanoparticle was performed by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES). The particles were degraded overnight in 5 mL of aqua regia (HNO_3 67% mixed with HCl 37% (1/2; v/v) at 80 $^\circ\text{C}$ and at an estimated concentration in gadolinium of 0.01 mM, 0.02 mM or 0.05 mM. Subsequently, the samples were diluted to 50 mL with 0.5 M HNO_3 (1/2500, v/v). The ICP-OES was calibrated with a single element standard solution prepared from 1000 ppm Gd standard and 1000 ppm Bistandard by successive dilutions with an HNO_3 5% (w/w) matrix. For each particle, the Gd^{3+} and Bi^{3+} composition given is an average of the three samples prepared (at 0.01, 0.02, and 0.05 mM).

Stability of the Nanoparticles. The stability of the nanoparticles was determined by relaxometry measurements over 24 h in aqueous solutions with a pH solution of 5 and 7, respectively. SiBiGdNP were dispersed in water at a concentration of $[\text{Gd}^{3+}] = 40 \text{ mM}$, and the pH was adjusted to 7 or 5. The solution was kept at 37 $^\circ\text{C}$ for all the experiments. Between 0 and 24 h, the solution was diluted in water, and the absorbance spectra was recorded using a UV–vis spectrophotometer (Varian Cary50).

NMR Measurements. Relaxation time measurements were performed using a Bruker Biospec operating at a magnetic field of 7 T and at 37 $^\circ\text{C}$. Before measurements of T_1 (longitudinal relaxation time) and T_2 (transverse relaxation time), lyophilized particles were dispersed in water for 1 h at room temperature, $[\text{Gd}] = 100 \text{ mM}$ and pH = 7.4. The SiBiGdNP $r_1 = 4.87 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ per Gd^{3+} and $r_2 = 3.48 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ per Gd^{3+} . A similar experiment was performed with a 1 T MRI (nanoScan PET/CT Mediso scanner), showing $r_1 = 22.0 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ and $r_1/r_2 = 1.6$ (Figure S3).

In Vitro DNA Double-Strand Breaks. A549 NSCLC cells were incubated 30 min with SiBiGdNP at a concentration of 0.5 mM prior to irradiation. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 15 min. After fixation, cells were blocked in 1% BSA, 10% FBS, and 0.3% tritonX-100 in PBS. Next, cells were stained with anti- γ H2AX antibody (Millipore) and anti-53BP1 (Santa Cruz) overnight. Subsequently, cells were incubated with secondary anti-mouse AlexaFluor-594 conjugated IgG and anti-rabbit AlexaFluor-488 conjugated IgG (Abcam), respectively, for the noted primary antibodies. A semiquantitative analysis was performed to evaluate the number of foci per cell expressing the

γ H2Ax and 53BP1 markers. Images were visualized with an upright Carl Zeiss microscope with an HXP 120C light source and a 63x/1.4 oil plan-apochromat objective. Foci were identified in the images and their signal intensity was quantified using CellProfiler cell imaging software (version 2.1.1).³⁹

Pharmacokinetic Study in Plasma Samples. A total of five mice were injected intravenously with 420 mg/kg (dry weight) of SiBiGdNP. Blood samples were collected at 5 and 30 min and 1, 3, 6, 24, and 48 h post-injection and analyzed with ICP-MS to determine the amount of bismuth and gadolinium per sample. Analysis was performed using a non-compartment model (Kinetics 4.4.1, Thermo Fisher).

Biodistribution Study in Mice. The biodistribution study was performed by ICP-MS in $n = 6$ mice per time point after IV injection of 420 mg/kg (dry weight) SiBiGdNP. The organs were dissolved in HCl, HNO₃, and H₂O₂ and analyzed on a VG Plasma Quad Excell ICP-MS. The experiment was performed at 30 min and 3, 6, and 24 h post-injection. This biodistribution study was then compared to a noninvasive imaging method (MR and CT) for the same time points (Figure S3).

In Vivo Imaging. For the MRI study, a T_1 gradient echo sequence on an ASpect One-Touch MRI was used to track and quantify the amount of nanoparticles in the different organs. More specifically, a whole body acquisition with the following parameters was performed: echo time of 4 ms, repetition time of 30 ms, flip angle of 57°, and slice thickness of 0.5 mm. For the μ CT acquisition, a nanoScan PET/CT Mediso scanner was used. The acquisition parameters were: 45 kVp, exposure time of 1100 ms, resolution of 12.8 pixels per mm, and slice thickness of 0.08 mm. Axial slides of the tumor were used to merge both CT and MRI images at the maximum concentration of nanoparticles in the tumor. The merged image was used for the dosimetry study to delineate the tumor region for irradiation.

Dosimetry Study. Clinical treatment planning and dose calculation software (Varian Medical Systems, Inc.) was used to calculate the 3D dose distribution in the animal. Animals were placed on top of 10 cm of solid water to mimic the depth in tissue of a typical tumor in the human body. On top of the tumor, 2 cm of tissue equivalent material was used to create backscatter. The irradiations were performed using the 6 MV mode of a TrueBeam linear accelerator (Varian Medical Systems, Inc.). The field size was equal to a 5.5 cm size in the X direction ($X_1 = 0.5$ cm and $X_2 = 5$ cm) and 10 cm in the Y direction ($Y_1 = Y_2 = 5$ cm). The linear accelerator's primary collimators shielded the body of the mouse.

Therapy Study in Mice. Mice were randomly divided into four groups of five mice each: -SiBiGdNP/-IR; +SiBiGdNP/-IR; -SiBiGdNP/+IR; and +SiBiGdNP/+IR. The mice selected with SiBiGdNP received a single intravenous injection of 420 mg/kg (dry weight) of nanoparticles 30 min prior to irradiation. Irradiations were performed with a single fraction of 10 Gy delivered with a 6 MV photon beam from a Varian TrueBeam linear accelerator as mentioned above. Mice were included in the study as soon as the tumor reached 7 mm in the longer axis and were excluded when the tumor reached 3 cm in the longer axis. Tumor volume and survival studies were performed with these measurement criteria.

In Vivo DNA Damage Study. DNA damage was evaluated semi-quantitatively by γ H2AX staining 30 min post-irradiation. Organs were harvested and fixed in 10% formalin followed by paraffin embedding. The staining was performed on tissue sections excised from the tumor, ipsilateral kidney, liver, spleen,

lung, and heart. To quantify the toxicity by γ H2AX, a primary antibody Abcam ab26350 and secondary antibody, ser139 (Cell Signaling Technologies) was utilized. Images were analyzed using a Zeiss Axio microscope at 63 \times magnification. The number of nuclei positive for γ H2AX were counted in $n = 30$ images from three animals per group. The ratio of positive nuclei to total nuclei was used to determine the effect induced by the presence of the nanoparticles under irradiation in comparison with that of the control groups and of the irradiation-alone group.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b05055.

Additional details on the synthesis of the nanoparticles, complexation of Bi³⁺ atoms, nanoparticle uptake study, toxicity evaluation, and radiation treatment plan. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: alex_detappe@dfci.harvard.edu.

*E-mail: rberbeco@bwh.harvard.edu.

ORCID

Alexandre Detappe: 0000-0001-9364-1621

Mark W. Tibbitt: 0000-0002-4917-7187

Author Contributions

All authors contributed to the writing of this article and have approved the final version.

Funding

This project was supported, in part, by a JCRT Foundation Grant and by award no. R21 CA188833 from the National Cancer Institute (NCI). The content of this manuscript is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NCI or NIH.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Miller, K. D.; Siegel, R. L.; Lin, C. C.; Mariotto, A. B.; Kramer, J. L.; Rowland, J. H.; Stein, K. D.; Alteri, R.; Jemal, A. *Ca-Cancer J. Clin.* **2016**, *66* (4), 271–89.
- (2) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. *Ca-Cancer J. Clin.* **2016**, *66* (1), 7–30.
- (3) Barnett, G. C.; West, C. M.; Dunning, A. M.; Elliott, R. M.; Coles, C. E.; Pharoah, P. D.; Burnet, N. G. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (2), 134–42.
- (4) Movsas, B.; Hu, C.; Sloan, J.; Bradley, J.; Komaki, R.; Masters, G.; Kavadi, V.; Narayan, S.; Michalski, J.; Johnson, D. W.; Koprowski, C.; Curran, W. J., Jr.; Garces, Y. I.; Gaur, R.; Wynn, R. B.; Schallenkamp, J.; Gelblum, D. Y.; MacRae, R. M.; Paulus, R.; Choy, H. *JAMA oncology* **2016**, *2* (3), 359–67.
- (5) Kong, F. M.; Ten Haken, R. K.; Schipper, M. J.; Sullivan, M. A.; Chen, M.; Lopez, C.; Kalemkerian, G. P.; Hayman, J. A. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **2005**, *63* (2), 324–33.
- (6) Hepel, J. T.; Leonard, K. L.; Safran, H.; Ng, T.; Taber, A.; Khurshid, H.; Birnbaum, A.; Brown University Oncology Research; Wazer, D. E.; DiPetrillo, T. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **2016**, *96*, 1021.
- (7) Ramroth, J.; Cutter, D. J.; Darby, S. C.; Higgins, G. S.; McGale, P.; Partridge, M.; Taylor, C. W. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **2016**, *96* (4), 736–747.

- (8) Brower, J. V.; Amini, A.; Chen, S.; Hullett, C. R.; Kimple, R. J.; Wojcieszynski, A. P.; Bassetti, M.; Witek, M. E.; Yu, M.; Harari, P. M.; Baschnagel, A. M. *Ann. Oncol.* **2016**, *27* (10), 1887–94.
- (9) Haseltine, J. M.; Rimmer, A.; Gelblum, D. Y.; Modh, A.; Rosenzweig, K. E.; Jackson, A.; Yorke, E. D.; Wu, A. J. *Pract Radiat Oncol.* **2016**, *6* (2), e27–33.
- (10) De Ruysscher, D. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1625.
- (11) Bissonnette, J. P.; Purdie, T. G.; Higgins, J. A.; Li, W.; Bezjak, A. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **2009**, *73* (3), 927–34.
- (12) Dawson, L. A.; Menard, C. *Oncologist* **2010**, *15* (4), 338–49.
- (13) Jaffray, D. A.; Siewerdsen, J. H.; Wong, J. W.; Martinez, A. A. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **2002**, *53* (5), 1337–49.
- (14) Dawson, L. A.; Jaffray, D. A. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25* (8), 938–46.
- (15) Noel, C. E.; Parikh, P. J.; Spencer, C. R.; Green, O. L.; Hu, Y.; Mutic, S.; Olsen, J. R. *Acta Oncol.* **2015**, *54* (9), 1474–82.
- (16) Urtasun, R. C.; Chapman, J. D.; Band, P.; Rabin, H. R.; Fryer, C. G.; Sturmwind, J. *Radiology* **1975**, *117* (1), 129–33.
- (17) Ning, S.; Bednarski, M.; Oronsky, B.; Sciacinski, J.; Saul, G.; Knox, S. J. *Cancer Res.* **2012**, *72* (10), 2600–8.
- (18) McMahon, S. J.; Paganetti, H.; Prise, K. M. *Nanoscale* **2016**, *8* (1), 581–9.
- (19) Retif, P.; Pinel, S.; Toussaint, M.; Frochot, C.; Chouikrat, R.; Bastogne, T.; Barberi-Heyob, M. *Theranostics* **2015**, *5* (9), 1030–44.
- (20) McMahon, S. J.; Hyland, W. B.; Muir, M. F.; Coulter, J. A.; Jain, S.; Butterworth, K. T.; Schettino, G.; Dickson, G. R.; Hounsell, A. R.; O'Sullivan, J. M.; Prise, K. M.; Hirst, D. G.; Currell, F. J. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 18.
- (21) Pan, Y.; Leifert, A.; Ruau, D.; Neuss, S.; Bornemann, J.; Schmid, G.; Brandau, W.; Simon, U.; Jahnen-Dechent, W. *Small* **2009**, *5* (18), 2067–76.
- (22) Kunjachan, S.; Detappe, A.; Kumar, R.; Ireland, T.; Cameron, L.; Biancur, D. E.; Motto-Ros, V.; Sancey, L.; Sridhar, S.; Makrigiorgos, G. M.; Berbeco, R. I. *Nano Lett.* **2015**, *15* (11), 7488–96.
- (23) Manohar, N.; Reynoso, F. J.; Diagaradjane, P.; Krishnan, S.; Cho, S. H. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22079.
- (24) Detappe, A.; Kunjachan, S.; Sancey, L.; Motto-Ros, V.; Biancur, D.; Drane, P.; Guieze, R.; Makrigiorgos, G. M.; Tillement, O.; Langer, R.; Berbeco, R. *J. Controlled Release* **2016**, *238*, 103–13.
- (25) Sancey, L.; Kotb, S.; Truillet, C.; Appaix, F.; Marais, A.; Thomas, E.; van der Sanden, B.; Klein, J. P.; Laurent, B.; Cottier, M.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Panczer, G.; Lux, F.; Perriat, P.; Motto-Ros, V.; Tillement, O. *ACS Nano* **2015**, *9* (3), 2477–88.
- (26) Le Duc, G.; Miladi, I.; Alric, C.; Mowat, P.; Brauer-Krisch, E.; Bouchet, A.; Khalil, E.; Billotey, C.; Janier, M.; Lux, F.; Epicier, T.; Perriat, P.; Roux, S.; Tillement, O. *ACS Nano* **2011**, *5* (12), 9566–74.
- (27) Song, G.; Liang, C.; Gong, H.; Li, M.; Zheng, X.; Cheng, L.; Yang, K.; Jiang, X.; Liu, Z. *Adv. Mater.* **2015**, *27* (40), 6110–7.
- (28) Lee, N.; Choi, S. H.; Hyeon, T. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (19), 2641–60.
- (29) Aviv, H.; Bartling, S.; Grinberg, I.; Margel, S. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2013**, *101* (101), 131–8.
- (30) Alqathami, M.; Blencowe, A.; Geso, M.; Ibbott, G. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12* (3), 464–71.
- (31) Sherry, A. D.; Brown, R. D.; Geraldine, C. F. G.; Koenig, S. H.; Kuan, K. T.; Spiller, M. *Inorg. Chem.* **1989**, *28* (3), 620–622.
- (32) Csajbok, E.; Baranyai, Z.; Banyai, I.; Brucher, E.; Kiraly, R.; Muller-Fahmow, A.; Platzeck, J.; Raduchel, B.; Schafer, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42* (7), 2342–9.
- (33) Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Itty Ipe, B.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (10), 1165–1170.
- (34) Na, H. B.; Lee, J. H.; An, K.; Park, Y. I.; Park, M.; Lee, I. S.; Nam, D. H.; Kim, S. T.; Kim, S. H.; Kim, S. W.; Lim, K. H.; Kim, K. S.; Kim, S. O.; Hyeon, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46* (28), 5397–401.
- (35) Kao, C. Y.; Hoffman, E. A.; Beck, K. C.; Bellamkonda, R. V.; Annappagada, A. V. *Academic radiology* **2003**, *10* (5), 475–83.
- (36) Herter-Spie, G. S.; Korideck, H.; Christensen, C. L.; Herter, J. M.; Rhee, K.; Berbeco, R. L.; Bennett, D. G.; Akbay, E. A.; Kozono, D.; Mak, R. H.; Mike Makrigiorgos, G.; Kimmelman, A. C.; Wong, K. K. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5870.
- (37) Kotb, S.; Piraquive, J.; Lamberton, F.; Lux, F.; Verset, M.; Di Cataldo, V.; Contamin, H.; Tillement, O.; Canet-Soulas, E.; Sancey, L. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35053.
- (38) Mignot, A.; Truillet, C.; Lux, F.; Sancey, L.; Louis, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Bocher, L.; Gloter, A.; Stephan, O.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Luneau, D.; Novitchi, G.; Figueiredo, L. C.; de Morais, P. C.; Bonneviot, L.; Albela, B.; Ribot, F.; Van Lokeren, L.; Dechamps-Olivier, I.; Chuburu, F.; Lemerrier, G.; Villiers, C.; Marche, P. N.; Le Duc, G.; Roux, S.; Tillement, O.; Perriat, P. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (19), 6122–36.
- (39) Carpenter, A. E.; Jones, T. R.; Lamprecht, M. R.; Clarke, C.; Kang, I. H.; Friman, O.; Guertin, D. A.; Chang, J. H.; Lindquist, R. A.; Moffat, J.; Golland, P.; Sabatini, D. M. *Genome biology* **2006**, *7* (10), R100.

2.5 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au développement de nanoparticules de type AGuIX portant des ions bismuth afin de maximiser leur effet en radiothérapie. Le DOTA étant un très bon complexant des ions Bi^{3+} , l'idée était d'augmenter le nombre de DOTA libres en surface de la particule puis de complexer des ions Bi^{3+} .

La première stratégie pour augmenter le nombre de DOTA libres a été de modifier la synthèse des particules AGuIX. La mise au point de cette voie nous a permis d'obtenir des particules AGuIX_{acide} avec environ 10 % de DOTA libres sans rajouter d'étapes de synthèse. Cependant, ce taux de ligands libres ne semblait pas suffisant pour l'application désirée. Nous nous sommes alors dirigés vers une deuxième stratégie consistant à greffer à la surface des particules AGuIX des chélates DOTA-NHS. On a ainsi pu obtenir environ 40 % de DOTA libres, ce qui nous a permis dans un deuxième temps de complexer des ions Bi^{3+} . Cette voie de synthèse est très intéressante par rapport à la précédente. D'une part, les particules AGuIX étant déjà produites en grande quantité, elle est plus rapide et simple à mettre en place. De plus, on peut moduler aisément la quantité de DOTA libres en surface des particules en fonction des applications désirées.

Dans les deux cas, un travail important a été réalisé pour purifier et caractériser le plus finement possible les particules. On a ainsi pu constater que tous les lots obtenus présentaient des propriétés similaires aux particules AGuIX malgré des conditions parfois dures (chauffage, pH faibles,...). Cela met en lumière l'intérêt de cette nanoplatforme qui conserve son intégrité tout en étant facilement fonctionnalisable.

L'efficacité des particules AGuIX@DOTA@ Bi^{3+} a été évaluée aux Etats-Unis à l'université d'Harvard, par Alexandre Detappe sous la direction de Ross Berbeco. Les résultats prometteurs obtenus sur des souris porteuses de tumeurs soulignent l'intérêt de ces particules pour la radiothérapie guidée par IRM. De plus, le numéro atomique plus élevé du bismuth par rapport au gadolinium (83 contre 64) laisse espérer une efficacité plus importante des particules AGuIX@DOTA@ Bi^{3+} par rapport aux particules AGuIX (pour une même quantité de métal). De premières expériences *in vitro* le montrent en effet mais des expériences *in vivo* restent nécessaires pour confirmer ces prédictions. Les résultats ont alors conduit le laboratoire à déposer un brevet avec Harvard pour les particules AGuIX@DOTA@ Bi^{3+} .

D'un point de vue général, la stratégie de fonctionnalisation des particules AGuIX par des DOTA-NHS est très intéressante en raison de sa versatilité. On peut facilement moduler le nombre final de DOTA en surface mais aussi utiliser d'autres molécules sous forme d'ester NHS pour avoir accès à de nouvelles applications. On peut, par exemple fonctionnaliser les particules avec différents chélates, c'est ce qu'on va présenter dans le chapitre suivant avec le greffage de NODAGA-NHS pour des applications en scintigraphie.

Chapitre 3

Développement de nanoparticules AGuIX pour la scintigraphie

3 CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE NPS AGuIX POUR LA SCINTIGRAPHIE

3.1 INTRODUCTION

Comme présenté dans le **chapitre 1**, le développement de nanoparticules pour le théranostic en oncologie, c'est-à-dire permettant de détecter, d'imager et de traiter les cancers, présente un intérêt de taille. Grâce aux capacités de contraste des particules, on peut déterminer leur biodistribution, mieux détecter et délimiter les tumeurs, optimiser les traitements (meilleure irradiation par exemple) ou encore suivre l'évolution de ces derniers. Par ailleurs, l'accumulation des particules dans les tumeurs peut être très hétérogène d'un patient à l'autre ce qui impacte l'efficacité des thérapies. L'imagerie pourrait être une réponse à ce problème car elle permettrait de prévoir au préalable la réponse des patients aux traitements. Ainsi, en fonction des résultats obtenus en imagerie il serait possible de sélectionner les patients présentant une réponse potentielle, on se dirige alors vers une médecine personnalisée à chaque patient.

Dans ce contexte, la scintigraphie est une technique d'imagerie qui présente de nombreux avantages comme nous allons le voir dans ce chapitre. Un travail important a donc été réalisé pour ajouter cette modalité d'imagerie aux particules AGuIX. La scintigraphie nécessite l'utilisation d'isotopes radioactifs ; de nombreux peuvent être utilisés en clinique. Selon le type de rayonnement produit, leur temps de demi-vie, leur disponibilité, leur coût, etc, le choix se portera sur l'un ou l'autre de ces isotopes. Dans ce chapitre, nous allons présenter le développement et la caractérisation d'une série de particules de type AGuIX nous permettant de complexer une large gamme de radiométaux *via* la présence de chélates.

3.1.1 La scintigraphie

La scintigraphie réunit la tomographie par émission de positons (PET) et la tomographie par émission monophotonique (SPECT). La PET est basée sur l'émission de positons par des radioisotopes lors de leur désintégration (émission β^+). Après avoir parcouru une courte distance (dépendant de l'isotope, ~ 1 mm), le positon rencontre un électron provoquant leur annihilation et l'émission de deux photons γ d'énergie 511 keV dans une même direction mais des sens opposés comme présenté sur la **Figure 3-1-a**.^[122] La SPECT, utilise elle aussi des radioisotopes, mais ceux-ci émettent directement un seul photon γ (d'énergie variable de l'ordre de 150 keV) que l'on peut détecter, comme présenté sur la **Figure 3-1-b**. Que ce soit pour la PET ou la SPECT, les rayonnements émis sont détectés sur des distances relativement grandes, hors du corps humain, et on cherche de plus à ce que la dose d'irradiation soit la plus faible possible pour les patients. D'autres types d'émissions peuvent apparaître lors de la désintégration de radioisotopes : des particules β^- et α ou encore des électrons Auger ; ces émissions sont utilisées en thérapie (curiethérapie). Dans ce cas-là, on cherche à déposer localement une dose suffisamment importante pour atteindre l'effet

thérapeutique désiré (détruire des cellules tumorales). En général, la désintégration des radioisotopes ne conduit pas à un seul type d'émission. Par exemple le gallium 67 (^{67}Ga) et l'indium 111 (^{111}In) qui sont des radioisotopes utilisés en SPECT émettent aussi des électrons Auger.^[123,124]

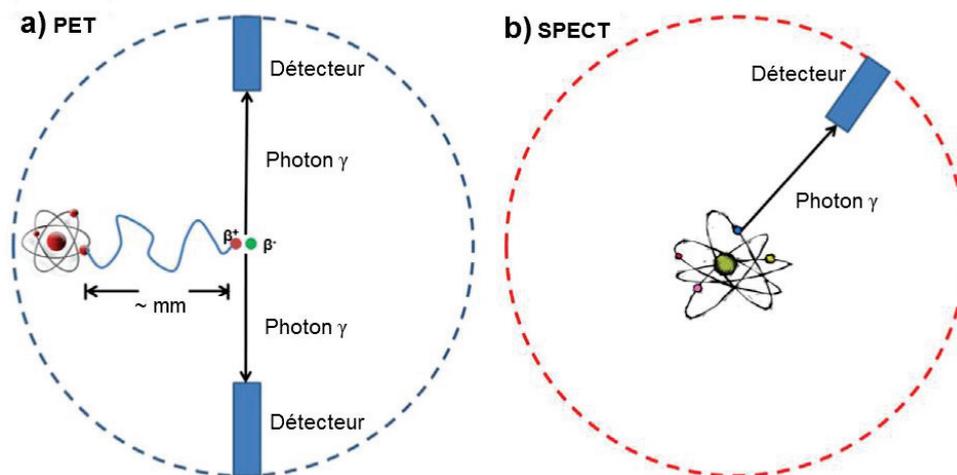


Figure 3-1 : Schéma de principe de la PET (a) et de la SPECT (b). Figure issue de Xu et al.^[122]

La PET et la SPECT sont deux techniques d'imagerie couramment utilisées en clinique. Comme nous l'avons vu dans le **chapitre 1**, leur avantage réside dans leur grande sensibilité. Cela permet d'injecter très peu de radiotraceurs pour acquérir une image ce qui diminue grandement la toxicité liée à l'injection.^[125] La scintigraphie peut ainsi être utilisée pour le développement de nouveaux médicaments. Après radiomarquage, les propriétés pharmacocinétiques (devenir d'une substance après administration dans l'organisme) de différents candidats peuvent être évaluées. L'imagerie permet d'orienter le choix vers les plus prometteurs. Elle peut aussi être utilisée pour déterminer les patients qui répondraient aux traitements dans le cadre de la délivrance de médicament avec des nanoparticules par exemple. Dans le cas des AGuIX, la scintigraphie permettrait d'injecter de très faibles doses de particules, de sélectionner les patients pour lesquels les particules s'accumulent bien dans les tumeurs et donc ceux qui ont le plus de chances de répondre au traitement (radiothérapie).

La SPECT présente l'avantage d'impliquer des radioisotopes avec des temps de vie plus longs (voir **Tableau 3-1** de la partie suivante) et des coûts plus faibles par rapport à ceux utilisés en PET. De plus, la plupart des hôpitaux possèdent déjà les équipements nécessaires.^[126] En SPECT, il est aussi possible de détecter simultanément différents radioisotopes car les photons γ émis n'ont pas les mêmes énergies. Cela permet d'obtenir une bonne corrélation spatio-temporelle entre les images et de diminuer les temps d'acquisition et les artefacts dus au mouvement.^[127] La PET s'est beaucoup développée ces dernières années et attire un grand intérêt car elle est plus sensible et permet une meilleure résolution spatiale et temporelle que la SPECT.^[122,127] L'intérêt croissant pour cette technique se traduit aussi par la commercialisation d'appareils combinant la PET et l'IRM, comme présenté dans le **chapitre 1**. Ces avancées soulignent l'intérêt d'ajouter des radioisotopes aux particules AGuIX pour développer une nanoplateforme multimodale PET/IRM. De

plus, cette technique est quantitative ce qui permet de déterminer la biodistribution du radiotracer de manière très précise et présente un intérêt certain pour un développement clinique.^[124] Ainsi, la connaissance de la quantité de nanoparticules AGuIX dans les tumeurs permettrait d'ajuster les doses d'irradiation en conséquence afin d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

3.1.2 Les radioisotopes

Le choix du radioisotope pour des applications d'imagerie est crucial et doit être guidé par différents points.

Le **Tableau 3-1** présente quelques radioisotopes utilisés fréquemment ou auxquels nous nous sommes intéressés au cours de la thèse. On constate que les isotopes utilisés en scintigraphie ont des durées de demi-vie variant de quelques minutes à quelques heures, voir quelques jours. Les radioisotopes de demi-vie entre la minute et l'heure ne permettent donc d'étudier des phénomènes biologiques que sur des temps courts. Selon l'application visée, ils peuvent se révéler inadaptés.^[124,128-130] Un des premiers choix à faire pour déterminer le radioisotope de travail consiste par conséquent à définir la durée sur laquelle on veut étudier le phénomène biologique d'intérêt.

Il faut aussi garder à l'esprit que tous les radioisotopes émettent des rayonnements, potentiellement nocifs à haute dose. Lors de l'élaboration de radiotraceurs, il est important de conserver une dose de radiation acceptable en clinique ce qui dépend du radioisotope (énergie, durée de vie) et de la biodistribution des particules (temps de rétention dans les différents organes).^[123,126]

De plus, pour être reconnu comme médicament, l'isotope radioactif doit être d'une grande pureté radiochimique et chimique.

Enfin, le choix d'un radioisotope va évidemment aussi être dicté par son prix et ses capacités d'approvisionnement.

Tableau 3-1 : Quelques radioisotopes utilisés en PET ou en SPECT et leurs caractéristiques.^[124,126,128-130] Ceux en gras et soulignés sont ceux auxquels nous nous sommes intéressés durant ce travail de thèse.

Technique Emission	Radioisotopes	$\tau_{1/2}$ en h	$E_{\max,\gamma}$ ou $E_{\max,\beta+}$ en keV (pourcentage d'émission en %)
SPECT γ	¹²³ I	13,2	159 (83)
	<u>¹¹¹In</u>	67,2	171 (90), 247 (94)
	^{99m} Tc	6,0	140 (89)
	<u>⁶⁷Ga</u>	78,3	93 (40), 184 (21)
PET $\beta+$	¹⁸ F	1,83	635 (97)
	<u>⁶⁴Cu</u>	12,7	653 (18)
	<u>⁶⁸Ga</u>	1,13	1899 (89)
	<u>⁸⁹Zr</u>	78,4	901 (22,8)

Le technétium 99m (^{99m}Tc , $\tau_{1/2} = 6,0$ h) est le radioisotope le plus utilisé en SPECT car il présente plusieurs avantages tels qu'une faible irradiation pour les patients (demi-vie relativement faible et énergie d'émission de 140 keV) et une production sur le site de l'utilisation par un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (molybdène/technétium). L'iode 123 (^{123}I , $\tau_{1/2} = 13,2$ h) est aussi couramment utilisé mais son coût est plus élevé et il est moins facilement disponible.

Au cours de la thèse, quelques tests de radiomarquage ont été réalisés avec l'indium 111 (^{111}In , $\tau_{1/2} = 67,2$ h) qui est peut-être l'émetteur γ le plus populaire après le ^{99m}Tc et présente un temps de demi-vie plus long. Cet isotope est actuellement utilisé pour détecter des foyers infectieux ou des rejets de greffes. Lorsqu'il est couplé à un analogue de synthèse de la somatostatine (une hormone) il permet de détecter des tumeurs neuro-endocrines comme celles du pancréas.^[131-133] D'autres expériences ont été réalisées avec du gallium 67 (^{67}Ga , $\tau_{1/2} = 78,3$ h) qui est lui aussi utilisé pour des diagnostics d'inflammations ou la détection de tumeur et le suivi des traitements.^[134]

Pour la PET, le ^{18}F ($\tau_{1/2} = 1,83$ h) est très fréquemment employé en raison de la faible énergie émise et d'une chimie versatile.^[123,125] Il permet notamment de marquer le déoxyglucose (^{18}FDG) utilisé pour l'imagerie des tumeurs. Au cours de la thèse nous nous sommes intéressés principalement au gallium 68 (^{68}Ga), au cuivre 64 (^{64}Cu) et au zirconium 89 (^{89}Zr) pour l'imagerie PET.

- La production de ^{68}Ga ($\tau_{1/2} = 1,13$ h) est possible grâce à un générateur commercial $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ (gallium/germanium) ce qui le rend très attractif. Ces générateurs sont déjà commercialisés et permettent donc la production du radioisotope directement sur le site d'utilisation durant quelques mois, la durée de vie de l'isotope parent (le ^{68}Ge) étant de 271 jours. Cela permet d'éviter toute décroissance radioactive durant le transport du lieu de production à celui d'utilisation.^[128,129]
- Le ^{64}Cu présente l'avantage d'avoir un temps de vie plus long ($\tau_{1/2} = 12,7$ h) ce qui laisse plus de temps pour éliminer toute activité non spécifique avant d'acquérir les images PET et de réaliser des études sur des temps plus longs. Il présente aussi une énergie assez faible ($E_{\max,\beta^+} = 653$ keV) et peut maintenant être produit avec de bons rendements et une pureté élevée.^[128,135]
- Au cours de ces dernières années, l'utilisation du ^{89}Zr en PET a connu un essor considérable. Il a surtout été utilisé pour le radiomarquage d'anticorps que ce soit pour des études précliniques ou cliniques car leur temps de circulation dans l'organisme correspond bien au temps de demi-vie du ^{89}Zr ($\tau_{1/2} = 78,4$ h). En plus, de l'intérêt lié à ce long temps de demi-vie, le ^{89}Zr est plus sûr à manipuler et moins cher à produire que le ^{64}Cu .^[136,137] Cependant, des préoccupations peuvent apparaître avec l'utilisation d'isotopes avec des temps de vie aussi longs puisque cela entraîne une plus grande irradiation pour les patients et limite donc leur utilisation répétée.^[138]

3.1.3 Différents type de NPs inorganiques pour la scintigraphie

3.1.3.1 Structure

De nombreuses nanoparticules inorganiques pouvant être suivies par scintigraphie ont été décrites dans la littérature. On peut définir plusieurs familles : les NPs présentant une radioactivité intrinsèque (cœur inorganique), celles pour lesquelles un isotope est lié de manière covalente et celles pour lesquelles un radiométal est complexé par un chélate.

La première famille réunissant des nanoparticules avec une radioactivité intrinsèque reste plutôt rare. Par exemple, des quantum dots à base de cadmium (Cd) peuvent être utilisés comme émetteurs γ si ces particules sont préparées à partir de ^{109}Cd ($E_\gamma = 88 \text{ keV}$, $\tau_{1/2} = 462 \text{ jours}$).^[139] Cependant, en raison de la toxicité liée à l'utilisation de cadmium, d'une énergie γ et d'un temps de demi-vie non adapté, ces particules ne sont pas envisagées pour des études *in vivo*. Zhao *et al.* ont eux synthétisé des nanoparticules d'or incorporant sous forme d'alliage du ^{64}Cu .^[140] Là aussi, une utilisation en clinique apparaît peu probable puisque la chimie de surface nécessaire à l'optimisation de leur biodistribution devrait être réalisée après synthèse ce qui entraînerait une décroissance de la radioactivité et donc une diminution de la fenêtre temporelle d'utilisation de ces particules en imagerie PET.

La deuxième famille correspond à des nanoparticules où le radioisotope est ajouté par liaison covalente comme c'est le cas pour le ^{18}F ou le ^{124}I .^[141] Un exemple très intéressant est la particule d'environ 7 nm de diamètre développée par Wiesner et son équipe (Université de Cornell, Etats-Unis) et appelée C dots.^[142] Elle est représentée sur la **Figure 3-2**.

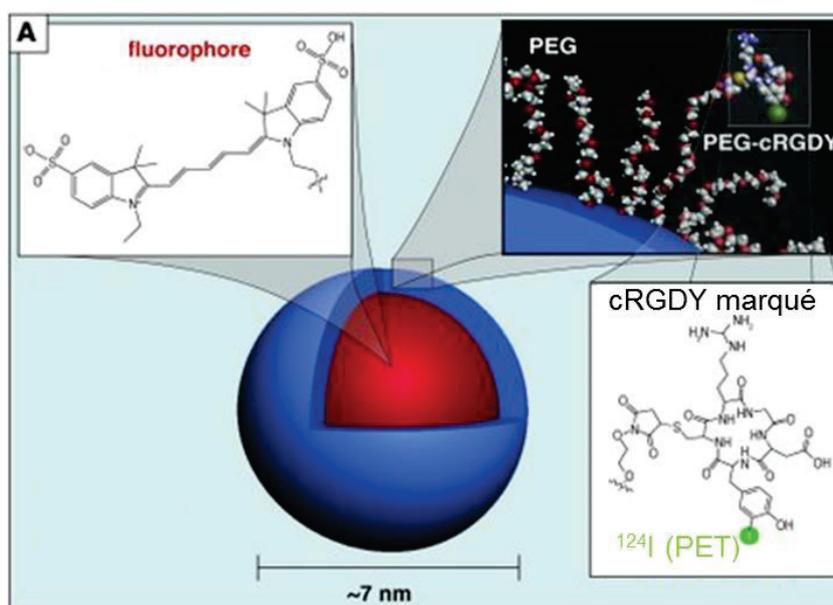


Figure 3-2 : Nanoparticule C Dots. Figure issue de Benezra *et al.*^[142]

Le cœur de ces particules est constitué de fluorophores et de silice, il est ensuite encapsulé dans une couche de silice. A la surface, se trouvent aussi des PEG et un peptide (RGD) pour améliorer la biodistribution des C dots et le ciblage des cellules cancéreuses. Ces particules ont été radiomarquées par du ^{124}I (sur le cRGDY plus exactement) pour l'imagerie PET et des études ont été réalisées sur cinq patients atteints de mélanomes métastatiques. Des résultats prometteurs présentés en 2014^[143] ont montré qu'il n'y avait pas d'effet indésirable lié aux C dots, une accumulation préférentielle au niveau des lésions malades et une élimination rénale. Un essai clinique de phase I est toujours en cours (NCT02106598) pour des mélanomes de la tête et du cou, gynécologiques ou des cancers du sein. Les C dots permettraient de mieux détecter et délimiter les tumeurs et les ganglions lymphatiques. Elles pourraient donc être utilisées pour aider le chirurgien à déterminer quels ganglions lymphatiques éliminer pour éviter les métastases.

Une dernière famille, dans laquelle les travaux de cette thèse se sont situés, comprend des nanoparticules présentant à leur surface des chélates disponibles pour complexer des radiométaux. Comme on va le voir dans la partie suivante, il existe pour chaque radiométal des chélates plus adaptés que d'autres. L'intérêt de cette catégorie de nanoparticules est de pouvoir greffer à la surface des NPs divers chélates sans changer fondamentalement la structure de la particule, ce qui permet de moduler facilement le radioisotope utilisé selon l'application visée ou sa disponibilité. De plus, les étapes de chélation du radioisotope et de purification peuvent être rapides et réalisées directement à l'hôpital ce qui évite une perte d'activité trop importante.^[125,144]

3.1.3.2 Les chélates

Il est important de noter qu'en général seule une minorité des particules sont radiomarquées. D'autre part, la scintigraphie permet de suivre le radioisotope et non pas la particule en elle-même. Le choix du chélate utilisé pour l'imagerie PET ou SPECT doit par conséquent être réalisé avec précaution afin que le complexe radioisotope-chélate soit stable même après injection dans l'organisme.^[124,125] Il faut éviter toute transmétallation du radioisotope pour des pH fluctuants (de 5 à 8) ou au contact d'autres ions présents dans l'organisme (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}).^[129] Ainsi, en suivant le radioisotope, on s'assure de suivre également les nanoparticules.

D'autre part, certains radioisotopes ayant un temps de demi-vie court, il faut pouvoir effectuer des marquages rapides. Si la particule est fragile, il faut aussi mettre en place des conditions douces pour éviter de la dégrader (température, pH,...). Enfin, on cherche au maximum à obtenir des rendements de marquage élevés afin d'éviter des pertes de produits et d'activité lors des étapes de purification. Il semblerait qu'un rendement de radiomarquage supérieur à 97 % permettrait, pour l'ANSM, une injection en clinique sans purification supplémentaire.

Tous les radioisotopes présentés précédemment peuvent évidemment être complexés par différents ligands mais en général l'un d'entre eux est privilégié pour des raisons liées au radiomarquage (cinétique, conditions, rendement) ou à cause de la stabilité des complexes *in vivo*. La **Figure 3-3** présente quelques ligands utilisés pour le ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu ou ^{89}Zr .

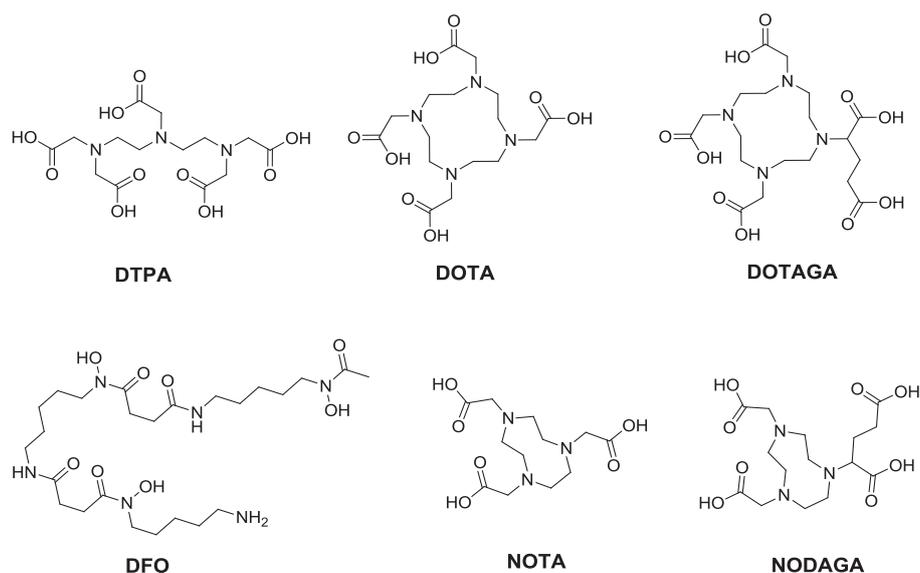


Figure 3-3 : Exemples de chélates utilisés pour le radiomarquage par le ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu ou ^{89}Zr .

- Actuellement, les deux ligands les plus utilisés pour complexer l'indium 111 sont un ligand linéaire, le DTPA ($\log K = 29$), et un ligand macrocyclique, le DOTA ($\log K = 23,9$).^[145] Ils ont ainsi été utilisés pour radiomarquer des peptides, des anticorps, ou des nanoparticules. Ils permettent d'obtenir de bons rendements de radiomarquage ($> 90\%$) avec d'assez bonnes stabilités *in vitro* et *in vivo*.^[124,146-148] Par exemple, après incubation dans du sérum humain à 37°C pendant 24 h, environ 11 et 12 % de ^{111}In sont libérés pour les complexes de DOTA et DTPA respectivement. Malgré tout, beaucoup de recherches continuent de développer des ligands permettant de complexer l'indium dans des conditions plus douces, plus rapides et avec une meilleure stabilité.^[145,149]
- Le DOTA peut complexer le ^{68}Ga de manière stable ($\log K = 26,1$) mais depuis quelques années, le NOTA apparaît particulièrement adapté pour ce radioisotope ($\log K = 30,98$).^[150] Contrairement au DOTA, il permet d'obtenir de bons rendements de radiomarquage dans des conditions douces et en quelques minutes. Ceci est compatible avec le faible temps de demi-vie de ce radioisotope ($\tau_{1/2} = 68\text{ min}$). Enfin, les complexes obtenus ont une excellente stabilité en milieu physiologique.^[151] Son dérivé, le NODAGA, présente des propriétés similaires après conjugaison sur des protéines et des radiomarquages avec le ^{68}Ga .^[129] Le ^{67}Ga possède les mêmes propriétés de complexation que le ^{68}Ga .^[134,152]
- Pour le ^{64}Cu , des ligands macrocycliques sont préférés aux ligands acycliques pour avoir une bonne stabilité *in vivo*. Il a ainsi été montré que le DTPA (chélate linéaire) libère le cuivre en quelques minutes après une injection intraveineuse.^[153,154] Différentes études montrent de plus que le NOTA permet une meilleure stabilité que le DOTA.^[155,156] L'une d'entre elles s'intéresse à la complexation de ^{64}Cu par des nanogels présentant des dérivés de DTPA, DOTA ou NOTA. Après incubation pendant 1 h dans du sérum

de souris, ces nanogels retiennent respectivement 11 %, 87 % et 94 % du cuivre. Après 48 h d'incubation, les nanogels à base de DOTA retiennent 69 % du cuivre contre 91 % pour ceux à base de NOTA. La plus grande stabilité des nanogels à base de NOTA a ensuite été confirmée par des expériences *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs hétérotopiques sous-cutanées ou de métastases (modèle de cancer du sein, 4T1).^[155] Comme pour le ⁶⁸Ga, le dérivé NODAGA a aussi été étudié pour la complexation du ⁶⁴Cu et présente des propriétés de radiomarquage intéressantes.^[128,157]

- Le ligand le plus répandu pour la complexation du ⁸⁹Zr est le DFO. Meijs *et al.* ont montré au début des années 90 que ce ligand peut chélater rapidement et efficacement le ⁸⁹Zr.^[158] Le complexe obtenu présente une bonne stabilité puisque moins de 0,2 % du métal est libéré après 24 h dans du sérum et moins de 2 % après 7 jours.^[159]

3.1.4 Projets de thèse

Au cours de cette thèse nous avons cherché à radiomarquer les particules AGuIX pour l'imagerie SPECT et PET. Pour ce faire, différentes stratégies ont été développées et sont présentées sur la **Figure 3-4**.

- (a) Des expériences ont été réalisées avec les particules AGuIX « classiques » qui présentent quelques ligands DOTAGA libres en surface (1-2 %).

Pour optimiser les radiomarquages et avoir accès à un plus grand nombre de radioisotopes, des expériences ont également été réalisées à partir de particules AGuIX modifiées.

- (b) Des tests ont ainsi été réalisés avec les particules AGuIX_{acide} présentées dans le **chapitre 2** et qui présentent plus de DOTAGA libres en surface (10 % environ).
- (c et d) La surface des particules a aussi été modifiée par greffage d'autres types de chélates (NODAGA et DFO).

Toutes les fonctionnalisations de surface et les caractérisations des particules ont été effectuées à l'ILM et les études de radiomarquage ont été menées en collaboration en France ou à l'étranger. J'ai ainsi pu réaliser des radiomarquages à Arronax (Nantes, France) sous la supervision de Sandrine Huclier ou au Lumen (Lyon, France) sous la supervision de David Kryza. Des expériences ont aussi été réalisées en Grèce par l'équipe de Penelope Bouziotis (Institut Demokritos, Athènes) ou aux Etats-Unis par l'équipe de Carolyn J. Anderson (Université de Pittsburgh) et de Michael J. Evans (Université de San Francisco).

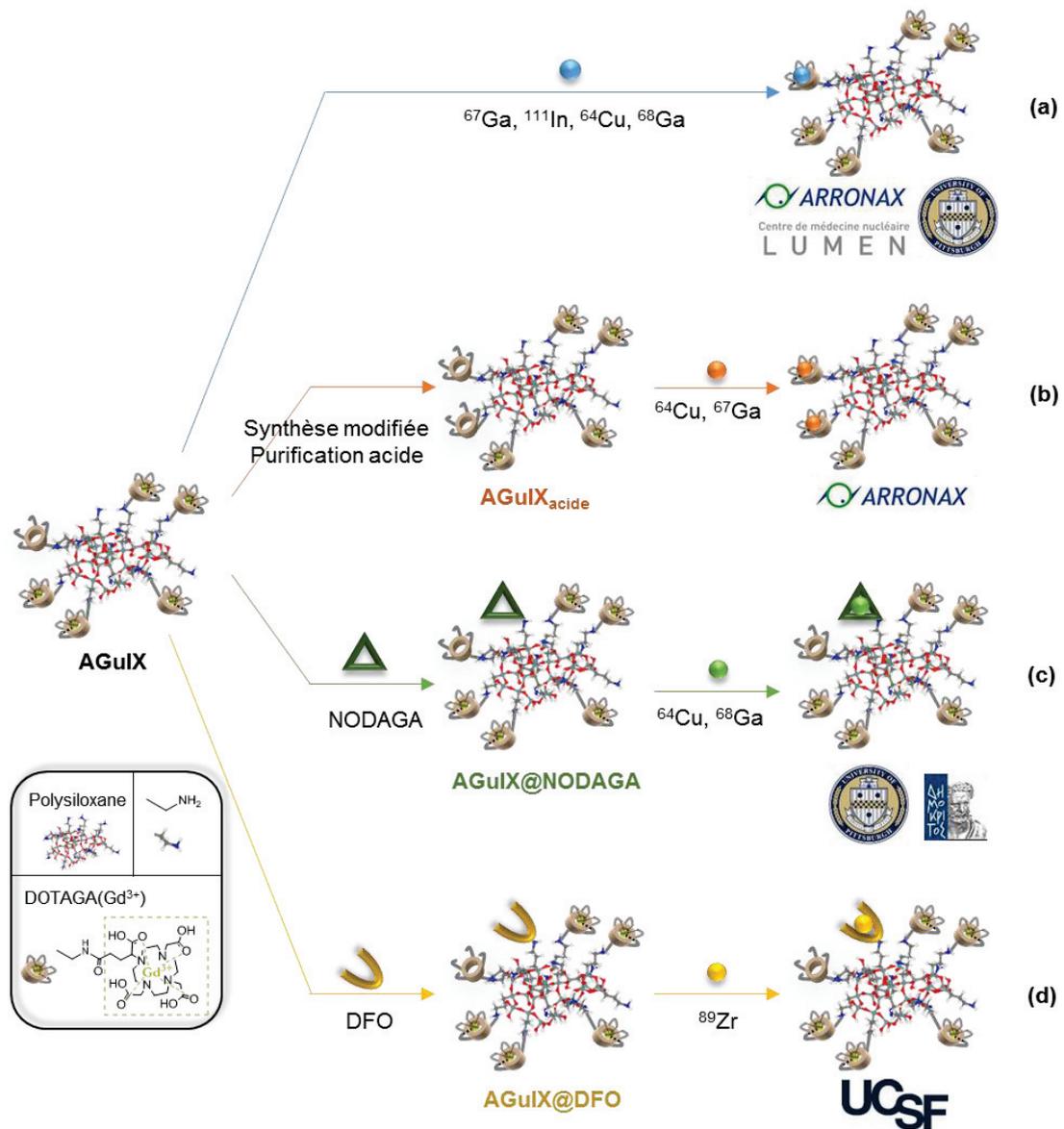


Figure 3-4 : Radiomarquage de particules AGuIX (a) ou AGuIX modifiées (b, c d) par différents radioisotopes pour la SPECT ou la PET.

3.2 COMPLEXATION DE RADIOISOTOPES VARIÉS PAR LE DOTAGA

Dans le chapitre précédent, nous avons pu déterminer que les particules AGuIX présentaient quelques DOTAGA libres en surface (1-2 %). On a aussi mis en place des stratégies de synthèse pour obtenir des particules modifiées : les AGuIX_{acide} avec environ 10 % de DOTAGA libres et les AGuIX@DOTA avec jusqu'à 40 % de DOTA libres en surface. La présence de ces chélates libres nous permet d'envisager la complexation de radioisotopes fournissant ainsi une nanoplatforme bimodale pour la scintigraphie et l'IRM. Dans cette partie, nous allons présenter des tests préliminaires (cinétique de radiomarquage, optimisation des conditions,...) réalisés avec des radioisotopes SPECT (¹¹¹In, ⁶⁷Ga) et PET (⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga). Au vu de la différence de sensibilité de la scintigraphie et de l'IRM, ces tests ont été réalisés sur les particules AGuIX et AGuIX_{acide} (voir **Figure 3-5**). En effet, 10 % de DOTAGA libres devraient être suffisants pour complexer les radioisotopes et permettre des études en scintigraphie. D'autre part, ces radiomarquages ont parfois nécessité un chauffage des solutions, nous avons alors au préalable validé la stabilité des nanoparticules dans ces conditions.

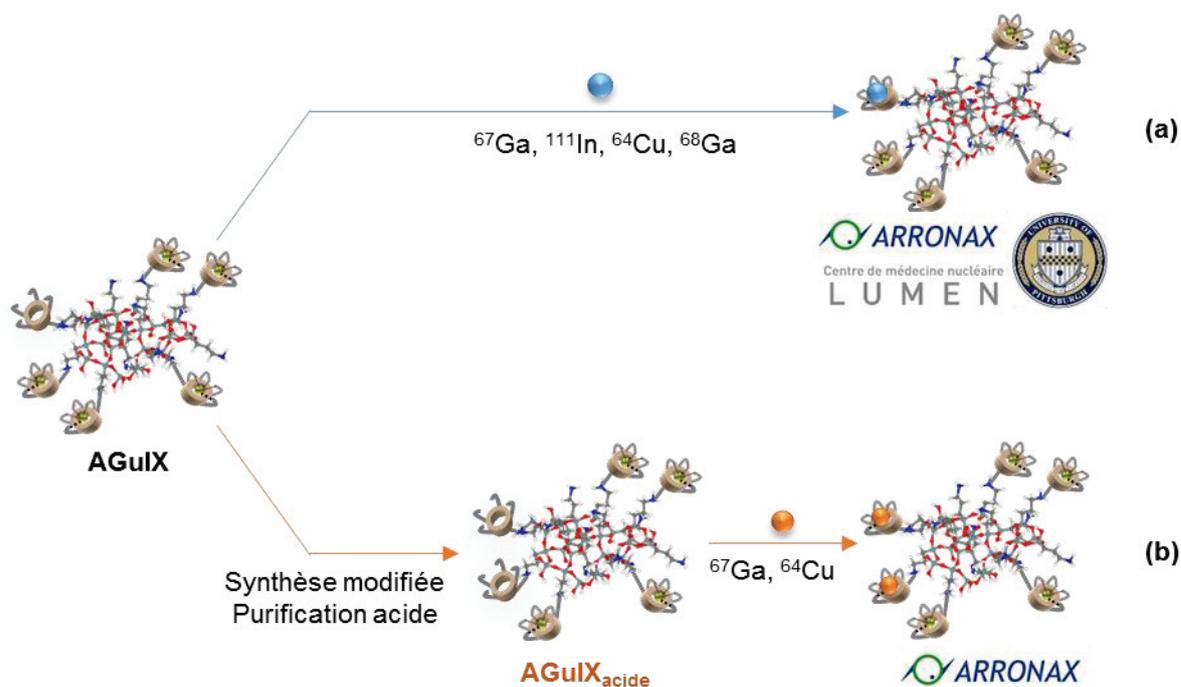


Figure 3-5 : Utilisation de DOTAGA libres pour radiomarquer des particules AGuIX (a) ou AGuIX_{acide} (b).

3.2.1 ⁶⁷Ga

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir aller à Arronax à Nantes et de radiomarquer les particules par du ⁶⁷Ga sous la supervision de Sandrine Huclier. Afin d'étudier l'influence du nombre de DOTAGA libres, les expériences de radiomarquage ont été faites à partir des particules AGuIX (1-2 % DOTAGA libres) et des AGuIX_{acide} (10 % DOTAGA libres).

3.2.1.1 Protocole

La cinétique de radiomarquage des particules a été étudiée sur une heure pour une concentration en Gd^{3+} de 30 mM, un pH de 4 (tampon acétate), à température ambiante ou à 90°C. Des expériences sans isotopes radioactifs ont permis de vérifier que les particules étaient stables durant plusieurs heures dans ces conditions (taille, relaxométrie, potentiel zéta, HPLC, osmolarité...).

Mode opératoire : Deux échantillons sont préparés pour chaque type de nanoparticules, AGuIX ou AGuIX_{acide}. Pour chaque échantillon, 45 μmol de Gd^{3+} sont dispersés à une concentration en Gd^{3+} de 250 mM dans l'eau. Les particules sont laissées une heure à température ambiante afin de permettre une bonne redispersion. Puis, un tampon d'acétate de sodium à 0,1 mol.L⁻¹ à un pH de 4 est ajouté afin d'atteindre un volume de 1,49 mL. Au temps $t = 0$ min, 10 μL de solution source de ^{67}Ga sont ajoutés aux échantillons. L'activité obtenue est de 865 kilobecquerel (kBq). L'un des échantillons est laissé à température ambiante et l'autre est chauffé à 90°C pendant 1 h. Le taux de radiomarquage est déterminé au bout de 15, 30, 45 et 60 minutes par CCM.

La pureté radiochimique correspond au ratio entre la radioactivité présente sur les particules et la radioactivité totale en solution. C'est un paramètre essentiel à déterminer pour une utilisation en imagerie. Sa détermination a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). Cela consiste à séparer les différents éléments d'une solution (le radioisotope libre et le radioisotope complexé sur les particules) grâce à leur différence d'affinité entre une phase fixe et une phase mobile ou éluant. Dans notre cas, 1 μL du mélange réactionnel est déposé sur des plaques de chromatographie (silice) qui sont ensuite éluées avec un tampon citrate (0,25 mol/L ; pH = 5,2). Après exposition dans des cassettes auto-radiographiques, l'activité des échantillons est détectée et visualisée par le système de lecture « Cyclone Plus Storage Phosphore ». Le ^{67}Ga migre en front de solvant tandis que les particules restent en ligne de dépôt. Le taux de radiomarquage est donc déterminé grâce au profil obtenu par le ratio : Activité(ligne de dépôt) / Activité(totale).

3.2.1.2 Résultats

Comme on le voit dans le **Tableau 3-2**, à température ambiante le rendement de marquage augmente avec le temps et avec le nombre de DOTAGA libres. On a par exemple des rendements de 21 et 45 % à 15 min et 44 et 76 % à 60 min pour les AGuIX et AGuIX_{acide} respectivement. L'augmentation de la température à 90°C permet d'accélérer le radiomarquage et d'atteindre d'excellents rendements de radiomarquage, 99 %, dès 15 minutes de réaction pour les deux types de nanoparticules. Aucune purification ne serait donc nécessaire avant injection *in vivo*.

Tableau 3-2 : Taux de radiomarquage (%) des particules AGuIX et AGuIX_{acide} par le ⁶⁷Ga. [Gd³⁺] = 30 mM, pH = 4, activité par échantillons : 577 kBq.mL⁻¹.

		15 min	30 min	45 min	60 min
AGuIX	T = 20°C	21	28	38	44
	T = 90°C	99	99	99	99
AGuIX _{acide}	T = 20°C	45	32	53	76
	T = 90°C	99	99	99	99

Même si ces expériences préliminaires nécessiteraient d'être approfondies, notamment concernant la stabilité des complexes *in vitro* et *in vivo*, elles illustrent la facilité avec laquelle on peut radiomarquer les particules et notamment des AGuIX non modifiées. Ils soulignent donc bien leur intérêt pour la scintigraphie.

3.2.2 ¹¹¹In

L'indium 111, radioisotope SPECT fréquemment utilisé, a pu être complexé par les particules AGuIX. J'ai réalisé ces tests avec le Docteur David Kryza au Lumen à Lyon. Les radiomarquages ont été faits pour une concentration en Gd³⁺ de 23 mM environ, à un pH de 5 et en faisant varier la température (35°C ou 80-85°C) ou le tampon (citrate ou acétate). Au bout de 30 min, le taux de radiomarquage est déterminé par CCM (plaque de silice) et les plaques sont lues avec un radiochromatographe. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3-3**.

A 35°C, le tampon citrate permet d'obtenir un très bon rendement de radiomarquage (87 %) contrairement au tampon acétate (41 %). Étonnamment, dans le tampon citrate, une augmentation de température entraîne une diminution du rendement de radiomarquage (de 87 % à 63 %). L'expérience nécessiterait d'être réitérée pour vérifier cette tendance.

Tableau 3-3 : Radiomarquage des particules AGuIX par l'indium 111. [Gd³⁺] = 23,3 mM, activité par échantillon : 38 MBq.mL⁻¹, temps : 30 min.

Tampon	Température	Rendement de radiomarquage (%)
Citrate (0,05 M, pH = 5)	35°C	87
Citrate (0,05 M, pH = 5)	80 – 85°C	63
Acétate (0,1 M, pH = 5)	35°C	41

L'utilisation d'un tampon citrate à un pH de 5 et d'un chauffage léger à 35°C est très prometteuse pour le marquage des particules AGuIX par l'indium 111. Afin de compléter cette étude, des tests *in vivo* doivent être réalisés pour vérifier l'intérêt d'une telle nanostructure pour la scintigraphie.

3.2.3 Radioisotopes pour la PET

Comme présenté dans la première partie introductive, les radioisotopes PET sont particulièrement intéressants pour le radiomarquage des particules AGuIX (meilleures sensibilité et résolution spatiale et développement de nouveaux appareils PET/IRM).

A Nantes, j'ai réalisé avec le ^{64}Cu , la même étude que celle sur le ^{67}Ga présentée précédemment. La cinétique de radiomarquage des particules AGuIX et AGuIX_{acide} a été étudiée sur une heure pour une concentration en Gd^{3+} de 30 mM, un pH de 4 (tampon acétate) et 7 (tampon MES), à température ambiante ou à 90°C. Les conditions utilisées ont permis d'obtenir au maximum des taux de radiomarquage de l'ordre de 60 % (déterminés par CCM), la modification de pH, de la température ou du nombre de DOTAGA libres n'ayant pas d'influence significative. Il s'est avéré que ces faibles rendements pouvaient venir d'un problème de pureté de la solution de radioisotope, nous avons alors décidé de recommencer des expériences pour vérifier ces tendances, ceci a été réalisé en collaboration avec une autre équipe.

Des études de radiomarquage par le ^{64}Cu et le ^{68}Ga ont été réalisées par Marie-Caline Abadjian sous la supervision de Carolyn J. Anderson à l'Université de Pittsburg aux Etats-Unis. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3-4** et montrent qu'il est possible d'obtenir de bons rendements de radiomarquage par le ^{64}Cu et ^{68}Ga pour les particules AGuIX.

Tableau 3-4 : Radiomarquage des particules AGuIX dans un tampon acétate (0,5 M) par le ^{64}Cu ou le ^{68}Ga . Le rendement de radiomarquage est déterminé par CCM.

Radioisotope	Conditions	Rendement (%)
^{64}Cu	$[\text{Gd}^{3+}] = 50 \text{ mM}$; 50°C ; pH = 4,5 ; 60 min ; 925 MBq.mL ⁻¹	80
^{68}Ga	$[\text{Gd}^{3+}] = 50 \text{ mM}$; 50°C ; pH = 3 ; 20 min ; 185 MBq.mL ⁻¹	85

3.2.4 Conclusion

Dans cette première partie, nous avons présenté plusieurs expériences montrant que les particules AGuIX pouvaient facilement complexer des radioisotopes pour la SPECT ou la PET. Plusieurs protocoles ont été mis en place avec succès et ont permis, tout en conservant une bonne stabilité des particules, d'obtenir des taux de radiomarquage supérieurs à 80 %.

Des expériences *in vitro* et *in vivo* (stabilité, biodistribution) seraient intéressantes afin de valider l'intérêt de telles nanostructures et vérifier qu'il n'y aurait pas de libération du radioisotope après administration, ce qui nuirait à l'imagerie.

Par ailleurs, dans l'introduction de ce chapitre, nous avons mentionné que pour le gallium et le cuivre le NOTA et le NODAGA étaient les ligands privilégiés. Afin d'optimiser les radiomarquages, nous nous sommes donc intéressés dans une deuxième partie à la fonctionnalisation des particules AGuIX avec le NODAGA.

3.3 COMPLEXATION DE ^{64}Cu ET ^{68}Ga PAR LE NODAGA

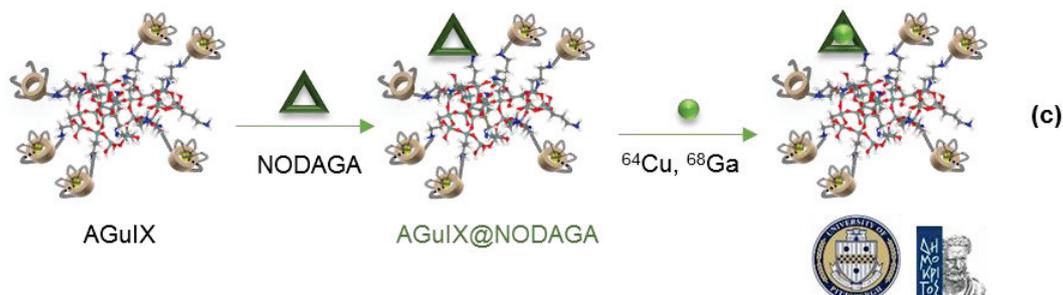


Figure 3-6 : Ajout de NODAGA sur les particules AGuIX pour le radiomarquage avec le ^{64}Cu et le ^{68}Ga .

3.3.1 Synthèse et caractérisations

Pour ajouter des fonctions NOTA à la surface des particules AGuIX, on a utilisé des ligands NODAGA ce qui permet de conserver, après fonctionnalisation, trois fonctions acide carboxyliques disponibles pour la complexation des radioisotopes. La synthèse des particules AGuIX@NODAGA est représentée sur la **Figure 3-7**, elle est identique à celle des particules AGuIX@DOTA présentée dans le **chapitre 2**. Le ligand NODAGA-NHS, fourni par CheMatech (Dijon, France), peut réagir avec les amines présentes à la surface des particules AGuIX pour former une liaison covalente amide. La purification est effectuée par filtration tangentielle comme précédemment.

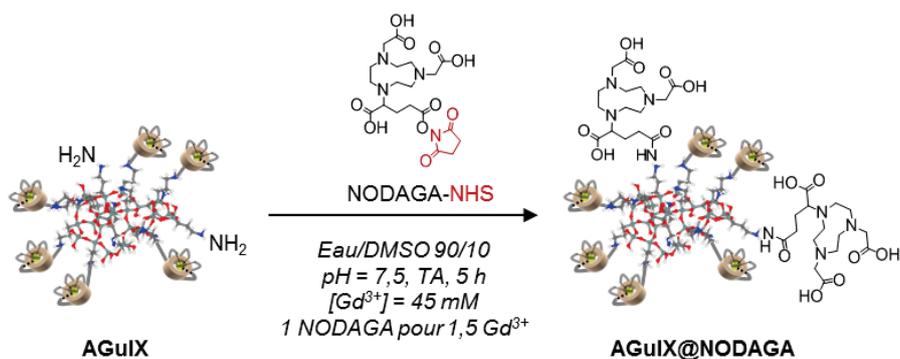


Figure 3-7 : Synthèse des particules AGuIX@NODAGA.

Les caractérisations des particules sont présentées dans **Tableau 3-5** et sur la **Figure 3-8**. Elles sont très proches de celles des particules AGuIX@DOTA (**chapitre 2**).

Les AGuIX@NODAGA ont un diamètre hydrodynamique de $4,3 \pm 1,0$ nm approprié pour une élimination rénale et similaire à celui des particules AGuIX ($3,3 \pm 0,8$ nm). Les propriétés magnétiques des particules AGuIX@NODAGA soulignent la possibilité de les utiliser comme agent de contraste positif en IRM, en effet,

elles possèdent une relaxativité $r_1 = 16,7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ et ratio un $r_2/r_1 = 1,4$. La pureté des particules a été évaluée par HPLC et mesure d'absorbance à 295 nm. Le temps de rétention est légèrement plus grand que celui des particules AGuIX (13,9 min et 12,6 min respectivement) ce qui peut provenir de la modification de la surface des particules. La diminution du point isoélectrique (de 7,6 pour les AGuIX à 5,2 pour les AGuIX@NODAGA) est cohérente avec la fonctionnalisation et donc l'échange des amines en surface par des acides carboxyliques. La présence des NODAGA, est aussi visible en spectroscopie IR. En effet, on observe l'apparition d'une bande à 1720 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation des liaisons C=O des acides carboxyliques des NODAGA.^[109,110]

Tableau 3-5 : Caractérisations des particules AGuIX et AGuIX@NODAGA.

Caractérisations	AGuIX	AGuIX@NODAGA
DLS	$D_H = 3,6 \pm 0,8 \text{ nm}$	$D_H = 4,3 \pm 0,9 \text{ nm}$
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	$r_1 = 12,2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}; r_2/r_1 = 1,3$	$r_1 = 16,7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}; r_2/r_1 = 1,4$
HPLC (A = 295 nm)	Pureté de 96 % $t_R = 12,6 \text{ min}$ $l_{1/2} = 0,9 \text{ min}$	Pureté de 99 % $t_R = 13,9 \text{ min}$ $l_{1/2} = 1,3 \text{ min}$
Point isoélectrique	$\text{pH} = 7,6 \pm 0,2$	$\text{pH} = 5,2 \pm 0,2$
Spectroscopie IR	Pas d'épaulement à 1720 cm^{-1}	Bande de vibration à 1720 cm^{-1}
Nombre de chélates libres	1 %	~ 30 %

Le nombre de chélates libres à la surface des particules AGuIX@NODAGA, a été évalué par les différentes techniques présentées dans le **chapitre 2**. On a ainsi complexé une quantité croissante d'ions Eu^{3+} ($\log K = 13,9$ pour le complexe NOTA@Eu^{3+})^[111] et suivi la luminescence des échantillons. Comme le montre la **Figure 3-8**, la luminescence s'accroît dans un premier temps lorsque l'euporium est complexé par les DOTAGA et les NODAGA en surface de la particule. Elle atteint un palier lorsque les chélates sont saturés. La rupture de pente nous indique que les particules présentent environ 0,42 chélates libres par Gd^{3+} soit 4,3 chélates libres par particule environ (30 %). En supposant qu'il n'y ait pas de changement du nombre de DOTAGA libres durant le greffage des NODAGA, on aurait donc 4,1 NODAGA par particule disponibles pour le radiomarquage. Les mêmes résultats sont obtenus en utilisant l'orange de xylénol après complexation d'ions Gd^{3+} ($\log K = 13,7$)^[160] pour le complexe NOTA@Gd^{3+} ou l'HPLC après complexation des ions Cu^{2+}

$\log K = 21,6^{[113]}$ pour le complexe NOTA@Cu^{2+}). En effet on trouve respectivement 30 et 31 % de chélates libres pour les AGuIX@NODAGA avec ces techniques.

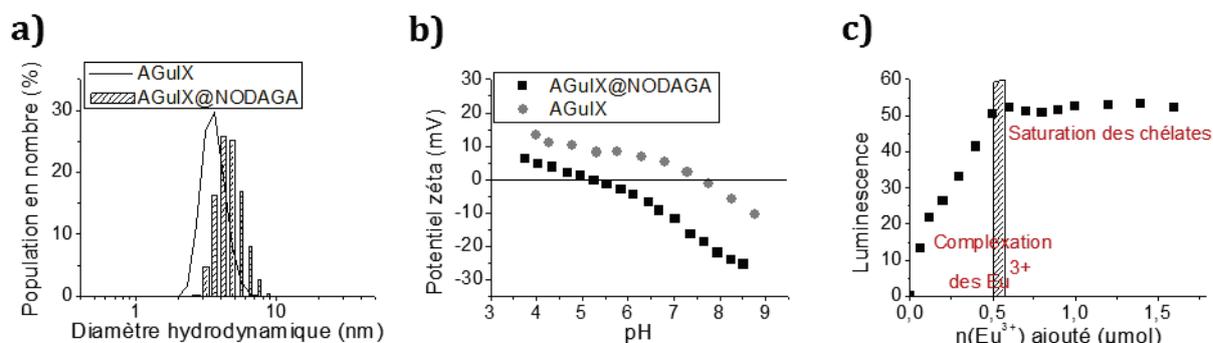


Figure 3-8 : Caractérisations des particules AGuIX@NODAGA. **(a)** Détermination du diamètre hydrodynamique par DLS. **(b)** Evolution du potentiel zéta (mV) en fonction du pH. **(c)** Détermination du nombre de chélates libres en surface de la particule par complexation d'ions Eu^{3+} et mesure de luminescence. $\lambda_{\text{excitation}} = 395 \text{ nm}$. $n_{\text{Gd,particule}} = 1,2 \mu\text{mol}$. La rupture de pente a lieu pour $n_{\text{Eu}^{3+}} = 0,51 \mu\text{mol}$.

Afin d'obtenir la structure des particules, les pourcentages massiques en gadolinium (Gd), silicium (Si), carbone (C) et azote (N) ont été déterminés par l'entreprise Filab (Dijon, France). Les résultats sont cohérents avec la formule suivante pour les particules AGuIX@NODAGA : $(\text{Gd}_1\text{APTES}^*_{3,3}\text{TEOS}^*_{4,1}\text{DOTAGA}^*_{1,02}\text{NODAGA}^*_{0,41})_n$ (voir le **Tableau 3-6**). Elle confirme le nombre de ligands libres en surface de la particule et est très proche de celle des particules AGuIX@DOTA. Comme pour ces dernières, la différence de composition, notamment la quantité de TEOS* et APTES*, par rapport à des particules AGuIX indique un changement dans la structure des particules. Cela peut venir des étapes de synthèse et de purification au cours desquelles on éliminerait les plus petites particules.

Tableau 3-6 : Comparaison des pourcentages massiques obtenus expérimentalement par Filab ou calculés à partir de la structure proposée pour les particules AGuIX@NODAGA.

	Gd	Si	C	N
%massique exp	8,5	11,5	23,31	6,44
%massique calc	8,5	11,2	23,00	6,52
Différence absolue	0	0,30	0,31	0,08

Dans cette partie, nous avons pu facilement transposer les méthodes de synthèses, de purifications et de caractérisations mises en place dans le cadre du **chapitre 2** afin d'intégrer des groupements NODAGA en surface des particules AGuIX. Ceci illustre encore une fois la grande versatilité de la nanoplatforme AGuIX et des étapes de fonctionnalisation de surface.

3.3.2 Radiomarquage par du ^{64}Cu : biodistribution quantitative

Les particules AGuIX@NODAGA ont pu être marquées par du ^{64}Cu afin d'étudier de manière quantitative la biodistribution des particules sur plusieurs heures ($\tau_{1/2} = 12,7$ h). Les expériences ont été réalisées par Marie-Caline Abadjian avec l'aide de Joe Latoche sous la supervision de Carolyn J. Anderson à l'Université de Pittsburg aux Etats-Unis.

Les nanoparticules AGuIX@NODAGA ont été marquées par le ^{64}Cu à un pH de 5, à 50°C et durant 35 min. Le rendement de radiomarquage de 81 % a été déterminé par CCM. Le cuivre non complexé a été éliminé par filtration tangentielle.

La biodistribution des particules après injection intraveineuse a ensuite été étudiée sur des souris pour un modèle de cancer du sein (4T1, tumeur hétérotopique). Six souris Balb/c femelles ont reçu une injection de 10^5 cellules 4T1 au niveau de l'épaule droite avant de laisser les tumeurs se développer durant environ 2 semaines jusqu'à atteindre un volume de 100-500 mm^3 . Les expériences *in vivo* ont ensuite été réalisées et les paramètres d'imagerie optimisés :

- IRM (2 souris): Injection de 100 μL de particules AGuIX@NODAGA par la veine de la queue ($[\text{Gd}^{3+}] = 50$ mM). 15 images prises entre 0 et 50 min puis sacrifice des souris pour histologie.
- PET/CT (4 souris) : Injection de 150 μL de AGuIX@NODAGA@ ^{64}Cu par la veine de la queue (activité spécifique: $\sim 0,2$ mCi, milliCurie, soit 7,4 MBq et $[\text{Gd}^{3+}] = 16,7$ mM). Images prises à 1 h, 2 h, 4 h et 24 h post injection. Collecte de quelques organes : sang, reins, foie, poumons, cœur, muscle, os, tumeur, rate, pancréas et graisse.

Quelques-unes des images IRM obtenues sont présentées sur la **Figure 3-9**. Elles montrent une prise de contraste de la tumeur (zone plus blanche) dès les cinq premières minutes ce qui correspond à une accumulation rapide des particules. La distribution n'est cependant pas homogène, les particules se concentrant principalement dans la partie périphérique de la tumeur. Au-delà de trente minutes, une diffusion lente hors des tumeurs est observée.

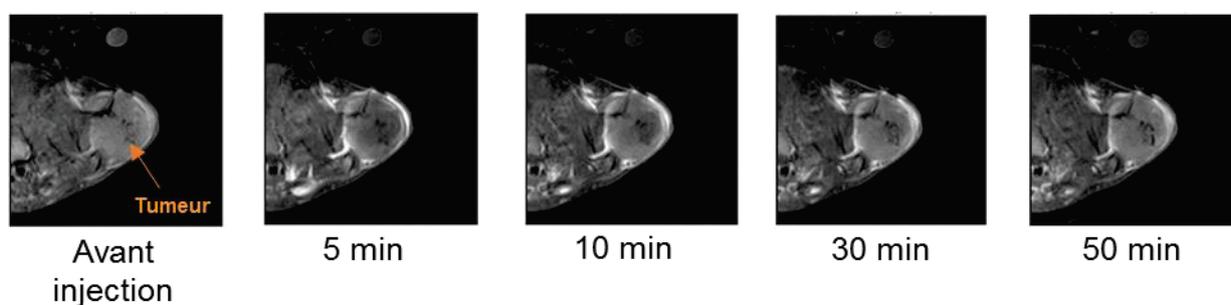


Figure 3-9 : Images IRM pondérées T_1 montrant la biodistribution des nanoparticules AGuIX@NODAGA après injection intraveineuse à des souris femelles Balb/c porteuses de tumeurs 4 T1. L'apparition de zone blanche révèle l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs.

Les images PET obtenues sont représentées sur la **Figure 3-10**. Elles montrent une accumulation dans la tumeur et les reins (contraste jaune orangé), les particules y sont toujours présentes 24 h post-injection. Une faible accumulation est observée dans le foie.

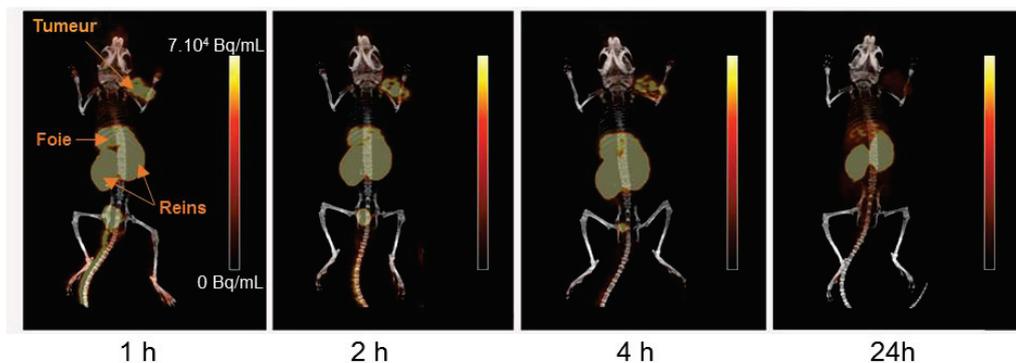


Figure 3-10 : Images PET/CT (MIP) montrant la biodistribution des nanoparticules AGuIX@NODAGA@⁶⁴Cu après injection intraveineuse dans des souris femelles Balb/c porteuses de tumeurs 4 T1. Les nanoparticules s'accumulent dans les tumeurs par effet EPR et sont éliminées majoritairement par voie rénale.

La distribution des particules a été quantifiée à la fois *ex vivo* (après sacrifice des animaux à 24 h) et *in vivo* (grâce à des images PET), les résultats sont présentés sur la **Figure 3-11**. L'unité « ID/g » (injected dose per gram) correspond à la dose de radioactivité mesurée pour un organe donné et divisée par la masse de celui-ci. Cette dose est exprimée en pourcentage de la dose totale injectée. La **Figure 3-11-a**, montre bien que l'élimination des particules est principalement rénale (ID/g ~ 112 % à 24 h) avec une accumulation relativement faible pour le foie (ID/g ~ 6,7 % à 24 h). Pour la tumeur, on trouve une valeur ID/g d'environ 3 % confirmant l'accumulation des particules dans celle-ci. D'autre part, comme présenté sur la **Figure 3-11-b**, les images PET permettent de déterminer les ratios des quantités (exprimées en ID/g) de particules marquées entre différents organes ou tissus. Ainsi le ratio Tumeur : Muscle est optimal 4 h après injection intraveineuse des particules, la valeur obtenue est proche de 4. Les nanoparticules sont donc toujours présentes dans les tumeurs mais ont été éliminées progressivement des tissus sains.

Actuellement, les conditions de radiomarquage sont en cours d'optimisation afin d'augmenter la pureté radiochimique et d'éviter les étapes de purification. L'idée serait ensuite d'étudier la biodistribution de ces particules AGuIX@NODAGA@⁶⁴Cu sur un modèle de souris porteuses de métastases (induites par une injection intraveineuse de cellules 4 T1). La sensibilité de la PET pourrait en effet être un atout par rapport à l'IRM en raison de la sensibilité de la technique (même une faible quantité de particules dans les métastases permettrait de les détecter) et de la facilité de quantification.

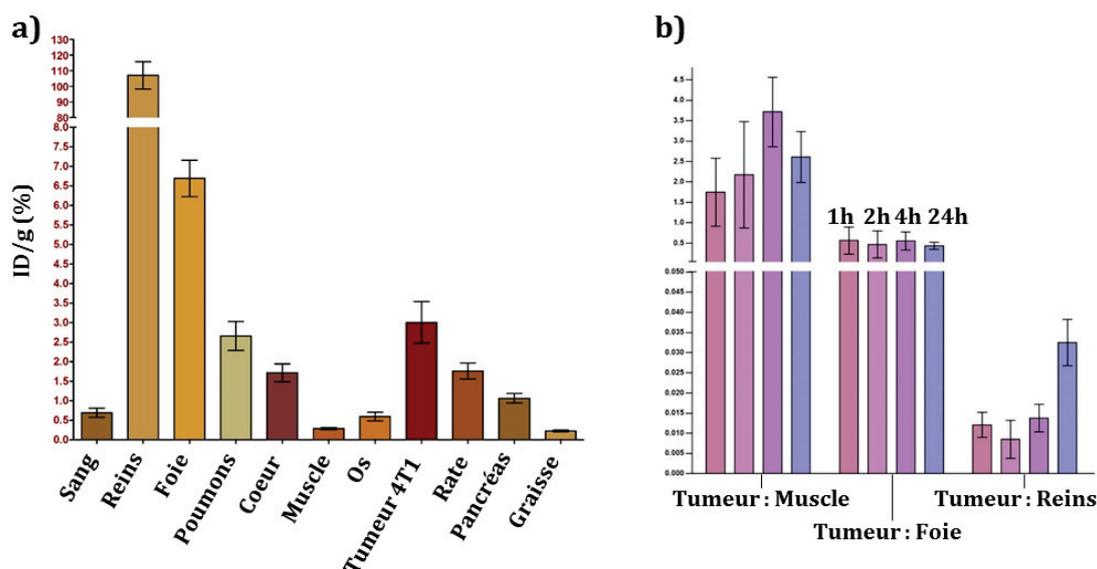


Figure 3-11 : Etude de la biodistribution des nanoparticules AGuIX@NODAGA@ ^{64}Cu après injection intraveineuse dans des souris femelles Balb/c porteuses de tumeurs 4T1. **(a)** Radioactivité dans différents organes exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme et déterminée 24 h post injection *ex vivo*. On constate que l'élimination est majoritairement rénale et que les particules s'accumulent dans les tumeurs. **(b)** Ratio pour différents organes des radioactivités déterminés par les images PET/CT. Le ratio Tumeur : Muscle indique une bonne différenciation entre tissus sains et tumoraux.

3.3.3 Radiomarquage par du ^{68}Ga : biodistribution et métabolisation, publication

Un deuxième aspect concernant les particules AGuIX@NODAGA était de déterminer si elles restaient intactes *in vivo* après injection intraveineuse. Pour cela les particules ont été marquées par du ^{68}Ga ; nous avons vu dans la première partie que le ligand NODAGA est particulièrement bien adapté pour ce radioisotope.

Les études de radiomarquage des particules AGuIX@NODAGA ont été réalisées par l'équipe de Penelope Bouziotis au centre de recherches scientifiques Demokritos en Grèce. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication acceptée dans *Nanomedicine* en 2017.

3.3.3.1 Résumé des principaux résultats

Les AGuIX@NODAGA ont été marquées par du ^{68}Ga à un pH de 5,6, 50°C et pendant 20 min conduisant à un rendement de radiomarquage de 85 %. Une purification sur colonne PD10 (éluant : PBS, pH = 7,4) a ensuite été mise en place et a permis d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 99 %. La stabilité des complexes a été évaluée dans du sérum et à 37°C , aucune dégradation n'a été observée jusqu'à 3 h.

Des injections intraveineuses sur des souris porteuses d'une tumeur hétérotopique U87MG (glioblastome, tumeur du cerveau) ont ensuite été réalisées. La biodistribution des particules a été évaluée *ex vivo* 30, 60 et 120 min après administration. Comme précédemment, la mesure du taux de radioactivité dans différents

organes a permis d'observer une accumulation dans les tumeurs et une élimination principalement rénale. Bien que l'absorption tumorale diminue de 30 à 120 min post-injection, le rapport Tumeur : Muscle augmente lui avec le temps (**Figure 3-12-a**). Ce dernier atteint une valeur de 5 environ 120 min post-injection, suggérant une nette différenciation entre les tissus sains et tumoraux. Des images IRM (**Figure 3-12-b**) et PET (**Figure 3-12-c**) ont aussi été enregistrées 60 min après administration aux souris porteuses d'une tumeur et montre l'accumulation des particules dans la zone tumorale.

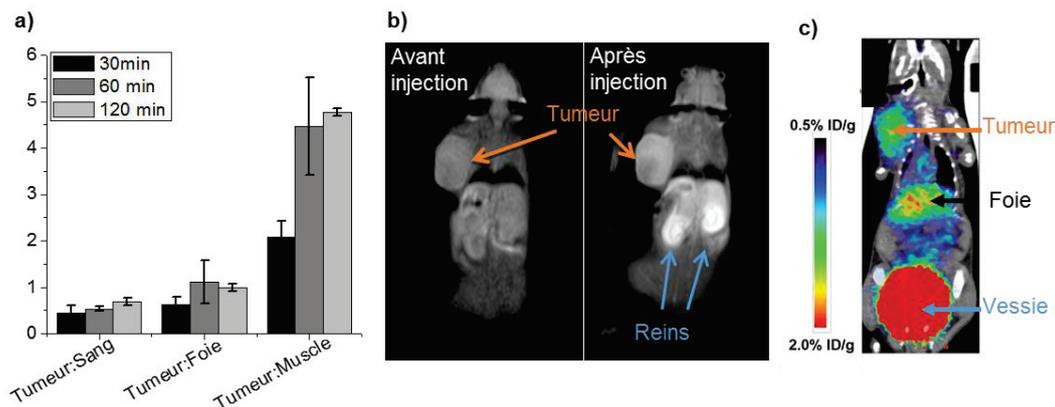


Figure 3-12 : Injection de nanoparticules AGuIX@NODAGA marquées au ^{68}Ga sur des souris porteuses d'une tumeur hétérotopique U87MG. **(a)** Etude ex vivo 30, 60 et 120 min après administration. Ratio de la quantité de radioactivité (exprimées en % de la dose injectée par gramme d'organe). Le ratio Tumeur:Muscle indique une bonne différenciation entre tissus sains et tumoraux. **(b)** Images IRM pondérée T1 avant et 60 min après injection des particules. **(c)** Images PET/CT obtenues 60 min après injections des particules. Elles montrent une accumulation dans le foie, la tumeur et les reins.

Enfin, une étude de métabolisme a été réalisée 60 min post-injection des particules pour vérifier l'intégrité des composés radiomarqués dans le sang, les urines et la tumeur. Après prélèvement, les échantillons sont traités et analysés par HPLC (voir **Figure 3-13**). Dans la tumeur, aucune dégradation des particules AGuIX@NODAGA@ ^{68}Ga n'a été observée. Dans les urines, la quantité de particules intactes est comprise entre 90 et 95 %. La faible dégradation observée pourrait venir de l'hydrolyse des liaisons Si-O-Si du cœur de polysiloxane des nanoparticules entraînant la formation de fragments@ ^{68}Ga (APTES-NODAGA@ ^{68}Ga ,...). Dans le sang, les particules sont très majoritairement intactes.

Cette étude nous a donc permis de mieux comprendre la biodistribution des particules AGuIX@NODAGA après injection intraveineuse et de montrer que ces particules sont adaptées et prometteuses pour l'imagerie PET.

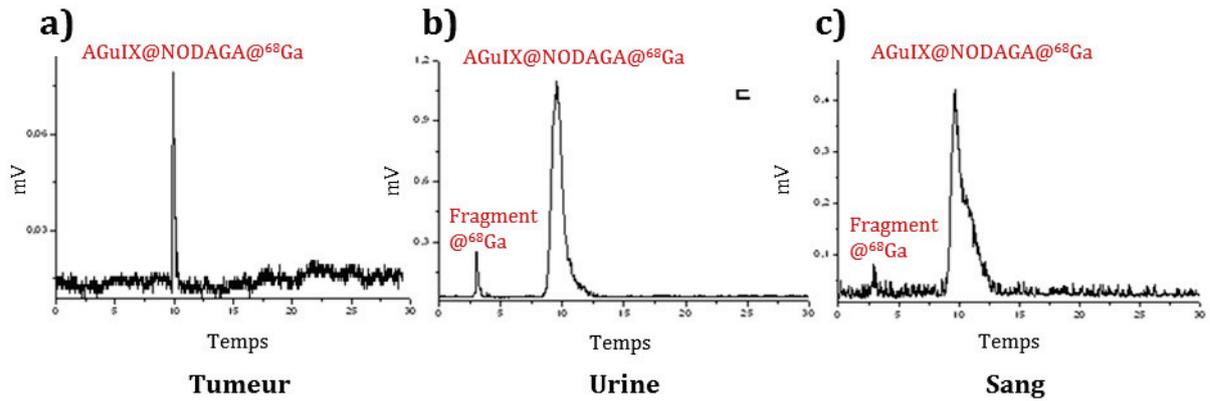


Figure 3-13 : Chromatogrammes HPLC obtenus 60 min après injection intraveineuse de particules AGuIX@NODAGA@ ^{68}Ga sur des souris porteuses de tumeurs. Les analyses réalisées pour (a) la tumeur, (b) l'urine et (c) le sang montrent que les particules sont majoritairement intactes.

3.3.3.2 Publication

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Nanomedicine



⁶⁸Ga-radiolabeled AGuIX nanoparticles as dual-modality imaging agents for PET/MRI-guided radiation therapy

Aim: The aim of this study was to develop a dual-modality positron emission tomography/magnetic resonance (PET/MR) imaging probe by radiolabeling gadolinium-containing AGuIX derivatives with the positron-emitter Gallium-68 (⁶⁸Ga). **Materials & methods:** AGuIX@NODAGA nanoparticles were labeled with ⁶⁸Ga at high efficiency. Tumor accumulation in an appropriate disease model was assessed by *ex vivo* biodistribution and *in vivo* PET/MR imaging. **Results:** ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA was proven to passively accumulate in U87MG human glioblastoma tumor xenografts. Metabolite assessment in serum, urine and tumor samples showed that ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA remains unmetabolized up to at least 60 min postinjection. **Conclusion:** This study demonstrates that ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA can be used as a dual-modality PET/MR imaging agent with passive accumulation in the diseased area, thus showing great potential for PET/MR image-guided radiation therapy.

First draft submitted: 25 January 2017; Accepted for publication: 26 April 2017; Published online: 16 June 2017

Keywords: Gallium-68 • PET/MR imaging • ultrasmall AGuIX nanoparticles

The development of multimodal imaging systems has led to a significant growth of dual-mode molecular imaging probes used for a range of different applications, including tumor imaging. Positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) was introduced in clinical practice 15 years ago to enhance the strengths of the two modalities and minimize their limitations combining biological with anatomical information [1]. More recently, MRI has been used in place of CT to provide PET/MRI and SPECT/MRI hybrid imaging systems, capable of increased soft tissue contrast and resulting in lower radiation exposure [2]. Most of the multimodal agents developed to date have been combinations of either PET or MRI agents with optical agents. It is interesting to note that few SPECT/MRI and PET/MRI probes have been reported to this day but now, with the development of suitable equipment, there is a great scope

for development of these kinds of probes. Dual-modality contrast agents, such as radiolabeled nanoparticles (NPs), are promising candidates for a number of diagnostic applications, since they combine the advantages of two different imaging modalities, namely PET imaging with MRI. The benefit of such a combination is to more accurately interpret disease and abnormalities *in vivo*, by exploiting the advantages of each imaging technique, in other words, high sensitivity for PET, high resolution anatomical information for MRI [3–6].

AGuIX NPs are ultrasmall rigid imaging NPs made of polysiloxane and surrounded by gadolinium chelates. They are obtained by a top-down process already described in the literature [7]. With a hydrodynamic diameter under 5 nm, they represent the first multifunctional silica-based NPs that are sufficiently small to escape hepatic clearance and enable animal imaging by four complemen-

Penelope Bouziotis^{*1}, Dimitris Stellas², Eloïse Thomas³, Charles Truillet³, Charalampos Tsoukalas¹, François Lux³, Theodoros Tsotakos¹, Stavros Xanthopoulos¹, Maria Paravatou-Petsotas¹, Anastasios Gaitanis², Lia Angela Mouloupoulos⁴, Vassilis Koutoulidis⁴, Constantinos D Anagnostopoulos² & Olivier Tillement³

¹Institute of Nuclear & Radiological Sciences & Technology, Energy & Safety, National Center for Scientific Research 'Demokritos', Aghia Paraskevi 15310, Athens, Greece

²Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou Street, 11527, Athens, Greece

³Institut Lumière Matière, UMR5306 Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

⁴First Department of Radiology, School of Medicine, National & Kapodistrian University of Athens, 76 Vasilissis Sofias Avenue, 11528, Athens, Greece

*Author for correspondence: bouzioti@rrp.demokritos.gr

Future
Medicine  part of 

tary techniques (MRI, SPECT after labelling by ^{111}In , fluorescence imaging and CT) [8]. Thanks to their radiosensitizing properties, AGuIX NPs have proven to be an excellent tool for radiation therapy, and recent literature shows how MRI can be used to perform image-guided radiation therapy with them [7,9-12]. However, a dual-modality PET/MRI imaging agent which combines the advantages of both imaging modalities has more to offer than a single-modality, gadolinium MR imaging agent, in this case, and can be used as a companion diagnostic agent.

Positron-emitting radionuclides, such as Fluorine-18, are produced at cyclotron facilities all over the world. An alternative production of positron-emitting radionuclides is via a generator system. Generators have the advantage of allowing clinical studies without an on-site cyclotron, thus providing radionuclides upon demand. Gallium-68 is one such radionuclide. The application of ^{68}Ga -labeled peptides has attracted considerable interest for cancer imaging because of its physical characteristics. ^{68}Ga decays at 89% through positron emission of 1.92 MeV (maximum energy) and can be eluted from an in-house $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator (^{68}Ge , $T_{1/2} = 270.8$ days), thus providing an ideal positron-emitting isotope without the need for an on-site cyclotron [13]. Furthermore, its physical half-life of 68 min renders it compatible with the *in vivo* pharmacokinetics of many peptides and antibody fragments. Thus, the application of ^{68}Ga -labeled peptides for cancer imaging has gained considerable interest in recent years [14,15]. One of the main advantages of ^{68}Ga is that it can be used as the diagnostic analogue of many trivalent radionuclides, for which the coordination chemistry is fully developed. In other words, the same chelator can be used for efficient labeling with the diagnostic radionuclide ^{68}Ga and with other therapeutic nuclides such as Yttrium-90 and Lutetium-177 [16].

Previous work from our group has shown that AGuIX derivatives labeled with ^{68}Ga are a promising imaging tool for simultaneous PET/MRI imaging [17]. The classical AGuIX NPs, made of polysiloxane and surrounded by DOTAGA(Gd^{3+}) covalently grafted to the inorganic matrix, have been modified in order to radiolabel them. While DOTA is a widely used chelator for gallium ($\log \beta = 13.7$), NODAGA 2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazanonane-1,4-diyl)diacetic acid appears to be a more interesting chelate and has thus been grafted on the NPs for this labeling ($\log \beta = 30.98$) [18]. *Ex vivo* biodistribution studies on normal mice showed an extremely low residual activity in all untargeted tissues, especially in organs where NPs are classically sequestered, such as the liver and lung (<2%

ID/g at 120 min p.i.). These same NPs, functionalized with a desferrioxamine chelator instead of NODAGA, have also been labeled with Zirconium-89 for PET imaging applications [19]. By incorporating a long-lived isotope such as ^{89}Zr ($T_{1/2} = \sim 78$ h) onto AGuIX, the amount of NPs at the cancerous site may be quantified at later time-points postinjection.

The present work aimed at showing that ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA NPs can be used as dual-modality PET/MRI imaging agents capable of providing higher-quality, more detailed images for better planning of radiation therapy sessions. The objectives of the present study were to assess the passive accumulation of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA in a U87MG tumor model, both by *ex vivo* biodistribution studies and *in vivo* PET and MR imaging studies.

Materials & methods

All reagents and solvents were of chemical grade and used without further purification. Sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38%), dimethylsulfoxide (DMSO, >99.5%) and europium chloride hexahydrate ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, >99%) were purchased from Aldrich Chemical (France). Acetonitrile (CH_3CN , >99.9%) was purchased from Carlo Erba (France). Trifluoroacetic acid (TFA, >99%) was purchased from Alfa Aesar (United Kingdom). AGuIX particles were purchased from Nano-H/CheMatech (France). The derivative NODAGA-NHS chelate (2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazanonane-1,4-diyl)diacetic acid) was purchased from CheMatech (France). All products were used without further purification. Only Milli-Q water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) was used for the aqueous solution preparation. Elementary analysis of particles was performed by the Filab company (France).

HPLC was performed using a Waters 600 Controller pump, a Waters 996 Photodiode Array detector and a γ -RAM radioactivity detector to measure radioactive flow. The UV detection wavelength was 295 nm for all experiments. A lower activity commercial $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator was acquired from Eckert & Ziegler (Berlin, Germany). HPLC analyses were performed on a Jupiter C4 column (150×4.60 mm, $5 \mu\text{m}$, 300 \AA , Phenomenex®, USA). The gradient systems used are given in the text. Solvents for HPLC were of analytical grade; before use they were filtered through $0.22 \mu\text{m}$ membrane filters (Millipore, MA, USA) and degassed. Radioactivity measurements were conducted in an automated well-typed γ -counter NaI(Tl) crystal (Packard). Tissue and blood samples were measured on a Packard COBRA II Auto-Gamma counter (Canberra, USA).

The U87MG cell line was acquired from ATCC (VA, USA). For cell culturing, Dulbecco's modified Eagle medium, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, L-glutamine and trypsin/EDTA solution were purchased from PAA Laboratories (GmbH, Austria). The bovine serum albumin, glutamax, HEPES, bacitracin, aprotinin and PMSF used were obtained from Sigma-Aldrich (GmbH, Austria).

Animals used for the biodistribution studies were obtained from the breeding facilities of the Institute of Biological Sciences, National Center for Scientific Research, Demokritos, Athens, Greece.

MRI studies were performed on a 1.5 Tesla MRI Unit (Philips Medical Systems, Best, The Netherlands).

PET scans were performed using a Mediso scanner (Mediso NanoScan PC, with 8 detector modules) with an axial field of view of 98.6 mm and a spatial resolution of 0.8 mm at the center of the scanner (with Tera-Tomo 3D PET iterative reconstruction). Prior to PET imaging, a CT scan was performed for attenuation correction and anatomic localization. The X-ray beam energy set at 50kVp, the exposure time at 300 msec and current at 670 μ A. The number of projections per rotation was 480 and the slice thickness 250 μ m. For the CT image reconstruction, a modified version of the Feldkamp algorithm and the Ram-Lak filter were used. PET and CT data were reconstructed using Nucline software version 2.01 (Build 011.0005). The PET image reconstruction was performed using a version of 3D OSEM algorithm (Tera-Tomo 3D PET image reconstruction algorithm) and voxel dimensions of 0.4 \times 0.4 \times 0.4 mm (size of image matrix 87 \times 75 \times 246). Dead time, decay, scatter, attenuation and axial sensitivity corrections as well as normalization were applied to PET data. Image analysis was performed with the Mediso InterView Fusion software package version 3.00.039.0000 BETA. Images were analyzed by drawing volumes of interests employing 'add isocount 3D Regions Of Interest (ROI)' option.

AGuIX@NODAGA synthesis

AGuIX NPs were synthesized according to an original top-down process already described in the literature [7] and presented briefly in the results part. They were then functionalized with NODAGA-NHS ((2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid). For this, 540 μ mol of Gd of AGuIX were dispersed in 5.40 ml of water for 1 h at a pH of 7.1 ($[Gd^{3+}] = 100$ mM). Then 4.41 ml of water was added. 198 mg of the derivative NODAGA chelate (270 μ mol; ratio Gd/DOTA = 2) was dissolved in 0.99 ml of DMSO ($[NODAGA] = 200$ mg/ml). This solution was then gradually added to the AGuIX solution under stirring at room tempera-

ture and the pH adjusted to 7.4 by addition of NaOH solution. The particles solution was stirred for 5 h 30 min.

AGuIX@NODAGA purification

The mixture was diluted in water to $[Gd^{3+}] = 16.4$ mM ($V = 33$ ml) in order to have a solution containing less than 4% DMSO and the pH decreased to 1 to avoid ionic interactions between ammonium of AGuIX and carboxylate of NODAGA-NHS. Particles were then purified by tangential filtration through Vivaspin[®] membranes (MWCO = 5 kDa) purchased from Sartorius Stedim Biotech (France). The colloidal solution was introduced into Vivaspin tubes, and centrifuged. This step was repeated several times, by filling the tubes with water and centrifuging again, until the desired purification rate was reached (>25,000). The particles' solution was concentrated to approximately $[Gd^{3+}] = 100$ mM, the pH adjusted to 7.4 and finally the solution was sterile filtered through a 0.2 μ m syringe filter in order to remove the largest impurities. It was freeze-dried for storage, using a Christ Alpha 1–2 lyophilisator. The Gd yield for the synthesis is 31%.

Radiolabeling of AGuIX@NODAGA NPs with

⁶⁸Ga

For the radiolabeling experiment, ⁶⁸Ga was eluted from the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator with 7 ml 0.1 N HCl and trapped onto an acidic cation exchange resin. Metal impurities (such as Zn, Fe, Ti and Ge) were removed by passage of 1 ml washing solution (N1, 80% acetone + 0.15 M HCl) [20]. Subsequent desorption of purified ⁶⁸Ga from the cation exchanger was afforded with 400 μ l of 98% acetone and 2% 0.15 M HCl. For a typical preparation of ⁶⁸Ga-labeled AGuIX@NODAGA NPs, 50 μ l AGuIX@NODAGA NPs (10 μ mol $[Gd^{3+}]$ in 200 μ l H₂O) were mixed with 300 μ l of sodium acetate buffer, pH 5.6 and 200 μ l of ⁶⁸Ga eluate (50 MBq) were consequently added. The mixture was then vortexed and incubated for 20 min at 50–60°C. In order to determine the radiochemical purity of the labeled NPs, 10 μ l aliquots of the reaction solution were analyzed by HPLC, applying a linear gradient system at a 1 ml/min flow rate from 0% B to 100% B in 20 min, where solvent A = 0.1% TFA in H₂O and solvent B = 0.1% TFA in AcCN. The radiolabeled complex was consequently purified on a PD10 column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) as follows. The PD10 column was first conditioned with 8 column volumes of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4. The solution was then loaded onto the column, and ten 0.5 ml fractions were eluted with PBS. ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA was first eluted as a yellowish suspension. The radioactivity of each frac-

Research Article Bouziotis, Stellas, Thomas *et al.*

tion was counted using an ionization chamber (Capintec Radioisotope Calibrator CRC-15, Capintec Inc., Ramsey USA). The fraction with the highest radioactivity was assessed for radiochemical purity by HPLC, as described above.

***In vitro* stability**

In vitro stability of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA was assessed in serum for up to 3 h. For the labeling stability experiment, ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA (0.4 MBq/100 μl) was incubated with 900 μl human serum in a 37°C water bath for 60, 120 and 180 min and then analyzed by ITLC-SG (mobile phase: 0.1 M citric acid). $^{68}\text{Ga}^{3+}$ is expected to move with the solvent front, while the labeled compound remains at the origin. All assays were performed in triplicate.

Animal model

Animal experiments were carried out according to European and national regulations. These studies have been further approved by our Institutional ethics committee and the procedures followed are in accordance with institutional guidelines. For experimental tumor models female SCID mice of 8 weeks on the day of inoculation were obtained from the breeding facilities of the Institute of Biology, NCSR 'Demokritos.' U87MG human glioblastoma cells (1×10^7 cells) were subcutaneously inoculated into the mice. The animals were housed in air-conditioned rooms under a 12-h light/dark cycle and allowed free access to food and water. Approximately 2 weeks after inoculation, *ex vivo* biodistribution studies and *in vivo* imaging studies on the tumor-bearing mice were performed.

Biodistribution studies

The *ex vivo* behavior of the radiolabeled compound was evaluated in athymic SCID mice (17–20 g) bearing U87MG glioblastoma tumors. Before injection in mice, a concentrated solution of AGuIX in water was added to ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA, in order to obtain an injectable solution of 6.8 μmol [Gd^{3+}]/1 MBq (~6.8 mg NPs/100 μl), which was administered via the tail vein. The biodistribution study was performed at 30, 60 and 120 min postinjection ($n = 3$ per time-point). Mice were sacrificed and the organs of interest, such as the heart, liver, kidneys, stomach, intestines, spleen, lungs, pancreas, bones and tumor were removed and together with samples of muscles and urine were weighed and counted in a NaI well counter (Packard COBRA II auto gamma counter). All measurements were corrected for background and radioactive decay. Tissue distribution data were calculated as the percent injected dose per gram (% ID/g), using an appropriate standard. Stomach and intestines were not

emptied before the measurements. The % ID in whole blood was estimated assuming a whole-blood volume of 6.5% of the total body weight.

Metabolite studies***In urine, serum***

Urine and blood metabolite assessment was performed at 15, 30 and 60 min p.i., in order to determine whether ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA was metabolized after injection. Urine was collected at sacrifice time and centrifuged for 5 min at $2000 \times g$ before RP-HPLC analysis. Blood collected from mice at the same time-points was also centrifuged for 10 min at $2000 \times g$ and the supernatant (serum) was collected. Serum was treated with twice the volume of cold EtOH for protein precipitation. Samples were centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min. The remaining supernatant was separated and injected onto the HPLC column for analysis.

In tumor

Tumor samples were rapidly cut into small pieces and added to ice-cold PBS. Samples were homogenized, and the resulting homogenate was centrifuged (2000 r.p.m., 15 min). The supernatant was filtered through a 0.2 μm membrane before HPLC analysis, and 200 μl of the filtrate was directly injected onto the HPLC column. The conditions, acquisition and data processing were the same as described above for urine and serum.

In vivo* imaging studies*PET imaging**

To confirm the feasibility of using ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA for passive tumor targeting, *in vivo* micro-PET scans were performed on a U87MG tumor model. U87MG mice were fasted for a period of 12 h prior to imaging. The PET studies were conducted using 2% isoflurane anesthesia in oxygen at 0.8 l/min. The lateral tail vein of the mouse was injected with 6.7 MBq of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA in a volume of 150 μl (10.2 μmol [Gd^{3+}]/~10 mg NPs, as described above for *Biodistribution Studies*). Two different uptake times were tested: a 15 min uptake time followed by a 20 min static scan, and a 60 min uptake time followed by a 20 min static scan. During uptake time, the animal was anesthetized and its body temperature was maintained at 36°C on the scanner bed.

Histopathological studies

Two hours post-PET scanning, the mice were sacrificed and the tumors, the livers and the kidneys of each mouse were surgically removed. The tissues were then fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4 μm and stained with hematoxylin and eosin. The slides and the pictures of each tissue were

taken using an Olympus BX-50 microscope, equipped with an Olympus DP71 camera.

MR imaging

MRI exams were conducted at the Department of Radiology of the National and Kapodistrian University of Athens on a 1.5 Tesla unit (Philips Healthcare, Best, The Netherlands) using a surface phased-array coil. Anesthesia was induced with a mixture of ketamine/xylazine. T1-Weighted Turbo Spin Echo images were acquired before the injection of NPs. The next day mice were injected with AGuIX@NODAGA {20 μmol [Gd³⁺] (~20 mg NPs/100 μl)} and were imaged 60 min postinjection with the same protocol. Signal intensity measurements were obtained on a dedicated workstation (Extended MR Workspace, Philips, Best, The Netherlands). Free-hand ROI were drawn around the tumors on the pre- and postinjection images. Care was taken to include as large a portion of the tumor as possible in the ROI.

Results

Synthesis & characterization of AGuIX NPs

AGuIX NPs were synthesized according to an original top-down process already described in the literature [7]. Briefly, gadolinium oxide core was synthesized in diethylene glycol before being encapsulated in a polysiloxane shell using hydrolysis-condensation of amino-propyltriethoxysilane (APTES) and tetraethylorthosilicate (TEOS). Thanks to the primary amino groups from APTES, the obtained nanostructures were then functionalized by DOTAGA chelates (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic acid). The NPs were then transferred from diethylene glycol to water leading to the core dissolution and the complexation of the Gd³⁺ ions by DOTAGA. The resulting polysiloxane hollow cores collapsed and fragmented into small and rigid platforms of polysiloxane: AGuIX NPs. AGuIX are therefore composed of a polysiloxane matrix surrounded by DOTAGA-Gd³⁺ and primary amino groups. AGuIX particles were then functionalized with the NODAGA-NHS (2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid) by incubating the chelate with particles in water, for 5 h 30 min at room temperature and at neutral pH. Thanks to the primary amines present at the surface of the particle, NODAGA was covalently grafted via an amide bond. The resulting AGuIX@NODAGA particles were purified by tangential filtration over a 5 kDa cut-off membrane. The purification was carried out at an acidic pH in order to avoid any ionic interactions that could occur between the amines of the particles and the carboxylic acids of the chelates.

AGuIX@NODAGA particles were characterized with several complementary techniques (see **Figure 1 & Supplementary Materials**). They present a hydrodynamic diameter of 4.3 ± 0.9 nm suitable for renal excretion and closed to the one of AGuIX particles (3.6 ± 0.8 nm). The magnetic properties of AGuIX@NODAGA highlight their possible use as a positive contrast agent in MRI, indeed they present an $r_1 = 16.7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ and an $r_2/r_1 = 1.4$ at 37°C and with a magnetic field of 1.4 T. The purity of AGuIX@NODAGA was checked by HPLC and the retention time determined. It is slightly higher than the one for AGuIX (13.9 and 12.6 min, respectively) which can be attributed to the modification of the particle surface.

The decrease of the isoelectric point (from 7.6 for AGuIX to 5.2 for AGuIX@NODAGA) is consistent with the functionalization and therefore the change of amino groups at the surface for carboxylic acids. In order to quantify more precisely the number of NODAGA grafted on particles, we performed a titration based on europium (Eu) luminescence [16,18]. When Eu³⁺ ions are not complexed and free in water, their luminescence is almost completely quenched by OH-oscillator. It is no more the case when Eu³⁺ ions are complexed by DOTAGA or NODAGA chelates. Indeed a signal at 592 nm is detected after an excitation at 395 nm. This difference was used to titrate available chelates at the NPs surface. Briefly, Eu³⁺ ions were added to a solution of AGuIX@NODAGA in water. They were complexed by NODAGA (and potential free DOTAGA) leading to an increase in the luminescence signal. When all the chelates have been saturated with Eu³⁺, the luminescence reaches a plateau. Thanks to the change of slope we can determine the number of free chelates, available on the particles for radiolabeling. In our case, there are around 4.2 free chelates for 10 Gd (or one particle). The same experiment on AGuIX (data not shown) gives us 0.09 free DOTAGA for 10 Gd. Assuming there are no change in the number of free DOTAGA during the grafting of NODAGA, we can conclude that AGuIX@NODAGA particles present around 4.1 NODAGA for one particle. The same result was obtained, thanks to ICP-MS. Indeed, the following formula for AGuIX@NODAGA can be proposed: $\text{Gd}_{10}\text{APTES}^*_{33}\text{TEOS}^*_{41}\text{DOTAGA}^*_{10,2}\text{NODAGA}^*_{4,1}$.

Radiolabeling & *in vitro* stability assessment

AGuIX NPs bearing NODAGA (AGuIX@NODAGA) were radiolabeled with ⁶⁸Ga eluate after 20 min heating at approximately 50°C, and were subjected to RP-HPLC analysis. The chromatogram showed a minor peak at approximately 2.5 min, corresponding to uncomplexed ⁶⁸Ga (~15%), as well as a major peak

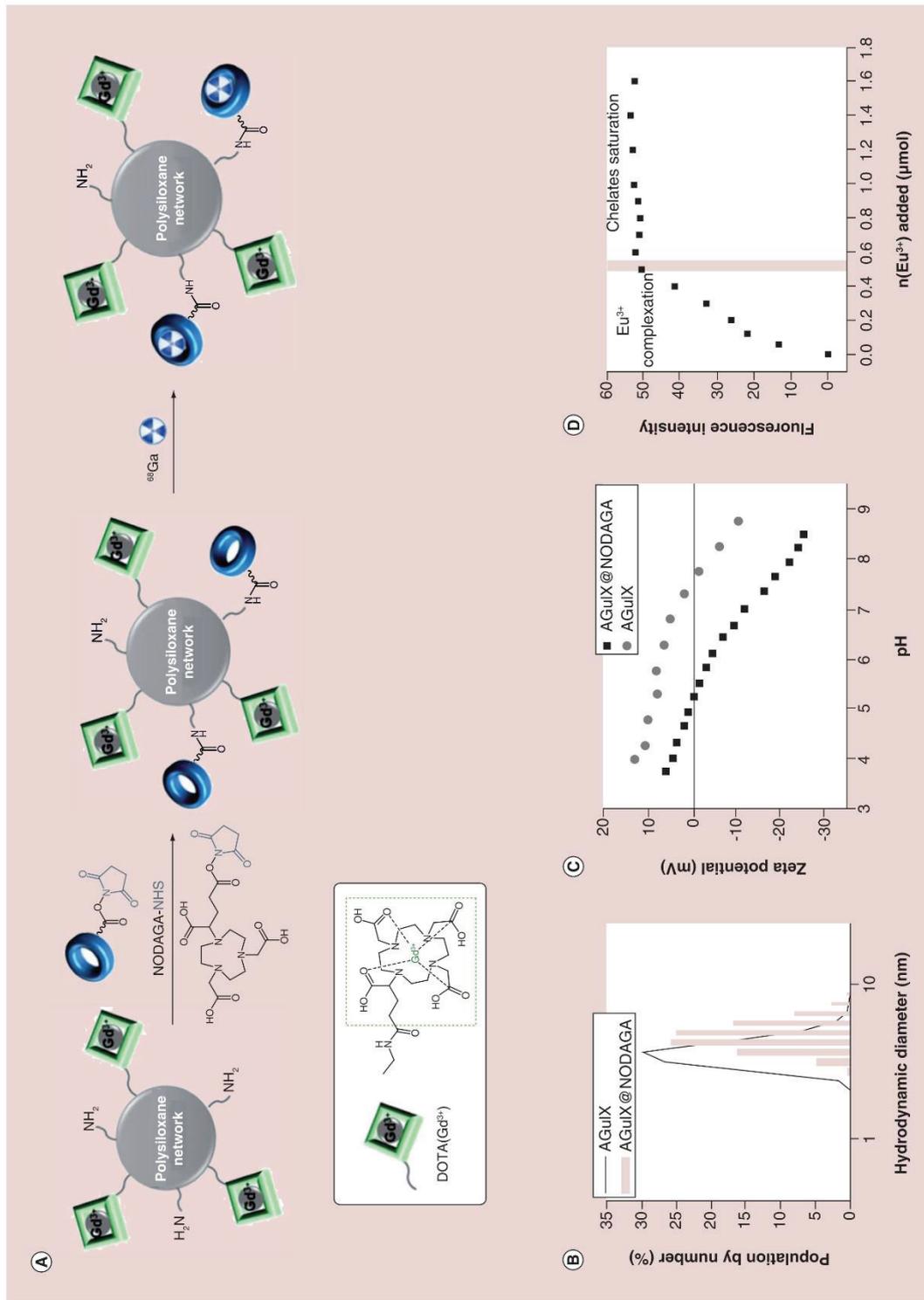


Figure 1. AGuIX@NODAGA synthesis and characterization. (A) Functionalization of AGuIX NPs with NODAGA and radiolabeling of the obtained AGuIX@NODAGA particles with ^{68}Ga . (B) Dynamic light scattering data showing the hydrodynamic diameter of AGuIX@NODAGA and AGuIX particles. (C) Evolution of the Zeta potential of AGuIX and AGuIX@NODAGA with pH. The isoelectric point for AGuIX@NODAGA is smaller than the one for AGuIX as expected. (D) Titration of available chelates on AGuIX@NODAGA thanks to europium luminescence. $n_{\text{Ga}^{3+}} = 1.2 \mu\text{mol}$. Excitation wavelength: 395 nm. Emission wavelength: 592 nm.

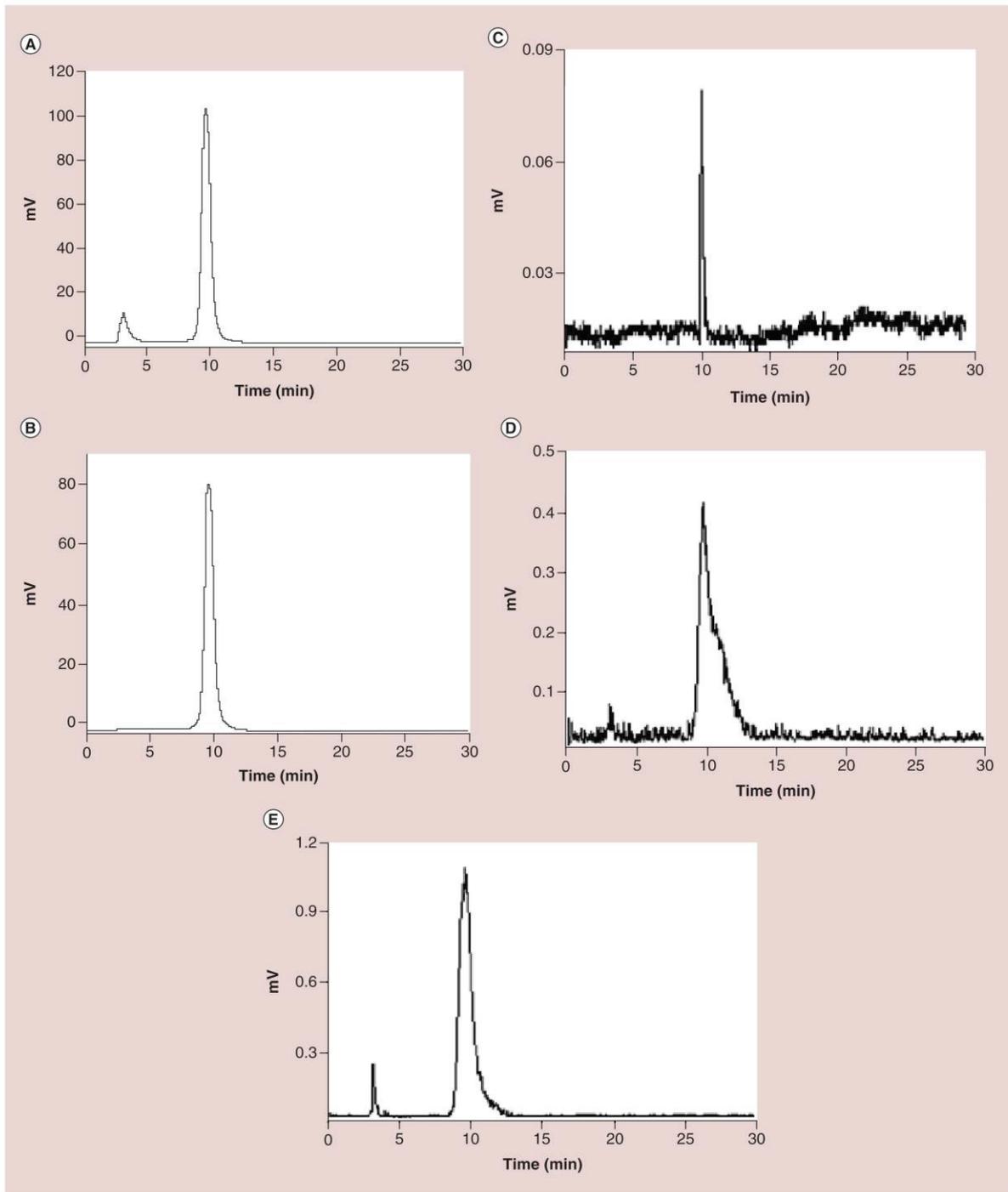


Figure 2. Metabolite studies of ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA in tumor (C), blood (D) and urine (E) of tumor-bearing mice, at 60 min postinjection (the pre- and postpurification high performance liquid chromatography curves, (A) and (B) respectively, are given as a reference).

at approximately 10 min, which is attributed to ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA (~85%) (Figure 2A). Extended heating was shown not to improve the radiolabeling yield. Therefore, ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA was subjected to purification on a PD10 column, using PBS pH 7.4 as the eluent. HPLC assessment of the purified ^{68}Ga -AGuIX showed a single peak at approximately 10 min, with practically no evidence of free ^{68}Ga (RCP > 99%, Figure 2B). The radiolabeled complex was stable in saline at RT up to 3 h.

Serum stability testing shows how well a radiotracer is tolerated *in vivo*. ^{68}Ga should remain coordinated to AGuIX@NODAGA and not released into the bloodstream. Serum stability assessment up to 3 h at 37°C showed that the complex remained almost completely intact after a 3 h incubation period (over 98% retention of the radiolabel). Further assessment was not possible, due to the short half-life of ^{68}Ga .

In vivo stability, biodistribution & imaging studies

The next step of our studies involved the assessment of the metabolite profile of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA in mouse blood and urine, as well as in tumor tissue, of a U87MG subcutaneous tumor model. As demonstrated by HPLC analysis of tumor samples, a single peak corresponding to the peak for ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA was also observed, with no other radioactive components present, suggesting that the radioactivity detected in the tumor samples is entirely attributable to unmetabolized ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA (Figure 2C). In mouse blood and urine samples at 15, 30 and 60 min postinjection of the radiotracer, no evidence of degradation of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA was observed

in all cases for blood, while for urine the amount of intact radiolabeled AGuIX@NODAGA was between 90 and 95% (Figure 2D & E, respectively). This may be attributed to small NP fragments containing ^{68}Ga -NODAGA.

Biodistribution and imaging studies followed in U87MG tumor-bearing mice injected with ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA via the tail vein. *Ex vivo* biodistribution was investigated at 30, 60 and 120 min postinjection (Figure 3 & Supplementary Table 1) and showed that the radiotracer passively accumulated in the tumor at 30 min p.i. ($1.03 \pm 0.11\%$ ID/g) and remains practically stable at 60 min p.i. ($1.10 \pm 0.16\%$ ID/g). The excretion route was primarily via the urinary tract, as no significant liver or intestinal uptake was observed. Apart from the kidneys and blood, no major uptake in all analyzed tissues is noted (<1.5% ID/g from 30 min p.i.). These results are in accordance to *ex vivo* biodistribution studies previously performed in normal Swiss mice, which showed that ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA cleared rapidly from the blood via the kidneys to the urine, resulting in extremely low background activity in all other tissues [17]. While the actual tumor uptake dropped from 30 to 120 min p.i., the Tumor/Blood and Tumor/Muscle (T/M) ratios increased over time, with the T/M ratio reaching a value of almost 5 at 120 min p.i., suggesting a clear differentiation between the affected and nonaffected tissue (Figure 4 & Supplementary Table 1).

After evidence of tumor accumulation was provided by the *ex vivo* biodistribution study, PET and MR imaging were performed on U87MG tumor-bearing SCID mice. By comparing MR images of mice before and after injection with AGuIX@NODAGA,

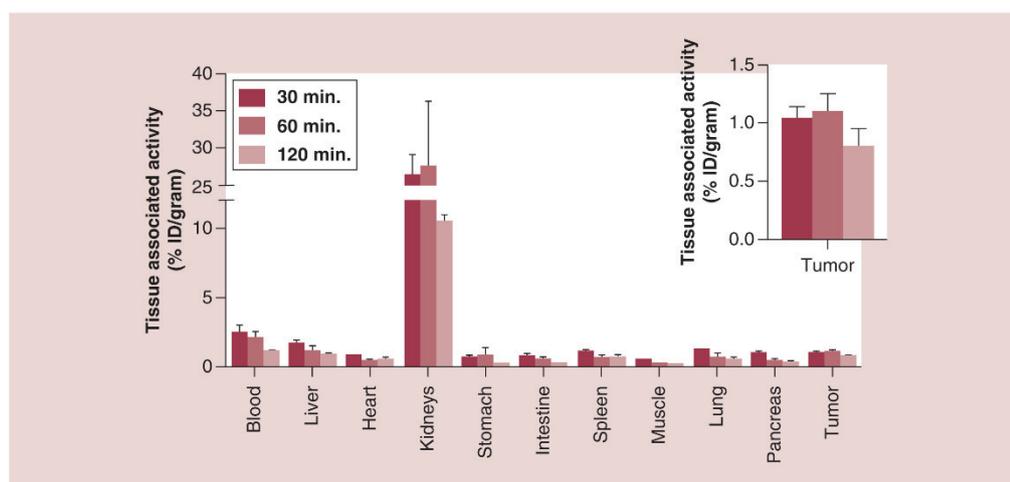


Figure 3. Biodistribution of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA in U87MG tumor-bearing mice.

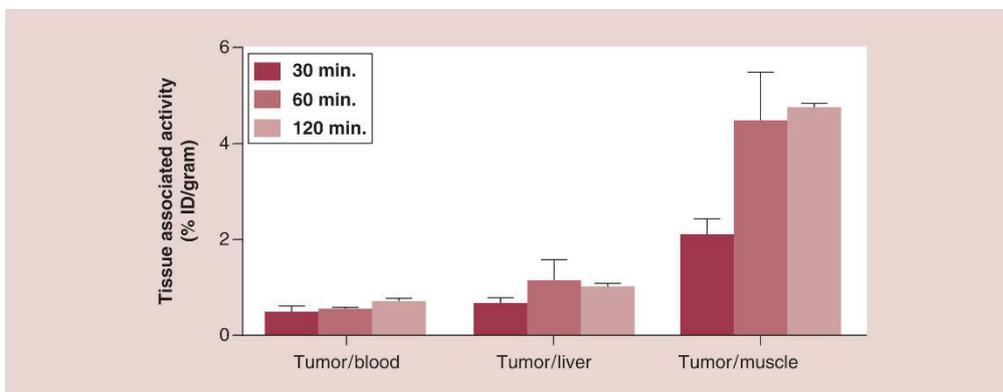


Figure 4. Tumor-to-tissue ratios ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA at 30, 60 and 120 min postinjection.

we observed positive contrast at 60 min postinjection of the Gd-bearing AGuIX@NODAGA (Figure 5). The PET image of mice injected with ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA showed accumulation of the radiotracer in the tumor from 15 min p.i., which was retained at the tumor site up to 60 min p.i. (Figure 6). Further *in vivo* assessment on the PET camera was not possible, due to the short half-life of ⁶⁸Ga.

Histology studies

Finally, histopathology studies showed that unmetabolized ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA NPs are passively accumulated into the tumor, as depicted in Figure 7, frames (E) and (F). The histopathological features of the livers of the examined animals showed no, or scarce evidence of the NPs accumulated into the liver (Figure 7G). On the contrary, the kidneys at that time point were already full of urine containing the aforementioned NPs (Figure 7H).

Discussion

The design of the AGuIX NPs has been made in order to ensure a fast and exclusive renal elimination and to avoid toxicity concerns [9,12,21,22]. The present work was designed to assess the passive accumulation of ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA in a U87MG tumor model, both by *ex vivo* biodistribution studies and *in vivo* PET and MR imaging studies.

Radiolabeling of AGuIX@NODAGA with the positron-emitter ⁶⁸Ga afforded a product of more than 99% radiochemical purity after purification, which is stable for at least 60 min p.i., and which accumulates in subcutaneous U87MG tumors. Tumor uptake peaked at 1 h p.i. ($1.10 \pm 0.16\%$ ID/g), while the T/M ratio increased over time, reaching a value of almost 5 at 120 min p.i. This provides us with ample time for PET/MR visualization of these areas, as early imaging has been shown to be promising for precise tumor

delineation, as previously demonstrated [23,24]. Furthermore it was shown that no radiolabeled derivatives of the parent radiotracer were detected in samples of serum, urine and tumor tissue, thus associating the biodistribution data entirely with the uptake of intact ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA.

One of the most significant advantages of PET is its sensitivity and its ability to be quantified. PET imaging tracers injected at very low concentrations are sufficient to provide high-quality images [25,26]. This fact was our first steppingstone for the initiation of our experiments to go as low as possible, in other words, to achieve a high specific activity product to work with. However, this approach would prove to be problematic in the case of a dual-modality PET/MR imaging agent, since MR imaging requires much higher concentrations of injected contrast agent, in order to provide satisfactory images. We finally opted to work with AGuIX@NODAGA samples having an adequately high concen-

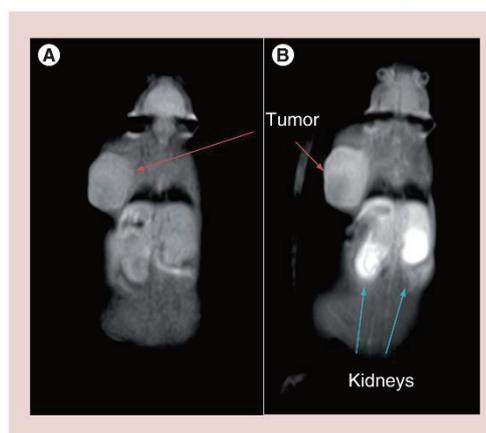


Figure 5. T1-weighted magnetic resonance images of a U87MG tumor-bearing mouse before (A) and 60 min after (B) injection of 20 μmol AGuIX@NODAGA.

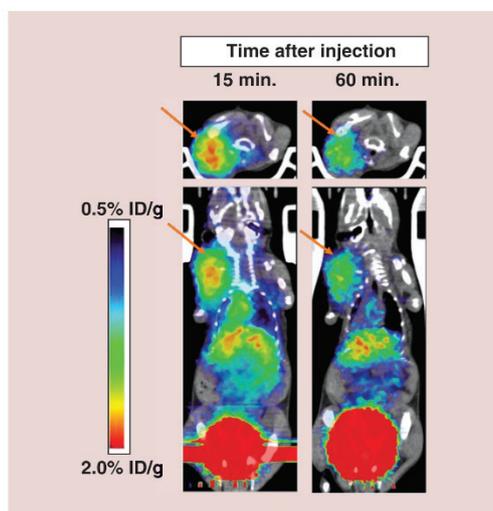


Figure 6. Positron emission tomography image of a U87MG tumor-bearing mouse injected with ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA, at 30 and 60 min p.i.

tration for satisfactory MR imaging, and to adjust the amount of radioisotope to provide an imaging tracer for simultaneous PET/MR imaging. The PET signal permits the precise quantification of the concentration of NPs in tumors for future treatments, using the radiosensitizing properties of AGuIX.

Radiolabeling of a low concentration AGuIX@NODAGA sample (500 nmol $[\text{Gd}^{3+}]/\sim 500 \mu\text{g}$ NPs/100 μl) with ^{68}Ga was easily accomplished and stability of the radiolabeled product was shown. For comparison, a high-concentration ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA sample (6.8 μmol $[\text{Gd}^{3+}]/\sim 6.8 \text{ mg}$ NPs/100 μl) was prepared, at a NP concentration similar to that required for MRI imaging (due to Gd). *Ex vivo* biodistribution studies on tumor-bearing mice with both low- and high-concentration samples (500 nmol/100 μl vs 6.8 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{l}$) showed tumor uptake for both samples, however fast washout from the tumor was observed for the low-concentration product. This can be explained by the increased biodegradability of the NP at high dilution because of the Si–O–Si bond hydrolysis. For concentrated solutions of AGuIX, no degradation occurs. The NPs are accumulated in the tumors and it seems like a local increase of the concentration of the NPs in the tumors occurs. *In vitro* experiments previously published by the team on accumulation in tumors have shown that the NPs are internalized in tumors cells notably by macropinocytosis mechanism [27]. In the vesicles, the NPs are aggregated. In the tumor environment, a similar aggregation can occur that can explain the nondegradation of the NPs observed in the tumor. The results

presented here show moderate tumor accumulation via passive targeting, which are comparable to results described by other groups in the literature [28–31]. However, while tumor uptake is quite similar, uptake in the RES organs is much higher in those studies, which could be problematic for future clinical translation.

We next focused on the metabolite study of the injected ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA, in order to see how these two different concentrations of radiotracer behave *in vivo*.

In general, for successful translation of a radiolabeled imaging agent to the clinical, it is very important to evaluate the degree to which the association between the radioactive label and the core molecule remains intact *in vivo* [25,32]. In our case, it is critical to assess the stability of radiolabeled NPs, once administered into systemic circulation. One of the objectives of this work was to study the *in vivo* integrity of AGuIX@NODAGA NPs labeled with ^{68}Ga .

Metabolite studies were performed on blood, urine and tumor samples taken from U87MG tumor-bearing SCID mice injected with ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA. Our evaluation showed that the high specific activity product (i.e., radiolabeling of a low-concentration AGuIX@NODAGA sample, 500 nmol $[\text{Gd}^{3+}]/\sim 500 \mu\text{g}$ NPs/100 μl) was rapidly degraded (>90% degradation at 5 min p.i., data not shown). On the other hand, the high-concentration ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA sample (6.8 μmol $[\text{Gd}^{3+}]/\sim 6.8 \text{ mg}$ NPs/100 μl) was metabolically stable up to 60 min p.i., in all evaluated samples. This result perfectly suits our needs for a dual-modality imaging agent, administered at concentrations adequate for both PET and MRI imaging modalities, as was proven by imaging studies that followed.

PET imaging of the low concentration AGuIX@NODAGA sample (500 nmol $[\text{Gd}^{3+}]/\sim 500 \mu\text{g}$ NPs/100 μl) showed rapid tumor uptake up to 10 min p.i., with consequent, washout from the tumor site (data not shown). This is in accordance with our metabolite studies discussed above. When a high concentration radiolabeled sample was injected into the tumor-bearing mice (6.8 μmol $[\text{Gd}^{3+}]/\sim 6.8 \text{ mg}$ NPs/100 μl , 150 μl injected sample), the tumor could be clearly delineated up to 60 min p.i. (Figure 5). MR images acquired after administration of AGuIX@NODAGA NPs at a similar concentration gave excellent images with a significant positive contrast.

As toxicity is always a major concern with gadolinium-based MRI contrast agents, Sancey *et al.* evaluated the maximum tolerated dose of AGuIX NPs [22]. For *in vivo* application in mice, it was proven that after bolus injection of these NPs, no toxicity effects were shown at doses up to ten-times higher than the ther-

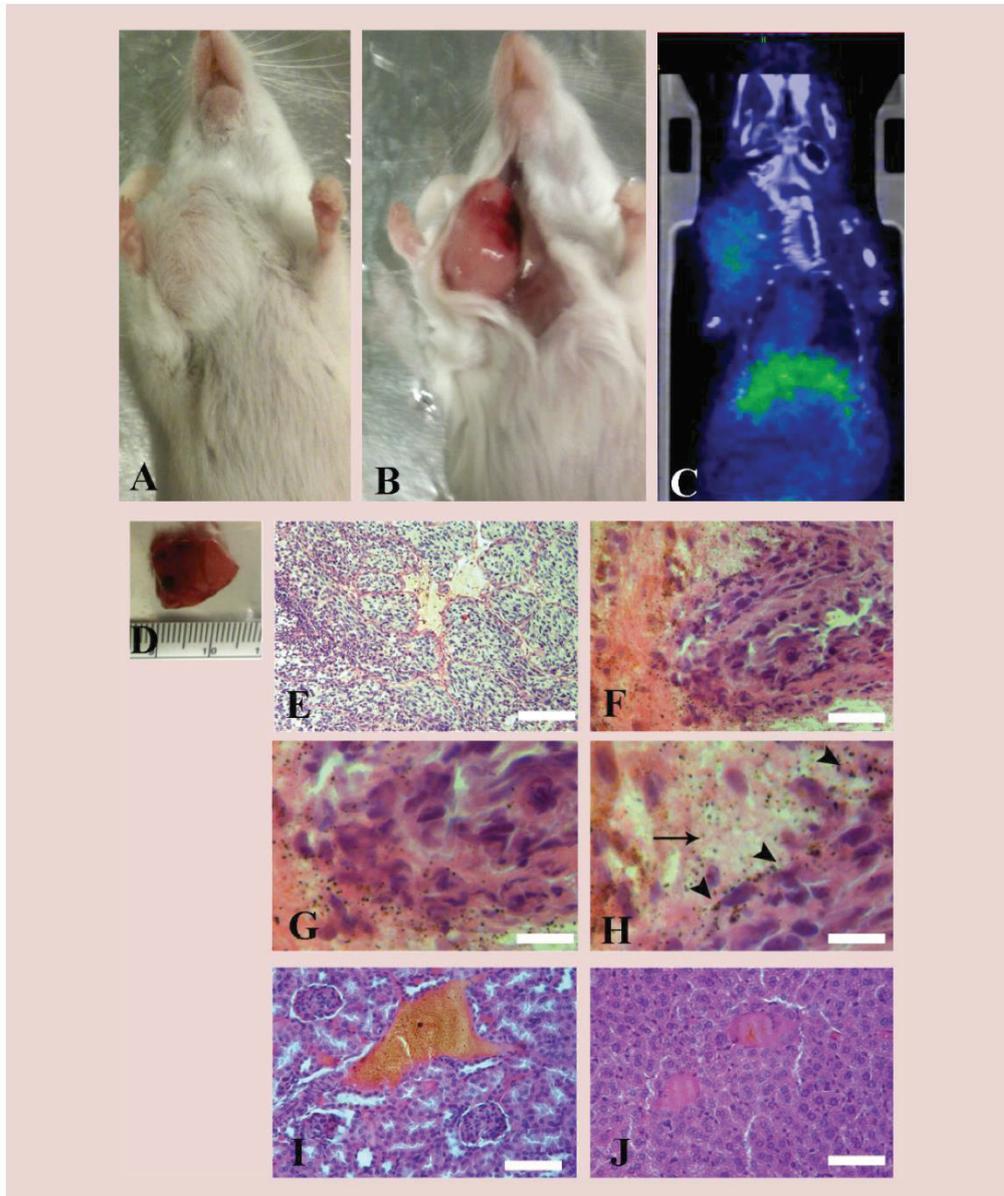


Figure 7. Histopathological studies. (A & B) Gross anatomic features of ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA injected mouse post mortem. (C) Positron emission tomography/computed tomography overlay image verifies the accumulation of ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA nanoparticles (NPs) in the tumor. ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA NPs are also weakly present in the liver. (D) The gross anatomy of the U87MG generated tumor after the excision. (E & F) Low magnification (scale bar = 200 μm) and high magnification (scale bar = 100 μm) of the U87MG tumor stained with Hematoxylin and Eosin. It is noteworthy that the ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA NPs are trapped inside the tumor parenchyma, especially in areas where necrotic features are more evident. (G & H) Higher magnification of the U87MG tumor. With an arrow we indicate the necrotic area and with arrowheads the location of the NPs (scale bar = 25 μm). (I) The high magnification of a section of the kidney counterstained with H&E also verifies the minor accumulation of ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA NPs as detected with the micro-PET camera (scale bar = 100 μm). (J) The high magnification of a section of the liver counterstained with H&E verifies the minor accumulation of ⁶⁸Ga-AGuIX@NODAGA NPs as detected with the micro-PET camera (scale bar = 100 μm).

Research Article Bouziotis, Stellas, Thomas *et al.*

apeutic dose, which corresponds to an injection of 8 μmol of $[\text{Gd}^{3+}]$. Furthermore, no significant difference in creatinine levels between AGuIX and control groups was recorded, suggesting the absence of any significant nephrotoxicity related to AGuIX NPs [9].

The ultrasmall size of the AGuIX leading to rapid elimination indeed limits circulating time in the blood but it seems like it permits a better penetration in tumors, as emphasized by recent papers which compare different size of NPs and their ability to penetrate into the tumor and to leave the perivascular space [33]. The interest of the active targeting for nanomedicine is still controversial [34,35]. For receptors present on the membrane of the tumor cells, the NPs have to be firstly accumulated in tumors by EPR effect and so active targeting will probably not drastically increase the quantity of NPs accumulated in the tumor (factor 2 or 3), as we have shown in precedent papers [36]. However, it will probably increase the retention time in the tumor and so be interesting for further theranostic applications.

Conclusion

In conclusion, we have developed NODAGA-functionalized AGuIX NPs, and then efficiently labeled them with the positron emitter Ga-68. We have evaluated the integrity of these radiolabeled NPs in the mouse and have reached the conclusion that ^{68}Ga -AGuIX@

NODAGA, when injected at a concentration which was appropriately tailored to the sensitivity of both PET and MR imaging modalities, remains unmetabolized in the mouse, thus providing a single-injection, dual-modality imaging agent adequate for both PET and MR imaging. *Ex vivo* biodistribution and *in vivo* PET and MR imaging studies provide further evidence of this. Second-generation AGuIX NPs will be developed, which will be functionalized for active targeting.

Future perspective

^{68}Ga -AGuIX@NODAGA NPs show promising properties as a dual-modality imaging agent and exhibit great potential for PET/MR image-guided radiation therapy of cancer.

Financial & competing interests disclosure

The authors acknowledge financial support from the French National Research Agency (ANR6126RPIB-0010 Multimage). François Lux and Olivier Tillement have one patent to disclose: WO2011135101. This patent protects some of the nanoparticles described in this publication: AGuIX. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Summary points

Objectives

- To assess the passive accumulation of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA in a U87MG tumor model, both by *ex vivo* biodistribution studies and *in vivo* PET and MR imaging studies.

Results

- AGuIX nanoparticles (NPs) were functionalized with the NODAGA-NHS (2,2'-(7-(1-carboxy-4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid). AGuIX@NODAGA particles present around 4.1 NODAGA for one particle.
- AGuIX@NODAGA NPs were radiolabeled with ^{68}Ga (radiochemical purity >99% after purification).
- The radiolabeled complex was stable in saline at RT up to 3 h. Serum stability assessment up to 3 h at 37°C showed that the complex remained almost completely intact after a 3 h incubation period.
- Metabolite analysis showed no evidence of degradation of ^{68}Ga -AGuIX in blood, while for urine the amount of intact radiolabeled AGuIX was between 90 and 95%. In tumor samples, a single peak corresponding to the peak for ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA was observed, suggesting that the radioactivity detected in the tumor samples is entirely attributable to unmetabolized ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA.
- Ex vivo* biodistribution showed that the radiotracer passively accumulated in the tumor. The excretion route was primarily via the urinary tract, as no significant liver or intestinal uptake was observed.
- Tumor/Blood and Tumor/Muscle ratios increased over time, thus providing a clear differentiation between the affected and nonaffected tissue.
- PET and MR imaging showed accumulation of the radiotracer in the tumor up to 60 min p.i.
- Histopathology studies showed that un-metabolized ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA NPs are passively accumulated into the tumor.

Conclusion

- This study includes the first investigation of ^{68}Ga -AGuIX@NODAGA as a single-injection, dual-modality PET/MR imaging agent, which can improve diagnostic performance for cancer detection. As a result of this, they exhibit great potential for PET/MR image-guided radiation therapy.

Acknowledgements

Acknowledgements are due to Professor Frank Roesch and Professor Helmut R. Maecke, for provision of the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators utilized in this work, and for their valuable expertise in ⁶⁸Ga chemistry.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles

outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Open access

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest;

•• of considerable interest

- Griffeth LK. Use of PET/CT scanning in cancer patients: technical and practical considerations. *BUMC Proceedings* 18, 321–330 (2005).
- Drzezga A, Souvatzoglou M, Eiber M *et al.* First clinical experience with integrated whole-body PET/MR: comparison to PET/CT in patients with oncological diagnoses. *J. Nucl. Med.* 53, 845–855 (2012).
- Kim SA, Kim Y-H, Kim JH *et al.* Development and *in vivo* imaging of a PET/MRI nanoprobe with enhanced NIR fluorescence by dye encapsulation. *Nanomedicine* 7, 219–229 (2012).
- Lee H-Y, Li Z, Chen K *et al.* PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. *J. Nucl. Med.* 49, 1371–1379 (2008).
- Yang X, Hong H, Grailer JJ *et al.* cRGD-functionalized, DOX-conjugated, and ⁶⁴Cu-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted anticancer drug delivery and PET/MR imaging. *Biomaterials* 32, 4151–4160 (2011).
- Tsoukalas C, Laurent G, Sanchez GJ *et al.* Initial *in vitro* and *in vivo* assessment of Au@DTDTPA-RGD nanoparticles for Gd-MRI and ⁶⁸Ga-PET dual-modality imaging. *EJNMMI Phys.* 2, A89 (2015).
- De Luc G, Roux S, Paruta-Tuarez A *et al.* Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* 5, 4 (2014).
- AGuIX NPs versus gadolinium-based molecular agent: comparison of their efficiency for MRI and radiosensitization.
- Lux F, Mignot A, Mowat P *et al.* Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50(51), 12299–12303 (2011).
- First report on the synthesis and characterization of ultrasmall AGuIX nanoparticles (NPs).
- Sancey L, Lux F, Kotb S *et al.* The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br. J. Radiol.* 87, 20140134 (2014).
- Review demonstrating that gadolinium-based NPs, in particular AGuIX, hold significant potential as theranostic agents.
- Dufort S, Le Duc G, Salomé M *et al.* The high radiosensitizing efficiency of a trace of gadolinium-based nanoparticles in the tumor. *Sci. Rep.* 6, 29678, (2016).
- Dufort S, Bianchi A, Henry M *et al.* Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. *Small* 11, 215–221 (2015).
- Lux F, Sancey L, Bianchi A *et al.* Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine* 10(11), 1801–1805 (2015).
- Interesting review on gadolinium NPs for biomedical applications, in particular for MR image-guided radiotherapy.
- Fani M, Andre JP, Maecke HR. ⁶⁸Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. Imaging* 3, 53–63 (2008).
- Al-Nahhas A, Fanti S. Radiolabelled peptides in diagnosis and therapy: an introduction. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39(Suppl. 1), S1–S3 (2012).
- Decristoforo C, Pickett RD, Verbruggen A. Feasibility and availability of ⁶⁸Ga-labelled peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39(Suppl. 1), S31–S40 (2012).
- Roesch F, Baum RP. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS. *Dalton Trans.* 40(23), 6104–6112 (2011).
- Truillet C, Bouziotis P, Tsoukalas C *et al.* Ultrasmall particles for Gd-MRI and ⁶⁸Ga-PET dual imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* 10(4), 309–19 (2015).
- First report on the radiolabeling of AGuIX NPs with Gallium-68.
- Mignot A, Truillet C, Lux F *et al.* A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chemistry* 19(19), 6122–6136 (2013).
- Truillet C, Thomas E, Lux F *et al.* Synthesis and characterization of ⁸⁹Zr-labeled ultrasmall nanoparticles. *Mol. Pharm.* 13, 2596–2601 (2016).
- First report on a Zirconium-labeled ultrasmall NP.
- Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP *et al.* Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application. *J. Nucl. Med.* 48, 1741–1748 (2007).
- Detappe A, Kunjachan S, Sancey L *et al.* Advanced multimodal nanoparticles delay tumor progression with

Research Article Bouziotis, Stellas, Thomas *et al.*

- clinical radiation therapy. *J. Control. Release* 238, 103–113 (2016).
- 22 Sancey L, Kotb S, Truillet C *et al.* Long-term *in vivo* clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano* 9(13), 2477–2488 (2015).
- 23 Le Duc G, Miladi I, Alric C *et al.* Toward and image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano* 5(12), 9566–9574 (2011).
- 24 Bianchi A, Dufort S, Lux F *et al.* Targeting and *in vivo* imaging of non-small-cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111(25), 9247–9252 (2014).
- 25 Choi H, Lee Y-S, Hwang DW *et al.* Translational radionanomedicine: a clinical perspective. *Eur. J. Nanomed.* 2, 71–84 (2016).
- 26 Rahmim A, Zaidi H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl. Med. Commun.* 29(3), 193–207 (2008).
- 27 Rima W, Sancey L, Aloy MT *et al.* Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials* 34(1), 181–195 (2013).
- 28 Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB *et al.* Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J. Clin. Invest.* 121, 2768–2786 (2011).
- 29 Xie H, Wang ZJ, Bao A *et al.* *In vivo* PET imaging and biodistribution of radiolabelled gold nanoshells in rats with tumor xenografts. *Int. J. Pharm.* 395, 324–330 (2010).
- 30 Chang Y, Chang C, Chang T *et al.* Biodistribution, pharmacokinetics and microSPECT/CT imaging of ^{188}Re -BMEDA-liposome in a C26 murine colon carcinoma solid tumor animal model. *Anticancer Res.* 27, 2217–2226 (2007).
- 31 Zhou M, Li J, Liang S *et al.* CuS nanodots with ultrahigh efficient renal clearance for positron emission tomography imaging and image-guided photothermal therapy. *ACS Nano* 9(7), 7085–7096 (2015).
- 32 Mirshojaei SF, Ahmadi A, Morales-Avila E *et al.* Radiolabeled nanoparticles: novel classification of radiopharmaceuticals for molecular imaging of cancer. *J. Drug Target.* 24(2), 91–101 (2016).
- 33 Popovic Z, Liu W, Chauhan VP *et al.* A nanoparticle size series for *in vivo* fluorescence imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49(46), 8649–8652 (2010).
- 34 Arranja AG, Pathak V, Lammers T *et al.* Tumor-targeted nanomedicines for cancer theranostics. *Pharmacol. Res.* 115, 87–95 (2017).
- 35 Kunjachan S, Pola R, Gremse F *et al.* Passive versus active tumor targeting using RGD- and NGR-modified polymeric nanomedicines. *Nano Lett.* 14, 972–981 (2014).
- 36 Morlieras J, Dufort S, Sancey L *et al.* Functionalization of small rigid platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors overexpressing $\alpha_v\beta_3$ -integrins. *Bioconjugate Chem.* 24(9), 1584–1597 (2013).

3.4 COMPLEXATION DE ^{89}Zr PAR LE DFO

Afin d'étudier la biodistribution des particules AGuIX *in vivo* sur plusieurs jours, nous nous sommes intéressés à l'acquisition d'images PET avec le radioisotope ^{89}Zr qui présente un temps de demi-vie très long ($\tau_{1/2} = 78$ h). Il peut être complexé de manière stable grâce au chélate desferrioxamine (DFO), c'est pourquoi, nous avons procédé dans un premier temps à la fonctionnalisation des AGuIX par ce chélate dans le but d'obtenir des AGuIX@DFO, comme présenté sur **Figure 3-14**.

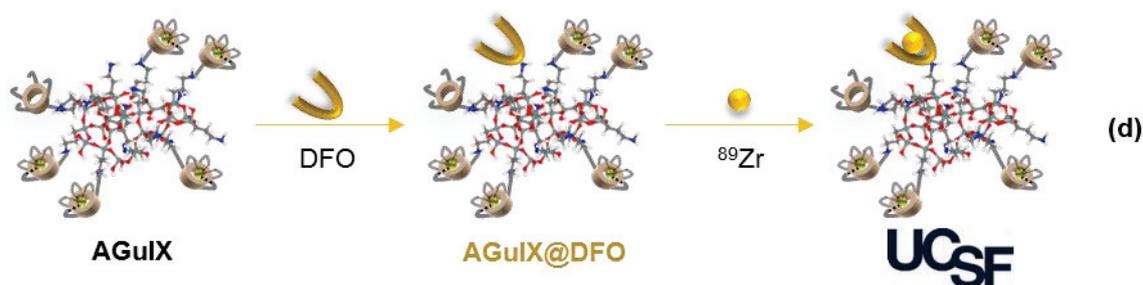


Figure 3-14 : Radiomarquage de ^{89}Zr par des particules AGuIX@DFO.

3.4.1 Synthèse

Afin de pouvoir fonctionnaliser facilement les particules par le DFO, nous avons utilisé le ligand sous forme isothiocyanate : DFO-Bz-NCS. L'utilisation de celui-ci est très répandue car il permet une fonctionnalisation simple et rapide,^[136] il a été fourni par la société CheMatech (Dijon, France). La réaction avec les amines primaires des particules implique une attaque sur le carbone électrophile du groupement isothiocyanate. Il en résulte la création d'une liaison covalente de type isothiourée sans groupe partant (voir **Figure 3-15**).

La réaction des isothiocyanates est en générale effectuée à $\text{pH} = 9$,^[105] cependant pour stabiliser les particules, le pH dans notre cas a été ajusté à 7-8. De plus, le ligand DFO-Bz-NCS étant peu soluble dans l'eau, la réaction a été réalisée dans un mélange eau/DMSO permettant de solubiliser le ligand et les particules tout en conservant une bonne stabilité colloïdale. Les ions Cl^- sont évités tout au long de la synthèse. En effet, après radiomarquage avec le ^{89}Zr , les radiations émises entraînent la création d'ions hypochlorites qui à leur tour conduisent au relargage du ^{89}Zr .^[138]

Mode opératoire : Le mode opératoire est détaillé dans la publication présentée plus loin dans la **partie 3.4.3**). Le rendement en gadolinium de la synthèse a été déterminé au laboratoire par ICP-OES et est d'environ 48 %. Celui en DFO est de 33,5-67 % (voir plus loin).

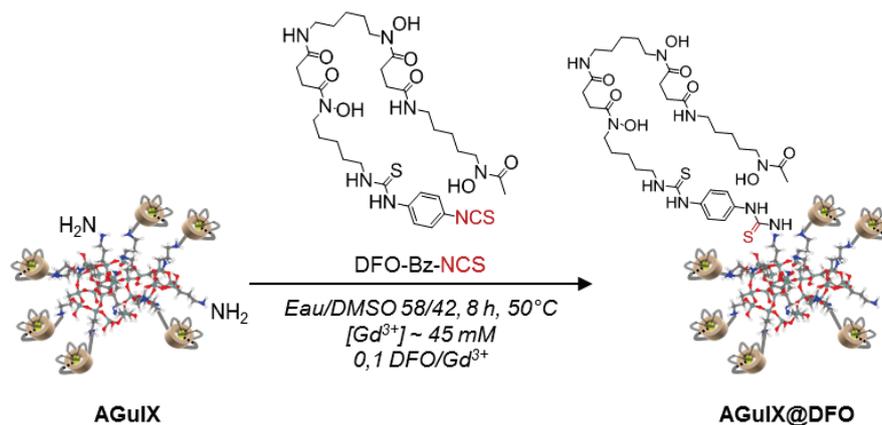


Figure 3-15 : Synthèse des particules AGuIX@DFO.

3.4.2 Caractérisations

3.4.2.1 Caractéristiques physico-chimiques

Les caractérisations des particules AGuIX@DFO sont présentées dans le **Tableau 3-7** ci-dessous. Le diamètre hydrodynamique et la relaxivité sont toujours en accord avec une élimination rénale et une utilisation comme agent de contraste positif en IRM.

Tableau 3-7 : Caractérisations des particules AGuIX et AGuIX@DFO.

Caractérisations	AGuIX	AGuIX@DFO
DLS	$D_H = 3,6 \pm 0,8 \text{ nm}$	$D_H = 4,4 \pm 1,0 \text{ nm}$
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	$r_1 = 12,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}; r_2/r_1 = 1,3$	$r_1 = 16,7 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}; r_2/r_1 = 1,5$
HPLC (A = 295 nm)	Pureté de 91 % $t_R = 13,0 \text{ min}$ $l_{1/2} = 1,0 \text{ min}$	Pureté de 99 % $t_R = 15,2 \text{ min}$ $l_{1/2} = 0,8 \text{ min}$

L'addition de DFO sur les particules entraîne une augmentation du temps de rétention en HPLC pouvant s'expliquer par une modification de la surface. De plus, le chromatogramme semble indiquer que le DFO non greffé à la surface des particules a bien été majoritairement éliminé (voir la **Figure 3-16-a**).

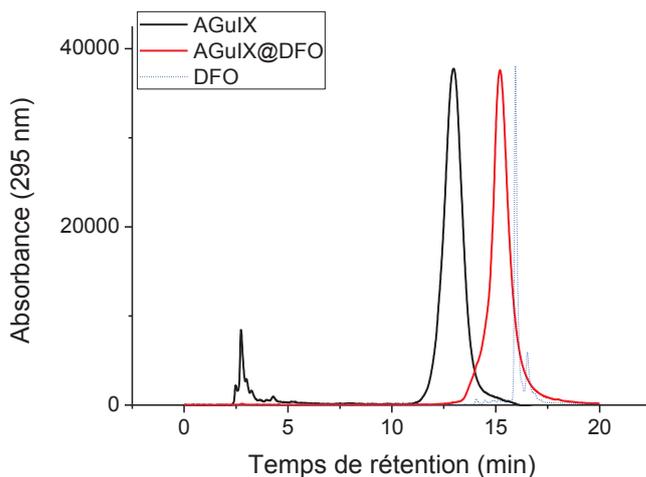


Figure 3-16 : Chromatogrammes des particules AGuIX, AGuIX@DFO et du DFO obtenus en mesurant l'absorbance à 295 nm pendant l'analyse HPLC.

3.4.2.2 Quantification du nombre de DFO par particule

Pour quantifier le nombre de DFO par particule, une méthode basée sur la complexation des ions Cu^{2+} et la séparation des constituants du mélange par HPLC a été mise en place. Le DFO a en effet une grande affinité pour le cuivre et peut former des complexes mono ou binucléaires ($\log K = 33,1$ pour CuLH^+ et $\log K = 32,09$ pour Cu_2LH^+ où L représente le ligand).^[161] Une quantité croissante d'ions Cu^{2+} a été ajoutée à une solution de particules AGuIX@DFO, les différents échantillons ont ensuite été analysés par HPLC.

Le chromatogramme obtenu lors de l'ajout d'un excès de cuivre est présenté sur la **Figure 3-17-a**. Le cuivre non complexé a un temps de rétention autour de 2,5 min, les particules autour de 15 min et on trouve aussi de petits pics autour de 4-5 min qui correspondent à des fragments de dégradation des particules complexant du cuivre (APTES-DFO@ Cu^{2+} ,...). Pour tous les échantillons, on intègre l'aire du pic correspondant au cuivre libre (voir la **Figure 3-17-b**). Celui-ci n'est détectable qu'à partir d'un ajout de 7 mM ce qui nous permet de déterminer que le ratio DFO/ Gd^{3+} est compris entre 9 à 18 % selon que le complexe formé est mono ou binucléaire. Cela correspond à un pourcentage de ligand libre compris entre 8 et 15 % ($\frac{\text{DFO}}{\text{DFO} + \text{DOTAGA}(\text{Gd}^{3+})}$).

Une technique plus rapide a aussi été envisagée. Elle consiste à s'intéresser uniquement à un échantillon contenant un excès de cuivre. L'aire du pic correspondant au cuivre libre est déterminée et en utilisant une courbe d'étalonnage en ions Cu^{2+} on peut en déduire la concentration d'ions non complexés. Connaissant la quantité de cuivre ajouté, on a directement la quantité de cuivre complexé par les particules. Les résultats sont similaires à ceux donnés précédemment (ratio DFO/ Gd^{3+} compris entre 8 et 16 %).

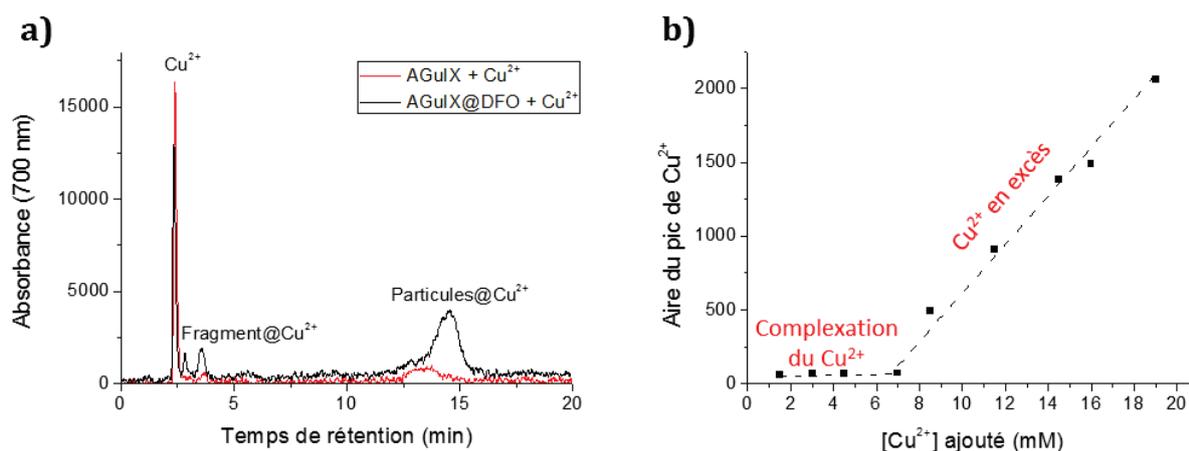


Figure 3-17 : Quantification du nombre de DFO par particule par complexation d'ions Cu^{2+} et injection en HPLC. **(a)** Chromatogramme obtenu en mesurant l'absorbance à 700 nm. Conditions de complexation : $[\text{Gd}^{3+}] = 38,4 \text{ mM}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 20 \text{ mM}$, eau, température ambiante pendant quelques heures. **(b)** Aire du pic de Cu^{2+} non complexé obtenue en HPLC ($A = 700 \text{ nm}$) pour différents échantillons contenant la même quantité de particules ($[\text{Gd}^{3+}] = 38,4 \text{ mM}$) mais une quantité croissante de Cu^{2+} . La rupture de pente a lieu pour $[\text{Cu}^{2+}] = 7 \text{ mM}$.

La complexation du cuivre ne donne pas des résultats précis mais uniquement un ordre de grandeur du nombre de DFO par particule (1-2 DFO par particule). Ceci est cependant suffisant dans une optique de radiomarquage des nanoparticules. En effet, dans ce contexte, le ligand sera en excès par rapport au radioisotope.

Afin d'obtenir la structure des particules, les pourcentages massiques en gadolinium (Gd), silicium (Si), carbone (C) et azote (N) ont été déterminés par l'entreprise Filab (Dijon, France). Comme cela est indiqué dans le **Tableau 3-8**, les résultats sont cohérents avec la formule suivante pour les particules AGuIX@DFO : $(\text{Gd}_1\text{APTES}^*_{2,78}\text{TEOS}^*_{2,66}\text{DOTAGA}^*_{1,02}\text{DFO}^*_{0,14})_n$. Cela conduit à un ratio DFO/ Gd^{3+} de 14 % compris dans la fourchette proposée précédemment. Les particules présentes donc 1-2 DFO par particule ce qui permettra de les radiomarquer par du ^{89}Zr .

Tableau 3-8 : Comparaison des pourcentages massiques obtenus expérimentalement par Filab ou calculés à partir de la structure proposée pour les particules AGuIX@DFO.

	Gd	Si	C	N
%massique exp	10,7	10,4	26,15	7,78
%massique calc	10,7	10,4	26,43	7,61
Différence absolue	0	0	0,28	0,17

3.4.3 Radiomarquage et biodistribution, publication

Les études de radiomarquage des particules AGuIX@DFO et de leur biodistribution ont été réalisées par Charles Truillet sous la direction de Michael J. Evans à l'université de San Francisco aux Etats-Unis. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication, présentée dans la suite, dans *Molecular Pharmaceutics* en 2016. Dans cette étude les particules sont notées DFO-AGuIX.

3.4.3.1 Résumé des principaux résultats

Les DFO-AGuIX ont été marquées par du ^{89}Zr à un pH de 7,2 à 37°C et pendant 60 min. Ces conditions ont permis d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 99 %. La stabilité des complexes a ensuite été évaluée *in vitro* après incubation dans du sérum bovin et *in vivo* après injection intraveineuse sur des souris saines. Comme le montre la **Figure 3-18**, des échantillons ont ensuite été prélevés entre 1 h et 72 h et analysés par CCM pour étudier l'intégrité du produit radiomarqué.

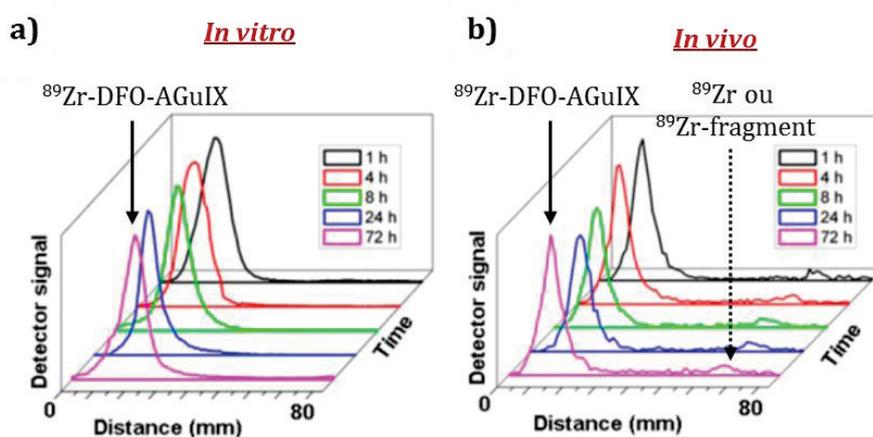


Figure 3-18 : La stabilité des particules $^{89}\text{Zr-DFO-AGuIX}$ a été évaluée par CCM. **(a)** Etude *in vitro* réalisée dans du sérum bovin à 37°C. Seul un pic correspondant aux particules $^{89}\text{Zr-DFO-AGuIX}$ est détecté ce qui suggère que les particules ne sont pas métabolisées en sous-produits radioactifs plus petits. **(b)** Etude *in vivo* réalisée sur des souris saines nu/nu après injection intraveineuse de particules $^{89}\text{Zr-DFO-AGuIX}$ (~ 50 μCi soit 1,85 MBq). Le sang est prélevé au moment indiqué et le sérum est ensuite isolé et analysé par CCM. L'intensité des courbes présentées est normalisée. Elles suggèrent qu'il n'y a pas de dégradation des particules.

Même au bout de 72 h, seul un pic correspondant aux particules $^{89}\text{Zr-DFO-AGuIX}$ est détecté ce qui suggère que les particules ne sont pas métabolisées en sous-produits radioactifs plus petits. Le temps de demi-vie biologique a pu être évalué à 67 h environ.

Des injections intraveineuses sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées U87MG (glioblastome, tumeur du cerveau) ont ensuite été réalisées. On observe une accumulation intratumorale 20 minutes post injection par IRM. Les images PET mettent en évidence une élimination principalement rénale et une accumulation dans les tumeurs (~2% ID/g à 24 h). Comme le montre la **Figure 3-19-a**, cette accumulation

est durable puisque les particules sont toujours détectées et donc présentes au bout de 72 h dans les tumeurs. L'accumulation dans les autres organes (reins mis à part) reste faible. La **Figure 3-19-b** montre l'évolution des ratios Tumeur:Sang et Tumeur:Muscle au cours du temps. Ce dernier atteint, 72 h après l'injection, une valeur supérieure à 10 ce qui illustre la nette différenciation entre les tissus sains et tumoraux.

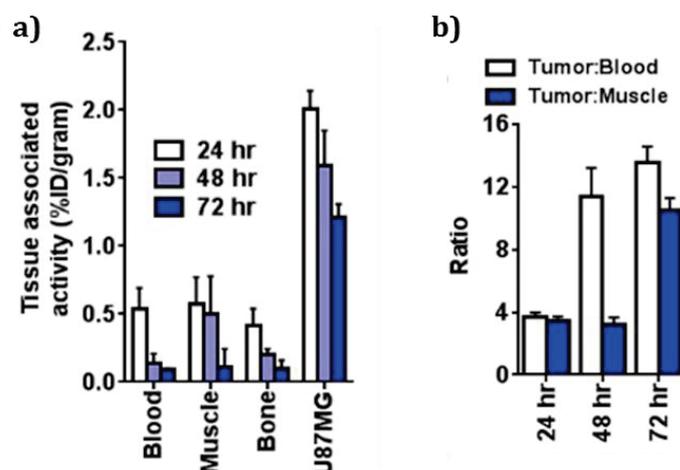


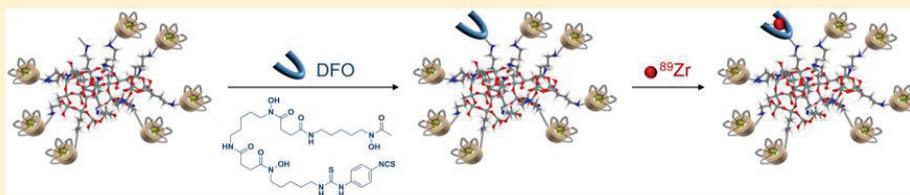
Figure 3-19 : Etude de la biodistribution des particules ^{89}Zr -DFO-AGuIX après injection intraveineuse sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées U87MG. **(a)** Les particules ^{89}Zr -DFO-AGuIX persistent dans le microenvironnement des tumeurs pendant plusieurs jours après l'injection. A 72 h, l'activité associée à la tumeur est de $\sim 1,0$ % ID/g, ce qui est supérieur au bruit de fond. **(b)** Evolution des ratios Tumeur:Sang et Tumeur:Muscle au cours du temps pour les souris ayant reçu des particules ^{89}Zr -DFO-AGuIX. Les ratios indiquent une nette différenciation entre tissus sains et tumoraux.

Cette étude met en évidence l'intérêt de la fonctionnalisation des particules AGuIX par le DFO pour des études de biodistribution et de pharmacocinétique sur quelques jours. Elle apporte aussi une information intéressante pour la radiothérapie actuellement évaluée en essai clinique pour les AGuIX. En effet, la rétention des particules dans les tumeurs sur plusieurs jours permet d'envisager de ne réaliser qu'une seule injection pour plusieurs séances de radiothérapie espacées de quelques jours. Cela diminue les risques de toxicité liés à des injections multiples de produit.

3.4.3.2 Publication

Synthesis and Characterization of ^{89}Zr -Labeled Ultrasmall NanoparticlesCharles Truillet,^{†,§} Eloise Thomas,^{‡,§} Francois Lux,[‡] Loc T. Huynh,[†] Olivier Tillement,[‡] and Michael J. Evans^{*,†}[†]Department of Radiology and Biomedical Imaging, University of California San Francisco, 185 Berry Street, Lobby 6, Suite 350, San Francisco, California 94107, United States[‡]Institut Lumière Matière, UMR5306, Université Claude Bernard Lyon1-CNRS, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

Supporting Information



ABSTRACT: The ultrasmall nanoparticle AGuIX is a versatile platform that tolerates a range of chemical diversity for theranostic applications. Our previous work showed that AGuIX clears rapidly from normal tissues, while durably accumulating within the tumor microenvironment. On this basis, AGuIX was used to detect tumor tissue with Gd^{3+} enhanced MRI and can sensitize tumors to radiation therapy. As we begin the translation of AGuIX, we appreciated that coupling AGuIX to a long-lived radioisotope would help to more completely measure the magnitude and duration of its retention within the tumor microenvironment. Therefore, we developed ^{89}Zr -DFO-AGuIX. AGuIX was coupled to DFO and then to ^{89}Zr in ~99% radiochemical yield. Stability studies showed that ^{89}Zr -DFO-AGuIX did not dissociate after 72 h. In animals bearing U87MG xenografts, it was detectable at levels above background for 72 h. Lastly, ^{89}Zr -DFO-AGuIX did not accumulate in inflammatory abscesses *in vivo*, highlighting its specificity for well vascularized tumors.

KEYWORDS: AGuIX, nanoparticle, positron emission tomography, cancer

INTRODUCTION

Owing to their chemical versatility and encouraging properties *in vivo*, nanotechnologies have been aggressively developed and refined over the past two decades for biomedical applications.^{1,2} We have previously developed AGuIX, an ultrasmall nanoparticle (NP) for theranostic applications in cancer.^{2–5} AGuIX is ~10 kDa NP with a hydrodynamic diameter of ~3 nm. The core of the NP is a polysiloxane matrix, onto which chemically diverse chelators can be grafted. For instance, about 10 DOTAGA chelators have been engineered per NP to bind Gd^{3+} for contrast enhanced MRI *in vivo*.^{6,7} Moreover, alternative chelators can be attached onto AGuIX for nuclear imaging, and we recently engineered one additional NODAGA chelator to bind $^{68}\text{Ga}^{3+}$ to AGuIX for PET *in vivo*.⁸ Lastly, near-infrared fluorescent molecules can be conjugated to the NP to track its tissue localization with microscopy or to follow them by optical imaging.^{9,10}

Applying these constructs *in vivo* to study the biodistribution of AGuIX longitudinally with MRI and PET has shown that the construct does not accumulate substantially in normal tissues, and rapidly clears from rodents via the kidneys. After 24 h, ~90% of the NPs are cleared in the urine, with ~10% of the

injected NPs bound within the kidneys and ~0.2% distributed in all other normal tissues. Microscopy with fluorescently tagged AGuIX showed retention within the proximal tubules of the kidneys, with subsequent excretion of the native or partially degraded NPs.¹¹ Lastly, sufficient accumulation of the NP has been observed in the microenvironment of preclinical tumor models to amplify the therapeutic effects of external beam radiation therapy.^{11,12} Collectively, these observations strongly justify first in man studies with AGuIX.

Long lived radioisotopes (e.g., zirconium-89, iodine-124) are essential to fully study the pharmacokinetics and biodistribution of molecules with higher order structure *in vivo*.¹³ Because AGuIX can be readily engineered with chemically discrete chelators, we reasoned that ^{89}Zr could be incorporated onto chelates grafted at the surface of the polysiloxane core for nuclear imaging. Indeed, we and others have shown that ^{89}Zr is an excellent radionuclide to characterize monoclonal antibodies

Received: March 24, 2016

Revised: May 9, 2016

Accepted: June 6, 2016

Published: June 6, 2016

in preclinical models of cancer and that ^{89}Zr can be stably coupled to large biomolecules with a desferrioxamine (DFO) chelator.^{13,14} These considerations motivated us to design a synthetic route to DFO-conjugated AGuIX and to evaluate the properties of ^{89}Zr -DFO-AGuIX *in vitro* and *in vivo*.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38%), and dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.5%) were purchased from Aldrich Chemical (France), acetonitrile (CH_3CN , >99.9%) was purchased from Carlo Erba (France), trifluoroacetic acid (TFA, > 99%) was purchased from Alfa Aesar (United Kingdom), copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 98%) was purchased from Merck (Germany). AGuIX particles were purchased from Nano-H (Saint-Quentin Fallavier, France). The desferrioxamine chelate, *p*-NCS-Bz-DFO (N1-hydroxy-N1-(5-(4-(hydroxy(5-(3-(4-isothiocyanatophenyl)thioureido)pentyl)amino)-4-oxobutanamido)pentyl)-N4-(5-(N-hydroxyacetamido)pentyl)-succinamide) was purchased from ChemaTech (France). All products were used without further purification. Only Milli-Q water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) was used for the aqueous solution preparation.

Synthesis of DFO-AGuIX. AGuIX nanoparticles (500 μmol based on $[\text{Gd}^{3+}]$, 1 equiv) were dispersed in 6.67 mL of water for 1 h at a pH of 7.4. *p*-NCS-Bz-DFO (37.6 mg, 50 μmol , 1 equiv) was dissolved in 4.80 mL of DMSO. The DMSO solution was then gradually added over 8 h to the AGuIX solution under stirring at 50 °C. The addition was performed gradually to prevent precipitation of the ligands and of the functionalized product. After addition was complete, the pH was decreased to 5.0 with 1 M HCl solution and stirred at room temperature overnight to precipitate free unreacted DFO. Unreacted DFO was first removed by centrifugation; all other unreacted products were removed by tangential filtration through Vivaspin membranes (molecular weight threshold = 5 kDa, Sartorius Stedim Biotech). The DFO-AGuIX solution was concentrated to approximately $[\text{Gd}^{3+}] = 100 \text{ mM}$ after many cycles of tangential filtration. The solution was sterile filtered through 0.2 μm syringe filter in order to remove the largest impurities. It was then freeze-dried for storage, using a Christ Alpha 1–2 lyophilizer. The Gd^{3+} yield for the synthesis of AGuIX prior to conjugating to DFO was 48%, which was determined with relaxometry and inductively coupled plasma mass spectrometry as reported previously.⁸ After conjugation of DFO to AGuIX, the yield of the final molecule was determined to be 68% using ICP–MS.

Radiochemistry. To a solution of $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -oxalic acid (1.2 mCi; 12 μL) and 2 M Na_2CO_3 (12 μL) was added 0.30 mL of 0.5 M HEPES (pH 7.1–7.3), 0.50 mL of DFO-AGuIX (pH = 7, 22.5 $\mu\text{moles Gd}$), or 0.50 mL of DFO (deferoxamine mesylate salt, pH = 7, 15 mg), and 0.70 mL 0.5 M HEPES (pH 7.1–7.3) into the reaction vial was added. After incubation (120 min) at 37 °C, the radiolabeling yield was determined by iTLC. The final product was filtered through a 0.2 μm filter into a sterile vial. Radiolabeling efficiency (typically > 98.5%) was determined by iTLC using chromatography strips and 20 mM citric acid (pH 4.9–5.1) as the mobile phase. *In vitro* stability of ^{89}Zr -AGuIX was assessed in serum for up to 3 days. For the serum stability studies, 50 μL of ^{89}Zr -AGuIX at 50 mM in Gd^{3+} was added to 450 μL serum, and the mixture was incubated at 37 °C. Samples were taken at 1, 4, 24, and 75 h

and assessed by iTLC. ^{89}Zr -transferrin was prepared as previously described.¹⁵

Serum Stability Determination. Blood samples were immediately subjected to centrifugation at 2300g for 15 min at 4 °C, and the serum supernatants were collected. The supernatant was immediately aliquoted and studied. *In vitro*, 50 μCi ^{89}Zr -DFO-AGuIX were incubated with 100% fetal bovine serum, and aliquots were reserved for analysis at 1, 4, 8, 24, and 72 h. Healthy *nu/nu* mice (8–10 weeks old, $n = 3$) were injected with $50 \pm 3 \mu\text{Ci}$ of ^{89}Zr -DFO-AGuIX preparation in 100 μL HEPES solution (pH = 7.4). Blood was sampled from the submandibular vein at 1, 4, 8, 24, and 72 h postinjection. Activity within the blood samples was resolved by iTLC, and each experiment was carried out in triplicate.

Animal Studies. All animal protocols were approved by the UCSF Administrative on Laboratory Animal Care. For tumor imaging studies, 8-wk-old male nude (*nu/nu*) mice (Charles River Laboratories) were injected subcutaneously with 1×10^6 cells containing 50% Matrigel (v/v) in the flank while anesthetized with 2% isoflurane. Animals were used for imaging studies with MRI and PET once the tumors became palpable. For MRI studies, AGuIX (20 μmol) and DOTAREM (20 μmol) were administered via tail vein injection. Animals were imaged with MRI 20 min postinjection. For biodistribution studies with inflammatory abscesses, ~50 μL of turpentine oil (Sigma-Aldrich) was injected subcutaneously in the right hind limb per a previously established methodology.¹⁶ Fifteen minutes was allowed to pass to generate the acute phase response, whereupon the mice were injected with ^{89}Zr -transferrin or ^{89}Zr -DFO-AGuIX. Animals were euthanized 30 min postinjection with CO_2 (g) asphyxiation.

Magnetic Resonance Imaging. All MRI acquisitions were performed on a 7T Small Animal MRI facility at UCSF, using a 7T 300 MHz Horizontal Bore Varian MR System. Pre- and post-treatment MR imaging was performed. A multislice spin-echo sequence was used to generate spin-density weighted images, with a TR of 3000 ms and a TE of 18 ms. Sample scans had an acquisition matrix of 128×128 points, with the field of view measuring 19.2×19.2 mm. Prior to injection in mice, a concentrated colloid (AGuIX in water, $[\text{Gd}^{3+}] = 100 \text{ mM}$) was diluted by saline solution in order to obtain an intravenous use solution ($[\text{Gd}^{3+}] = 50 \text{ mM}$). The pH was adjusted to 7.4. Before use, this solution was filtered onto syringe filter with nylon membrane (pore diameter 0.22 μm). The chelate used was DOTAREM (laboratories Guerbet, Aulnay sous Bois France, 0.5 mM/mL) as available in MRI units. The aqueous AGuIX was manually injected in the tail vein at 200 μL volume. The gadolinium chelates were injected via the tail vein at the same concentration (50 mM) at 200 μL volume.

■ RESULTS

AGuIX NPs were synthesized according to our previously established, top-down protocol. Briefly, gadolinium oxide cores were first synthesized in diethylene glycol. The oxide core was coated with a polysiloxane shell using hydrolysis–condensation of aminopropyl triethoxysilane (APTES) and tetraethyl orthosilicate (TEOS). DOTAGA groups (1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic acid) were then covalently ligated onto the nanoparticles via a primary amine from APTES. To induce core dissolution, the NPs were transferred from DEG to water. The resulting polysiloxane hollow cores were collapsed and fragmented into small and

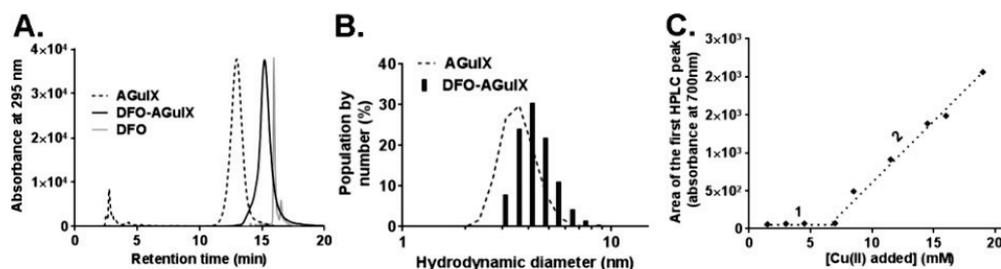


Figure 1. Synthesis and characterization of DFO-AGuIX. (A) An overlay of reverse phase HPLC traces showing the resolution of DFO-AGuIX at ~ 15 min compared to naked AGuIX (~ 13 min) and free DFO (~ 16 min). These data also underscore the purity of DFO-AGuIX after filtration. The early eluting peaks on the AGuIX HPLC trace are minor degradation products. They do not appear on the DFO-AGuIX trace because they are removed with reaction purification. (B) Dynamic light scattering data showing that the hydrodynamic diameter of DFO-AGuIX is larger than naked AGuIX, as expected. These data were acquired using the purified DFO-AGuIX material. (C) Determination of the number of DFO chelates per AGuIX nanoparticle using Cu^{2+} titration and UV/vis spectroscopy. The area under the peak corresponding to free Cu^{2+} was calculated after addition of Cu^{2+} on DFO-AGuIX and injection in HPLC (see also Supplemental Figure 1). Under subsaturating conditions, no peak was detected (1); while after increasing the concentration of Cu^{2+} , free Cu^{2+} ions were detected as the concentration exceeded ~ 7 mM (2). This assay was conducted with 38.4 mM AGuIX (in $[\text{Gd}^{3+}]$).

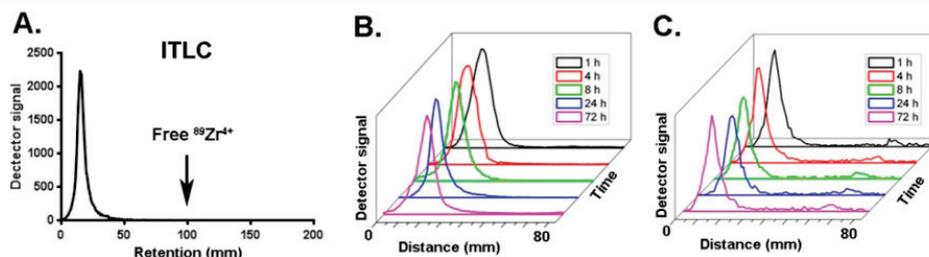


Figure 2. Synthesis and characterization of ^{89}Zr -DFO-AGuIX. (A) A representative ITLC showing the near complete metalation of DFO-AGuIX with ^{89}Zr -oxalate. The large peak corresponds to activity at the baseline, interpreted to be ^{89}Zr -AGuIX, and an arrow indicates the expected R_f for ^{89}Zr -oxalate (see also Supplemental Figure 5). (B) Representative ITLC traces showing the stability of ^{89}Zr -DFO-AGuIX over time in neat fetal bovine serum. No peaks were resolved from baseline, suggesting that ^{89}Zr -DFO-AGuIX is not metabolized to smaller radioactive byproducts. (C) Representative iTLC traces showing the stability of ^{89}Zr -DFO-AGuIX over time in mouse serum. Mice were injected with ~ 50 μCi of ^{89}Zr -DFO-AGuIX, and blood was harvested at the indicated time point. The isolated serum was spotted and resolved by iTLC.

rigid platforms of polysiloxane. The resulting NPs bear on their surface DOTAGA molecules that are chelated to Gd^{3+} cations.⁷

To prepare DFO-AGuIX, 1-(4-isothiocyanatophenyl)-3-[6,17-dihydroxy-7,10,18,21-tetraoxo-27-(*N*-acetylhydroxylamino)-6,11,17,22-tetraazaheptaicosine] thiourea (*p*-NCS-Bz-DFO) was incubated with AGuIX for 1 h at room temperature. DFO was covalently ligated to the solvent exposed primary amines contained within APTES, and the resulting functional group was a thiourea. DFO-AGuIX was subjected to tangential filtration over a 5 kDa membrane to remove any unconjugated *p*-NCS-Bz-DFO at pH 5. DFO-AGuIX NPs were then freeze-dried for storage.

We expected that adding DFO to AGuIX would change its retention on reverse phase HPLC. On this basis, we subjected DFO-AGuIX to RP-HPLC to determine its purity. Naked AGuIX, DFO-AGuIX, and free DFO were loaded into the injection loop separately. The corresponding chromatogram from the DFO-AGuIX showed peaks at 2.5 min corresponding to degradation fragments of DFO-AGuIX due to the hydrolysis of silyl ether bonds in diluted medium.¹⁷ The major peak at 13–14 min corresponded to DFO-AGuIX (Figure 1A). Moreover, DFO-AGuIX eluted later than AGuIX, and no free DFO was detected in the DFO-AGuIX formulation. The final colloidal solution was characterized by dynamic light scattering,

and DFO-AGuIX was determined to have a hydrodynamic diameter of 4.4 ± 1 nm (slightly larger to the hydrodynamic diameter of naked AGuIX that is 3.6 ± 0.8 nm, Figure 1B), which is suitable for renal excretion.

To quantify the number of DFO molecules per AGuIX, we titrated Cu^{2+} into a preparation of DFO-AGuIX ($[\text{Gd}^{3+}] = 38.4$ mM) and resolved the free and AGuIX bound Cu^{2+} with HPLC. We chose to utilize Cu^{2+} for several reasons. First, the constant of complexation between Cu^{2+} and DFO has been calculated¹⁸ and is only 2-fold less than Fe^{3+} ($\log \beta = 23.98$ for $[\text{CuLH}]^0$, $\log \beta = 41.01$ for $[\text{FeLH}]^+$). Moreover, $\text{Cu}(\text{II})$ sulfate is easily detected at 700 nm. Lastly, we have previously developed, validated, and published this HPLC based approach using $\text{Cu}(\text{II})$ sulfate to determine the number of NODA chelators on the AGuIX scaffold.⁸

On titration, a free fraction of $\text{Cu}(\text{II})$ sulfate was initially detected at ~ 7 mM of Cu^{2+} , and this point of inflection allowed us to estimate between one and two DFO chelators per DFO-AGuIX (Figure 1C and Supplemental Figure 1). A detectable but negligible amount of unknown $\text{Cu}(\text{II})$ conjugated degradation products were also observed (Supplemental Figure 2). These early eluting peaks did not interfere with the integration of the $\text{Cu}(\text{II})$ sulfate peak on the HPLC trace. ICP-MS performed on DFO-AGuIX also resulted in a relative

composition consistent with one to two DFO molecules per AGuIX: $\text{Gd}_{10}\text{APTES}^*_{27.8}\text{TEOS}^*_{26.6}\text{DOTAGA}^*_{10.2}\text{DFO}^*_{1.4}$. Lastly, a separate set of experiments with Cu^{2+} and naked AGuIX lacking DFO showed almost no evidence of binding (Supplemental Figure 3). This indicates that the DOTAGA chelators within AGuIX are saturated with Gd^{3+} (free chelate <2%), and the Cu^{2+} binding observed with DFO-AGuIX is due to an interaction between Cu^{2+} and DFO.

DFO-AGuIX was then metalated with ^{89}Zr -oxalate in 1 h to a radiochemical yield of 99%. Unreacted ^{89}Zr -oxalate was removed by centrifugal membrane filtration per a previous protocol.¹⁹ The radiochemical purity was determined to be 100% by iTLC using 20 mM citric acid as the mobile phase (Figure 2A and Supplemental Figure 4).

We next evaluated the stability of ^{89}Zr -DFO-AGuIX *in vitro* and *in vivo*. No detectable degradation of ^{89}Zr -DFO-AGuIX was observed after 72 h of incubation at 37 °C in bovine serum (Figure 2B). Moreover, no evidence of degradation was observed in the serum harvested from mice injected intravenously with ^{89}Zr -DFO-AGuIX (Figure 2C and Supplemental Figure 5). Because ^{89}Zr -DFO-AGuIX was very stable, we determined the biological half-life of the construct in normal mice. Serial measurements of total activity in tumor naïve *nu/nu* mice injected with ^{89}Zr -AGuIX intravenously showed that the biological half-life is ~67 h (Supplemental Figure 6).

We next asked if ^{89}Zr -DFO-AGuIX accumulates within a subcutaneous tumor model in mice. Male *nu/nu* mice inoculated with subcutaneous U87MG tumors were injected with ^{89}Zr -DFO-AGuIX intravenously, and the biodistribution was monitored over time. After observing evidence of accumulation in the tumor with MRI 20 min postinjection due to the positive contrast agent properties of DFO-AGuIX ($r_1 = 16.7 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ and $r_2/r_1 = 1.5$ at 37 °C and 1.4 T) (Supplemental Figure 7), we investigated the tumor associated activity from 24–72 h with biodistribution studies. Durable retention of the NPs (~2% ID/g) was observed in human glioma U87MG tumors and was statistically greater than the accumulation of ^{89}Zr -DFO (~0.5% ID/g at 24 h postinjection, see Figure 3A,B and Supplemental Figures 8 and 9 for biodistribution from a larger panel of normal tissues.). The tumor to blood and tumor to muscle ratio for ^{89}Zr -AGuIX incrementally increased over time to values greater than 10 at 72 h postinjection (Figure 3C). The uptake in other normal tissues was low, as expected, with the notable exception of the kidneys (Supplemental Figure 9). Autoradiography of the tumor slices *ex vivo* also showed that the highest degree of activity within the tumor slices colocalized with areas harboring visually obvious pericellular compartments (Supplemental Figure 10). Lastly, we tested whether ^{89}Zr -DFO-AGuIX accumulated in inflammatory abscesses *in vivo*. After inducing an acute phase response with an intramuscular injection of turpentine, normal *nu/nu* mice were treated with ^{89}Zr -DFO-AGuIX or ^{89}Zr -transferrin, a molecule we previously showed to localize to sites of inflammation.¹⁵ After 30 min, a biodistribution study was conducted to determine the amount of activity in the inflamed muscle and normal tissues. The uptake of ^{89}Zr -Tf was higher in the inflamed muscle compared to the untreated contralateral muscle, as expected. However, no difference in activity was observed between the inflamed and untreated muscles of mice treated with ^{89}Zr -AGuIX (Figure 3D and Supplemental Figure 11). Moreover, the level of tissue associated activity in the inflamed muscle was ~0.5% ID/g, or

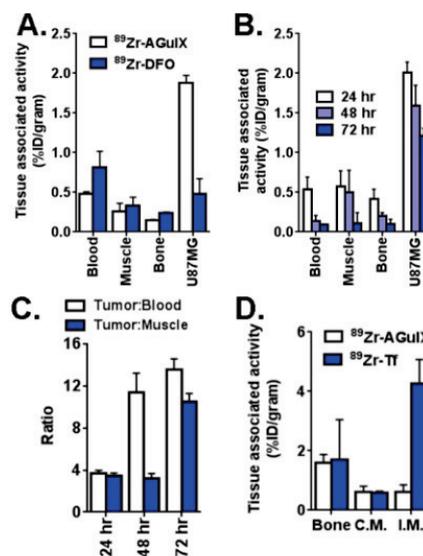


Figure 3. ^{89}Zr -DFO-AGuIX accumulates in the tumor microenvironment, but not in inflammatory abscesses. (A) Biodistribution data at 24 h postinjection of ^{89}Zr -DFO-AGuIX or ^{89}Zr -DFO shows significantly higher uptake of the NP in the microenvironment of subcutaneous U87MG tumors compared to ^{89}Zr -DFO. No substantial differences were observed in muscle or bone, two normal reference tissues, from the cohorts receiving either radionuclide. (B) Biodistribution data showing that ^{89}Zr -DFO-AGuIX persists in the tumor microenvironment for several days postinjection. At 72 h, the tumor associated activity was ~1.0% ID/g, which is above background. (C) A graphical representation of the mean tumor to muscle and tumor to blood ratios over time for mice treated with ^{89}Zr -DFO-AGuIX. (D) Biodistribution data showing no uptake of ^{89}Zr -DFO-AGuIX in the inflamed muscles within the hindlimbs of a mouse cohort. By comparison, ^{89}Zr -transferrin showed robust uptake in the inflamed muscle, presumably owing to the abundant expression of the transferrin receptor on peripheral mononuclear blood cells. I.M. = inflamed muscle, C.M. = contralateral unmanipulated muscle.

roughly equal to what was observed for ^{89}Zr -DFO in U87MG tumors.

DISCUSSION

In this report, we describe the synthesis and characterization of AGuIX functionalized with DFO and conjugated to ^{89}Zr . The construct was synthesized from AGuIX in two steps to >98% radiochemical yield. Consistent with our expectations, the radiolabeled construct is stable out to 72 h *in vitro* and *in vivo*, and durably accumulates into subcutaneous tumors during this time period. Finally, ^{89}Zr -DFO-AGuIX did not accumulate in inflammatory abscesses *in vivo*, as expected. Collectively, these data support the use of ^{89}Zr -DFO-AGuIX as a tool to measure the biodistribution and pharmacokinetics of AGuIX in a first-in-man study.

To our knowledge, this is the first example of a ^{89}Zr -labeled ultrasmall nanoparticle, though others have conjugated ^{89}Zr to larger nanoparticles with longer circulation times.^{20–24} As we demonstrate, the use of ^{89}Zr is justified, as AGuIX can persist for days in the tumor microenvironment due to the enhanced permeability and retention effect. Consistent with previous MR and microscopy data, accumulation within the kidney also

persists for days, extending the biological half-life of AGuIX.²⁵ Moreover, we felt a radiometal-based approach (as opposed to a halogen) was appropriate, as we have previously shown that chemically discrete chelators can be added to the polysiloxane core after functionalization with DOTAGA and saturation with Gd³⁺. Lastly, ⁸⁹Zr was an attractive radionuclide to work with, owing to its long half-life (~78 h), and the recently clinical data showing it is well tolerated in patients when attached to monoclonal antibodies.^{26,27}

Incorporating a long-lived radioisotope for PET onto AGuIX presents a more realistic approach to quantify the amount of NPs in cancer at later time points postinjection. While our preclinical experience with AGuIX shows that its concentration in tumors can be calculated with MRI within minutes to hours postinjection, contrast becomes more difficult to detect in tumors >24 h postinjection.⁴ By comparison, a ~1 h PET acquisition should be sufficient to acquire the ~10 million coincident events needed for tumor contrast based on the magnitude of radioactivity detected in the biodistribution study. PET also broadens the dynamic range of concentrations that can be measured by lowering the limit of NP detection compared to contrast enhanced MRI. All of these considerations are significant, as the pharmacokinetics of the NP will dictate the design of a pending clinical trial to determine its value as a radiosensitizer.

Using our current synthetic scheme, approximately one molecule of DFO was incorporated per AGuIX NP. In the future, we anticipate more DFO chelators can be added to the unreacted primary amines on the polysiloxane core, which in turn could favorably raise the specific activity of the construct. Along these lines, our data also argues strongly for the ligation of ⁸⁹Zr-AGuIX onto large biomolecules (e.g., IgG, Fab) for immunoPET applications.¹⁴ We are currently exploring these frontiers.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00264.

Supplemental methods, HPLC data, representative MR images of tumor bearing mice, autoradiography of xenograft sections, and biodistribution studies of mice treated with ⁸⁹Zr-AGuIX (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: michael.evans@ucsf.edu. Phone: 415-353-3442.

Author Contributions

§These authors contributed equally to this work

Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): M.J.E. receives consulting fees and owns shares in ORIC Pharmaceuticals, Inc.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Sergio Wong and Drs Youngho Seo and Sergey Magnitsky for assistance with the biodistribution studies and MRI experiments, and Frederic Boschetti from CheMatech SAS for the furnishing of p-NCS-Bz-DFO. M.J.E., C.T., and L.T.H. were supported by the 2013 David H. Koch Young Investigator Award from the Prostate Cancer

Foundation, by the National Institutes of Health (R00CA172695, 1R01CA17661-01), and the Department of Defense Prostate Cancer Research Program (PC140107, PC151060). E.T., F.L., and O.T. were supported by the French National Research Agency (ANR6126RPIB-0010 Multimage).

■ REFERENCES

- Hainfeld, J. F.; Smilowitz, H. M.; O'Connor, M. J.; Dilmanian, F. A.; Slatkin, D. N. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine* **2013**, *8* (10), 1601–9.
- Lux, F.; Mignot, A.; Mowat, P.; Louis, C.; Dufort, S.; Bernhard, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Brunet, C.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Laurent, S.; Vander Elst, L.; Muller, R.; Sancey, L.; Jossierand, V.; Coll, J. L.; Stupar, V.; Barbier, E.; Remy, C.; Broisat, A.; Ghezzi, C.; Le Duc, G.; Roux, S.; Perriat, P.; Tillement, O. Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50* (51), 12299–303.
- Sancey, L.; Lux, F.; Kotb, S.; Roux, S.; Dufort, S.; Bianchi, A.; Cremillieux, Y.; Fries, P.; Coll, J. L.; Rodriguez-Lafresse, C.; Janier, M.; Dutreix, M.; Barberi-Heyob, M.; Boschetti, F.; Denat, F.; Louis, C.; Porcel, E.; Lacombe, S.; Le Duc, G.; Deutsch, E.; Perfettini, J. L.; Detappe, A.; Verry, C.; Berbeco, R.; Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Prise, K. M.; Perriat, P.; Tillement, O. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobes to improve radiotherapy efficacy. *Br. J. Radiol.* **2014**, *87* (1041), 20140134.
- Le Duc, G.; Roux, S.; Paruta-Tuarez, A.; Dufort, S.; Brauer, E.; Marais, A.; Truillet, C.; Sancey, L.; Perriat, P.; Lux, F.; Tillement, O. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* **2014**, *5* (1), 4.
- Detappe, A.; Kunjachan, S.; Rottmann, J.; Robar, J.; Tsiamas, P.; Korideck, H.; Tillement, O.; Berbeco, R. AGuIX nanoparticles as a promising platform for image-guided radiation therapy. *Cancer Nanotechnol.* **2015**, *6* (1), 4.
- Bianchi, A.; Dufort, S.; Fortin, P. Y.; Lux, F.; Raffard, G.; Tassali, N.; Tillement, O.; Coll, J. L.; Cremillieux, Y. In vivo MRI for effective non-invasive detection and follow-up of an orthotopic mouse model of lung cancer. *NMR Biomed.* **2014**, *27* (8), 971–9.
- Mignot, A.; Truillet, C.; Lux, F.; Sancey, L.; Louis, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Bocher, L.; Gloter, A.; Stephan, O.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Luneau, D.; Novitchi, G.; Figueiredo, L. C.; de Morais, P. C.; Bonneviot, L.; Albel, B.; Ribot, F.; Van Lokeren, L.; Dechamps-Olivier, I.; Chuburu, F.; Lemercier, G.; Villiers, C.; Marche, P. N.; Le Duc, G.; Roux, S.; Tillement, O.; Perriat, P. A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (19), 6122–36.
- Truillet, C.; Bouziotis, P.; Tsoukalas, C.; Brugiere, J.; Martini, M.; Sancey, L.; Brichart, T.; Denat, F.; Boschetti, F.; Darbost, U.; Bonnamour, I.; Stellas, D.; Anagnostopoulos, C. D.; Koutoulidis, V.; Mouloupoulos, L. A.; Perriat, P.; Lux, F.; Tillement, O. Ultrasmall particles for Gd-MRI and (68) Ga-PET dual imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10* (4), 309–19.
- Morlieras, J.; Dufort, S.; Sancey, L.; Truillet, C.; Mignot, A.; Rossetti, F.; Dentamaro, M.; Laurent, S.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Roux, S.; Perriat, P.; Lux, F.; Coll, J. L.; Tillement, O. Functionalization of small rigid platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors overexpressing alphavbeta3-integrins. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (9), 1584–97.
- Morlieras, J.; Chezal, J. M.; Miot-Noirault, E.; Roux, A.; Heinrich-Balard, L.; Cohen, R.; Tarrit, S.; Truillet, C.; Mignot, A.; Hachani, R.; Kryza, D.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Perriat, P.; Janier, M.; Sancey, L.; Lux, F.; Tillement, O. Development of gadolinium based nanoparticles having an affinity towards melanin. *Nanoscale* **2013**, *5* (4), 1603–15.
- Lux, F.; Sancey, L.; Bianchi, A.; Cremillieux, Y.; Roux, S.; Tillement, O. Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomedicine* **2015**, *10* (11), 1801–15.

- (12) Le Duc, G.; Miladi, I.; Alric, C.; Mowat, P.; Brauer-Krisch, E.; Bouchet, A.; Khalil, E.; Billotey, C.; Janier, M.; Lux, F.; Epicier, T.; Perriat, P.; Roux, S.; Tillement, O. Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, *5* (12), 9566–74.
- (13) Zeglis, B. M.; Houghton, J. L.; Evans, M. J.; Viola-Villegas, N.; Lewis, J. S. Underscoring the influence of inorganic chemistry on nuclear imaging with radiometals. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (4), 1880–99.
- (14) Evans, M. J. Measuring oncogenic signaling pathways in cancer with PET: an emerging paradigm from studies in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Discovery* **2012**, *2* (11), 985–94.
- (15) Holland, J. P.; Evans, M. J.; Rice, S. L.; Wongvipat, J.; Sawyers, C. L.; Lewis, J. S. Annotating MYC status with ^{89}Zr -transferrin imaging. *Nat. Med.* **2012**, *18* (10), 1586–91.
- (16) Jennings, G.; Elia, M. The acute-phase response to turpentine-induced abscesses in malnourished rats at different environmental temperatures. *Metab., Clin. Exp.* **1992**, *41* (2), 141–7.
- (17) Truillet, C.; Lux, F.; Tillement, O.; Dugourd, P.; Antoine, R. Coupling of HPLC with electrospray ionization mass spectrometry for studying the aging of ultrasmall multifunctional gadolinium-based silica nanoparticles. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10440–7.
- (18) Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Crespo-Alonso, M.; Sanna, G.; Zoroddu, M. A.; Alberti, G.; Biesuz, R. A Speciation Study on the Perturbing Effects of Iron Chelators on the Homeostasis of Essential Metal Ions. *PLoS One* **2015**, *10* (7), e0133050.
- (19) Vosjan, M. J.; Perk, L. R.; Visser, G. W.; Budde, M.; Jurek, P.; Kiefer, G. E.; van Dongen, G. A. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (4), 739–43.
- (20) Keliher, E. J.; Yoo, J.; Nahrendorf, M.; Lewis, J. S.; Marinelli, B.; Newton, A.; Pittet, M. J.; Weissleder, R. ^{89}Zr -labeled dextran nanoparticles allow in vivo macrophage imaging. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (12), 2383–9.
- (21) Chen, F.; Goel, S.; Valdivinos, H. F.; Luo, H.; Hernandez, R.; Barnhart, T. E.; Cai, W. In Vivo Integrity and Biological Fate of Chelator-Free Zirconium-89-Labeled Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Nano* **2015**, *9* (8), 7950–9.
- (22) Miller, L.; Winter, G.; Baur, B.; Witulla, B.; Solbach, C.; Reske, S.; Linden, M. Synthesis, characterization, and biodistribution of multiple ^{89}Zr -labeled pore-expanded mesoporous silica nanoparticles for PET. *Nanoscale* **2014**, *6* (9), 4928–35.
- (23) Perez-Medina, C.; Abdel-Atti, D.; Zhang, Y.; Longo, V. A.; Irwin, C. P.; Binderup, T.; Ruiz-Cabello, J.; Fayad, Z. A.; Lewis, J. S.; Mulder, W. J.; Reiner, T. A modular labeling strategy for in vivo PET and near-infrared fluorescence imaging of nanoparticle tumor targeting. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (10), 1706–11.
- (24) Perez-Medina, C.; Tang, J.; Abdel-Atti, D.; Hogstad, B.; Merad, M.; Fisher, E. A.; Fayad, Z. A.; Lewis, J. S.; Mulder, W. J.; Reiner, T. PET Imaging of Tumor-Associated Macrophages with ^{89}Zr -Labeled High-Density Lipoprotein Nanoparticles. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (8), 1272–7.
- (25) Sancey, L.; Kotb, S.; Truillet, C.; Appaix, F.; Marais, A.; Thomas, E.; van der Sanden, B.; Klein, J. P.; Laurent, B.; Cottier, M.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Panczer, G.; Lux, F.; Perriat, P.; Motto-Ros, V.; Tillement, O. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano* **2015**, *9* (3), 2477–88.
- (26) Pandit-Taskar, N.; O'Donoghue, J. A.; Durack, J. C.; Lyashchenko, S. K.; Cheal, S. M.; Beylgeril, V.; Lefkowitz, R. A.; Carrasquillo, J. A.; Martinez, D. F.; Fung, A. M.; Solomon, S. B.; Gonen, M.; Heller, G.; Loda, M.; Nanus, D. M.; Tagawa, S. T.; Feldman, J. L.; Osborne, J. R.; Lewis, J. S.; Reuter, V. E.; Weber, W. A.; Bander, N. H.; Scher, H. I.; Larson, S. M.; Morris, M. J. A Phase I/II Study for Analytic Validation of ^{89}Zr -J591 ImmunoPET as a Molecular Imaging Agent for Metastatic Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (23), 5277–85.
- (27) Dijkers, E. C.; Oude Munnink, T. H.; Kosterink, J. G.; Brouwers, A. H.; Jager, P. L.; de Jong, J. R.; van Dongen, G. A.; Schroder, C. P.; Lub-de Hooge, M. N.; de Vries, E. G. Biodistribution of ^{89}Zr -trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87* (5), 586–92.

3.5 CONCLUSION

Au cours de cette thèse, différentes particules de type AGuIX ont été synthétisées et caractérisées afin de permettre leur utilisation en scintigraphie. Cette bibliothèque de particules nous offre la possibilité de complexer des radioisotopes variés et l'une ou l'autre des particules peut être choisie en fonction de l'application désirée, de la disponibilité du radioisotope, etc.

Nous avons ainsi pu réaliser quelques radiomarquages des particules AGuIX par des isotopes pour la SPECT, le ^{111}In et le ^{67}Ga , et obtenu des rendements de radiomarquage supérieurs à 80 %. Concernant la PET, des collaborations en Grèce et aux Etats-Unis nous ont permis de radiomarquer des particules de type AGuIX présentant des ligands NODAGA ou DFO en surface. Nous avons pu réaliser des études *in vivo* avec le ^{64}Cu , le ^{68}Ga et le ^{89}Zr et pu suivre la biodistribution des particules sur des temps plus ou moins longs. Ces études ont montré une accumulation dans les tumeurs en quelques minutes et une rétention sur plusieurs jours ainsi qu'une élimination principalement rénale des particules. Nous avons aussi pu vérifier que les particules restent intactes dans les tumeurs après injection intraveineuse.

De par la meilleure résolution spatiale et sensibilité de la PET, sa facilité de quantification et la commercialisation d'appareils PET/IRM, il semble plus intéressant de complexer des radioisotopes PET que SPECT sur les particules AGuIX. Le gros avantage du ^{68}Ga réside dans sa production par générateur $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ qui peut être disponible sur le site même de l'hôpital mais son temps de demi-vie est court (environ 1 h). Lors de l'essai clinique des particules AGuIX pour l'amélioration de la radiothérapie, le temps de demi-vie plasmatique des particules a pu être estimé sur l'homme à environ 2 h. Le temps de demi-vie du ^{64}Cu ($\tau_{1/2} = 12,7$ h) semblerait donc adéquat pour une utilisation avec les AGuIX (production, transport, radiomarquage, purification éventuelle, injection et imagerie). Que ce soit dans le cas du ^{68}Ga ou de ^{64}Cu , il est intéressant de modifier les particules AGuIX par ajout de NODAGA en surface. La méthode de fonctionnalisation mise au point et présentée dans ce chapitre est une voie simple et robuste pour atteindre ce but.

Le ^{89}Zr possède aussi un temps de demi-vie long ($\tau_{1/2} = 74,8$ h). Au cours de nos recherches, nous avons modifié les particules en ajoutant à leur surface du DFO pour complexer le radioisotope, c'est en effet le ligand le plus utilisé. Cependant, une étude récente montre que le complexe DOTA peut être utilisé pour complexer ce radioisotope.^[130] Le complexe obtenu présente une meilleure stabilité *in vitro* et *in vivo* que le complexe DFO@ ^{89}Zr utilisé presque systématiquement. Il serait donc tout à fait possible d'utiliser les particules AGuIX non modifiées pour complexer le ^{89}Zr ce qui serait très intéressant. Des études vont avoir lieu dans les prochains mois pour le vérifier.

Les particules AGuIX@DOTA et AGuIX@NODAGA présentées dans les **chapitres 2 et 3** ont environ 30-40 % de chélates libres en surface. Au vu de la sensibilité de la scintigraphie par rapport à l'IRM, il n'est pas utile d'avoir autant de ligands disponibles pour le radiomarquage. La fonctionnalisation par des ligands NHS étant facilement modulable, on a pu récemment synthétiser et caractériser de nouvelles particules AGuIX@NODAGA et AGuIX@DOTA avec moins de ligands libres, elles vont être utilisées pour des études de radiomarquage dans les mois qui viennent. D'un autre côté, dans l'objectif de complexer des isotopes

radioactifs pour de la thérapie (curiethérapie), il peut être intéressant d'avoir beaucoup de ligands libres pour apporter une forte dose de radioactivité aux tumeurs. Les particules développées et présentées dans ce manuscrit pourraient ainsi permettre de complexer du ^{90}Y (yttrium) ou du ^{177}Lu (lutécium) qui sont fréquemment utilisés. Pour aller plus loin, on peut aussi imaginer travailler avec des paires de radioisotopes telles que $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{90}\text{Y}$, $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ ou $^{68}\text{Ga}/^{90}\text{Y}$. Pour l'imagerie ou la thérapie, il sera possible de travailler avec l'un ou l'autre isotope de la paire définie tout en conservant un matériau unique et ayant les mêmes propriétés pharmacocinétiques.^[124,162]

Les particules AGuIX peuvent aussi servir pour d'autres formes de thérapie. C'est ce que nous allons présenter dans le dernier chapitre de ce manuscrit avec le développement de nanoparticules pour la photothérapie dynamique guidée par IRM.

Chapitre 4

Développement de nanoparticules
AGuIX pour la photothérapie
dynamique guidée par IRM

4 CHAPITRE 4 : DEVELOPPEMENT DE NPS AGuIX POUR LA PDT GUIDEE PAR IRM

4.1 INTRODUCTION

La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie constituent actuellement les principales modalités de traitement du cancer. Malgré des améliorations continues, ces techniques ne sont pas toujours suffisantes pour traiter complètement le cancer et éviter les récurrences et présentent chacune leurs propres effets secondaires. La photothérapie dynamique (PDT, *photodynamic therapy*) est un traitement qui peut être utilisé comme alternative ou complément des techniques précédentes.^[163,164]

Depuis très longtemps, il est connu que certaines molécules peuvent avoir un effet thérapeutique en combinaison avec la lumière. Par exemple, les Egyptiens utilisaient des substances naturelles et la lumière du soleil pour traiter des maladies de peau.^[165] Depuis, la PDT a été utilisée dans le traitement de certaines pathologies inflammatoires ou infectieuses ou encore de cancers. Elle est par exemple utilisée pour soigner des cancers superficiels de la vessie, de la prostate, du poumon, de l'œsophage, de la tête et du cou, de la peau...^[61] Sa faible profondeur d'utilisation constitue son principal inconvénient et limite souvent son application à des pathologies superficielles.

Dans ce chapitre, on va s'intéresser à la fonctionnalisation des particules AGuIX afin de les utiliser pour la photothérapie dynamique.

4.1.1 Principe de la PDT

4.1.1.1 Mécanisme d'action

La PDT est basée sur l'utilisation conjointe d'un photosensibilisateur (PS), de lumière et de dioxygène. Après irradiation du PS (voir **Figure 4-1**), des espèces cytotoxiques sont formées et induisent la destruction des tumeurs. Contrairement à la chimiothérapie par exemple, les éléments utilisés en PDT (la lumière d'une part et le PS d'autre part) ne sont pas toxiques en eux-mêmes, c'est leur combinaison qui l'est. Cela constitue le principal avantage de la PDT.^[61,164]

L'irradiation du PS permet le passage de son état singulet fondamental S₀ aux états singulets excités S₁, S₂,... Par conversion interne, non radiative, le PS revient dans son état excité S₁, dont le temps de vie est relativement court (quelques nanosecondes). De là, le PS peut revenir à son état fondamental S₀ par émission d'un photon, c'est le phénomène de fluorescence. Il est d'ailleurs possible d'utiliser la fluorescence du PS pour l'imagerie et le diagnostic. Un croisement inter-système (CIS) peut aussi avoir lieu et permettre le passage du PS de son état singulet S₁ à son état triplet T₁. A partir de celui-ci, le PS peut revenir dans son

état fondamental S_0 par émission d'un photon, c'est le phénomène de phosphorescence. La durée de vie de l'état triplet étant relativement longue (de la microseconde à la seconde), le PS peut aussi interagir avec les molécules environnantes et leur transmettre son énergie ce qui constitue la base de la PDT.^[61,164]

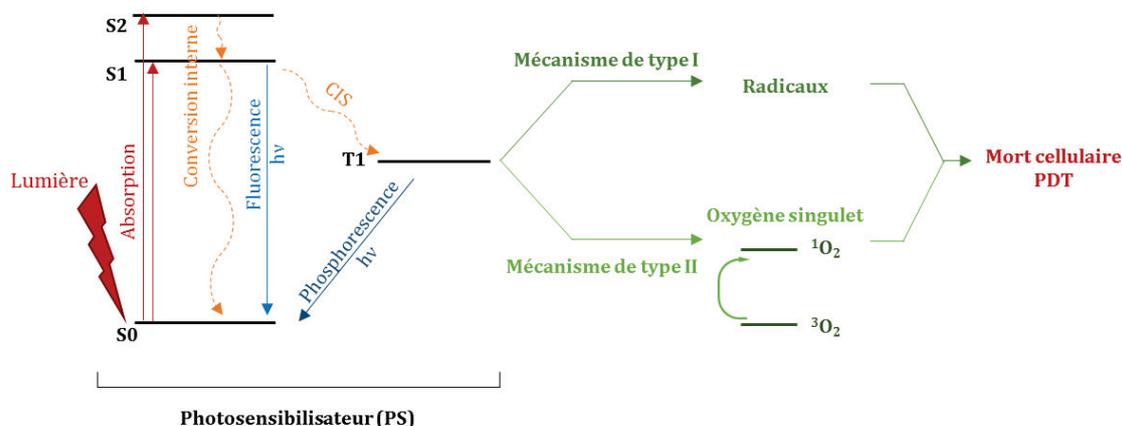


Figure 4-1 : Processus photochimique de la PDT : l'irradiation du photosensibilisateur par de la lumière conduit à la formation d'espèces cytotoxiques.

On distingue deux mécanismes pour la PDT. Lors du mécanisme de type I, le PS excité dans son état T1 interagit directement avec les molécules environnantes (constituants des cellules, des membranes,...) pour créer des espèces radicalaires. Elles entraînent à leur tour la formation de dérivés réactifs de l'oxygène cytotoxiques (ROS, *Reactive Oxygen Species*).^[18,164] Le mécanisme de type II serait prépondérant dans la plupart des cas.^[164] Dans ce cas, le PS excité retourne à son état fondamental S_0 par interaction avec l'oxygène et formation d'oxygène singulet. Ce dernier transfère ensuite son énergie aux cellules environnantes entraînant leur destruction par nécrose ou apoptose. La demi-vie de l'oxygène singulet est courte (de 0,03 μ s à 0,2 ms) et son rayon d'interaction est inférieur à 0,2 μ m. Les dommages résultant de la PDT coïncident donc en général avec la localisation du PS excité.^[166] En utilisant un faisceau de lumière localisée précisément, on peut ainsi détruire sélectivement les cellules tumorales et préserver les tissus sains.

Concernant les dommages induits par la PDT, on distingue les dommages directs correspondant à la destruction des cellules tumorales, des dommages indirects correspondant à la destruction du réseau vasculaire de la tumeur. La croissance des tumeurs dépend en effet de leur capacité à augmenter le nombre de vaisseaux sanguins autour d'elles (phénomène d'angiogenèse) afin de permettre un apport important en oxygène et en nutriments. La destruction du système vasculaire de la tumeur permettrait d'augmenter l'efficacité de la PDT et faciliterait l'éradication de la tumeur.^[167] D'autre part, la réponse immunitaire ou inflammatoire suivant la PDT, pourrait aider au contrôle de la tumeur sur le long terme.^[164]

4.1.1.2 Profondeur de pénétration de la PDT

L'un des principaux inconvénients de la PDT est la faible pénétration de la lumière dans les tissus à cause de l'absorption des constituants de l'organisme (hémoglobine, eau,...) et de la diffusion de la lumière. Le phénomène d'absorption est minimal entre 800 et 1000 nm (**Figure 4-2**), d'où l'intérêt de travailler dans cette plage de longueurs d'onde et de développer des PS adaptés à cette fenêtre.^[168] Malgré tout, même dans cette plage de longueurs d'ondes, la profondeur de pénétration de la lumière est limitée à quelques millimètres.^[18,163]

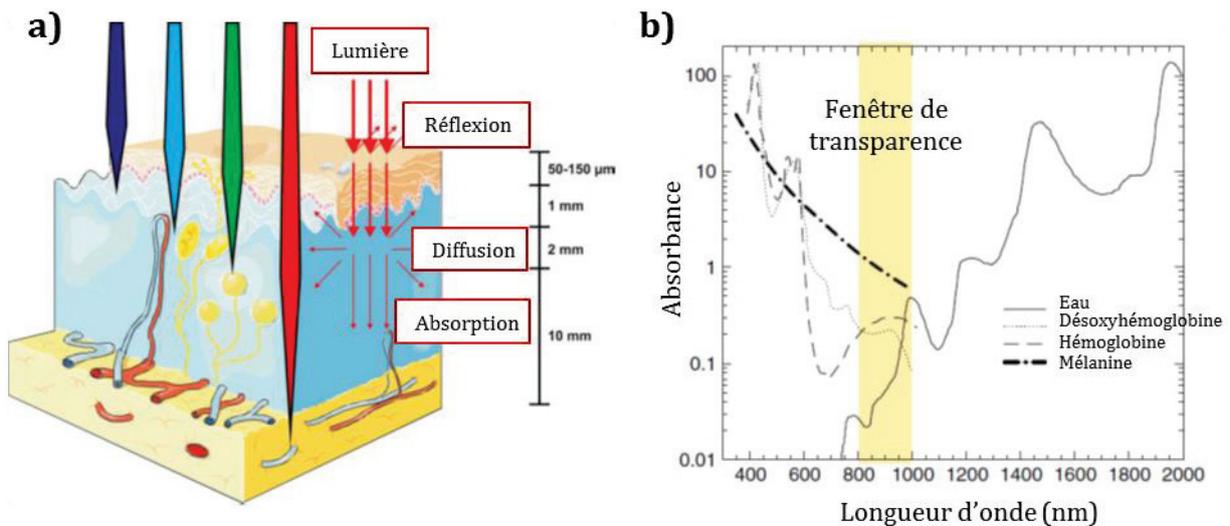


Figure 4-2 : Pénétration de la lumière dans les tissus. **(a)** Influence de la longueur d'onde sur la profondeur de pénétration dans les tissus. Figure issue de Agostinis et al.^[169] **(b)** Absorption de différents constituants des tissus et fenêtre de transparence biologique (800-1000 nm). Figure issue de Altinoglu et Adair.^[170]

De ce fait, l'utilisation de la PDT en clinique est restée limitée aux traitements de lésions externes, à des cancers accessibles facilement par des orifices ou à une utilisation en intra-opératoire. Par exemple, la PDT peut être utilisée après la chirurgie pour « nettoyer » les bords de l'ablation des tumeurs.^[163] Une autre possibilité peut être d'irradier les PS par l'intermédiaire d'une fibre optique qui est positionnée localement. C'est le cas de la PDT interstitielle (iPDT) au cours de laquelle la lumière est appliquée directement au sein de la masse tumorale.^[171]

Beaucoup de recherches sont en cours tant pour améliorer les systèmes d'irradiation et la délivrance de dose que pour améliorer les PS.^[164]

4.1.2 Exemple de photosensibilisateurs

Dans l'idéal, un photosensibilisateur doit présenter les caractéristiques suivantes :^[18,164]

- ne pas être toxique en lui-même, c'est-à-dire sans irradiation lumineuse.
- s'accumuler préférentiellement dans les tumeurs et pas dans les tissus sains.
- être éliminé rapidement du corps humain.
- pouvoir être excité dans la fenêtre de transparence biologique (800-1000 nm).
- avoir une stabilité à l'irradiation (photostabilité) élevée.
- présenter un rendement en oxygène singulet important et un temps de vie de l'état triplet suffisant pour permettre la création des espèces radicalaires.
- être soluble en milieu physiologique afin de faciliter son injection et d'éviter son agrégation (qui entraînerait une diminution du rendement d'oxygène singulet).

On distingue plusieurs types de photosensibilisateurs : les PS non tétrapyrroliques et les PS tétrapyrroliques. Pour la première catégorie, quelques exemples sont donnés sur la **Figure 4-3**. On trouve par exemple le psoralène qui était déjà utilisé par les Egyptiens pour traiter des problèmes de peaux et qui est toujours utilisé aujourd'hui contre le psoriasis.^[165]

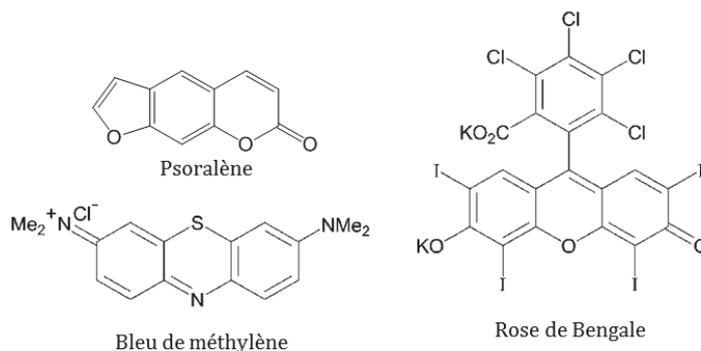


Figure 4-3 : Exemple de PS non tétrapyrroliques.^[164,165]

Plusieurs générations de PS tétrapyrroliques peuvent être définies.^[164,172,173] La première génération, étudiée au début des années 1980, correspond à des molécules d'origine naturelle regroupant l'hématoporphyrine et ses dérivés. L'hématoporphyrine est un mélange de monomères et d'oligomères et est obtenue à partir de l'hémoglobine du sang. Un mélange partiellement purifié est commercialisé sous le nom de Photofrin[®] et est représenté **Figure 4-4**. Ce composé a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1995 pour le traitement de différents types de cancer (poumon, vessie...). Il a aussi obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France en 1996.^[164,165] Cependant, le Photofrin[®] présente plusieurs désavantages^[165] : une longueur d'onde d'excitation faible (630 nm), une absorption dans les tissus sains, notamment la peau, et une élimination lente de l'organisme (3 à 5 semaines) ce qui conduit à une photosensibilité prolongée pour les patients.

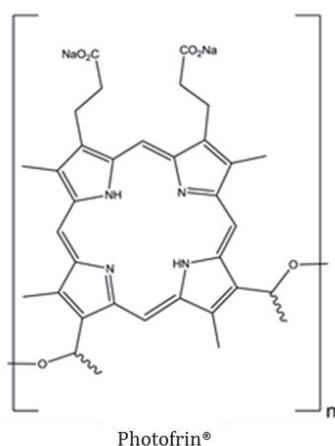


Figure 4-4 : Structure du Photofrin®,^[164]

Pour pallier ces inconvénients, une deuxième génération de PS a été développée depuis la fin des années 1980. On trouve par exemple des porphyrines, des chlorines, des bactériochlorines, des phtalocyanines, etc (voir **Figure 4-5**). De manière générale, cette deuxième génération présente des longueurs d'onde d'excitation, des coefficients d'extinction et des rendements d'oxygène singulet plus élevés que la première génération de PS. De plus, le ratio de l'accumulation dans les tumeurs et les tissus sains est plus élevé et la sensibilité cutanée plus faible. C'est à cette catégorie qu'appartient le Foscan® ($\lambda_{\text{excitation}} = 652 \text{ nm}$). Il a obtenu une AMM en 2001 en France et est utilisé pour les cancers du pancréas, de la prostate ou de la tête et du cou. Certains de ces PS complexent des métaux comme la phtalocyanine d'aluminium aussi appelé Photosens® ($\lambda_{\text{excitation}} = 675 \text{ nm}$) et utilisé pour différents types de cancers en Russie depuis 2001.^[164]

Malgré les améliorations apportées par la deuxième génération, la plupart des PS ont une solubilité en milieu aqueux et une accumulation dans les tumeurs assez faibles. Actuellement, la recherche se concentre donc sur le développement d'une 3^e génération de PS. Notamment, on a vu émerger au cours des dernières années l'utilisation de nanoparticules pour vectoriser les PS dans les tumeurs, cela sera détaillé un peu plus loin dans la **partie 4.1.4**. Parallèlement, des stratégies de ciblage actifs apparaissent. L'idée est de greffer des groupements (peptides, anticorps,...) reconnaissant les cellules tumorales ou le système vasculaire des tumeurs.^[165] Cette stratégie permettrait d'améliorer l'effet de la PDT, cela sera présenté dans la **partie 4.3**.

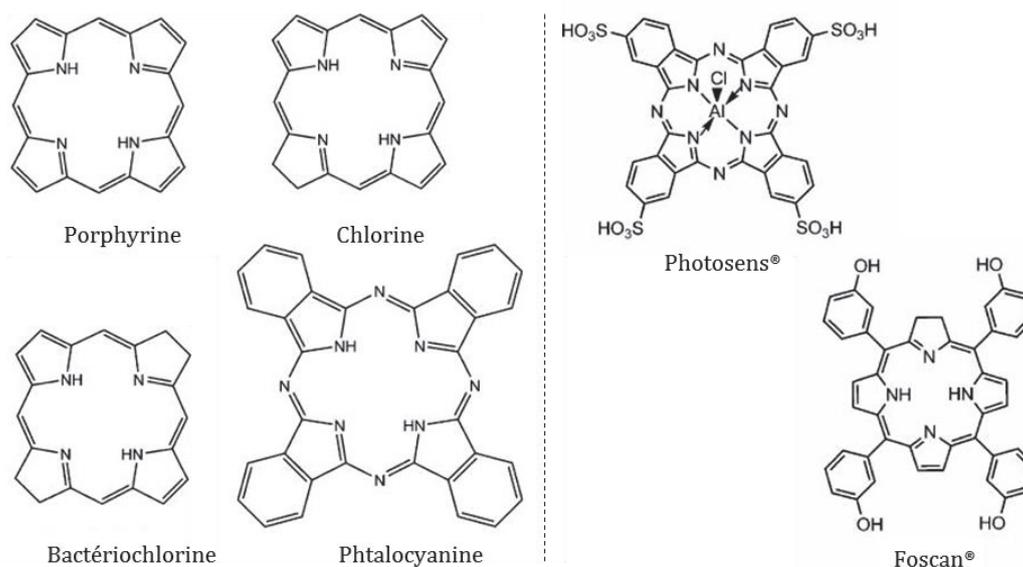


Figure 4-5 : Exemples de PS de seconde génération : quelques structures de base (porphyrine, chlorine, bactériochlorine et phtalocyanine) et structure des composés Photosens® et Foscan®. Figure adaptée de Lucky et al.^[164]

4.1.3 Utilisation de la PDT pour le traitement des glioblastomes

Les glioblastomes multiformes (GBM) représentent les tumeurs cérébrales primaires malignes les plus courantes et 29 % de toutes les tumeurs intracrâniennes.^[163,174] Malgré l'utilisation de traitements lourds, l'espérance de vie des patients est de moins d'un an et demi.^[175] Actuellement, les thérapies combinent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie mais malheureusement une grande majorité des GBM, plus de 80 % des cas, récidivent localement entraînant la mort des patients.^[176] Ce constat indique qu'il est nécessaire de développer des thérapies plus agressives localement permettant une meilleure destruction des tumeurs. Cependant, une ablation plus complète et donc curative de ces tumeurs est difficilement atteignable à cause de l'infiltration de cellules tumorales dans des parties saines du cerveau.^[175] D'autre part, la chimiothérapie et la radiothérapie à haute dose entraînent des effets secondaires ayant un impact important sur la santé et la qualité de vie des patients.^[163] Dans ce contexte, la PDT pourrait apporter des solutions comme thérapie complémentaire des précédentes afin d'éviter la récurrence locale des GBM et d'augmenter la survie globale des patients avec un minimum d'effets indésirables.^[174,176] En utilisant un faisceau lumineux positionné précisément, la PDT permettrait de tuer sélectivement les cellules cancéreuses tout en épargnant les régions sensibles et saines du cerveau.

Plusieurs essais cliniques reflètent l'intérêt de la PDT pour le traitement des GBM.^[163,174,176,177] Pour les études en phase II, on peut citer celle du groupe de Muragaki sur des patients atteints de tumeurs cérébrales primaires malignes et qui inclut 13 GBM.^[178] On peut aussi mentionner celle du groupe de Whelan actuellement en cours pour le traitement de gliomes de haut grade récidivants. Au cours de cet essai, un PS, le Photofrin®, est injecté par voie intraveineuse un jour avant l'ablation chirurgicale des tumeurs. Le

lendemain de l'opération, la cavité tumorale est irradiée afin d'éliminer les cellules cancéreuses qui auraient pu être laissées.

4.1.4 Intérêt des NPs pour la PDT

Les photosensibilisateurs jouent un rôle crucial sur l'efficacité de la PDT, et même si de nombreux types de molécules existent, des problèmes demeurent et doivent être surmontés.^[164] Tout d'abord, comme on l'a vu dans la **partie 4.1.2**, beaucoup de PS sont des dérivés aromatiques et hydrophobes et donc peu solubles dans l'eau.^[61] Dans les milieux physiologiques, ils peuvent s'agréger ce qui conduit à une diminution drastique de la formation d'oxygène singulet et à des difficultés d'injection. De plus, ils présentent souvent une faible sélectivité tumorale *in vivo*.^[179,180] Une des solutions à ces problèmes, qui a émergé au cours des dernières décennies, est l'utilisation de nanoparticules pour la PDT. Elle présente plusieurs avantages.^[181] Le premier est lié à la biodistribution des particules. En effet, les NPs permettent la délivrance des PS dans la tumeur en s'y accumulant grâce à l'effet EPR et en limitant leur extravasation dans les tissus sains. De plus, leur surface peut être modifiée pour cibler un récepteur spécifique sur-exprimé sur les cellules tumorales ou sur les néovaisseaux.^[3,182] Leur composition peut être modulée pour protéger les PS, pour augmenter leur solubilité dans les milieux biologiques, pour optimiser leur temps de circulation dans l'organisme ou pour éviter leur dégradation par des enzymes.^[61]

Enfin, en ajoutant une modalité d'imagerie aux nanoparticules, elles peuvent être utilisées à la fois pour le diagnostic et la thérapie. Il est ainsi possible de détecter la tumeur et de planifier le traitement (par exemple la position de la fibre PDT pour une réponse optimale en iPDT).^[183] Kopelman *et al.* ont été les premiers à décrire la synthèse d'une nanoparticule non biodégradable pour le diagnostic et le traitement de cancer du cerveau.^[184] Elle est composée de polyacrylamide, d'agents de contraste IRM (pour l'imagerie), de photosensibilisateurs (pour la PDT), de chaînes PEG (pour une meilleure solubilité et biodistribution) et d'un peptide RGD (pour le ciblage du système vasculaire des tumeurs). Des expériences *in vivo* ont été réalisées sur des rats porteurs de tumeurs 9L intracrânielles. *In vivo*, l'agent de contraste IRM a permis de suivre la destruction des cellules tumorales en temps réel. Ils ont pu montrer qu'un traitement PDT d'une durée de 5 minutes permettait de retarder la croissance tumorale et même de diminuer le volume de la tumeur dans la plupart des cas.

4.1.5 Projets de thèse

L'objectif des projets présentés dans ce chapitre a été de fonctionnaliser les nanoparticules AGuIX par des photosensibilisateurs de type porphyrine pour le traitement des GBM par iPDT (voir **Figure 4-6**). Le greffage des PS sur les particules permet d'améliorer leur solubilité dans l'eau et d'optimiser leur biodistribution et leur accumulation dans les tumeurs. De plus, les nanoparticules peuvent être utilisées comme agent de contraste IRM positif. Il sera donc possible de détecter la tumeur et de planifier et optimiser les traitements (éventuelle chirurgie et/ou détermination de la position précise de la fibre PDT) puis de suivre l'efficacité du traitement.

Dans un premier temps, une tétraphénylporphyrine non ciblant a été greffée à la surface des particules. Dans ce cas, seul le ciblage passif des tumeurs par les particules a été étudié. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des particules AGuIX par la tétraphénylporphyrine et par un peptide (DKPPR). L'objectif de cette voie était d'étudier l'intérêt du ciblage actif des vaisseaux sanguins de la tumeur pour la PDT. Ces études ont été réalisées dans le cadre d'un projet EuroNanoMed II (projet « PhotoBrain » n° ANR-14-ENM2-0001-01).

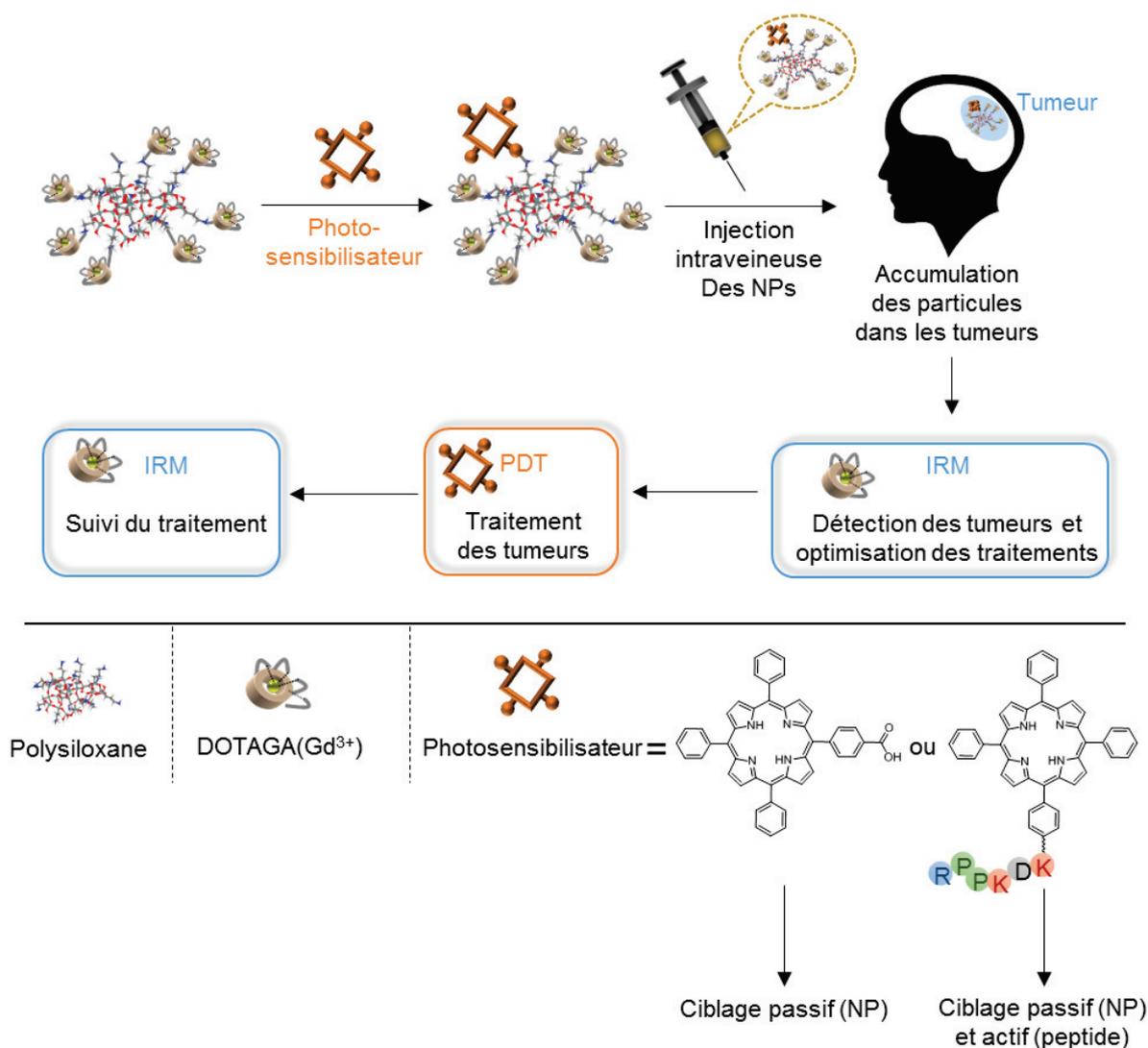


Figure 4-6 : Greffage de photosensibilisateurs de type porphyrine sur les particules AGuIX pour la iPDT guidée par IRM. Le greffage du PS améliore sa solubilité et sa biodistribution. La présence des complexes de Gd³⁺ permet la détection des tumeurs, l'optimisation du traitement PDT et son suivi.

4.2 PDT ET CIBLAGE PASSIF DES TUMEURS

4.2.1 Synthèse des AGuIX@PS

Afin de greffer la tétraphénylporphyrine (PS) sur les particules AGuIX, nous avons travaillé avec le PS sous forme d'ester NHS (voir la **Figure 4-7**). Comme cela a été décrit dans le **chapitre 1**, ces composés permettent la formation d'une liaison covalente amide après réaction avec les amines primaires présentes à la surface des particules.

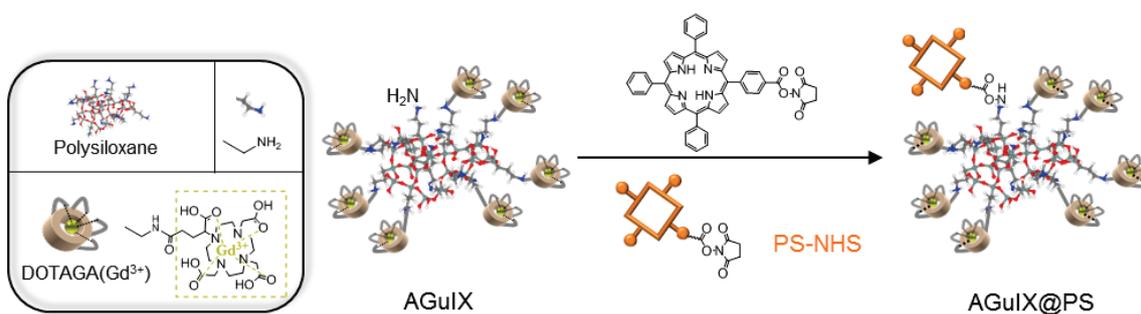


Figure 4-7 : Fonctionnalisation des particules AGuIX par la tétraphénylporphyrine (PS).

La difficulté de la réaction provient des différences de solubilité du PS et des particules. Les particules sont en effet hydrophiles, elles ne se redispersent pas dans les solvants organiques, tandis que le PS est très hydrophobe et non soluble dans l'eau. Cela impose deux choses. D'une part, travailler dans un mélange de solvants pour avoir à la fois une bonne solubilité des particules et du PS. D'autre part, il faut veiller à ne pas fonctionnaliser les particules avec trop de PS ce qui risquerait de déstabiliser la suspension colloïdale et de diminuer la solubilité des particules dans l'eau.

Dans un premier temps nous avons décidé de travailler dans des mélanges d'eau et de DMSO. Les nanoparticules ont été dispersées dans l'eau ultrapure à un pH de 7,5 pendant 1 h à température ambiante, puis du DMSO a été ajouté. Le PS a été dissout dans le DMSO anhydre et ajouté aux nanoparticules sous vive agitation et très progressivement afin de maximiser la solubilité du PS (plusieurs ajouts, goutte à goutte, sur une journée). Les mélanges ont éventuellement été chauffés à 40°C et la concentration en particules diminuée, toujours pour favoriser la solubilité du PS. Pour conserver une bonne stabilité colloïdale, la proportion maximale de DMSO avec laquelle on a pu travailler était de 40 % en volume. Les différentes conditions testées sont présentées dans le **Tableau 4-1**. Malheureusement, aucune n'a permis d'obtenir les particules AGuIX fonctionnalisées par le PS (AGuIX@PS) probablement en raison de problème de solubilité.

Tableau 4-1 : Conditions testées pour le greffage du PS-NHS sur les particules AGuIX.

Solvant	[Gd ³⁺] (mM)	Gd ³⁺ / PS-NHS
Eau (pH=7,5) / DMSO : 60/40	30	30
Eau (pH=7,5) / DMSO : 60/40	20	75
Eau (pH=7,5) / DMSO : 60/40	20	100

Le passage dans un mélange d'eau, de DEG et de DMSO (13/53/34 en volume) nous a permis de greffer le PS-NHS sur les particules AGuIX. Après avoir dissout les particules dans un mélange eau/DEG, la solution est chauffée à 40°C et le PS-NHS (dans le DMSO, 0,1 équivalent par Gd³⁺) est ajouté progressivement. La solution est laissée 12 h sous agitation ([Gd³⁺] = 66 mM) avant d'être purifiée.

Mode opératoire : Le protocole détaillé est présenté un peu plus loin dans la publication de la **partie 4.2.4** (p. 159). Le rendement en Gd³⁺ pour la synthèse a été déterminé au laboratoire par ICP-OES et est de 33 %, celui en PS-NHS a été déterminé par mesure d'absorbance et est de 24%.

4.2.2 Caractérisations

4.2.2.1 Caractérisations physicochimiques

Le **Tableau 4-2** présente quelques-unes des caractérisations des particules AGuIX@PS.

L'augmentation des relaxivités longitudinale et transversale traduit une augmentation de la taille des particules après fonctionnalisation par la porphyrine. Ces valeurs confirment aussi la possibilité d'utiliser les particules comme agent de contraste positif en IRM ($r_1 = 17,6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ et $r_2/r_1 = 1,6$ à $1,4 \text{ T}$, 37°C). La détection des tumeurs, l'optimisation du placement de la fibre et le suivi du traitement iPDT pourraient donc bien être réalisés en IRM.

Le diamètre hydrodynamique des particules a été obtenu par DLS. Sa valeur n'est pas très précise à cause de l'absorbance du PS à la longueur d'onde du laser utilisé pour cette technique. Elle nous permet cependant d'avoir un ordre de grandeur de la taille des particules et de vérifier qu'il n'y a pas d'agrégation à cause de la fonctionnalisation. Cette voie de greffage nous a bien permis de fonctionnaliser les particules AGuIX par le PS en conservant une bonne stabilité colloïdale en solution aqueuse.

Le greffage du PS, neutre, par formation d'une liaison covalente amide fait « disparaître » des fonctions ammonium (-NH₃⁺) en surface des particules. Le changement de charges se traduit par une diminution du potentiel zéta des particules après fonctionnalisation. Cependant, comme avec la DLS, l'absorbance du PS entraîne une incertitude sur la mesure ; les valeurs obtenues sont à considérer avec précaution.

Tableau 4-2 : Caractérisations des particules AGuIX et AGuIX@PS.

Caractérisations	AGuIX	AGuIX@PS
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	$r_1 = 12,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; $r_2/r_1 = 1,3$	$r_1 = 17,6 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; $r_2/r_1 = 1,6$
DLS	$D_H = 3,6 \pm 0,8 \text{ nm}$	$D_H = 11,2 \pm 3,9 \text{ nm}$
Potentiel zéta, pH = 7,4	$19,1 \pm 3,7 \text{ mV}$	$6,6 \pm 2,9 \text{ mV}$
HPLC Absorbance à 295 nm (fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 653 \text{ nm}$)	$t_R = 13,0 \text{ min}$ (pas de signal en fluorescence)	$t_R = 14,5 \text{ min}$ (fluorescence) et épaulement à 13,6 min (pas de fluorescence)

Les particules ont aussi pu être caractérisées par HPLC, comme présenté sur la **Figure 4-8**. La méthode d'éluion est identique à celle décrite dans les chapitres précédents (voir aussi l'**Annexe A.1**), elle est composée d'un gradient d'eau et d'acétonitrile et d'une séparation des produits sur une colonne C4. La détection s'effectue simultanément en absorbance à 295 nm et en fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 420 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 653 \text{ nm}$). En absorbance à 295 nm, les particules AGuIX sont détectées à 13,0 min, aucune fluorescence n'est observée. Le PS a lui un temps de rétention de 21,2 min et est détecté à la fois en absorbance et en fluorescence. Le chromatogramme AGuIX@PS présente, en absorbance à 295 nm, un pic avec un temps de rétention de 14,5 min et un épaulement à 13,6 min. Un signal est détecté en fluorescence avec le pic à 14,5 min mais pas avec l'épaulement à 13,6 min. Cela nous indique qu'il reste dans le lot synthétisé quelques particules AGuIX non fonctionnalisées (pic à 13,6 min). Le pic à 14,5 min correspond, lui, aux particules fonctionnalisées (AGuIX@PS). Puisqu'il n'y a plus de pic à 21,2 min, tout le PS non greffé a bien été éliminé, la purification est satisfaisante. Le chromatogramme HPLC nous permet donc de confirmer le greffage du PS sur les particules AGuIX et la purification. On remarque cependant la présence de petits pics ou d'une traînée entre 16 et 21 min. Cela pourrait correspondre à des fragments de dégradation liés au PS. En effet, dans l'eau quelques liaisons -Si-O-Si- du cœur de polysiloxane des particules peuvent être hydrolysées. On aurait alors en solution quelques fragments APTES*-PS, ou TEOS*-APTES*-PS,... Grâce à la présence des silanes, ces fragments sont un peu plus hydrophiles que le PS seul et ont donc des temps de rétention un peu plus faibles. Ces fragments ne sont présents qu'en faible proportion et ne sont pas gênants pour les expériences *in vivo*, ce lot de particules a donc été utilisé pour la suite des expériences.

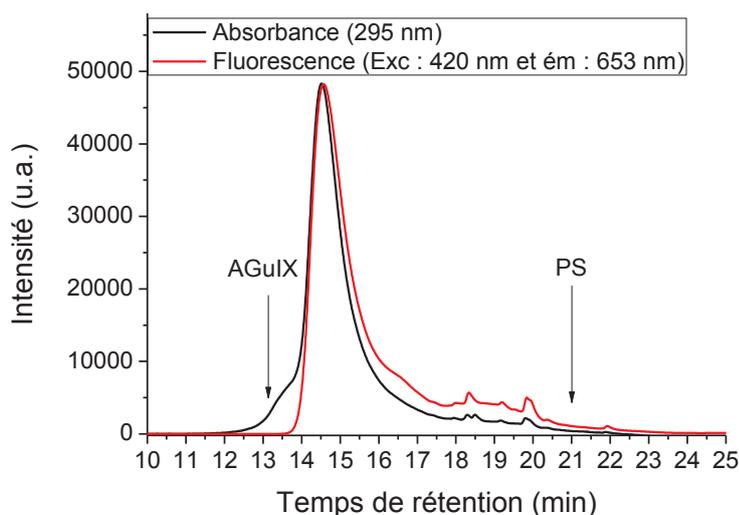


Figure 4-8 : Extrait du chromatogramme des particules AGuIX@PS. L'absorbance est mesurée à 295 nm, on détecte à la fois les particules et le PS. La fluorescence est mesurée pour $\lambda_{excitation} = 420 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 653 \text{ nm}$, on détecte uniquement la porphyrine.

4.2.2.2 Quantification du nombre de PS par particule

Le nombre de porphyrines par particule a été déterminé par spectroscopie UV-visible. Dans un premier temps, nous avons vérifié que le spectre d'absorbance du PS n'était pas modifié par son greffage sur les particules. Comme présenté sur la **Figure 4-9**, celui-ci est composé de cinq bandes d'absorption correspondant à des transitions $\pi - \pi^*$.

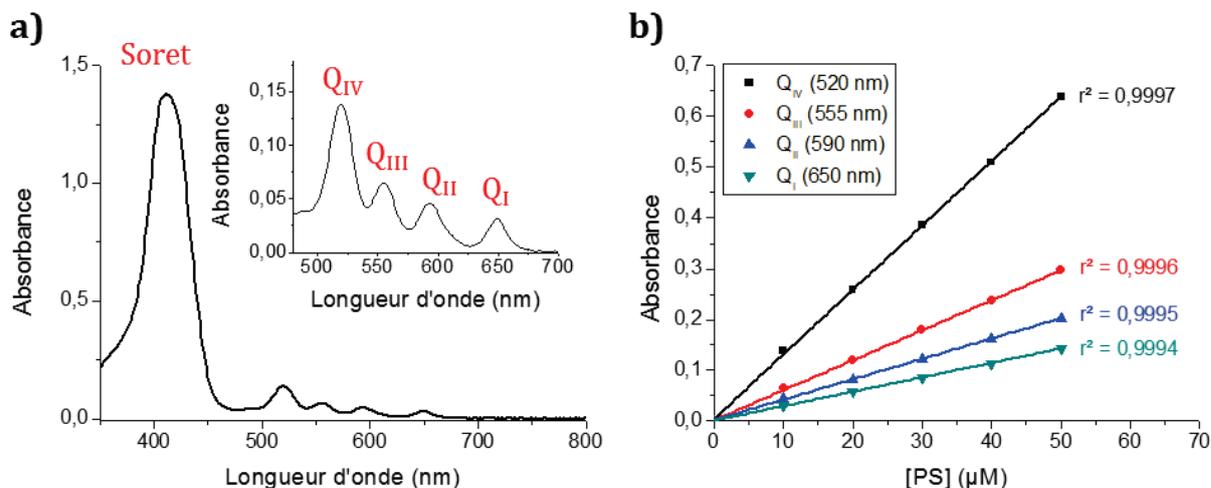


Figure 4-9 : Quantification du nombre de PS par particule par spectroscopie UV-visible. **(a)** Spectre d'absorbance du PS à $10 \mu\text{M}$ dans l'eau. **(b)** Courbes d'étalonnage dans l'eau pour les bandes Q du PS.

La bande à 420 nm, la plus intense, est appelée bande de Soret, suivent ensuite les quatre bandes Q : Q_I à 650 nm, Q_{II} à 590 nm, Q_{III} à 555 nm et Q_{IV} à 520 nm. L'allure du spectre UV-visible est identique avant et après greffage (position des bandes et intensité relative). Nous avons alors construit des courbes d'étalonnage en PS seul (pour la bande de Soret et les bandes Q) et pu déterminer qu'on avait ajouté 1 PS pour 14 Gd³⁺ (soit 1 PS pour 1-2 particules).

Afin d'obtenir la structure des particules, les pourcentages massiques en gadolinium (Gd), silicium (Si), carbone (C) et azote (N) ont été déterminés par l'entreprise Filab (Dijon, France). Les résultats sont cohérents avec la formule suivante pour les particules AGuIX@PS : (Gd₁APTES*_{3,7}TEOS*_{3,7}DOTAGA*_{1,02}PS*_{0,07}DEG_{0,2})_n, voir le **Tableau 4-3**. Cela confirme que l'on a environ 1 PS pour 14 Gd³⁺ soit 1 PS pour 1 à 2 particules. D'autre part, on constate qu'il reste un peu de DEG dans les lots de particules. Lors de la synthèse, celui-ci peut en effet s'adsorber à la surface des particules et est ensuite très difficile à éliminer complètement.

Tableau 4-3 : Comparaison des pourcentages massiques obtenus expérimentalement par Filab ou calculés à partir de la structure proposée pour les particules AGuIX@PS.

	Gd	Si	C	N
%massique exp	10,63	14,30	28,13	7,25
%massique calc	10,63	14,05	27,95	7,63
Différence absolue	0	0,25	0,18	0,38

4.2.3 Propriétés photophysiques

Les propriétés photophysiques ont été étudiées au Laboratoire Réactions et Génie des procédés (LRGP) à l'Université de Lorraine par Magali Toussaint, étudiante en thèse sous la supervision de Muriel Barberi-Heyob (Université de Lorraine, Nancy).

Lorsqu'on excite la porphyrine à 420 nm, deux bandes sont détectées en fluorescence, l'une à 653 nm et l'autre à 720 nm environ (**Figure 4-10-a**). Après greffage sur la particule, l'intensité relative de ces deux bandes est modifiée. Cependant le rendement en oxygène singulet (Φ_{Δ}), espèce cruciale vis-à-vis de la PDT, laisse présager une bonne efficacité du traitement (**Figure 4-10-b**). En raison de la faible solubilité du PS dans l'eau, ces rendements n'ont pas pu être déterminés dans l'eau avant greffage. Ce n'est plus le cas lorsque le PS est greffé sur les AGuIX mettant en évidence le fait que les AGuIX permettent de le solubiliser dans l'eau. De plus, les rendements des AGuIX@PS dans l'eau sont semblables à ceux du PS dans le toluène ce qui laisse présager que les particules pourront être photoactivées *in vitro* et *in vivo* pour induire la mort des cellules tumorales environnantes.

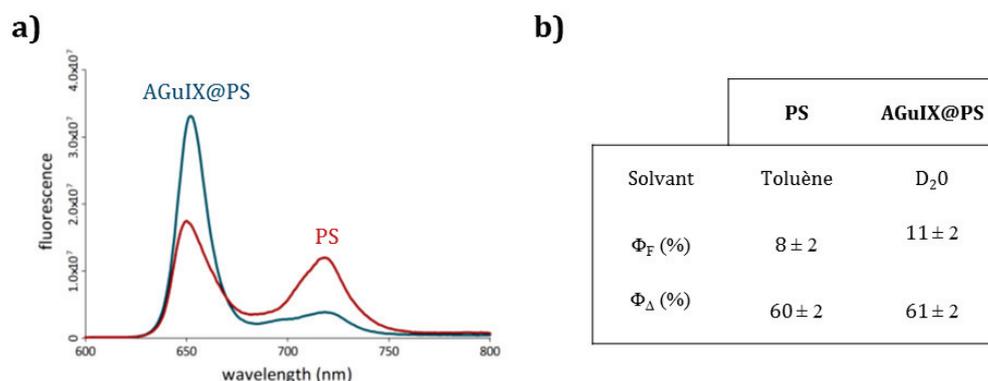


Figure 4-10 : (a) Spectres d'émission de fluorescence du photosensibilisateur avant et après greffage sur les particules AGuIX ($\lambda_{excitation} = 419$ nm). (b) Propriétés photophysiques du PS avant et après greffages sur les particules : rendement de fluorescence (Φ_F) et rendement de formation d'oxygène singulet (Φ_Δ).

Ces résultats sont compatibles avec des études antérieures sur ce type de nanoparticules portant des photosensibilisateurs de type chlorine ou porphyrine.^[167,179,185] De manière générale, la manière dont le photosensibilisateur est ajouté, que ce soit à l'intérieur ou à la surface de la nanoparticule, est très importante car elle peut avoir un impact sur ses propriétés photophysiques et donc sur son effet photocytotoxique. Chu *et al.* ont ainsi conçu des nanoparticules à base de silice et encapsulant du bleu de méthylène comme photosensibilisateur. Ils ont montré que la formation d'oxygène singulet avec la particule était plus faible que pour le bleu de méthylène seul, probablement à cause de la formation de dimères à l'intérieur de la particule.^[186] Une étude comparative a également été réalisée par l'équipe de Tang pour évaluer l'encapsulation du bleu de méthylène dans deux types de nanoparticules à base de silice d'environ 175 nm.^[187] Une des particules a été préparée à partir de tétraéthoxysilane (TEOS) et l'autre de deux précurseurs, le méthyltriméthoxysilane et le phényltriméthoxysilane. Si le nombre de photosensibilisateurs encapsulés est plus élevé avec la première particule, la cinétique de formation d'oxygène singulet est plus faible. Dans notre cas, le PS est ajouté à la surface des particules ce qui présente l'avantage de ne pas avoir besoin que l'oxygène diffuse à l'intérieur puis hors de la particule pour induire l'effet PDT. De plus, le greffage sur des particules hydrophiles empêche l'agrégation du PS. Ces deux éléments devraient permettre d'obtenir une bonne efficacité en PDT pour les particules fonctionnalisées. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées pour le vérifier.

4.2.4 Résultats *in vitro* et *in vivo*, publication

Les expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées à l'Université de Lorraine par Magali Toussaint. Elles ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Theranostics* en 2017.

4.2.4.1 Résumé des principaux résultats

Dans cet article, l'intérêt de l'iPDT guidée par IRM a été évalué pour le traitement des glioblastomes. Les expériences ont été réalisées sur des rats nus portant des xénogreffes de glioblastome intracrânien U87MG. L'irradiation PDT a été réalisée après injection intraveineuse des particules AGuIX@PS par l'intermédiaire d'une fibre optique (Figure 4-11-a).

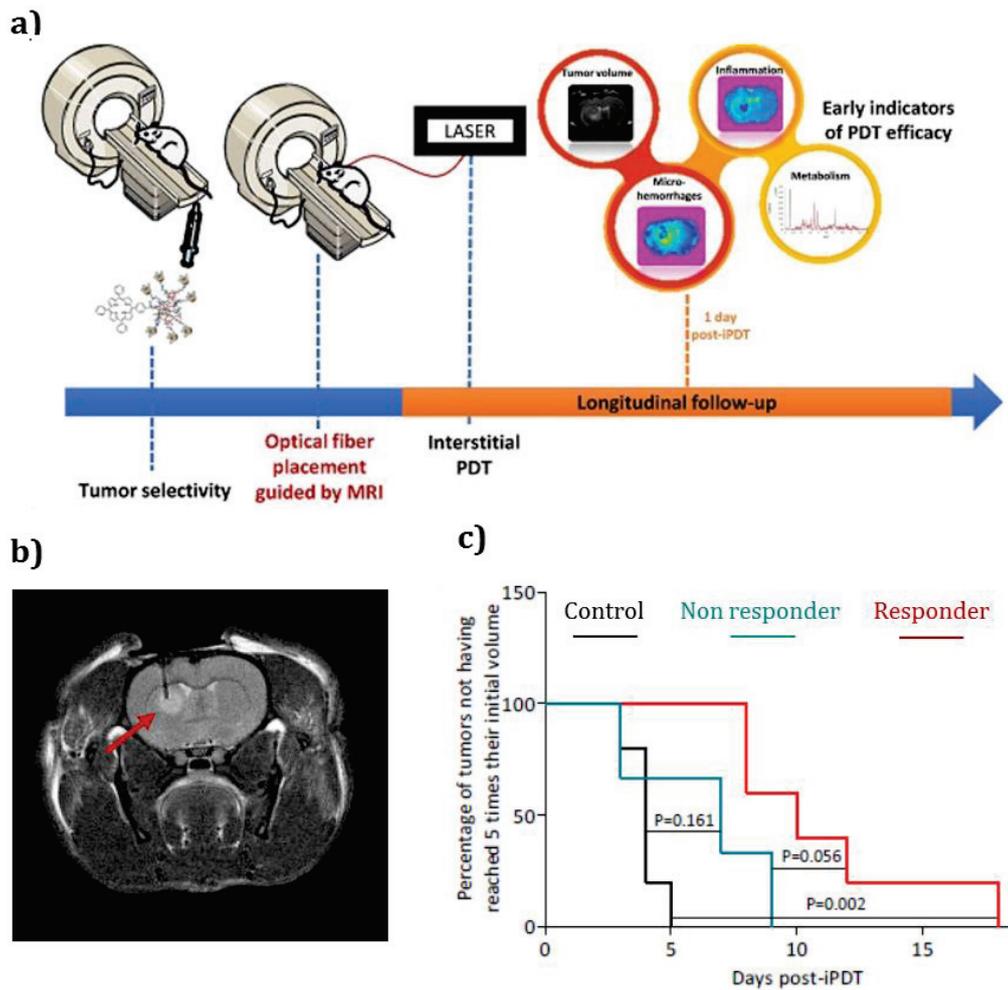


Figure 4-11 : (a) Injection intraveineuse de nanoparticules AGuIX@PS sur des rats nus portant des xénogreffes de glioblastome intracrânien U87MG, traitement iPDT et suivi du traitement par imagerie. (b) Images IRM pondérées proton (TR/TE : 5000/33ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) montrant l'insertion de la fibre en coupe coronale. La flèche rouge montre l'accumulation des particules dans la tumeur après administration (zone plus blanche). (c) Courbes de survie pour les animaux contrôles (en noir), les animaux ne répondant pas au traitement PDT (en bleu) et les animaux répondant bien au traitement PDT (en rouge). Représentation du pourcentage de tumeurs qui n'ont pas atteint 5 fois leur volume initial en fonction du temps.

Les études de biodistribution ont montré que les particules sont éliminées principalement par voie rénale comme le laissait présager leur petite taille. De plus, les images IRM pondérées T₁ ont mis en évidence une accumulation des particules dans les tumeurs quelques minutes après administration. L'augmentation du contraste entre les tissus sains et tumoraux nous a permis par la suite d'optimiser l'implantation des fibres optiques pour le traitement iPDT (**Figure 4-11-b**).

Cette étude a aussi permis de mieux caractériser les effets directs (destruction des cellules tumorales) et indirects (effondrement de la vascularisation tumorale et activation de la réponse immunitaire et inflammatoire) de l'iPDT. Cela nous a permis d'obtenir des marqueurs prédictifs précoces de l'efficacité du traitement. En effet, nous avons utilisé avec succès l'IRM conventionnelle, l'imagerie T₂*, l'imagerie pondérée par diffusion (DWI, *Diffusion Weighted Imaging*) et la spectroscopie de résonance magnétique (MRS, *Magnetic Resonance Spectroscopy*) pour établir des profils concernant les altérations cytoarchitecturales tissulaires, les perturbations vasculaires locales et les informations métaboliques sur la biologie des tumeurs cérébrales. Dès le lendemain du traitement iPDT, la DWI et la MRS nous ont permis d'identifier des marqueurs prometteurs tels que la valeur du coefficient de diffusion apparent (ADC, *Apparent Diffusion Coefficient*), la quantité de lipides, de choline et de myo-inositol. Ces résultats nous donnent des signes précurseurs bien avant que la croissance de la tumeur ne reprenne. Ils nous permettent de distinguer rapidement les animaux répondants au traitement iPDT de ceux n'y répondants pas (**Figure 4-11-c**).

Les techniques présentées dans cet article constituent donc de nouveaux outils pour guider et surveiller le traitement des glioblastomes. Leur application conduirait à des soins sophistiqués et personnalisés plus efficaces.



Research Paper

Proton MR Spectroscopy and Diffusion MR Imaging Monitoring to Predict Tumor Response to Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastoma

Magali Toussaint^{1,2}, Sophie Pinel^{1,2}, Florent Auger³, Nicolas Durieux³, Magalie Thomassin^{1,2}, Eloise Thomas⁶, Albert Moussaron⁶, Dominique Meng^{1,2}, François Plénat^{1,2}, Marine Amouroux^{1,2}, Thierry Bastogne^{1,2}, Céline Frochot^{4,5}, Olivier Tillement⁶, François Lux⁶, Muriel Barberi-Heyob^{1,2}✉

1. CRAN UMR 7039, CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, France;
2. CRAN UMR 7039, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France;
3. Plateforme d'imagerie du vivant - Plateau Préclinique, Université de Lille - Droit et Santé, Lille, France;
4. LRGP UMR 7274 NRS, Nancy, France;
5. LRGP UMR 7274, Université de Lorraine, Nancy, France;
6. ILM UMR 5306 CNRS, Claude Bernard-University, Lyon, France.

✉ Corresponding author: CRAN UMR 7039 CNRS, Département SBS, Faculté de Médecine - Bâtiment D, 1er étage, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. +33 (0)3 83 68 32 08 Email: muriel.barberi@univ-lorraine.fr.

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2016.08.16; Accepted: 2016.10.12; Published: 2017.01.05

Abstract

Despite recent progress in conventional therapeutic approaches, the vast majority of glioblastoma recur locally, indicating that a more aggressive local therapy is required. Interstitial photodynamic therapy (iPDT) appears as a very promising and complementary approach to conventional therapies. However, an optimal fractionation scheme for iPDT remains the indispensable requirement. To achieve that major goal, we suggested following iPDT tumor response by a non-invasive imaging monitoring. Nude rats bearing intracranial glioblastoma U87MG xenografts were treated by iPDT, just after intravenous injection of AGulX® nanoparticles, encapsulating PDT and imaging agents. Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) allowed us an original longitudinal follow-up of post-treatment effects to discriminate early predictive markers. We successfully used conventional MRI, T2 star (T2*), Diffusion Weighted Imaging (DWI) and MRS to extract relevant profiles on tissue cytoarchitectural alterations, local vascular disruption and metabolic information on brain tumor biology, achieving earlier assessment of tumor response. From one day post-iPDT, DWI and MRS allowed us to identify promising markers such as the Apparent Diffusion Coefficient (ADC) values, lipids, choline and myoInositol levels that led us to distinguish iPDT responders from non-responders. All these responses give us warning signs well before the tumor escapes and that the growth would be appreciated.

Key words: Interstitial photodynamic therapy; Glioblastoma; *In Vivo* non-invasive imaging; Multifunctional nanoparticles; Image guided therapy; Therapy assessment.

Introduction

With a 5-years overall survival rate of about 2%, the medical management of patients with glioblastoma (GBM) requires major improvements [1]. Despite a heavy line of treatments composed of surgery, radiotherapy and chemotherapy unfortunately, a tumor recurrence is always reported

[2]. Improvements for the follow-up of the patients will come from new therapeutic approaches as complementary line of treatment. In this context, photodynamic therapy (PDT) stands as an interesting complementary approach for recurrent GBM [3]. Briefly, PDT is a local therapy that uses non-ionizing

light from a LASER diode to activate a photoactivatable molecule called photosensitizer such as porphyrin or chlorin derivatives. Activation of this photosensitizer requires a suitable wavelength of the light to produce reactive oxygen species (ROS) and free radicals. We previously demonstrated that PDT stimulates the expression of several inflammatory mediators, including tumor necrosis factor- α , IL-6 [4]. Photodynamic therapy causes direct cytotoxicity to malignant cells and also indirect effects upon various non-malignant components of the tumor microenvironment. This action can lead to PDT-mediated angiogenesis and inflammation, which are emerging as important determinants of PDT responsiveness [4] [5] [6]. In the case of iPDT, the light is fed directly into the tumor tissue, allowing a physical targeting. Unfortunately, biological effects are often limited by the photons propagation; indeed, light penetration through tissues depends on the tissue's specific optical properties [7].

A phase II clinical trial (NCT01966809) was suggested to use PDT for recurrent high grade gliomas in intraoperative to improve the quality of the resection by cleaning up the resection banks. PDT offers a localized treatment approach in which improvements in local control of GBM may result in significant improved survival [8] [9] [10]. However, the limitation mainly relies on the difficulty to highlight very early the presence of residual neoplastic cells post-treatment. Indeed, improvements in the relapse detection might help the clinician to a better treatment planning. In the last decade, Magnetic Resonance Imaging (MRI) has become the method of choice for diagnosis, intraoperative guiding and also for the treatment follow-up [11]. The routine MRI sequences used in the clinical practices of GBM are T2/FLAIR and T1 pre- and post-gadolinium injection. Both are suggested for diagnostic, treatment planning and even for intraoperative navigation [12]. Nevertheless, these sequences separately used can lead to misinterpretation and delay in the establishment of the prognosis [13]. Advanced MRI techniques bestow much more relevant information on GBM development such as cellularity, invasiveness, mitotic activity, angiogenesis and necrosis, helping in the glioma grading before treatment and follow-up after treatment [11]. This is the reason why advanced MRI, such as Diffusion Weighted-Imaging (DWI), ^1H -Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) could be excellent tools to characterize and follow-up the tumor response to iPDT.

Bobek-Billewicz *et al.* suggested using DWI to discriminate radiation necrosis from tumor recurrence and to adapt the clinical management more quickly [14]. Indeed, before the resumption of tumor growth

or a change in contrast enhancement, molecular changes occur into the tumor tissue and could be detected earlier with other MRI sequences than T1 (pre- and post-gadolinium injection) and T2/FLAIR. DWI remains a very promising MR sequence that allows analyzing water mobility and collates relevant information on tissue architecture at a microscopic level [15] [16] [17] [Le-Bihan, D. Diffusion MRI: what water tells us about the brain EMBO Molecular Medicine, 2014, 6, 569-73; Kalpathy-Cramer, J.; Gerstner, E. R.; Emblem, K. E.; Andronesi, O. & Rosen, B. Advanced Magnetic Resonance Imaging of the Physical Processes in Human Glioblastoma Cancer Res, 2014, 74, 4622-4637; Schaefer, P. W.; Grant, P. E. & Gonzalez, R. G. Diffusion weighted MR Imaging of the Brain Radiology, 2000, 217, 331-45]. Precious additional clinical studies on its utility and effectiveness as prognosis response in cancer treatment have previously concluded that DWI could be suggested as a biomarker, requiring to be tested in more appropriated clinical trials [18]. The T2* weighted imaging is sensitive to the presence of hemoglobin and water content appears hyperintense into the tumor tissue. Mabray *et al.* present this sequence as a tool to follow chronic micro bleeds induced by radiation therapy [19] [20].

Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) offers a wide range of potential prognostic factors, but is still under investigation mainly due to the complexity of the data evaluation. MRS provides important information on tumor metabolism, such as N-acetyl-aspartate (NAA), choline, or creatine levels [21] [22]. This sequence could become a standard and represents a valuable diagnostic tool for evaluation of metabolic changes in intracranial neoplasms after radio surgical treatment [23]. Several studies have already suggested metabolites ratio such as choline/NAA or choline/creatine as an early predictive value in the tumor response after surgery and radiotherapy [24] [25].

Despite the wealth of information gathered by these MRI sequences, the lack of consensus on the methodology makes their routine clinical practice still difficult and under debate.

To demonstrate the feasibility of the iPDT followed by MRI, our team evaluated the potential of AGuIX® multifunctional nanoparticle composed by the combination of MRI contrast agents and a photosensitizer for iPDT [26]. We demonstrated a positive contrast enhancement of the tumor tissue using T1-weighted imaging few minutes post-intravenous (i.v.) injection of these multifunctional nanoparticles. These nanoparticles provide interesting possibilities for new avenues to significantly improve iPDT. The positive contrast

enhancement of the tumor tissue allowed us to optimize the optical fiber implantation. Moreover, a judicious choice of iPDT regimens could be suggested to promote iPDT efficiency and to consider a rationalized fractionated treatment. In this original preclinical paper our goal was to characterize by MRS, DWI and T2* the direct and indirect iPDT effects on an orthotopic human GBM model in *nude* rats and to elicit early predictive values of the treatment efficiency. For the first time, we demonstrated the ability of a longitudinal follow-up to characterize the tumor response by structural, vascular and metabolic ways and unexpectedly, we clearly highlighted the ability to discriminate iPDT non-responding from responding animals.

Materials and Methods

Nanoparticles synthesis: AGuIX® nanoparticles were prepared in diethylene glycol (DEG) according to Le Duc *et al* [27]. AGuIX® nanoparticles (1500 μmol of Gd^{3+}) were dispersed in water at a pH of 7.4 (3 mL, $[\text{Gd}^{3+}] = 500 \text{ mM}$). After 1 hour, the suspension was heated at 40°C and DEG (12 mL) already heated at 40°C was added. A solution of 5-(4-carboxyphenyl succinimide ester)-10,15,20-triphenylporphyrin (113.4 mg, 150 μmol , 10 Gd^{3+} per TPP) in dimethyl sulfoxide (DMSO) (7.56 mL, $[\text{TPP}] = 15 \text{ mL/mL}$) was added drop by drop to the dispersion of nanoparticles under stirring. The mixture was stirred at 40°C for 12 hours in the dark.

Number of TPP per Gd quantification: Lyophilized nanoparticles were first dispersed in water for one hour at room temperature, $[\text{Gd}^{3+}] = 50 \text{ mM}$ and $\text{pH} = 7.4$. Then the solution was diluted in water to $[\text{Gd}^{3+}] = 0.5 \text{ mM}$ and absorbance measured at 520 nm, 555 nm, 590 nm and 650 nm (Q bands). The nanoparticles solution was diluted to $[\text{Gd}^{3+}] = 27 \mu\text{M}$ in water and absorbance measured at 420 nm (Soret band). The average result gives 14 Gd^{3+} per TPP.

Photophysical properties: Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtaboeuf, France) UV-visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermo stated cell compartment (25°C), using a 450 W Xenon lamp. Fluorescence quantum yields (Φ_f) were determined using a TPP solution as a fluorescence standard. For the direct determination of singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ): excitation occurred with a Xe-arc, the light was separated in a SPEX 1680, 0.22 μm double monochromator. The detection at 1270 nm was done through a PTI S/N 1565 monochromator, and the emission was monitored by a liquid nitrogen-cooled Ge-detector model (EO-817L, North Coast Scientific

Co).

Dynamic light scattering size and ζ -potential measurements: Direct measurements of the size distribution of the nanoparticles suspended in any medium were performed via Zetasizer NanoS DLS (Dynamic light scattering, laser He-Ne 633 nm) from Malvern Instrument. The ζ -potential of the nanoparticles was also performed *via* a Zetasizer NanoS. Prior to the experiment, the nanoparticles were diluted in an aqueous solution containing 0.01 M NaCl and adjusted to pH 7.4.

U87 Glioblastoma cell culture: U87 glioblastoma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in monolayer culture (37°C, 5% CO_2 , 95% O_2) in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAN biotech, GmbH, Aidenbach, Germany), 5% penicillin and streptomycin, 1.25% sodium pyruvate, 1% essential amino acid, 0.5% non-essential amino acid, 0.4% vitamins, 1% L-glutamine, L-serine, L-asparagine (Gibco, invitrogen, Saint Aubin, France).

Animals and stereotactic xenograft implantation: Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines. All experiments were performed in accordance with animal care guidelines (Directive 2010/63/EU) and carried out by competent and authorized persons (personal authorization number 54-89 issued by the Department of Veterinary Services) in a registered establishment (establishment number C-54-547-03 issued by the Department of Veterinary Services). Male athymic nude rats (Hsd:RH-Foxn1^{rnu}) were chosen for this study (Envigo, Gannat, France). The rats were used for tumor implantation at age of 8 weeks (180-220 g). During microsurgery (implantation or treatment protocol) and all acquisitions with microimaging, rats were anesthetized with a mixture of air and isoflurane concentrate (1.5-2% depending on the breathing) under sterile conditions. The rats were placed into a Kopf stereotactic frame (900M Kopf Instruments, Tujunga, CA). A midline incision was done and a burr hole was drilled 0.5 mm anterior and 2.7 mm lateral to the bregma. A skull anchor (Patent N° 11 55596) was fixed. 5.10^4 U87 cells were suspended in 5 μL Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, 1X) and were injected in 4.4 mm into the brain parenchyma with a flow of 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ using a 10 μL Hamilton syringe. After injection, the scalp incision was sutured (Suture 6.0 filament) and the surface was antiseptically cleaned.

Nanoparticles preparation for *in vivo* studies: Nanoparticles were suspended in ultrapure water and NaCl 9% (20:80) to obtain an equivalent concentration of 2.5 mM TPP or 60 mM Gd. Each batch of nanoparticles was buffered in order to obtain an

iso-osmolar solution and pH 7.4 and conserved at 5°C. Injected TPP amounted to 1.75 µmol/kg as previously described [26]. The injection solution was prepared by dissolution in 9% NaCl to obtain an injection volume of 600 µL (e.g. 0.525 µmol of TPP or 12.7 µmol of Gd for a body weight of 300 g) and injected, following by 600 µL of 9% NaCl were injected during 1 min.

Interstitial Photodynamic Therapy: The treatment happens 10-12 days after the graft when the tumor reached approximately 2.5±0.5 mm of diameter. The animal was maintained under volatile anesthesia (EZ-7000, WPI, Sarasota, USA) consisting in a mixture of 2% isoflurane (IsoFlo; Axience, Pantin, France) and air during MRI monitoring and treatment. The rats' temperature was maintained at 37°C thanks to the heating bed. The blood oxygenation was monitored all along the longitudinal follow-up and did not go down 87%. One hour prior the irradiation, the nanoparticles preparation was injected by intravenous administration in the caudal vein. Then the treatment was performed at 50 mW in fiber output (UltraSil ULS 272; OFS, Norcross, USA), 26 J and 652±1 nm with a laser diode (Biolitec, Jena, Germany). Sham rats received an injection of nanoparticles without photosensitizer one hour prior to iPDT.

MRI-guided iPDT and light delivery: Light delivery fiber was inserted through the skull anchor into the tumor tissue. The fiber tip (272 nm diameter, ULS 272, OFS, Norcross, U.S.A.) delivered the light (652 nm, 50 mw, 8 min 40 s, 26 J). A T1 weighted imaging in the coronal plane (TURBO-RARE, TR/TE: 400/9ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) as a reference image before the injection of the nanoparticles, and a second T1 weighted MRI in the coronal plane to confirm their presence and to measure the coordinates for the fiber placement were performed. Then a density proton weighted image (TR/TE: 5000/33ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) was performed before iPDT in order to control the positioning of the optical fiber inside the brain.

MRI acquisition protocol: The MR experiments were performed on a small animal 7 Teslas magnet (Bruker, Biospec 70/20 USR, Ettlingen Germany). A transmit body coil and a receive head coil were used for all acquisition except for the proton density weighted acquisition where just a transmit/receive body coil was used. The software Paravision 5.1 (Bruker, Ettlingen, Germany) was used to analyze the data. The MRI acquisition protocol was repeated at the eight times of the follow-up: the pre-treatment and post-treatment days (t=0), 1, 2, 3, 4 and 7 days post-treatment. The MRI acquisition protocol was composed by six images sequences and lasts 1h40: T2

weighted imaging (TURBO-Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement TR/TE: 5000/77ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) in axial and coronal planes to visualize the tumor in hyperintense. Diffusion-Weighted Imaging (DWI) on the slice of interest (Spin Echo-Echo Planar Imaging, TR/TE: 3000/30ms, six b values (100, 200, 400, 600, 800 and 1000 s/mm²), FOV: 4x4 cm, matrix: 128x128, SI: 1mm) defined from the fiber positioning. Taking into account the exponential diffusion signal decay, six b values were selected for a better fitting of the exponential curve. This has all been possible as we were not constrained by the movements of the anaesthetized animals and the duration of the acquisition. An Apparent Diffusion Coefficient map was calculated from the SE-EPI acquisition. This sequence was used to observe the water diffusion of the tissue.

Multi Gradient Echo-T2* acquisition (TR: 1500ms, 12 TE: range from 4 to 60ms, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) was performed on the same slice of interest. A T2* relaxation map was calculated from the T2* acquisition. The Bruker t2vtr-fitting function (Paravision 5, Bruker) based on the equation below was applied to calculate T2* relaxation time as a function of signal intensity and TE values of each image:

$$y = A + C \exp(-t/T2^*)$$

With: A= absolute bias, C= signal intensity, T2*= spin-spin relaxation time All calculated T2* times were given in ms. ¹H-MR spectroscopy PRESS-1H (Point RESolved Spectroscopy) sequence (TR/TE : 2500/20ms, NEX : 512, VOI : 2.5x2x3mm) combined with a water suppression sequence VAPOR (VARIABLE Power Optimized Relaxation delays) are used for acquiring in single voxel spectroscopy one spectrum from a voxel placed on the tumor and another one on the contralateral side. Before MRS and T2* weighted images, a second order shim was performed.

MRI monitoring: The tumor response to the treatment was monitored by MRI from the pre-treatment to 20 days after the treatment. Each MRI session included an anatomical MRI, a diffusion MRI, a T2* MRI and a MRS. MRI session were performed just before the treatment, just after the treatment and 1, 2, 3, 7 and 10 days after the treatment. All sequences of one MRI session were carried out consecutively without moving the animal.

Images analysis: The volume of the tumors was achieved with a segmentation software ITK-SNAP 3.0.0 [28]. Mean ADC value of the tumor comes from a ROI which circled the whole tumor on the T2 weighted images and which is then, replaced on the ADC map. The ADC ratios were calculated by

dividing the tumor ADC value by the contralateral ADC value. Each ratio was then normalized to the pretreatment ratio. The VOI for MRS was drawn on the T2 weighted images, and included the whole initial tumor volume ($7.2 \pm 3.1 \text{ mm}^3$) and also the brain adjacent to tumor. For the final stages, the whole tumor ($63.1 \pm 56.6 \text{ mm}^3$) was filling the VOI so that the voxel remains focused on tumor. Each brain tissue spectrum was analyzed using jMRUI software with a basis set of prior knowledge containing 17 peaks which correspond to 9 metabolites (Lipids/lactate (CH/CH₂/CH₃), N-Acetyl-Aspartate (NAA), glutamine, glutamate, glutamine-glutamate (GLX), creatine (Cr), choline (Cho), taurine, myo-inositol (MIn)) [29] [30]. The metabolites expression was determined using the water signal as a reference, and therefore all amplitudes were expressed semi quantitatively. AMARES algorithm is used for the quantitation [31].

The proportion of hemorrhage and the proportion of the water compartment came from T2* map. The ROIs have always the same size and enclosed the tumor and its periphery, in order to assess the micro hemorrhages and the water content changes, induced by iPDT, in and around the tumor. An arbitrary threshold was defined to quantify the hemorrhage or the water content. The proportion of hemorrhage or water content was respectively defined as the ratio of the number of pixels under or upper the threshold divided by the total number of pixels.

Light propagation Simulation: The simulation of photon propagation in the tumor volume and healthy tissues was made with Molecular Optical Simulation Environment (MOSE), a simulation platform for optical molecular imaging research co-developed by Xidian University, Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, China and Virginia Tech-Wake Forest University School of Biomedical Engineering & Sciences, USA. The parameters of the simulation were a sphere of the corresponding diameter for the tumor, a cube of 4 mm side for the healthy brain, a flat cylindrical light source at 652 nm (Figure 7c and d). The characterization of optical coefficients in various biological tissues of different species exists in the literature. However, there are very few studies evaluating these coefficients *in vivo*, and let alone in presence of nanoparticles. We used a method developed by our group to estimate the *in vivo* optical parameters. The *in vivo* values of the optical coefficients (absorption and scattering μ_a and μ_s , respectively) of subcutaneous U87MG tumors grafted in nude mice with and without AGuIX® nanoparticles were estimated by solving the inverse problem using fast Monte Carlo simulation and

experimental spatially resolved diffuse reflectance spectra [32].

Immunohistochemistry: The brains were kept in formol® (CARLO ERBA Reagents S.A.S, Val de Reuil, France) during 10 days. The tissue samples were dehydrated in successive ethanol baths from 70° to 100° to finish in toluene. They were conserved as 5 μm thick slice in paraffine. Immunohistopathology was performed on deparaffined slices. The unmasking step was performed at 110°C/5min in citrate buffer. To detect tumor cellular proliferation, sections were incubated for one night at room temperature with the primary antibody (rabbit monoclonal antibody anti-Ki67, 1:200 dilution buffer; SP6, RM-9106-S0, S1, NeoMarkers, Labvision). After washing, the slides were incubated for 1 hour with the secondary goat polyclonal antibody anti-rat biotinylated IgG (1:400 dilution in PBS-Tween E0432, Dakocytomation, Denmark). The revelation of secondary biotinylated antibodies was performed with a streptavidin-horseradish peroxidase complex (1 h at room temperature, diluted 1:400 in PBS-Tween, Dakocytomation, Denmark) and the peroxidase substrate (5 min, Vector® NovoRed™ Substrate Kit for peroxidase, HistoGreen, Vector Laboratories, Paris). A hematoxylin counterstaining was performed to visualize the section by optical microscopy (Eclipse E600, Nikon France S.A, Champigny sur Marne, France). ImageJ was used to perform counting. KI67 index is the number of nuclei stained on the number of nuclei unstained, counting on 3 different images, x40 magnification.

In vivo PDT response variables: Following PDT, tumor volume was measured by segmentation on T2 weighted images. For the statistical analysis, we used an innovative approach developed by Bastogne *et al.* and based on the mixed-effect modeling of the tumor responses [33]. Its main advantage is to account for all the tumor kinetics and not only a specific end-point, which allows to significantly enhancing the statistical power of the tests. This method firstly required to define a parametric model of the kinetic response and secondly to determine the values of the model parameters with a maximum likelihood estimator. For the modeling step, originality was also to consider the equivalent diameter instead of the tumor volume. The diameter response generally showed a linear trend and therefore a simpler model [34] [35]. As previously described, an exponential-linear model structure was used:

$$x(t) = 1 - k_1 T (1 - e^{-t/T}) + k_2 (t - \tau)$$

where x is the tumor diameter (D), t is the time variable, k_1 , T , k_2 , τ are the model parameters to be estimated from the experimental data [33]. This model

was implemented in the computational environment Matlab® with the toolbox Monolix®. Three groups of animals were deduced from this model, a non-treated group (control), a partially treated group (non-responder) and completely treated group (responder). The growth rate k_2 decreased of about 30% versus 57% for the non-responder and responder animals, respectively.

Statistical Analyses

Data were presented as mean \pm standard deviation (SD). The GraphPad (Prism5.01, San Diego, USA) software was used to perform statistical tests. A non-parametric test Kruskal-Wallis with an additional Dunn's test were suggested to compare the three groups with $p < 0.05$. A log rank test was used for the Kaplan-Meier curves. A non-parametric statistical test, the Mann-Whitney U was also used with $p < 0.05$ or $p < 0.10$.

Results and Discussion

Nanoparticles characterizations

Figure 1 summarizes the chemical and photophysical characterizations of a 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-(triphenyl)porphyrin (TPP) grafted onto AGuIX® nanoparticles (AGuIX-TPP) compared to AGuIX® alone and TPP molecule. AGuIX® are sub-5 nm nanoparticles made of a polysiloxane matrix surrounded by gadolinium chelates covalently grafted to the inorganic matrix. The grafting of the TPP was obtained by the formation of a peptide bond between free amino function in the nanoparticle and the NHS ester on the TPP. Fluorescence (Figure 1a), absorption (Figure 1b) and $^1\text{O}_2$ luminescence spectra (Figure 1c) were assessed in toluene for free TPP and in D_2O for AGuIX-TPP. No significant changes in the quantum yields of fluorescence and $^1\text{O}_2$ were observed between free TPP or grafted onto AGuIX® (Figure 1e). We demonstrated that the grafting of the TPP molecule on the AGuIX® did not modify its chemical and photophysical properties. Size distribution and zeta potential are given Figure 1d. The hydrodynamic diameters were 2.0 ± 0.9 nm and 11.2 ± 3.9 nm for AGuIX® and AGuIX-TPP, respectively (Figure 1d). The presence of TPP induces a decrease in the surface charge, as measured by zeta potential at pH 7.4. As previously demonstrated, the derivatization of the nanoparticles by tetra azacyclo dodecane tetra acetic acid (DOTA, an active chelator substance) rendered them water soluble in a wide pH range, including pH of biological fluid [26].

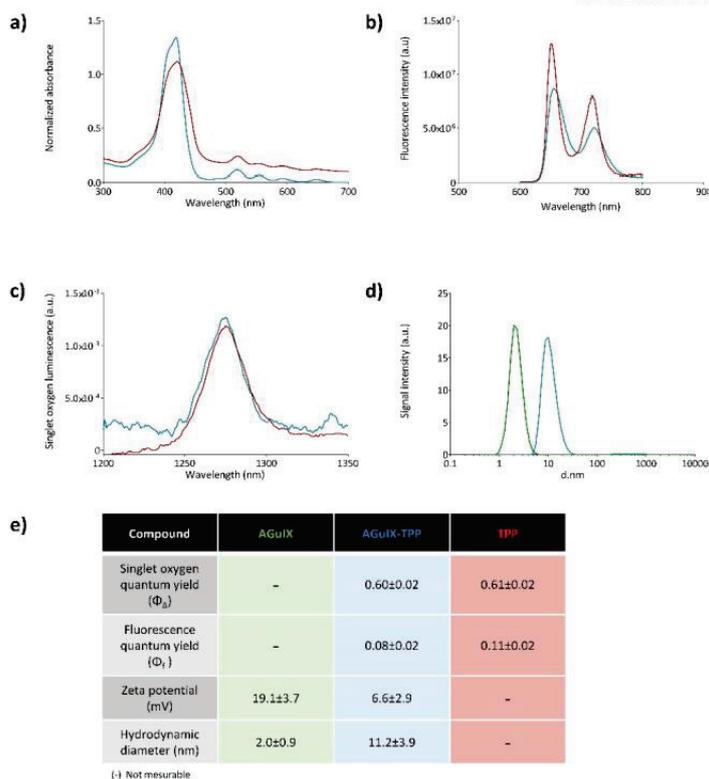


Figure 1. Photophysical properties of the free photosensitizer (TPP in red, in toluene), and after its coupling to the AGuIX nanoparticles (AGuIX-TPP in blue, in D_2O). Absorption spectra (a), fluorescence emission spectra for the same absorbance ($\lambda_{\text{exc}} = 419$ nm) (b) and singlet oxygen emission spectra for the same absorbance after excitation at 419 nm (c). Size distribution determined by photon correlation spectroscopy of AGuIX® nanoparticles with (in blue) or without TPP (in green) (d). A table summarizing photophysical and chemical characteristics (e).

Tumor volume and apparent diffusion coefficient (ADC) post-iPDT

Using the same procedure than Bechet *et al.*, the tumor volume visualized by T1-weighted imaging after injection of AGuIX-TPP, was illuminated *via* an optical fiber placed stereotactically into the brain of each rat. To perform iPDT, the optical fiber position was confirmed by a coronal and sagittal proton density-weighted MRI acquisition (Figure 2a and b) [26] [36] [37]. The sham rats were represented as

control group (*i.e.* rats exposed to light 1 hour post-i.v. injection with AGuIX nanoparticles without photosensitizer). Using AGuIX-TPP nanoparticles, iPDT induced a statistically significant efficiency compared to the control group (**Figure 2c**). GBM tumor cellularity was evaluated by T2-weighted MR images and DWI which provides information on water molecular diffusion. Theoretically, a high cellularity may impede free water diffusion resulting in a reduction of the ADC values [38]. We examined the usefulness of DWI post-iPDT through the evaluation of response patterns based on ADC changes. Unexpectedly, the ADC values based on the entire tumor volume data, did not demonstrate any statistically significant differences between the control and the treated groups (**Figure 2d**). Nevertheless, as

soon as 1 day post-iPDT, the ADC maps illustrated clearly a difference in the cytoarchitecture of the tumor tissue compared to the control group (**Figure 2e**). Indeed, an inflammatory effect with vasogenic and cytotoxic *edema* was evidenced 1 day post-treatment for the treated group. The hyperintense area of the T2 weighted images matches with the hyposignal area of the ADC map which means a low water mobility, making a finding of cytotoxic *edema*. No induction of the inflammatory effect was evidenced for the control group meaning that the insertion of the optical fiber through the cortex into the tumor led to no disruptive effect and that AGuIX® nanoparticles without photosensitizer were inert material.

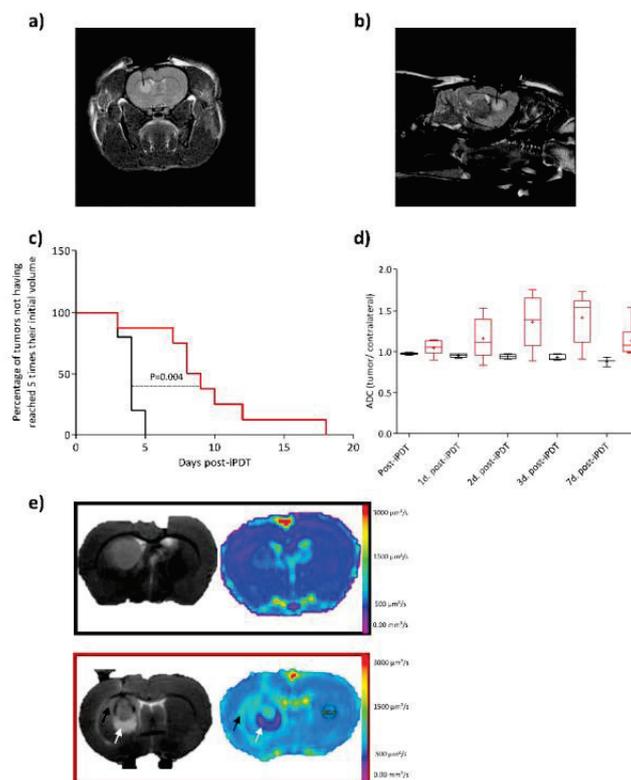


Figure 2. Proton-weighted images (TR/TE: 5000/33ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) showing the fiber insertion in coronal (a) and sagittal (b) planes. Kaplan-Meier survival curves for control rat (black line) versus treated rats (red line) by iPDT (radiant power = 50 mW; radiant energy = 26 J) with AGuIX®-TPP nanoparticles with the endpoint when the tumor volume reached 5 times their initial volume. Statistical analysis was performed using the log-rank test $p = 0.003$ (c). Using DWI (TR/TE: 3000/30ms, FOV: 4x4 cm, matrix: 128x128, SI: 1mm), the post-iPDT evolution of the ADC values in the tumor ROI of the treated rats (red boxes) and control rats (black boxes) (d). T2 weighted images (TR/TE: 5000/77ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) (left) and ADC map (right) of a representative control rat (black rectangle) and treated rat (red rectangle) 1 day post-iPDT (e). The arrows indicate a representative vasogenic (black arrow) and cytotoxic edema (white arrow) only for the treated group.

MR Imaging of cellularity, edema and micro-hemorrhages

Two commonly used characteristics of tumor growth are the tumor growth delay and the tumor volume. We previously suggested the equivalent diameter as a pertinent tumor growth statistic tool that can be used as response variable [33]. Originality was to consider this equivalent diameter (D) instead of the tumor volume. D is a new tumor diameter growth model characterizing early, late and steady-state treatment effects [7]. Indeed, tumor volume and tumor growth delay responses only give quantitative information about the tumor growth at

an event point but provide no information about the global behavior of the tumor before or after this event. Using this dynamic model from the experimental data (for details see Experimental section and [33]), we can clearly identify two different profiles of iPDT response concerning the treated group (Figure 3a), also underlined using Kaplan-Meier survival curves (Figure 3b). Taking into account this discrepancy, we decided to integrate this consideration by comparing the data from MRI analysis between these two sub groups, the responder group (Figure 3, red) and the non-responder group (Figure 3, blue).

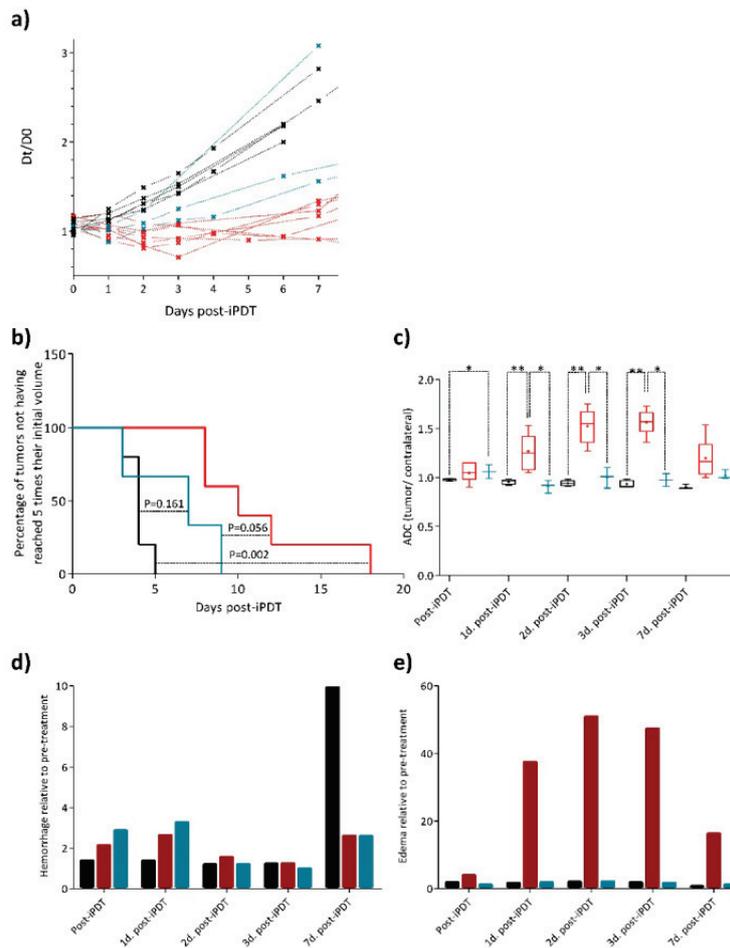


Figure 3: Relative growth kinetics with the theoretical diameter D. Identification of two sub groups in the treated group (for details see Experimental Section *In vivo* PDT response variables) (a). Kaplan-Meier survival curves of U87MG tumors for control (black line), responder (red line), and non-responder (blue line) groups, considering the percentage of tumors not having reached 5 times their initial volume at the end point. Significant difference between responder and control groups is found with a log rank test: $p=0.002$ (b). ADC values relative to the pre-treatment from the tumor ROI of responder group (red boxes) increase significantly compared to control group (black boxes) and non-responder group (blue boxes) (c). The relative rate of hemorrhage normalized to the pre-treatment values comes from T2* map values for the control (black), responder (red) and non-responder (blue) groups (d). The relative rate of edema normalized to the pre-treatment values for the same different groups (e).

The ADC values of the tumor region of interest (ROI) demonstrated from one to three days post-iPDT firstly, statistically significant differences between the control and responder groups and secondly, statistically significant differences between both treated groups (*i.e.* responder *vs.* non-responder) (Figure 3c). These major results revealed a significantly higher frequency of high ADC values in the responder group, corresponding to a decreased cellularity into the tumor tissue due to the photodynamic effect. This efficiency was not observed in the non-responder group. Interestingly, seven days post-iPDT those discrepancies disappeared, meaning that this treatment effect did not remain a discriminant event. Many studies described variations of ADC values related to changes induced by treatments such as radiotherapy [39]. Just after treatment, some studies reported a transient decrease of ADC values due to a vascular *collapsus* and a cell swelling, arising from the reduction of extracellular space [40]. An extracellular edema and a cellular necrosis are events which coincide with an increase of the ADC values [41] [42] [43]. It is also perfectly well described that PDT induces membrane associated damages that occurs *via* protein cross linking and lipid peroxidation. This leads to alterations in membrane permeability with subsequent cellular swelling and lysis, a vascular shutdown and acute inflammatory/immune responses [44]. The early changes in ADC values of the responder group are in accordance with a necrosis process and a release of cell content in the extracellular space, leading to an inflammatory reaction and an increase in vessels permeability.

The major utility of T2* susceptibility sequence

in brain tumor imaging is to provide information on radiation induced chronic micro-hemorrhages. Indeed, these sequences are very sensitive to blood products and may be very helpful to depict post-iPDT micro-hemorrhages. As described by [19] [20], susceptibility weighted imaging (SWI) could lead to an improved sensitivity to venous blood and hemorrhage compared to T2* sequence however only T2* weighted magnitude images can succeed to have quantitative T2* values, useful to discriminate states of tissues. For the non-responder group, micro-hemorrhages were observed immediately and 1-day post treatment and for the control group, a marked micro hemorrhagic process about 5-fold higher, appeared in later stage post treatment (Figure 3d). GBM is among the most vascularized of all solid tumors, and relies upon angiogenesis for growth and histological progression. A number of proangiogenic factors promote angiogenesis in GBM such as vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and angiopoietin-2 (Ang-2). For instance, overexpression of VEGF can degrade the capillary basement membranes of tumor vessels, causing them to become more permeable and leak plasma fluid and proteins from the intravascular compartment into the brain parenchyma. The extension of the micro-hemorrhages was differently localized between the responder and non-responder groups (Figure 4a and b). Non-responder rats described a major hemorrhage on the top of the tumor tissue area, corresponding to the brain adjacent to tumor (BAT) and a minor one inside compared to responder rats which demonstrated a predominant micro-hemorrhage into the tumor rim.

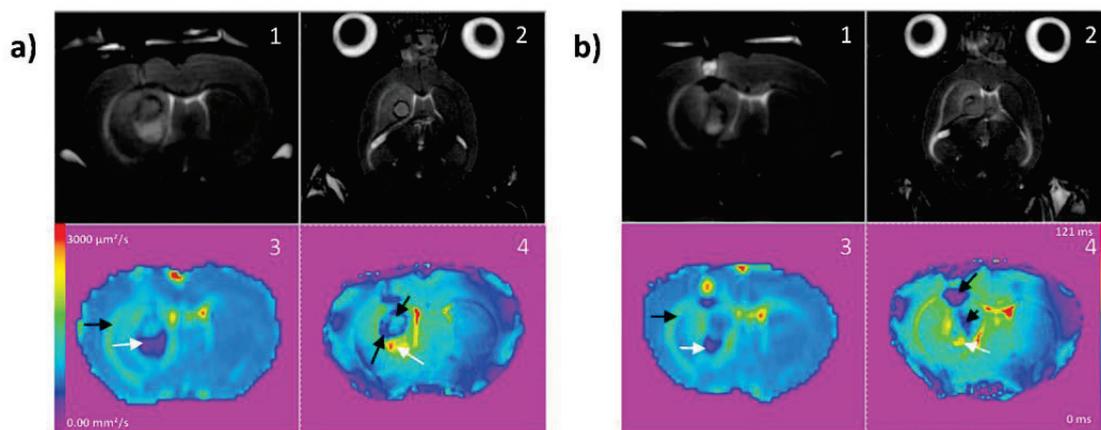


Figure 4: Board of T2 weighted images in coronal (1) and axial (2) planes (TR/TE: 5000/77ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm), ADC and T2* maps for a representative responder rat (a) and a non-responder rat (b). On ADC map (3), black arrows indicate vasogenic edema and white arrows cytotoxic edema. On T2* map (4), black arrows indicate micro-hemorrhage and white arrows cytotoxic edema.

It is now well established that complex interactions between cancer and stromal cells within the tumor microenvironment play major roles in cancer progression at both the primary and metastatic sites [45]. In GBM, the serine protease urokinase plasminogen activator (uPA), and matrix metalloproteases such as MMP-2/MMP-9 contribute to its invasive growth pattern. Indeed, the invasive growth of GBM relies strongly on the restructuring of the extracellular matrix (ECM). ECM restructuring typically involves three steps, adhesion, degradation and migration, and it is induced by the serine protease uPA and is carried out by plasmin and various MMPs. In the case of GBM, a prominent infiltration zone was created between the solid tumor and normal brain adjacent tissue, containing multiple tumor cell aggregates which could be potentially responsible for recurrent tumor growth. Thus, micro-hemorrhage into the BAT is thought to cause an initial early reversible opening of the brain blood barrier due to activation of MMPs, which is distinct from a delayed secondary opening caused by inflammatory response days later [46]. **Figure 3e** highlights the water content of the tumor tissue and the BAT. With no doubt, according to the DWI images a major inflammatory effect and vasogenic *edema* characterized the responder group.

Metabolic approach by MRS

With the recent advancement of MRS, biologically relevant intracellular metabolites can be detected. This non-invasive imaging with ^1H -MRS, led us to perform analysis of the metabolism of tumor tissue and contralateral hemisphere post-iPDT. This approach allows measurements of metabolites for specific atomic nuclei and their components, including choline-containing components (Cho), creatine (Cr), N-acetyl aspartate (NAA), lipid such as CH/CH₂/CH₃ levels, myo-inositol (MIn), glutamate plus glutamine (GLX), and taurine. For instance, Opstad *et al.* demonstrated that the measurement of taurine in gliomas *in vivo* by non-invasive MRS could be a useful technique for monitoring tumor apoptosis in clinical practice [47]. NAA is a predictor for neuronal integrity since decreased levels are usually observed after brain injury. The second most commonly observed MRS finding after brain tumors is the increased of Cho levels *via* cell membrane disruption and altered phospholipid metabolism, which are biomarkers for cell membrane turnover [46]. The Cho level may be suggested to predict the malignancy of gliomas. The Cho level has also been found to correlate with the cellular density of tumors

and the Cr peak appears to be an indicator of cell energy metabolism and can be used to distinguish pure tumors from pure necrosis. It was described that Cho, lipid and lactate levels normalized to Cr are strong predictors of survival [48].

The stability of metabolites rate in the contralateral side during the longitudinal follow of each rat was also checked to assume that iPDT had no effect on the healthy hemisphere. MRS *spectra* for each rat were acquired from the tumor and contralateral side. The analysis of the MRS *spectra* provided precious information on the metabolic state (**Figure 5**). The metabolite rates were normalized to the water amplitude of the contralateral side, usually used for its low variability [49]. The maximum variation of water amplitude reaches a mean value of 9% between 1 and 2 days post-iPDT (**Figure 5a**). Seven metabolites of the cerebral metabolism devoted all our attention lipid (CH/CH₂/CH₃), NAA, GLX, Cr, Cho, Tau and MIn (**Figure 5b**) and their expression was assessed at different days after iPDT for the three groups (**Figs 4c-h**). As expected, before treatment, all groups displayed comparable levels of each metabolite, considered as a metabolic signature of the tumor tissue (**Figure 5c**).

No significant difference appeared just after iPDT but very interestingly as soon as 1-day post-iPDT, the responder group distinguished itself from control and non-responder groups by the lipid amplitude which was, 2 days post-iPDT, statistically significantly higher whereas Cho and MIn amplitudes were reduced (**Figure 5e**). These discrepancies were accentuated 3 days post-treatment (**Figure 5f and g**).

For the responder group, the lipid level evolution was reversed from 3 days post-iPDT (**Figure 5h**). The observation of elevated lipid levels is believed to be associated with a membrane breakdown; it depicts necrosis process related to an insufficient blood flow leading to ischemia. It could also be the result of anaerobic glycolysis. According to these results, the lipid analysis may be very useful in an early differentiation of the tumor recurrence post-iPDT. Moreover, the hypothesis of a necrosis death pathway was also confirmed by the ADC map, illustrating a major increase in the tumor water mobility in the responder group (**Figure 3c**). After radiotherapy, a lipid signal is also observed and could originate from the change of metabolism of irradiated cells [50]. Kimura *et al.* show that the ratio Cho/lipid was also used in the attempt to diagnose radiation necrosis, describing in that case, a high lipid-dominant peak [51].

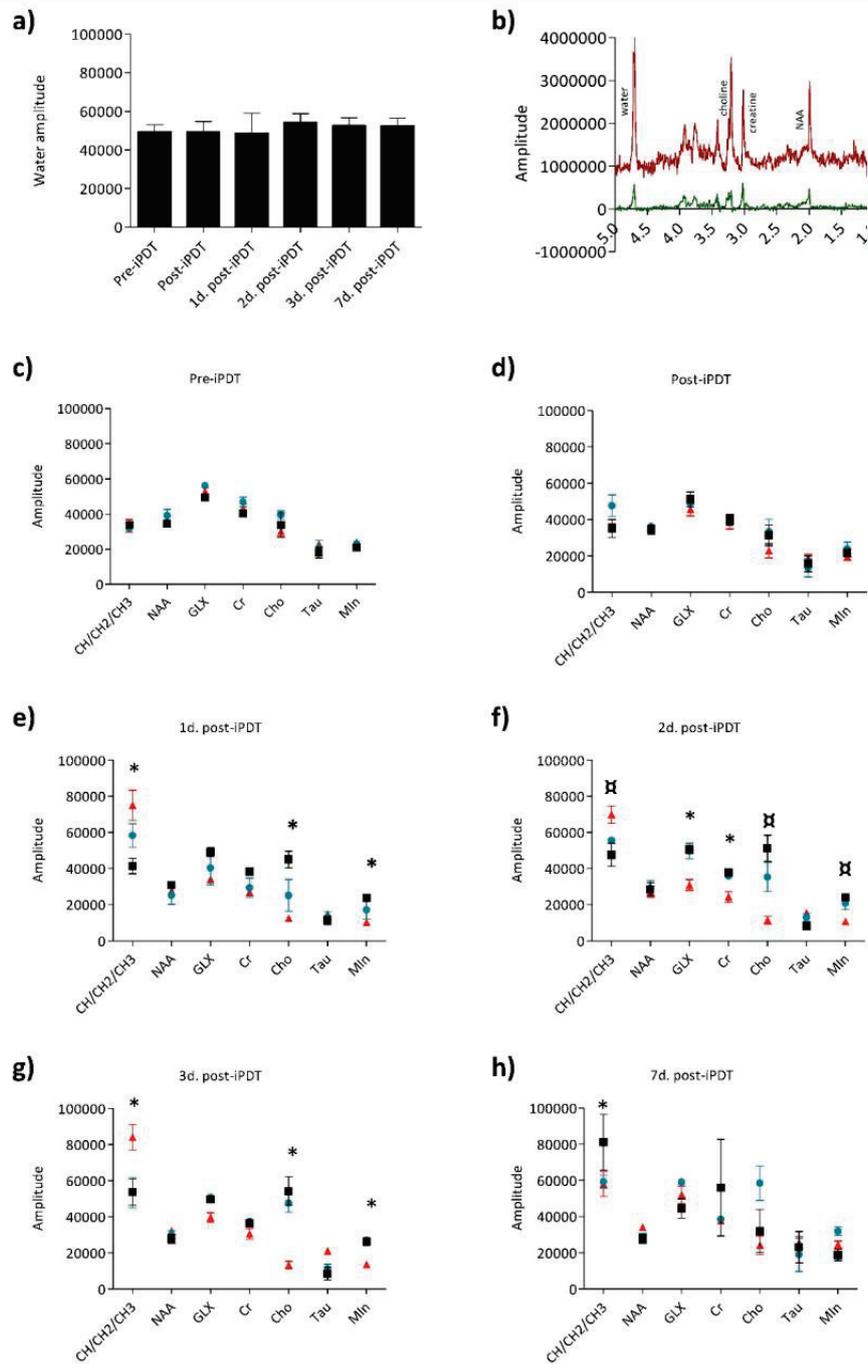


Figure 5: Metabolic profiles of the three groups. ^1H -MR spectroscopy PRESS-1H sequence for the spectra acquisition were used (TR/TE: 2500/20ms, NEX : 512, VOI : 2.5x2x3mm). The variability of the water amplitude in the contralateral voxel compared day per day. The values vary up to 9% (a). The spectra of the tumor voxel (red spectrum) and the contralateral voxel (black spectrum) with the following peaks: CH/CH₂/CH₃ 0.89, 1.31, 5.33; NAA 2.01, 2.49, 2.65, 2.05; glutamine 2.45; glutamate 2.35; GLX 2.35, 2.45, 2.04, 3.76; Cr 3.03, 3.92; Cho 3.22; tau 3.41, 3.24; Min 3.52, 3.63 (b). Relative amplitude (/water amplitude) for each metabolite for the responder group (red triangle), non-responder group (blue circle) and control group (black square) just before iPDT (c), just after iPDT (d), 1 day after iPDT (e), 2 days after iPDT (f), 3 days after iPDT (g) and 7 days after iPDT (h). Data are presented as mean \pm standard deviation (SD), responder group n=5; non-responder group n=3; control group n=5. A non-parametric Mann-Whitney statistical test was used to compared the responder and non-responder groups with $p < 0.010$ and responder to control groups with $p < 0.005$.*

We also evidenced that from the first day post-iPDT the relative amplitudes of Cho and MIn metabolites were statistically significantly different for the non-responder group. Choline is involved in the membrane metabolism and its decrease in the responder group indicated a rapid cellular membrane turnover. The third metabolite which emerged was MIn, found in great abundance within glial cells as indicator of the microglial activation and proliferation [52]. MIn is one of nine distinct isomers of inositol. It is found in phospholipids which function as cellular mediators of signal transduction, in metabolic regulation, and growth. Its decrease in the responder group argues the proliferation shutdown.

MRS modality highlights very precious qualitative data on the tumor response mechanisms. Three main metabolites, Lipids, Cho and MIn, could be suggested as early indicator of treatment response.

Vascular effects and proliferation rate

In order to argue the MRI observations, we also performed immunohistochemistry analysis. Histological examination of tissue sections taken from brain tissue 1 day after iPDT indicated an edema into both tumor and BAT areas (**Figure 6**). However, only responder rats exhibited a major inflammatory process with neutrophils infiltration (**figure 6a and d**). *Li et al.* also reported that immune response plays a

key role in iPDT anti-tumor activity, inducing an increase in immune cells infiltration [53]. **Figure 6b** demonstrated the cell death induction by many apoptotic bodies into the tumor area. In accordance with the decrease of Cho and MIn levels, an intense decrease of Ki67 index was observed into the tumor tissue after iPDT for the responder group around 2 times less compared to the non-responder group (**Figure 6c and f**). For the non-responder group, iPDT induced major micro-hemorrhages into the BAT (**Figure 6e**). This observation is also in accordance with T2* map images.

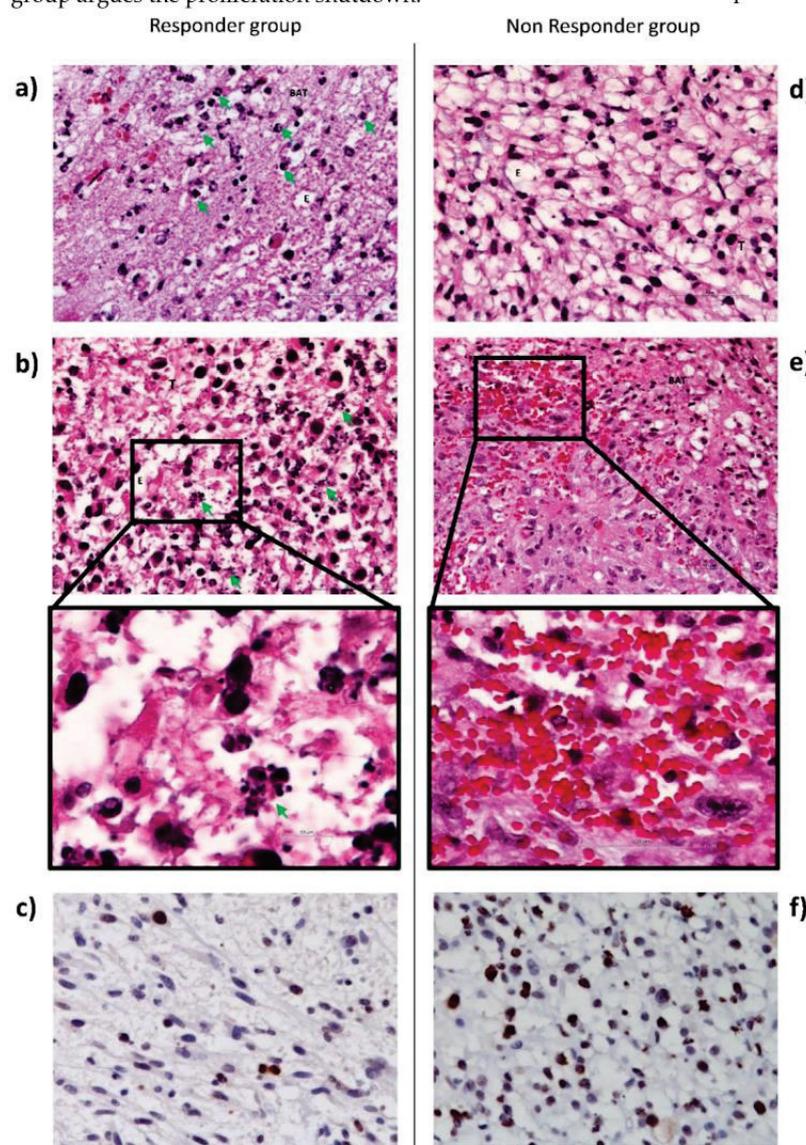


Figure 6: Histological images of U87MG tumor and BAT, 1 day post-iPDT for the responder (left) and non-responder groups (right). Representative edema images of hematoxylin-eosin staining indicate in responder group a major neutrophils infiltration (green arrow) (a) and apoptotic bodies (green arrow) (b) versus a lack of neutrophil infiltration (d) and a bleeding process (x40) (e). Representative images of Ki67 staining counterstained with hematoxylin-eosin in responder group (c) and in non-responder group (f). Abbreviations: T: Tumor; BAT: Brain Adjacent to Tumor; E: Edema

Monte Carlo simulation of light scattering

To understand the differential tumor response within the treated group (*i.e.* responder and non-responder), we explored the notion of light dosimetry. To take into account the light dose deposition, we performed Monte Carlo simulation under MOSE software. The settings were estimated from our experimental *in vivo* conditions. They concerned the optical properties of the tumor and healthy tissues with AGuIX® nanoparticles, the fiber placement as well as the radiant power, the radiant energy and the light wavelength. Based on the scattering of the emitted photons and due to the optical fiber positioning, we determined that only the tumor tissue of the responder group received a sufficient photodynamic dose to the tumor bulk (Figure 7). The isodose curves were deduced by simulation from the light source, corresponding to 80, 60, 40, 20, 10, 5 and 2 % of the initial light dose and to complete these investigations, we also evaluated the percentage of photons into the tumor tissue. We obtained an average of about 71% *versus* 67% Figures 7c and 7d, respectively. This slight difference argues that the positioning of the optical fiber to the ring of the tumor volume could also be a strong contributing factor. Indeed, molecular oxygen concentration is heterogeneous within the tumor, due to differences in

vascularization and oxygen supply and we previously demonstrated that the margins of the orthotopic human U87 GBM model xenografted in nude rat were more vascularized than its center [26].

The light distribution through the whole tumor volume in deep-seated tumor remains a limiting factor to reach an optimal PDT effect. To complicate matters, its planning depends mainly on photosensitizer concentration, light diffusion and oxygen consumption which can vary during treatment (*e.g.* photobleaching of the photosensitizer, variations of tissue optical properties and of molecular oxygen concentrations due to photochemical consumption during treatment and/or vascular damage). As opposed to chemotherapy, where the main factor is the drug dose, to be determined by a classical dose escalation methodology, PDT not only is linked to a molecule but is a complex technique wherein several factors (photosensitizer, light dose, and oxygen) interact with each other. A modification of the optical fiber positioning from the center to the ring led to a different photodynamic dose. These difficulties make the determination of the PDT modalities a nonlinear and multivariate optimization problem, and a successful dosimetry strategy has to take into consideration these particular aspects.

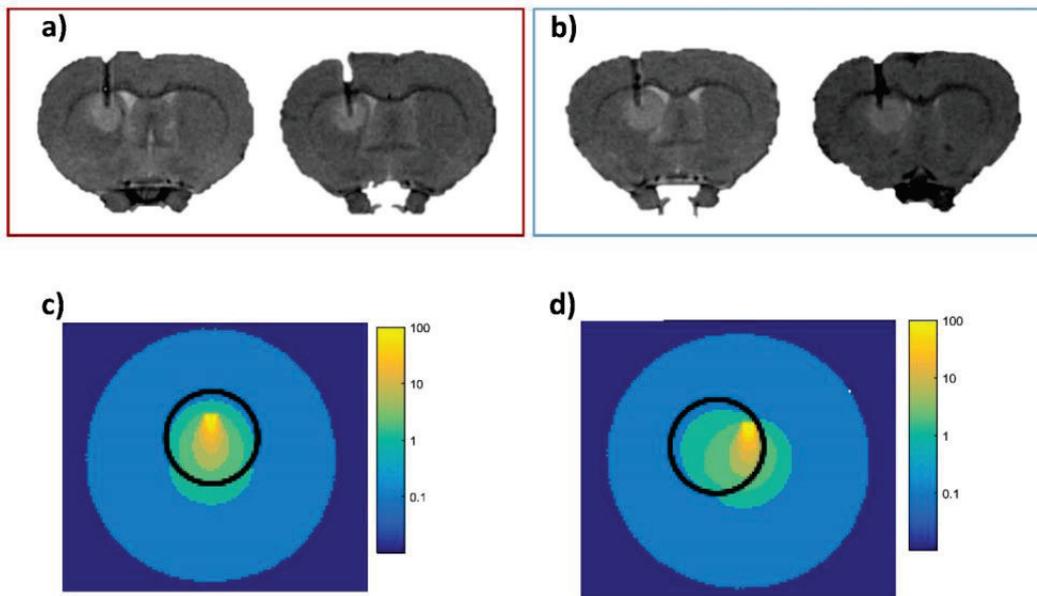


Figure 7: Simulation of the photons propagation. Two illustrative implantations of the fiber positioning into the tumor tissue of responder rats (red block); proton density weighted MRI (TR/TE: 5000/33 ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, Sl: 1 mm) (a), and two other representative optical fiber implantation into the tumor of non-responder group (blue block) (b); proton density weighted MRI (TR/TE: 5000/33 ms, NEX: 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, Sl: 1 mm). Monte Carlo simulation of the light scattering through the tumor tissue (sphere of 2 mm diameter (black circle), $\mu_s = 0.094 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_a = 6.32 \text{ mm}^{-1}$) and healthy tissue around ($\mu_s = 0.057 \text{ mm}^{-1}$, $\mu_a = 28 \text{ mm}^{-1}$ from [54]) which illustrates the isodoses distribution in the responder group (c) and in the non-responder group (d). Each colored line represents an irradiated volume receiving the same light dose. The isodose curves decrease with the distance from the light source from yellow to blue, corresponding to 80, 60, 40, 20, 10, 5 and 2 % of the initial light dose.

Review of results

As previously published by our group, we would like to point out that tumor response post-PDT once again demonstrates the crucial role of light dose deposition [7]. The multimodal MRI approach and MRS allow us to have a better understanding of the early effects induced by AGuIX® nanoparticles after iPDT. We selected the different aspects of the treatment response by their direct or indirect effects. Classically PDT leads to tumor eradication through the direct effect (destruction of tumor cell), and the indirect effect (collapse of tumor vascularization and activation of the immune and inflammatory response). We summarized the longitudinal tumor response in **Table 1**, characterized by a major inflammatory process with a cytotoxic and vasogenic edema, an ischemia and antiproliferative activity. The ischemia was validated by the rise in the CH/CH₂/CH₃ level. The antiproliferative effect was also confirmed by the higher level in lipids, the decrease in Cho and Min expression, and KI67 staining. A necrosis deduced from the high CH/CH₂/CH₃ level and ADC map was also observed, showing an increase of the water mobility in the tumor center.

In this original preclinical paper using an orthotopic human GBM model xenografted in nude rats, early predictive values were highlighted using MRI sequences at different times after iPDT. Moreover, with ¹H-MRS, we applied the quantitative spectral analysis to measure and compare metabolites expression before and after iPDT for the tumor tissue and in the healthy contralateral hemisphere. For the first time, we demonstrated the ability of a longitudinal follow-up to characterize the tumor response by structural, vascular and metabolic ways in a time-dependent manner and unexpectedly, we clearly highlighted the ability to discriminate non-responding from responding animals. MR imaging techniques can potentially help evaluate the underlying key histopathological features of GBM by showing the physiologic changes and metabolic activities, thus improving radiation treatment efficiency. We currently suggest an optimal and rational fractionation scheme for iPDT using these MRI sequences. These functional tools provide a new window to guide and monitor the treatment of gliomas. Application of these imaging techniques could lead to sophisticated and personalized patient care.

Table 1. An overview of the main results of direct and indirect effects 1 and 7 days post-iPDT in control, responder and non-responder groups.

Events	Indicators	Indicators 1d. Post-iPDT			Indicators 7d. Post-iPDT				
		Sham	Non-Responder	Responder	sham	Non-Responder	Responder		
Direct effect	Proliferation rate	Choline	→	→	↓	→	↑	↑	
		Myo Inositol	→	→	↓	↓	↑	↑	
		KI67 staining	→	→	↓	→	ND.	↑	
	Tumor cell destruction	CH ₂ /CH ₃	→	→	↑	↑	→	↓	
ADC values		→	→	↑	→	→	↓		
Indirect effect	Vascular damage	Hemorrhage	T2* values	→	↑	→	↑	→	→
	Edema		ADC values	→	→	↑	→	→	→
	Immune damage	Neutrophils infiltration	HES coloration	No	No	Yes	ND	ND	ND

Mention: →, ↑ or ↓ meaning a stability, an increase or a decrease, respectively of indicator level compared to its previous state. . ND : not determined.

Abbreviations

ADC: Apparent Diffusion Coefficient; AGuIX: Ultra-small gadolinium based particle; Ang-2: Angiopoietin-2; a.u.: arbitrary unit; BAT: Brain Adjacent Tumor; bFGF: basal Fibroblast Growth Factor; CH/CH₂/CH₃: Lipid(L)/ Lactate; Cho: Choline; Cr: Creatine; D₂O: Deuterium oxide; DGR: Diameter Growth Rate; DLS: Dynamic Light

Scattering; DOTA: tetraazacyclo-DODECANE Tetra-acetic Acid; DWI: Diffusion Weighted Imaging; E: Edema; ECM: ExtraCellular Matrix; FGR: Fluorescence-Guided Resection; FLAIR: FLuid Attenuated Inversion Recovery; FLASH: Fast Low-Angle Shot; FOV: Field of View; GBM: Glioblastoma Multiforme; GLX: Glutamine+Glutamate; HBSS: Hank's Buffered Salt Solution; iPDT: interstitial PhotoDynamic Therapy;

MIn: Myo Inositol; MRI: Magnetic Resonance Imaging; MMP-2/9: Matrix Metalloproteinase 2/9; ¹H-MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy; NAA: N-acetyl-aspartate; NEX: acquisition number; PDD: PhotoDynamic Diagnosis; PDGF: Platelet Derived Growth Factor; PDT: PhotoDynamic Therapy; PET: Positron Emission Tomography; PRESS: Point-Resolved Spectroscopy Sequence; RARE: Rapid Acquisition with relaxation enhancement; ROI: Region Of Interest; ROS: Reactive Oxygen Species; SE-EPI: Spin Echo - Echo Planar Imaging; Tau: Taurine; TE: Echo Time; TR: Repetition time; TGD: Tumor Growth Delay; TPP-COOH: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrine; VAPOR: Variable Power Optimized Relaxation delays; Φ_f : fluorescence quantum yield; Φ_{Δ} : ¹O₂ quantum yield; T2*: T2 star; uPA: urokinase Plasminogen Activator; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; VOI : Voxel Of Interest.

Supplementary Material

Supplementary figure 1.

<http://www.thno.org/v07p0436s1.pdf>

Acknowledgements

The authors would like to thank Jordane Jasniewski, Philippe Arnoux, and Jean-Baptiste Tylcz for their technical assistances. This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales (ARTC), Lions Club Nancy Commanderie, EURONANOMED II "PhotoBrain" project no. ANR-14-ENM2-0001-01.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Carlsson S, Brothers S, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med.* 2014; 6: 1359-70.
- Ducray F, Dutertre G, Ricard D, et al. Advances in adults' gliomas biology, imaging and treatment. *Bull Cancer.* 2010; 97: 17-36.
- Bechet D, Mordon S, Guillemin F Et al. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a complementary approach to conventional therapies. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40: 229-41.
- Bechet D, Tirand L, Faivre B et al. Neupilin-1 Targeting Photosensitization-Induced Early Stages of Thrombosis via Tissue Factor Release. *Pharm. Res.* 2010; 27: 468-79.
- Tirand L, Frochet C, Vanderesse R et al. A peptide competing with VEGF165 binding on neupilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J of Controlled Release.* 2006; 111: 153-64.
- Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB et al. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* 2011; 3: 2516-39.
- Tirand L, Bastogne T, Bechet D Et al. Response surface methodology: an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 75: 244-52.
- Stummer W, Beck T, Beyer W, et al. Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. *J Neurooncol.* 2008; 87 : 103-9.
- Stupp H, Beck T, Pongratz T, et al. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007; 26: 157-64.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler O, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 392-401.
- Kao HW, Chiang SW, Chung HW, et al. Advanced MR Imaging of Gliomas: An Update. *BioMed Research International.* 2013; [Epub ahead of print].
- Frappaz D, Chinot O, Bataillard A, et al. Summary version of the Standards, Options and Recommendations for the management of adult patients with intracranial glioma (2002). *Br. J. Cancer.* 2003; 89: S73-S83.
- Hygino Da Cruz L, Rodriguez J, Domingues R, et al. Pseudoprogression and Pseudoresponse: Imaging Challenges in the Assessment of Posttreatment Glioma. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011; 32: 1978-85.
- Bobek-Billewicz B, Stasik-Pres G, Majchrzak H, et al. Differentiation between brain tumor recurrence and radiation injury using perfusion, diffusion-weighted imaging and MR spectroscopy. *Folia Neuropathol.* 2010; 48: 81-92.
- Le-Bihan D. Diffusion MRI: what water tells us about the brain. *EMBO Molecular Medicine.* 2014, 6: 569-73
- Kalpathy-Cramer, J.; Gerstner, E. R.; Emblem, K. E.; Andronesi, O. & Rosen, B. Advanced Magnetic Resonance Imaging of the Physical Processes in Human Glioblastoma *Cancer Res.* 2014, 74: 4622-4637
- Schaefer, P. W.; Grant, P. E. & Gonzalez, R. G. Diffusion weighted MR Imaging of the Brain *Radiology.* 2000, 217: 331-45
- Padhani AR, Liu G, Mu-Koh D, et al. Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging as a Cancer Biomarker: Consensus and Recommendations. *Neoplasia.* 2009; 11: 102-25.
- Bian W, Hess CP, Chang SM, Nelson SJ, et al. Susceptibility-weighted MR imaging of radiation therapy-induced cerebral microbleeds in patients with glioma: a comparison between 3T and 7T. *Neuroradiology.* 2014; 56: 91-6.
- Mabray MC, Barajas RF, Cha S. Modern Brain Tumor Imaging. *Brain Tumor Res Treat.* 2015; 3: 8-23.
- Kwoc L, Smith JK, Castillo M, et al. Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: brain, breast, and prostate cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7 :859-68.
- Wang W, Hu Y, Lu P, et al. Evaluation of the Diagnostic Performance of Magnetic Resonance Spectroscopy in Brain Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos one.* 2014; 9. [Epub ahead of print].
- Benard F, Romsa J, Hustinx R. Imaging gliomas with positron emission tomography and single-photon emission computed tomography. *Semin.Nucl. Med.* 2003; 33: 148-62.
- Oh J, Henry RG, Pirzkall A, et al. Survival Analysis in Patients With Glioblastoma Multiforme: Predictive Value of Choline-to-N-Acetylaspartate Index, Apparent Diffusion Coefficient, and Relative Cerebral Blood Volume. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2004; 19: 546-54.
- Yu T, Feng Y, Feng X, et al. Prognostic factor from MR spectroscopy in rat with astrocytic tumour during radiation therapy. *B. J. Radiol.* 2015; 88: 0-10.
- Bechet D, Auger F, Couleaud P, et al. Multifunctional ultrasmall nanoplatforms for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of brain tumors guided by real-time MRI. *Nanomedicine.* 2015; 11: 657-70.
- Le Due G, Roux S, Paruta-Tuarez A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* 2014; 5. [Epub ahead of print].
- Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage.* 2006; 31: 1116-28.
- Naressi A, Couturier C, Castang I, et al. Java-based graphical user interface for MRUI, a software package for quantitation of in vivo/medical magnetic resonance spectroscopy signals. *Comput Biol Med.* 2001; 31: 269-86.
- Stefan D, Di Cesare F, Andrasescu A, et al. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. *Meas. Sci. Technol.* 2009; 20: 104035.
- Vanhamme L, Van Den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J. Magn. Reson.* 1997; 129: 35-43.
- Pery E, Blondel W, Thomas C. Monte Carlo modeling of multilayer phantoms with multiple fluorophores: simulation algorithm and experimental validation. *J. Biomed. Opt.* 2002; 14: 024048.
- Bastogne T, Samson AA, Vallois P, et al. Phenomenological modeling of tumor diameter growth based on a mixed effects model. *J. Theor. Biol.* 2010; 262: 544-52.
- Mandonnet E, Pallud J, Clatz O, et al. Computational modeling of the WHO grade II glioma dynamics: principles and applications to management paradigm. *Neurosurg. Rev.* 2008; 31: 263-9.
- Ribba B, Watkin E, Tod M, et al. A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. *Eur. J. Cancer.* 2011; 47: 479-90.
- Tylcz JB, Bastogne T, Benachour H, et al. A Model-based Method of Characterizing the Pharmacokinetics of Engineered Nanoparticles in Pilot Studies. *IEEE J NB.* 2015; 14: 368-77.

- [37] Benachour A, Seve A, Bastogne T, et al. Multifunctional Peptide-Conjugated Hybrid Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy and MRI. *Theranostics*. 2012; 2: 889-904.
- [38] Hein PA, Eskey CJ, Dunn JF, et al. Diffusion-Weighted Imaging in the Follow-up of Treated High-Grade Gliomas: Tumor Recurrence versus Radiation Injury. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2004; 25: 201-9.
- [39] Patterson DM, Padhani AR, Collins DJ, et al. Technology Insight: water diffusion MRI a potential new biomarker of response to cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008; 5: 220-33
- [40] Plaks V, Koudinova N, Nevo U, et al. Photodynamic Therapy of Established Prostatic Adenocarcinoma with TOOKAD: A Biphasic Apparent Diffusion Coefficient Change as Potential Early MRI Response. *Neoplasia*. 2004; 6: 224-33
- [41] Chenevert TL, Stegman LD, Taylor JMG, et al. Diffusion Magnetic Resonance Imaging: an Early Surrogate Marker of Therapeutic Efficacy in Brain Tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 2029-36
- [42] Hall D, Moffat B, Stojanovska J, et al. Therapeutic efficacy of DTI-015 using diffusion magnetic resonance imaging as an early surrogate marker. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 7852-9
- [43] Cui Y., Zhang XP, Sun YS, et al. Apparent Diffusion Coefficient: Potential Imaging Biomarker for Prediction and Early Detection of Response to Chemotherapy in Hepatic Metastases. *Radiology.* 2008; 248: 894-900
- [44] Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy: PDT Mechanisms. *Clin endosc.* 2013; 46 : 24-9
- [45] Quail D, Joyce J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 2013; 19: 1423-37.
- [46] Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2011; 42: 3323-8.
- [47] Opstad K, Bell B, Griffiths J, et al. Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas. *Br. J. Cancer.* 2009; 100: 789-94.
- [48] Marcus KJ, Astrakas LG, Zurakowski d, et al. Predicting survival of children with CNS tumors using proton magnetic resonance spectroscopic imaging biomarkers. *Int J Oncol.* 2007; 30: 651-7.
- [49] Meyerand ME, Pipas JM, Mamourian A, et al. Classification of Biopsy-Confirmed Brain Tumors Using Single-Voxel MR Spectroscopy. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1999; 20: 117-23.
- [50] Sundgren P. MR Spectroscopy in Radiation Injury. *AJNR: Am. J. Neuroradiol.* 2009; 30: 1469-76.
- [51] Kimura T, Sako K, Gotoh t, et al. In vivo single-voxel proton Mr Spectroscopy in brain lesion with ring-like enhancement. *NMR biomed.* 2001; 14: 339-49.
- [52] Galanaud D, Nicoli F, Fur YL, et al. Multimodal magnetic resonance imaging of the central nervous system. *Biochimie.* 2003; 85: 905-14.
- [53] Li F, Cheng Y, Lu J, et al. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3. *J Cell Biochem.* 2011; 112: 3035-43.
- [54] Angell-Petersen E, Spetalen S, Madsen SJ, et al. Influence of light fluence rate on the effects of photodynamic therapy in an orthotopic rat glioma model. *J Neurosurg.* 2006; 104: 109-17.

4.2.5 Conclusion

Dans cette partie, nous avons fonctionnalisé les particules AGuIX par la tétraphénylporphyrine (PS) pour le traitement des glioblastomes guidé par IRM. Dans cette étude, les nanoparticules s'accumulent dans les tumeurs grâce à l'effet EPR, c'est-à-dire par ciblage passif uniquement. De nombreuses études ont montré que le ciblage actif de la vascularisation tumorale serait efficace pour améliorer l'efficacité de la PDT.^[167] Pour atteindre ce but, nous avons commencé une nouvelle étude en fonctionnalisant les particules AGuIX à la fois par le PS et par un peptide ciblant les vaisseaux des tumeurs.

4.3 PDT ET CIBLAGE ACTIF DES TUMEURS

4.3.1 PDT ciblée de la vasculature des tumeurs (VTP)

4.3.1.1 Intérêt de la VTP

Le ciblage de la vascularisation tumorale est appelé VTP (*Vascular-Targeted PDT*). La destruction de la vascularisation tumorale entraînerait une diminution de l'oxygène et des nutriments et faciliterait l'éradication de la tumeur.^[179,188] Les récepteurs sur-exprimés ou situés spécifiquement sur les cellules endothéliales angiogéniques des tumeurs (cellules de la couche interne des nouveaux vaisseaux sanguins) sont donc des cibles moléculaires prometteuses pour la PDT. Plusieurs stratégies existent comme l'utilisation d'anticorps ou de petits peptides synthétiques. Ces derniers ont l'avantage d'être plus faciles à préparer et à manipuler.^[61,189] Ichikawa *et al.* ont ainsi synthétisé des liposomes pour le ciblage de ces cellules endothéliales angiogéniques. Ils portent un pentapeptide (APRPG) et un photosensibilisateur (un dérivé de la benzoporphyrine).^[190] Ils ont montré que les liposomes fonctionnalisés à la fois par le PS et le peptide permettaient une meilleure diminution de la croissance tumorale par rapport aux liposomes uniquement fonctionnalisés par le PS.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au ciblage de la neuropiline-1 (NRP-1) qui est un récepteur pour le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Le VEGF est l'un des facteurs de croissance endothéliale vasculaire le plus important et spécifique de l'angiogenèse, il gouverne la croissance tumorale (prolifération, migration...)^[61] La neuropiline-1 est sur-exprimée dans le cas de plusieurs cancers dont le glioblastome.^[191] L'utilisation d'un PS de type chlorure conjugué à un heptapeptide (ATWLPPR) et leur combinaison sur une nanoparticule a déjà été décrite pour le ciblage de NRP-1 et la VTP. Cette stratégie a fourni des résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo*.^[167,179,192-195] Récemment, les équipes de Régis Vanderesse, Céline Frochot et Muriel Barberi-Heyob (Université de Lorraine, Nancy) ont mis en évidence de nouveaux peptides ayant une meilleure affinité pour le récepteur NRP-1. Le pentapeptide DKPPR représenté sur la **Figure 4-12** est l'un d'entre eux.^[196]

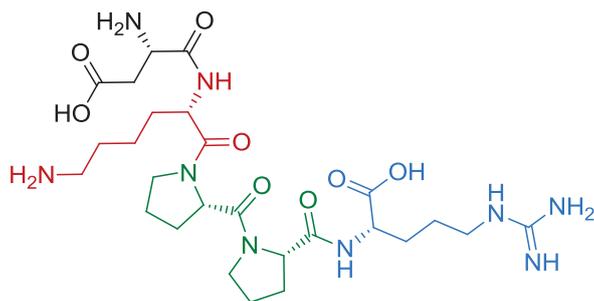


Figure 4-12 : Peptide DKPPR. D : aspartate (noir), K : lysine (rouge), P : proline (vert) et R : arginine (bleu).

4.3.1.2 Objectifs

Le but du projet est d'ajouter sur les particules AGuIX@PS développées précédemment le peptide DKPPR pour cibler le système vasculaire des tumeurs et ainsi améliorer l'efficacité de la PDT. En plus d'une meilleure efficacité, on peut aussi s'attendre à une rétention intratumorale plus longue et à la détection par IRM du volume tumoral réel, c'est-à-dire prenant en compte la partie proliférative de la tumeur.

Au lieu de greffer séparément le PS et le peptide ciblant sur la particule, il a été décidé de coupler ces deux éléments ensemble dans une première étape puis de greffer le conjugué obtenu à la surface des AGuIX (voir la **Figure 4-13**). L'intérêt est d'améliorer la reproductibilité de la synthèse en ne réalisant qu'une seule étape de conjugaison sur les particules, de conserver une bonne homogénéité pour les particules fonctionnalisées et enfin de quantifier facilement le nombre de peptides ciblants par particule grâce à la forte absorbance du PS. Dans un premier temps, une lysine (K) possédant une amine primaire sur sa chaîne latérale a été ajoutée à l'extrémité du peptide DKPPR. Grâce à cette amine, le PS a pu être couplé au peptide formant le composé K(PS)DKPPR, appelé PS@peptide dans la suite du manuscrit. Le conjugué PS@peptide a ensuite été greffé sur les particules AGuIX pour former les particules AGuIX@PS@peptide. Toutes les expériences ont aussi été réalisées avec un peptide contrôle qui possède les mêmes acides aminés mais dans un autre ordre : K(PS)PRKPD. Le composé est noté dans la suite du manuscrit PS@scramble et la particule correspondante AGuIX@PS@scramble. L'intérêt est ici de ne plus avoir de reconnaissance spécifique pour le récepteur NRP-1 mais d'avoir une particule avec une surface très similaire à celle de la particule AGuIX@PS@peptide.

La synthèse des peptides et leur conjugaison avec la porphyrine ont été réalisées à l'Université de Lorraine (Nancy, France) par Ludovic Colombeau de l'équipe de Céline Frochot et de Régis Vanderesse, des détails sur ces étapes peuvent être trouvés dans la publication présentée au paragraphe **4.3.5.2**. La fonctionnalisation des particules AGuIX a été réalisée au laboratoire.

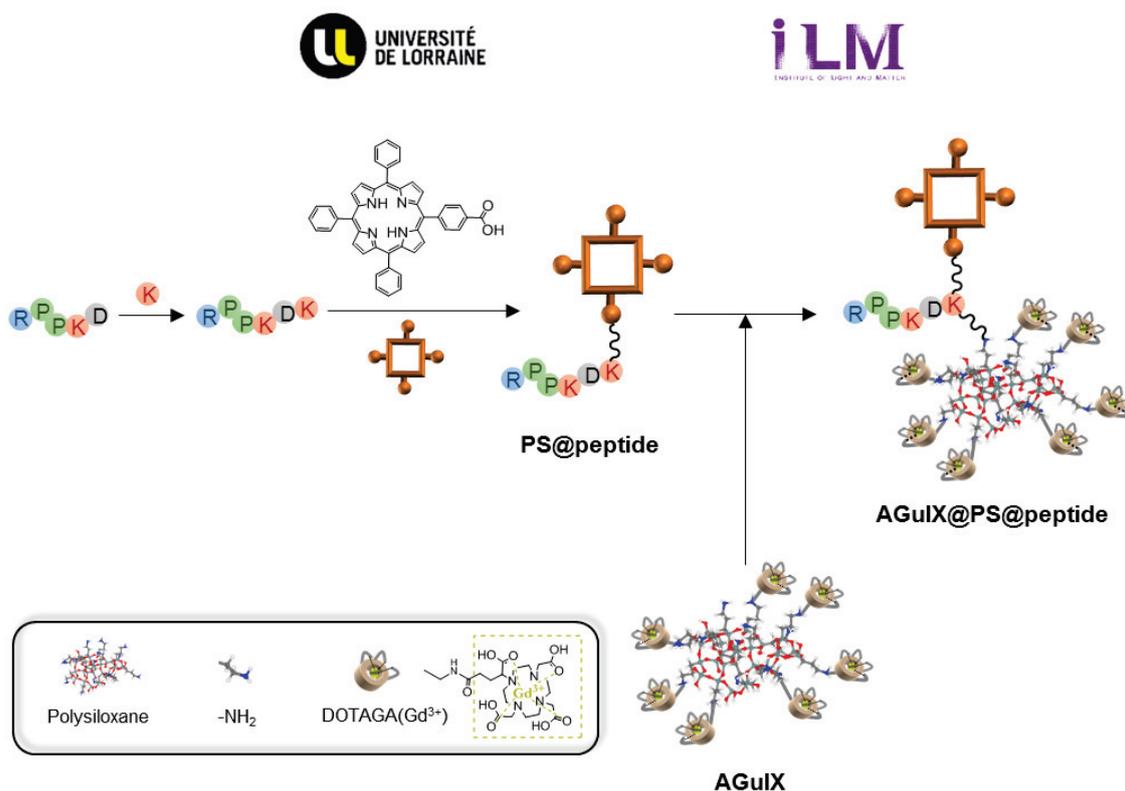


Figure 4-13 : Synthèse des particules AGuIX@PS@peptide pour la PDT ciblée du système vasculaire des tumeurs (VTP).

4.3.2 Stratégies de synthèse envisagées

Différentes stratégies ont été envisagées pour greffer le composé PS@peptide sur les particules AGuIX tout en conservant l'affinité du peptide DKPPR pour le récepteur NRP-1. Elles sont représentées sur la **Figure 4-14**. Dans tous les cas, l'ajout du dérivé de PS a été fait dans un mélange eau/DMSO afin de solubiliser à la fois les particules et le PS. Pour les voies (b) et (c), le greffage se fait sur les particules par l'intermédiaire des amines primaires en surface. La voie (a) utilise les particules AGuIX_{acide} développées dans le **chapitre 1**, elles présentent environ 10 % de DOTAGA libres et ont donc des fonctions acides carboxyliques disponibles en surface.

Les voies (a) et (b) ont été réalisées sur résine, juste après la synthèse des composés PS@peptide. Plusieurs conditions ont été utilisées en variant les agents de couplages, les temps de réactions ou les équivalents mais il n'a jamais été possible d'obtenir les particules AGuIX@PS@peptide, probablement en raison d'un problème de solubilité des différents composants. La voie (c) a alors été mise au point. Elle consiste à modifier certaines amines en surface des particules AGuIX par des fonctions thiol. Le composé maléimido-PS@peptide peut ensuite être ajouté à la surface des particules. Cette voie de fonctionnalisation a été la plus prometteuse pour l'obtention des particules AGuIX@PS@peptide et AGuIX@PS@scramble et elle est détaillée dans la suite du manuscrit.

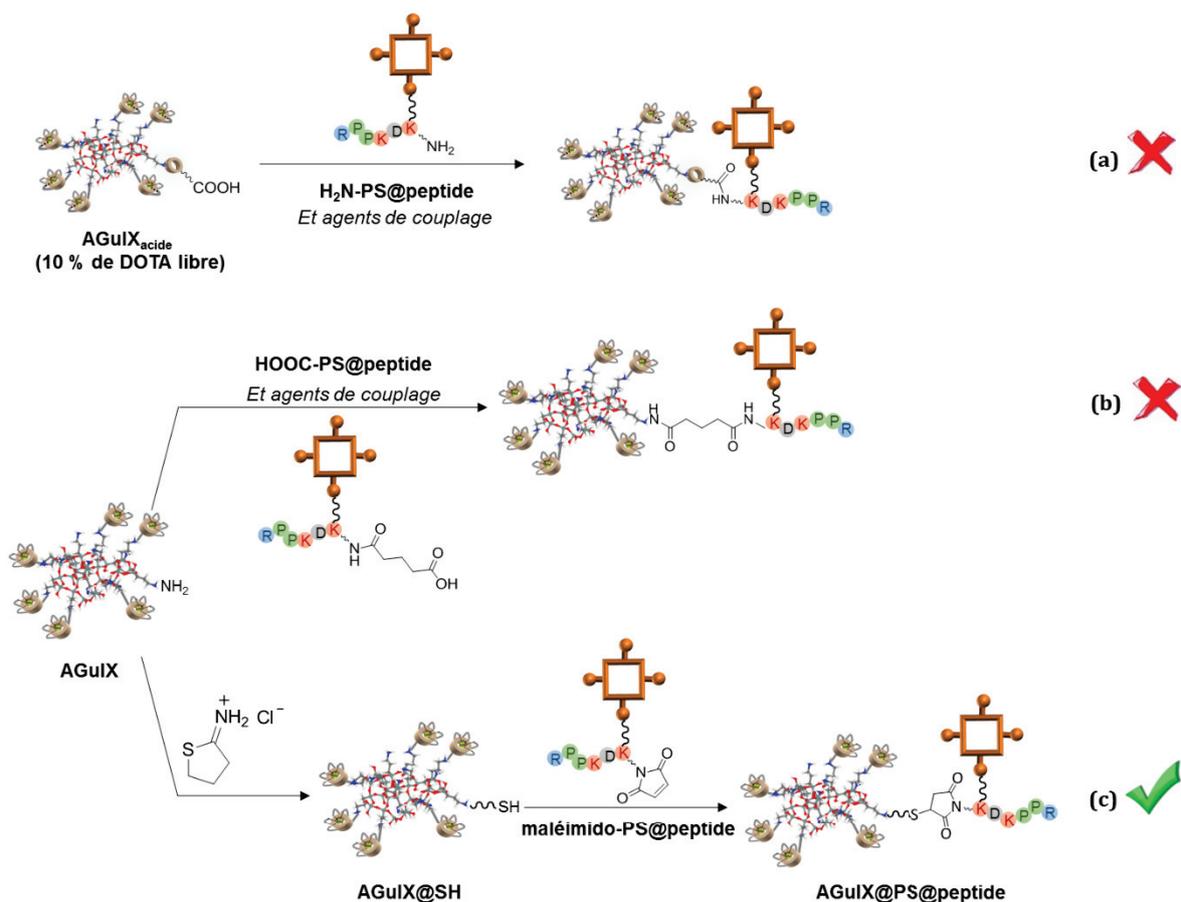


Figure 4-14 : Stratégies de synthèse des AGuIX@PS@peptide à partir de particules AGuIX , fonctionnalisation par les amines primaires pour les voies (b) et (c), ou de particules $\text{AGuIX}_{\text{acide}}$, fonctionnalisation par les COOH des DOTAGA libres pour la voie (a).

4.3.3 Synthèse et caractérisations des AGuIX@SH

4.3.3.1 Synthèse des AGuIX@SH

La stratégie mise en place pour introduire des groupements thiol sur les particules AGuIX est basée sur l'utilisation d'un imidoester cyclique, le réactif de Traut. Ce réactif est incubé avec des particules AGuIX et réagit avec les amines primaires présentes à la surface par une réaction d'ouverture de cycle conduisant à un groupement SH libre (**Figure 4-15**).^[105] Les particules AGuIX@SH obtenues sont ensuite purifiées par filtration tangentielle ou dialyse. Grâce à l'absorbance du réactif de Traut à 248 nm, la purification peut être suivie par spectroscopie UV-visible.

Mode opératoire : Le protocole détaillé est présenté plus loin dans la publication de la **partie 4.3.5**.

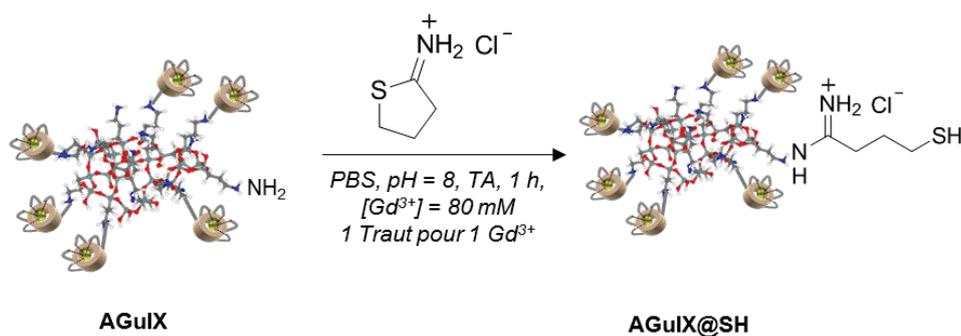


Figure 4-15 : Synthèse des particules AGuIX@SH par réaction du réactif de Traut sur les amines primaires disponibles à la surface des particules.

Le **Tableau 4-4** montre que la taille, les propriétés magnétiques et le chromatogramme HPLC des AGuIX@SH sont semblables à ceux des AGuIX. La légère augmentation de ces paramètres peut être expliquée par une augmentation de taille et une modification de la surface des particules à la suite de leur fonctionnalisation ainsi que par l'élimination des plus petites particules lors des étapes de purification.

D'autre part, on peut mentionner que les thiols SH peuvent être oxydés en solution ce qui conduirait à la formation de ponts disulfure (-S-S-). Cela entraînerait une augmentation de la taille (visible en DLS et HPLC) et de la relaxivité. Le TCEP (tris (2-carboxyéthyl) phosphine) est un agent réducteur et peut briser ces ponts disulfures (réaction durant quelques minutes à pH = 4-5). Les caractérisations des AGuIX@SH ont été réalisées avec et sans TCEP et ont donné les mêmes résultats. Il n'y a donc pas de pont disulfure entre les particules AGuIX@SH, tous les thiols sont disponibles pour la conjugaison avec le composé maléimido-PS@peptide.

Tableau 4-4 : Caractérisation des AGuIX@SH.

Caractérisations	AGuIX	AGuIX@SH
DLS	$D_H = 3,6 \pm 0,8 \text{ nm}$	$D_H = 4,7 \pm 1,2 \text{ nm}$
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	$r_1 = 12,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}; r_2/r_1 = 1,3$	$r_1 = 14,5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}; r_2/r_1 = 1,6$
HPLC (A = 295 nm)	Pureté de 96 % $t_R = 12,6 \text{ min}$ $l_{1/2} = 0,9 \text{ min}$	Pureté de 99 % $t_R = 13,2 \text{ min}$ $l_{1/2} = 1,0 \text{ min}$

4.3.3.2 Quantification du nombre de thiols par particule

Afin de quantifier le nombre de thiols par particule, le réactif d'Ellman peut être utilisé.^[197] Dans des conditions légèrement basiques, cette molécule peut réagir avec des groupements SH et libérer l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque qui présente une forte absorbance à 412 nm (**Figure 4-16**). La quantification est basée sur l'addition d'une quantité croissante de réactif d'Ellman à des particules d'AGuIX@SH. On peut d'abord observer une augmentation de l'absorbance à 412 nm en raison de la réaction du thiol avec le réactif d'Ellman. Lorsque toutes les fonctions thiols ont réagi, un plateau est atteint. Les résultats pour ce type de synthèse donnent environ un thiol pour 7-10 Gd³⁺ (ce qui correspond à environ un SH par particule).

Mode opératoire : Le protocole détaillé est présenté dans la publication de la **partie 4.3.5** (p. 185).

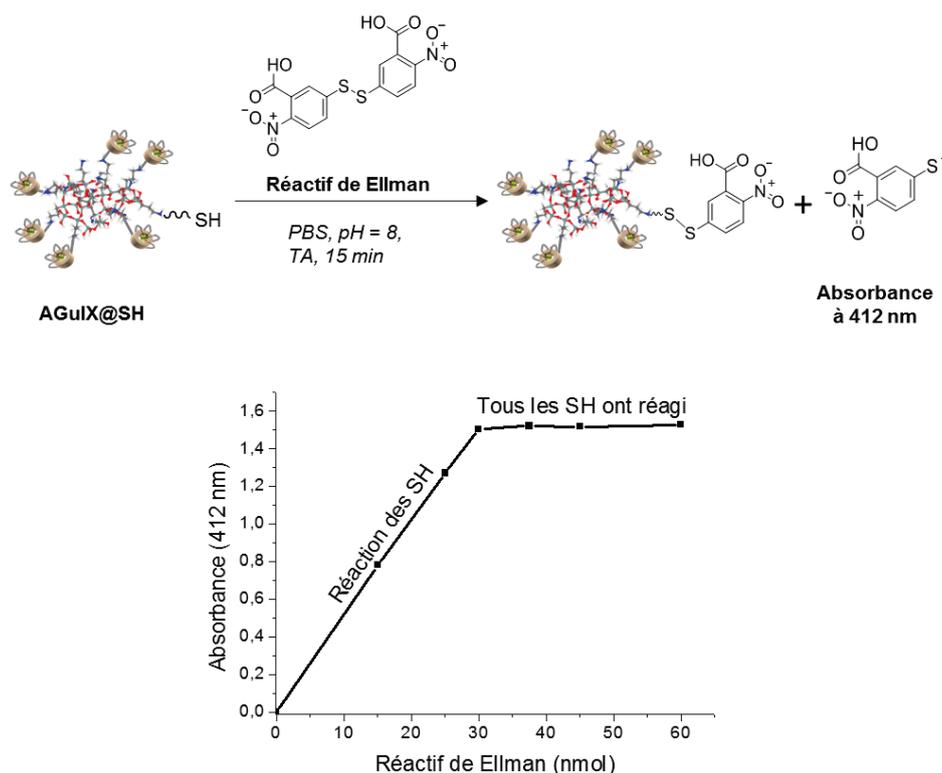


Figure 4-16 : Quantification du nombre de thiols par particule AGuIX@SH. Réaction des particules, $n(\text{Gd}^{3+}) = 0,3 \mu\text{mol}$, avec le réactif d'Ellman dans le PBS (0,1 M, pH = 8), 15 min, TA. La rupture de pente a lieu pour environ 30 nmol de réactif Ellman.

4.3.4 Synthèse des AGuIX@PS@peptide

4.3.4.1 Synthèse

Dans une deuxième étape, les particules AGuIX@SH réagissent spécifiquement avec le composé maléimido-PS@peptide pour former à un pH de 7,5 une liaison thioéther stable (**Figure 4-17**).^[105] Pour permettre la solubilité à la fois des particules et des dérivés de porphyrine, on ajoute progressivement le maléimido-PS@peptide aux particules dans un mélange de PBS et de DMSO à 40°C. La suspension

colloïdale est purifiée par filtration tangentielle ou centrifugation et dialyse pour éliminer le photosensibilisateur non greffé et le DMSO.

Mode opératoire : Le protocole détaillé est présenté plus loin dans la publication de la **partie 4.3.5** (p.185).

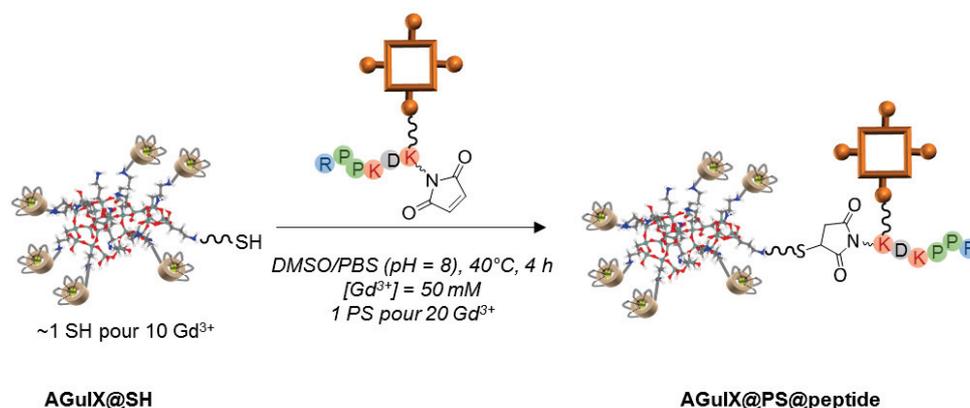


Figure 4-17 : Synthèse des AGuIX@PS@peptide par greffage du maléimido-PS@peptide sur les AGuIX@SH.

4.3.4.2 Caractérisations

Les particules AGuIX@PS@peptide ont des propriétés similaires à celles des particules AGuIX@PS de la partie précédente. Comme présenté dans le **Tableau 4-5**, elles possèdent un diamètre hydrodynamique d'environ 10 nm qui devrait permettre une élimination rénale. Là encore, la valeur présentée ici a été obtenue par DLS et n'est pas très précise à cause de l'absorbance du PS. Elle nous permet cependant d'avoir un ordre de grandeur de la taille des particules et de vérifier qu'il n'y a pas d'agrégation à cause de la fonctionnalisation. Cette stratégie de synthèse nous permet donc d'obtenir une solubilité dans l'eau satisfaisante et une bonne stabilité colloïdale. D'autre part, les propriétés magnétiques sont cohérentes avec leur utilisation comme agent de contraste positif en l'IRM ($r_1 = 16,1 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ et $r_2/r_1 = 1,6$ à 37°C et 1,4 T). La détection des tumeurs, l'optimisation du placement de la fibre et le suivi du traitement iPDT pourraient donc bien être réalisés par IRM.

Tableau 4-5 : Caractérisations des AGuIX@SH et AGuIX@PS@peptide.

Caractérisations	AGuIX@SH	AGuIX@PS@peptide
DLS	$D_H = 4,7 \pm 1,2 \text{ nm}$	$D_H = 9,0 \pm 2,3 \text{ nm}$
Relaxométrie (1,4 T, 37°C)	$r_1 = 14,5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; $r_2/r_1 = 1,6$	$r_1 = 16,1 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$; $r_2/r_1 = 1,6$

Comme pour la partie précédente, aucune modification du spectre d'absorbance du composé maléimido-PS@peptide n'a été détectée après greffage sur la particule ; l'intensité relative de chaque bande et leur longueur d'onde sont identiques (voir **Figure 4-18**). Après la construction de courbes d'étalonnage (pour la bande de Soret et les bandes Q), nous avons pu déterminer qu'il y avait environ 1 PS@peptide pour 15 Gd³⁺, soit 1 PS@peptide pour 1-2 particules. En revanche, comme pour les AGuIX@PS, on constate que le spectre d'émission de fluorescence est légèrement modifié.

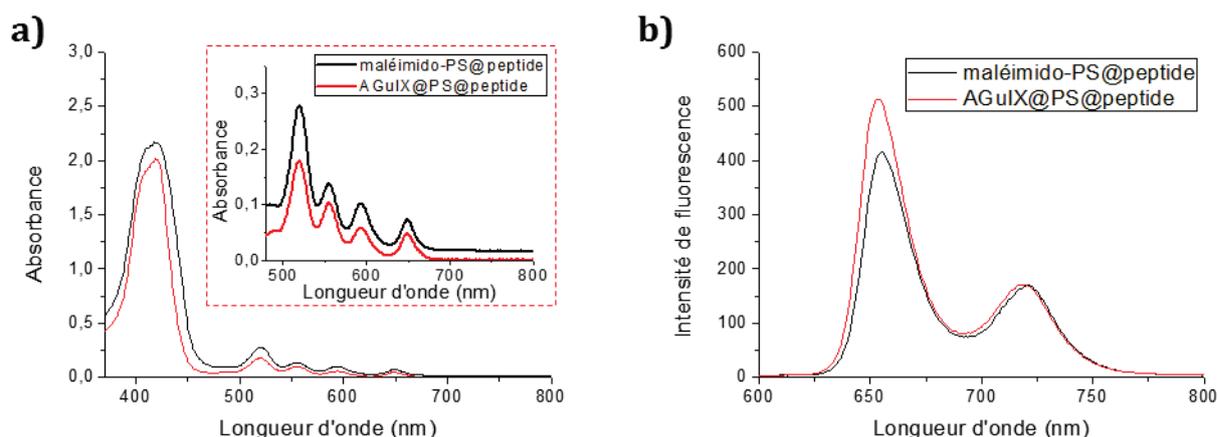


Figure 4-18 : (a) Spectre d'absorbance UV-visible dans l'eau du maléimido-PS@peptide et des particules AGuIX@PS@peptide. Aucune modification de l'allure (intensité relative et position des pics) n'est détectée après greffage.

(b) Spectre de fluorescence du composé maléimido-PS@peptide et des particules AGuIX@PS@peptide dans l'eau.

Longueur d'onde d'excitation : 420 nm, fentes en excitation et en émission : 5 nm, intervalle : 1 nm, moyenne sur : 0,1 s.

Les propriétés photochimiques des particules ont été obtenues par Ludovic Colombeau à l'université de Lorraine (Nancy, France). En raison de la faible solubilité du maléimido-PS@peptide dans l'eau, son rendement quantique de fluorescence (Φ_F) et d'oxygène singulet (Φ_Δ) n'ont pas pu être déterminés dans l'eau. Comme le montre le **Tableau 4-6**, ce n'est plus le cas lorsque le maléimido-PS@peptide est greffé sur les AGuIX ($\Phi_F = 10\%$ et $\Phi_\Delta = 28\%$) mettant en évidence le fait que les AGuIX permettent de solubiliser le PS dans l'eau. De plus, ces rendements sont semblables à ceux du maléimido-PS@peptide dans le DMSO ($\Phi_F = 13\%$ et $\Phi_\Delta = 20\%$). Le PS pourrait donc être photoactivé pour induire la mort des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*.

Tableau 4-6 : Propriétés photophysiques du PS, du maléimido-PS@peptide et des particules AGuIX@PS@peptide.

Composé	Solvant	λ_{exc} (nm)	Φ_F (%)	Φ_Δ (%)
maléimido-PS@peptide	DMSO / eau	419 / 416	13 / 0	20 / 0
AGuIX@PS@peptide	eau	416	10	28

La même stratégie de synthèse a été utilisée pour le couplage du composé PS@scramble (K(PS)RPKPD), tous les résultats sont similaires.

L'affinité des particules pour le récepteur NRP-1 et leur efficacité en VTP ont été testées *in vitro* et *in vivo* à l'Université de Lorraine (Nancy, France) par Noémie Thomas et Cédric Boura de l'équipe de Muriel Barberi-Heyob. Les résultats ont fait l'objet d'une publication acceptée dans *International Journal of Nanomedicine*.

4.3.5 Publication

4.3.5.1 Résumé des principaux résultats

La publication présente la synthèse et les caractérisations des particules AGuIX@PS@peptide présentées dans les paragraphes précédents ainsi que les résultats *in vitro* et *in vivo* concernant l'affinité des particules pour le récepteur NRP-1 et leur efficacité en PDT.

Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur des cellules endothéliales humaines de la veine de cordon ombilicale (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) qui sur-expriment le récepteur NRP-1. *In vitro*, en l'absence d'irradiation lumineuse, les nanoparticules fonctionnalisées ne présentent aucune cytotoxicité pour des concentrations en PS inférieure à 10 μM .

L'effet photocytotoxique des particules a été confirmé *in vitro* (**Figure 4-19-a**). Comme cela pouvait être attendu, l'augmentation de la dose (de 5 à 10 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) entraîne une diminution de la viabilité cellulaire. De meilleurs résultats ont été obtenus avec les AGuIX@PS@peptide par rapport aux autres particules, probablement grâce à une internalisation plus grande dans les cellules. Cela montre l'intérêt du peptide DKPPR pour le traitement PDT.

L'affinité moléculaire pour le récepteur NRP-1 a ensuite été étudiée par des tests de compétitions pour les différents peptides conjugués ou non au PS et aux particules (**Figure 4-19-b**). Les valeurs EC_{50} ont pu être déterminées et correspondent aux concentrations nécessaires en peptide pour détruire 50 % des liaisons entre le récepteur NRP-1 et un compétiteur (le facteur de croissance VEGF). Après greffage sur les particules, le peptide DKPPR est encore capable de se lier à la protéine NRP-1 et de déplacer le facteur VEGF. En effet, les particules AGuIX@PS@peptide présentent une affinité moléculaire élevée avec une valeur de EC_{50} de 19 μM . Cette valeur est de 81 μM (4 fois plus élevée) pour le maléimido-PS@peptide et de 176 μM (près de 10 fois plus élevée) pour les particules AGuIX@PS@scramble ce qui traduit une affinité plus faible.

L'affinité a également été évaluée *in vivo* après injection intraveineuse de particules à des souris portant des xénogreffes de tumeurs U87 (**Figure 4-19-c**). Les AGuIX@PS et AGuIX@PS@scramble sont libres dans les vaisseaux sanguins tumoraux 1 h après injection intraveineuse. Au contraire, les particules AGuIX@PS@peptide sont fixées aux parois des vaisseaux 1 h après injection et sont encore détectées dans la tumeur 24 heures après administration. Ces résultats sont prometteurs quant à l'utilisation des nanoparticules AGuIX@PS@peptide pour la VTP guidée par IRM.

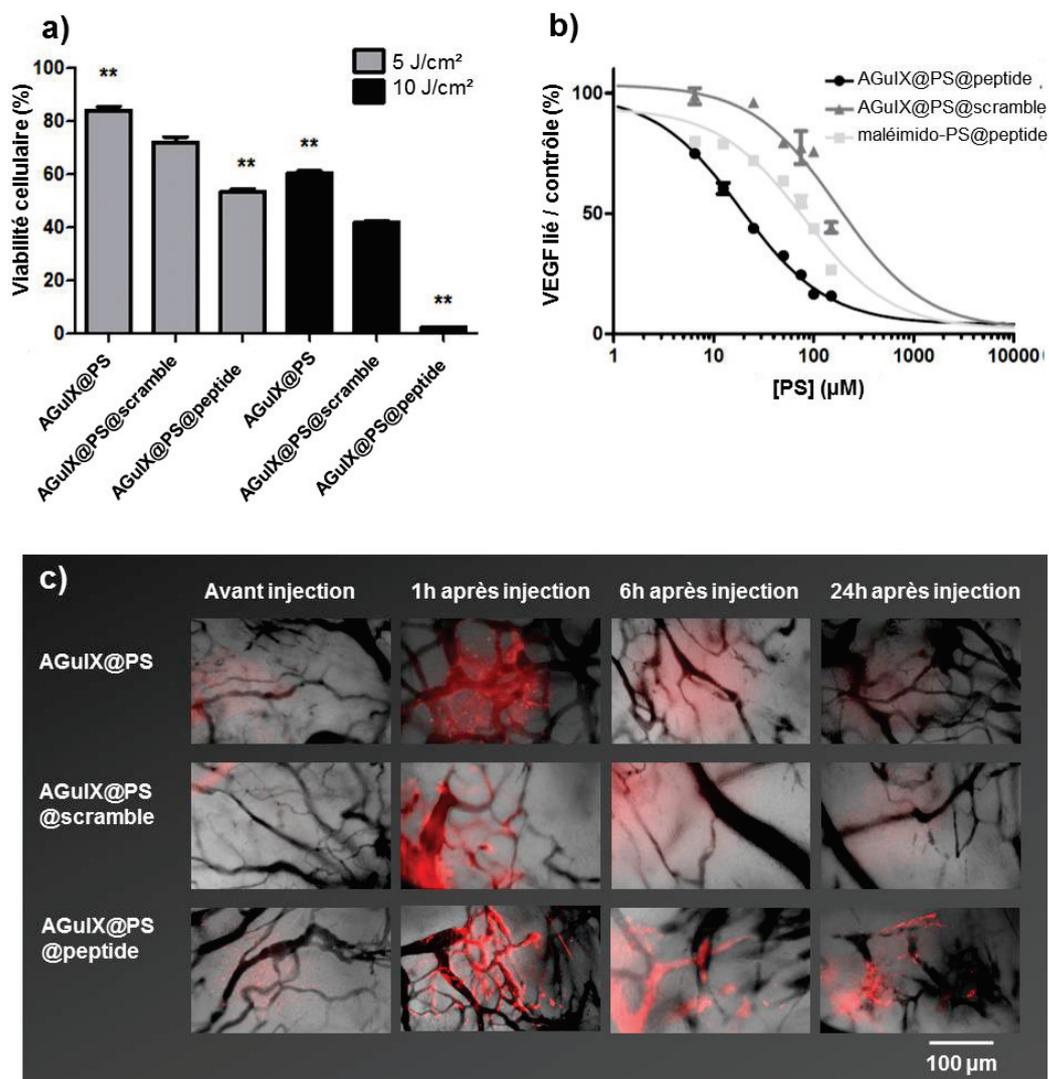


Figure 4-19 : (a) Effet photocytotoxique des NPs sur des cellules HUVEC. Les cellules sont exposées 4 h aux NPs ([PS] = 1 μM) avant lavage des milieux et irradiation. n = 6; * p < 0,05, ** p < 0,01 vs AGuIX@PS@scramble. Un meilleur effet photocytotoxique est obtenu avec les particules AGuIX@PS@peptide. (b) Affinité in vitro des NPs pour le récepteur NRP-1. Des concentrations croissantes de PS sont ajoutées à une solution contenant le récepteur NRP-1, du VEGF biotinyllé (5 ng/mL; 110 pM) et de l'héparine (2 μg/mL); moyenne sur 3 expériences. Les AGuIX@PS@peptide présentent une affinité moléculaire plus élevée que les autres composés. (c) Sélectivité in vivo évaluée avec des chambres dorsales sur des souris. Les images sont obtenues avant et après injection de NPs ([PS] = 6 μmol/kg). Les vaisseaux sanguins sont représentés en noir et le PS en rouge. Contrairement aux autres NPs, les particules AGuIX@PS@scramble sont fixées aux parois des vaisseaux de la tumeur.

4.3.5.2 *Publication*

1 **Article type: Full Paper**

2

3 **Title: Ultrasmall AGuIX Theranostic Nanoparticles for Vascular-Targeted Interstitial**
4 **Photodynamic Therapy of Glioblastoma**

5

6 **Authors:** *Eloïse Thomas, Ludovic Colombeau, Mickaël Gries, Thibaut Peterlini, Clélia Mathieu, Noémie*
7 *Thomas, Cédric Boura, Céline Frochot, Régis Vanderesse, François Lux,* Muriel Barberi-Heyob,*
8 *Olivier Tillement,*

9

10 E. Thomas, C. Mathieu, Prof. O. Tillement, Dr. F. Lux
11 Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institut Lumière Matière, F-69622, LYON, France
12 E-mail : francois.lux@univ-lyon1.fr

13

14 Dr. L. Colombeau, DR C. Frochot,
15 Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274, Université de Lorraine-CNRS, Nancy, France

16

17 M. Gries, T. Peterlini, Dr. N. Thomas, Dr. C. Boura, Prof. M. Barberi-Heyob
18 Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
19 CNRS, CRAN, UMR 7039, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

20

21 CR R. Vanderesse
22 Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR 7375, Université de Lorraine-CNRS, Nancy,
23 France

24

25 **Keywords:** AGuIX nanoparticles, PDT, vascular targeting

26

27

28 **Abstract:** Despite a combination of heavy treatments, glioblastoma outcome remains poor with frequent
29 local recurrences indicating that a more efficient and local therapy is needed. In this way, vascular-
30 targeted photodynamic therapy (VTP) could help tumor eradication by destroying its neovessels. In this
31 study, we design a polysiloxane-based nanoparticle combining a MRI contrast agent, a photosensitizer
32 and a new affin peptide (KDKPPR) targeting neuropilin-1(NRP-1) receptor overexpressed by angiogenic
33 endothelial cells of the tumor vasculature. This structure could enable the detection of the tumor and its
34 proliferating part by MRI, its treatment by VTP and the real time follow up of the therapy. The
35 photophysical properties of the photosensitizer as long as peptide affinity for NRP-1 recombinant protein
36 are preserved with the grafting on nanoparticles. Cellular uptake of nanoparticles by Human Umbilical
37 Vein Endothelial Cells (HUVEC) is increased by twice in comparison to nanoparticles without the
38 KDKPPR peptide or with a scramble peptide. Nanoparticles induce no toxicity in the dark but confer
39 phototoxicity to cells in combination with light irradiation. The *in vivo* selectivity, evaluated using a
40 skinfold chamber in mice, confirms that the nanoparticles were localized in the tumor vessel wall.

41

42

43

44

45 1. Introduction

46 Despite heavy treatments, glioblastoma multiform (GBM), the most frequent and malignant brain tumor,
47 still present an overall survival of only 14.6 months.^[1] Currently, treatments often combine surgery,
48 radiotherapy and chemotherapy but a wide majority of glioblastoma recur locally, upwards of 80% of
49 cases, leading to patient's death.^[2] This indicates that a more aggressive local therapy is needed for better
50 local control. However, resection can hardly be a complete and curative intervention because of the tumor
51 cells migration into the healthy brain parenchyma.^[1] Furthermore, radiotherapy leads to side effects
52 impacting health and quality of life. In this context, photodynamic therapy (PDT) appears to be an
53 interesting complementary approach to the previous one to prevent GBM local recurrence and improve
54 survival rate with the minimal side effect.^[2] PDT is based on the use of a photosensitizer (PS) activated
55 by light at an appropriate wavelength in order to induce cell death through the creation of reactive oxygen
56 species, especially singlet oxygen.^[3] PS should be not toxic on their own and should accumulate into
57 tumor tissue. Besides, the radius of interaction for singlet oxygen is inferior to 0.2 μm and the half life is
58 short, from 0.03 μs to 0.18 ms according to the medium, so cells are only damaged if they are in the close
59 proximity of the activated PS.^[4] This accurate light irradiation can be performed thanks to the application
60 of optical fibers which can be precisely located as for the interstitial PDT (iPDT), in which light can be
61 brought directly to the tumor mass.^[5] Several clinical trials have highlighted the interest of PDT for GBM
62 treatments.^[2,6-8] For phase II studies, we can mention the one of the Muragaki group on patients with
63 primary malignant parenchymal brain tumors including 13 GBM^[9] or the one of the Whelan group
64 (NCT01966809) for recurrent high grade gliomas where intraoperative PDT is used to eliminate cancer
65 cells that may be left after surgery.

66 PS are crucial for the efficiency of PDT; if a lot have been developed, issues remain and have to be
67 overcome.^[10] First, numerous PS are porphyrin derivatives and therefore poorly soluble in water, they
68 can aggregate in physiological media leading to a drastic decrease in singlet oxygen formation and
69 difficulties for injection. Moreover they often describe a low tumor selectivity *in vivo*.^[11,12] One solution
70 emerged during the last decades with the use of multifunctional nanoparticles (NPs) for PDT and presents
71 several advantages.^[13] The first one comes from the NPs tumor selectivity. They can specifically deliver
72 the PS into the tumor tissue by accumulating inside thanks to the enhanced permeability and retention
73 (EPR) effect with no extravasation into healthy tissues. Besides, their surface can be modified to target
74 a specific receptor overexpressed by tumor cells or angiogenic endothelial cells.^[14,15] Their composition
75 can be modulated to protect the PS, increasing its solubility in biological media, optimizing its lifetime
76 in plasma or avoiding enzymatic degradation. Finally, by adding an imaging modality to the NPs, they
77 can also be used at the same time for therapy-guided by imaging. It is therefore possible to detect the
78 tumor, to plan the treatment (appropriate PDT fiber position for example), to optimize the drug-light
79 interval before light exposure, and to follow the tumor response.^[16]

80 Different kinds of NPs have already been described for PDT.^[17-23] The one based on polysiloxane are
81 particularly interesting because their size and shape can be controlled, they are biocompatible and can be
82 easily functionalized.^[24] PS molecules can be encapsulated inside pores of a mesoporous NP or grafted
83 at the surface of a polysiloxane core. With this last strategy singlet oxygen doesn't need to diffuse out of
84 the NP and PS molecules don't risk to aggregate inside the pores. Our group recently described such kind

85 of NPs for iPDT of GBM.^[25] In this case, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin was grafted
86 at the surface of an ultrasmall NP called AGuIX. AGuIX is composed of a polysiloxane core surrounded
87 by DOTA@Gd³⁺ complexes (DOTA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) enabling
88 NP detection by MRI. AGuIX@PS nanoparticles were injected intravenously to nude rats bearing U87
89 intracranial glioblastoma. Their accumulation was followed by MRI, the tumor edges detected and the
90 fiber was precisely located into the tumor burden. Using AGuIX@PS, iPDT induced a statistically
91 significant therapeutic effect compared to control groups. It was also possible to determine early
92 predictive markers by MRI to discriminate between non-responding from responding animal.

93 Until now, most of the efforts in the development of tumor targeting PS have focused on the targeting of
94 markers overexpressed by tumor cells themselves. However, PDT effects are mediated not only through
95 direct killing of tumor cells but also through indirect effects, involving both initiation of an immune
96 response against tumor cells and destruction of the neovasculature.^[26-28] The latter effect may indirectly
97 lead to tumor destruction, following deprivation of life-sustaining nutrients and oxygen. This vascular
98 effect is thought to play a major part in the eradication of some vascularized tumors by PDT. Indeed,
99 when a tumor reaches a size of 2–3 mm³, oxygen and nutrients can no longer be supplied by diffusion
100 only, and angiogenesis is necessary to provide these vital elements to the tumor and support further
101 growth. We previously demonstrated that this effect would play a major role in the destruction of GBM
102 by PDT.^[11,29] The goal of the present study was to synthesize an ultrasmall theranostic NP presenting
103 high affinity for neovessels. In addition to a better PDT efficiency, we can also expect longer intra-tumor
104 retention and detection by MRI of the real tumor volume taking into account the proliferating part of the
105 tumor tissue. Overexpressed receptors specifically located on angiogenic endothelial cells are therefore
106 promising molecular target for PDT. Neuropilin-1 (NRP-1) is one of them, it is a receptor for vascular
107 endothelial growth factor (VEGF) and is overexpressed in several cancers included GBM^[30] The use of
108 a chlorin conjugated to a heptapeptide (ATWLPPR) as long as their combination with a NP have already
109 been described for vascular targeted PDT (VTP) and have shown very promising results *in vitro* and *in*
110 *vivo*.^[11,26,29,31-33] Recently, we evidenced that new peptides have an improved affinity for NRP-1, DKPPR
111 is one of them.^[34]

112 This article focuses on the design of a new AGuIX type nanoplatform for VTP using this DKPPR peptide.
113 For our research approach, a lysine (K) had to be added at the *N*-terminal side of the DKPPR peptide.
114 Subsequently, the KDKPPR peptide was coupled with a PS (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-
115 triphenylporphyrin) to the amine function of the lysine lateral side chain, producing PS@KDKPPR. This
116 conjugate was then used in the design of this new nanoplatform for VTP by grafting at the surface of
117 AGuIX particles (producing AGuIX@PS@KDKPPR). After the NPs synthesis and characterization,
118 their photophysical properties as well as their affinity for NRP-1, dark cytotoxicity, *in vitro* and *in vivo*
119 vascular selectivity and PDT efficiency were evaluated. All the results were compared with the one
120 obtained for a scramble NP (KRPKDP).

121

122

2. Results

The synthesis of AGuIX particles and AGuIX functionalized with 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tetraphenylporphyrin (AGuIX@PS) have already been described in the literature.^[25,35] In the present study and in order to maintain the affinity of the DKPPR peptide for the NRP-1 receptor, a new functionalization approach had to be developed. It consists in the conjugation of the KDKPPR peptide to the 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tetraphenylporphyrin (PS) followed by their grafting at the surface of the particles thanks to a maleimido-thiol reaction and producing AGuIX@PS@KDKPPR. The same protocole was also used with a scramble peptide containing the same amino acids in another order (maleimido-PS@KRPKPD, maleimido-PS@scramble) in order to verify the targeting specificity.

2.1 Synthesis and characterization of peptide derivatives

Maleimido-PS@KDKPPR and maleimido-PS@scramble compounds were synthesized by a Fmoc/*t*Bu solid-phase strategy (Figure 1). It is known that the lysine side chain provides a convenient handle to link a photosensitizer. For the synthesis of the maleimido-PS@KDKPPR and maleimido-PS@scramble, we choose to link first in liquid phase the 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-porphyrin succidiny ester (PS-NHS) already described in our team^[36] to the amine function of the lysine lateral side chain to form the Fmoc-Lys(PS)-OH (Figure 1). The coupling of Fmoc-Lys(PS)-OH and *N*- ϵ -maleimidocaproic acid was achieved on a H-peptide-Wang resin. During the coupling of Fmoc-Lys(PS)-OH and all the next steps, light exposure was minimized by sealing the reaction vessel in aluminium foil to limit the occurrence of unwanted side reactions. The maleimido-PS@KDKPPR and maleimido-PS@scramble peptides were cleaved from the resin with a mixture of trifluoroacetic acid, triisopropylsilane (TIPS) and water (92.5/2.5/5). The maleimido-PS@KDKPPR and maleimido-PS@scramble compounds were purified by preparative RP-HPLC. Characterizations of the compounds were confirmed by HRMS mass spectrometry and ¹H NMR experiments (see Supplementary Information). As shown in Figure 2.a, the photophysical properties of PS are preserved during the maleimido-PS@KDKPPR compound synthesis, indeed, the singlet oxygen and the fluorescence quantum yields remains almost identical. The affinity of the peptide for the NRP-1 receptor was estimated as EC₅₀ values (i.e. the concentration of competitor that displaced 50% of biotinylated VEGF₁₆₅ binding, using the medium effect method). It was found to be almost as good as the one of DKPPR alone (Figure 2.b). Indeed, we found an EC₅₀ value of 46 μ M for DKPPR, 2 μ M for KDKPPR, 1 μ M for the PS@KDKPPR and 81 μ M for the maleimido-PS@KDKPPR.

2.2 Synthesis and characterization of the nanoparticles for VTP

To introduce thiol group on the NP, a cyclic imidoester, the Traut's reagent was incubated with AGuIX NPs for 1 h at room temperature and at pH 8 (Figure 3.a). It reacted with the primary amines present at the surface of the particles in a ring-opening reaction resulting in a free sulfhydryl.^[37] The obtained AGuIX@SH particles were then purified by tangential filtration over a 5 kDa cut-off membrane. Thanks to the absorbance of Traut's reagent at 248 nm, the purification was followed by UV-visible spectroscopy. In order to quantify the number of thiol per particle, the Ellman's reagent was used.^[38] In slightly basic conditions, it can react with sulfhydryl groups and release the 5-thio-2-nitrobenzoic acid presenting a strong absorbance at 412 nm (Figure 3.b). Briefly, the quantification is based on the addition

165 of an increasing quantity of Ellman's reagent to AGuIX@SH particles. It can first be observed an increase
166 of absorbance at 412 nm because of the reaction of thiol with Ellman's reagent. When all the thiol
167 functions have reacted, a plateau is reached. The results give around one thiol for 10 Gd³⁺ (corresponding
168 to about one per particle).

169 In a second step, as shown on **Figure 4.a**, AGuIX@SH were functionalized with the maleimido-
170 PS@KDKPPR compound by creating a stable thioester bond. To obtain solubility of both NPs and
171 porphyrin derivatives, the maleimido-PS@KDKPPR was gradually added to the NPs in a mixture of
172 phosphate-buffered saline (PBS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) at 40 °C. Then, the colloidal
173 suspension was purified by tangential filtration over a 5 kDa cut-off membrane and by filtration over a
174 0.2 µm filter. As presented in **Figure 4.b**, the resulting AGuIX@PS@KDKPPR have an hydrodynamic
175 diameter around 10 nm suitable for renal elimination. Besides, magnetic properties are consistent with
176 their use as a positive contrast agent in MRI ($r_1 = 16.1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ per Gd³⁺ $r_2/r_1 = 1.6$ at 37 °C and 1.4 T).
177 No modification in the maleimido-PS@KDKPPR absorbance spectra was detected after grafting (see
178 Supplementary Information). Calibration curves indicate that one maleimido-PS@KDKPPR compound
179 is present for 15 Gd³⁺ (corresponding to 1-2 particles). However the fluorescence spectrum was found to
180 be modified (see Supplementary Information for the emission spectra after an excitation at 420 nm).
181 Because of the poor solubility of PS in water, its fluorescence (Φ_F) and singlet oxygen (Φ_Δ) quantum
182 yield as well as the one for maleimido-PS@KDKPPR compound cannot be determined in water. As
183 presented on Figure 4.b, this is no more the case when maleimido- PS@KDKPPR is grafted on AGuIX
184 ($\Phi_F = 10 \%$ and $\Phi_\Delta = 28 \%$) highlighting the fact that AGuIX enable the solubility of PS in water.
185 Besides, these yields are similar to the one of PS or maleimido-PS@KDKPPR in DMSO ($\Phi_F = 15$ and
186 13% and $\Phi_\Delta = 24$ and 20% respectively). The NPs obtained with the scramble peptide,
187 AGuIX@PS@scramble (AGuIX@PS@KRPKPD), present similar characteristics.

189 2.3 Nanoparticles affinity to NRP-1 protein

190 For measurements of the binding affinities of NPs for recombinant NRP-1 protein, a competitive binding
191 test using biotinylated VEGF₁₆₅ was performed. As biotinylated VEGF₁₆₅ binding to this receptor is
192 heparin dependent, the competitive binding experiments were always carried out in the presence of
193 heparin. As shown on **Figure 5**, AGuIX@PS@KDKPPR displaces the binding of biotinylated VEGF₁₆₅
194 to NRP-1 ($EC_{50} = 19 \mu\text{M}$) more effectively than maleimido-PS@KDKPPR and AGuIX@PS@scramble
195 (81 and $176 \mu\text{M}$, respectively).

197 2.4 *In vitro* dark cytotoxicity

198 A MTT test was used to evaluate the dark cytotoxicity of NPs for PS concentration ranging from 1 to
199 $10 \mu\text{M}$. A 24 h incubation of HUVEC in the absence of light exposure with $10 \mu\text{M}$ of NPs yielded no
200 cytotoxicity (see Supplementary Information).

202 2.5 *In vitro* and *in vivo* selectivity

203 The cellular uptake of NPs was examined using HUVEC, in the dark, at a PS non-cytotoxic concentration
204 of $1 \mu\text{M}$. As shown on the **Figure 6.a**, after 4 h of NPs incubation with HUVEC cells, the
205 AGuIX@PS@KDKPPR uptake was found to be twice higher than the one for AGuIX@PS or
206 AGuIX@PS@scramble thanks to the targeting properties of the DKPPR peptide. Indeed, the fluorescence

207 per cell is of $(7.85 \pm 1.89) \cdot 10^{-3}$, $(3.83 \pm 0.75) \cdot 10^{-3}$ and $(3.25 \pm 0.42) \cdot 10^{-3}$ respectively. However, no
208 statistically relevant difference in cellular uptake was observed after 24 h of incubation for AGuIX@PS
209 and AGuIX@PS@KDKPPR (fluorescence per cell of $(2.52 \pm 0.55) \cdot 10^{-2}$ and $(2.58 \pm 0.29) \cdot 10^{-2}$
210 respectively).

211 The vascular distribution of the NPs were performed by intravital microscopy in U87 xenograft tumors
212 implanted in nude mice skinfold chambers. *In vivo*, distribution of AGuIX@PS and
213 AGuIX@PS@scramble describe the same profile (**Figure 6.b**). They were found free in the blood vessel
214 at 1 h but disappeared from them at 6 h. AGuIX@PS@KDKPPR were bounded to the vessels walls of
215 the tumor at 1 h post intravenous injection. The fixation seems solid until 24h. These results look very
216 promising in the context of VTP.

217

218 **2.6 *In vitro* PDT efficiency**

219 **Figure 6.c** illustrates *in vitro* results concerning photocytotoxicity on HUVEC and light dose effects. As
220 expected, increasing light dose lead to a decrease in cell viability. Indeed the cell viability (%) for an
221 irradiation at $5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ was of 100 ± 6 , 84 ± 3 , 72 ± 5 and 53 ± 3 for the control, AGuIX@PS,
222 AGuIX@PS@scramble and AGuIX@PS@KDKPPR respectively. The cell viability (%) for an
223 irradiation at $10 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ was of 100 ± 3 , 60 ± 2 , 42 ± 1 and 2 ± 1 for the control, AGuIX@PS,
224 AGuIX@PS@scramble and AGuIX@PS@KDKPPR respectively. Better results were obtained with
225 AGuIX@PS@KDKPPR in comparison to other NPs showing the interest of the targeting DKPPR
226 peptide for PDT treatment. The effect of incubation time or concentration (of porphyrin) were also
227 studied (see Supplementary Information). When using a concentration of $10 \mu\text{M}$ (of porphyrin), the
228 specificity was lost as the cell viability fell for all the particles. As expected by the results of particles
229 uptake, it was found that after 4 h of incubation of particles with HUVEC cell, a higher phototoxic effect
230 was obtained for AGuIX@PS@KDKPPR compare to AGuIX or AGuIX@PS. However, no real
231 difference was detected for longer time between the different NPs.

232

233 **3. Discussion**

234 Many studies have shown that tumor vasculature targeting is effective in enhancing the therapeutic
235 efficacy of PDT. Several strategies exist as the use of antibodies or small synthetic peptides, that have
236 the advantages to be easier to prepare and handle.^[39,40] For example, Ichikawa *et al.* have synthesized
237 liposomes bearing a pentapeptide (APRPG) and a photosensitizer (benzoporphyrin derivative) for
238 angiogenic endothelial cells targeting.^[41] They showed that peptide-conjugated liposomal PS exhibited
239 strong suppression of tumor growth compared to those targeted with particles without APRPG. Besides,
240 there is a growing interest in the development of particles for VTP and imaging. Kopelman *et al.* were
241 the first to describe the synthesis of a non-biodegradable NP for the diagnosis and treatment of brain
242 cancer.^[42] It is composed of polyacrylamide, MRI contrast agents (for imaging), photosensitizers (for
243 PDT), PEG chains (for a better solubility and biodistribution) and a RGD peptide moiety (for the
244 targeting of neovasculature). *In vivo* experiments on rats bearing intracerebral 9L tumors showed that the
245 MRI contrast agent provided real-time tumor kill measurement. They showed that a 5 minutes PDT lead
246 to a significant tumor growth retardation and, in many cases, to tumor mass shrinkage.

247 Following this lead, the goal of our study was to design and to evaluate a new nanoplatform consisting
248 of a surface-localized tumor vasculature targeting NRP-1 and displaying PDT and imaging agents for
249 iPDT of GBM guided by interventional MRI. A NP called AGuIX was used, it is composed of
250 gadolinium chelates (DOTAGA, 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-
251 tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid) covalently grafted to a polysiloxane core; its synthesis
252 and properties have already been presented in the litterature.^[35,43-47] A photosensitizer, TPP (a
253 tetraphenylporphyrin), and a peptide (KDKPPR) targeting the NRP-1 receptor overexpressed by tumor
254 angiogenic vessels, were then grafted at the surface of this particle. The choice of the AGuIX particle
255 was driven by several points. First, it displays a hydrodynamic diameter below 10 nm, even after
256 functionalization, which is small enough to provide exclusive renal excretion and well adapted for further
257 clinical development. They can also accumulate in the tumor by EPR effect. So far, no toxicity has been
258 noticed during regulatory toxicity tests on rodents and monkeys and AGuIX has been recently accepted
259 for a phase I clinical assay (N° EudraCT : 2015-004259-30). The presence of gadolinium enables the
260 NPs to be used as a positive MRI contrast agent, it will therefore be possible to detect the tumor tissue,
261 to determine an accurate position for the PDT fiber and to follow up by non-invasive imaging
262 photodynamic efficiency.

263 In this study, it was decided not to graft separately the PS and the targeting peptide on the particle but to
264 graft directly the compound PS@KDKPPR. The major interest is to improve the synthesis reproducibility
265 by performing only one conjugation step on the particle, to conserve a good homogeneity for the
266 functionalized particles, and finally to quantify easily the number of targeting peptides on the particle
267 thanks to the strong absorbance of the PS. AGuIX particles present primary amines on their surface and
268 our group has recently published a study in which these groups were used to graft a TPP molecules on
269 AGuIX.^[25] In that case, the porphyrin used presented an NHS ester function that could react with an
270 amino group to form a covalent amid bond. In the present study, a new functionalization approach had
271 to be developed in order to maintain the affinity of the KDKPPR peptide for NRP-1 receptor. First, a
272 thiol function was added at the surface of the particles and reacted in a second step with the maleimido-
273 PS@KDKPPR compound to form a stable thioether bonds. Maleimide reactions are specific for thiols at
274 the pH of 7.5 used.^[37] With this strategy we can easily modulate the number of PS@KDKPPR per
275 particle, in our case one compound was added for 15 Gd³⁺ (corresponding approximately to one PS for
276 one or two NPs). With this ratio a good solubility and colloidal stability in aqueous solutions were
277 maintained and an appropriate PDT efficiency was obtained. Besides, the magnetic properties of the
278 functionalized particles ($r_2/r_1 = 1.6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ at 37 °C and 60 MHz) are consistent with their use as a
279 positive contrast agent in MRI to guide and follow PDT treatment. The same process was used for the
280 coupling of a scramble peptide (KRPKPD) coupled to the PS.

281 *In vitro*, in the absence of light irradiation, the functionalized NPs showed no cytotoxicity for
282 concentration of PS below 10 μM using HUVEC over-expressing NRP-1 receptor. The singlet oxygen
283 quantum yield was not altered by the grafting on the NPs showing that the PS molecules could be
284 photoactivated to yield photocytotoxic effects *in vitro* and *in vivo* ($\Phi_{\Delta} = 20 \%$ for maleimido-
285 PS@KDKPPR in DMSO and $\Phi_{\Delta} = 28 \%$ for AGuIX@PS@KDKPPR in water). This is consistent with
286 previous studies on this kind of NPs bearing chlorin or porphyrin photosensitizers^[11,25,29]. The way by
287 which the PS is added in or on the NP is really crucial because it can have an impact on its photophysical
288 properties and therefore on its photocytotoxic effect. Chu *et al.* designed silica-based NPs encapsulating

289 methylene blue. They showed that the singlet oxygen formation with the particle was lower than for the
290 methylene blue alone probably because of dimer's formation inside the particle.^[48] A comparative study
291 was also performed by Tang *et al.* to evaluate the encapsulation of methylene blue in two types of silica-
292 based NPs.^[49] One was prepared by the Stöber procedure and the other one using methyltrimethoxysilane
293 and phenyltrimethoxysilane as precursor. If the photosensitizer loading was higher with the Stöber
294 process, the singlet oxygen formation kinetic was lower. Our strategy describes different advantages for
295 the PS photophysical properties. As the PS is grafted at the surface of the particle, the singlet oxygen
296 does not need to diffuse in and out of the particles and the grafting prevents the PS aggregation. The
297 photocytotoxic effect was confirmed *in vitro* on HUVEC. Indeed, we observed that the presence the
298 peptide units (KDKPPR) onto the AGuIX@PS increased its PDT effect probably due to an improved
299 cellular uptake.

300 Molecular affinity was investigated for functionalized particles. Even after grafting on NPs, the KDKPPR
301 peptide was still able to bind NRP-1 protein. Indeed, AGuIX@PS@KDKPPR showed a relevant
302 molecular affinity of 19 μM whereas the maleimido-PS@KDKPPR demonstrated a molecular recognition
303 for NRP-1 protein of 81 μM (4 times higher) and the scramble particles, AGuIX@PS@scramble, had one
304 of 176 μM (nearly 10 times higher).

305 The affinity was also evaluated *in vivo* thanks to dorsal skinfold chamber studies performed after
306 intravenous injection of NPs in mice bearing U87 xenografts tumors. AGuIX@PS and
307 AGuIX@PS@scramble, were found free in the blood vessel at 1 h post intravenous injection but
308 disappeared from them at 6 h due to the leaky fenestration extravasation of the NPs out of the vasculature.
309 On the contrary, AGuIX@PS@KDKPPR particles were bounded to the vessels wall of the tumor 1 h
310 after intravenous injection and were still present 24 h after the administration. AGuIX@PS@KDKPPR
311 particles seem therefore really promising to detect the proliferating part of the tumor by MRI and in the
312 context of VTP. The long term targeting of the neo-vasculature seems an important asset for a further
313 fractionated treatment.

314

315 4. Conclusion

316 In this study, we designed a new AGuIX nanoparticle for MRI-guided VTP of GBM. It combines MRI
317 contrast agents, a PS and a peptide targeting NRP-1 receptor overexpressed in tumor vasculature. It was
318 shown that photophysical properties of the PS as long as the peptide affinity for NRP-1 are preserved
319 after the grafting onto NPs. Uptake of NPs by HUVEC is increased by twice in comparison to NPs
320 without peptide or with a scramble peptide. Besides, NPs show no evidence of toxicity in the dark but
321 confer phototoxicity to cells in combination with light irradiation. The *in vivo* selectivity, evaluated using
322 a skinfold chamber in mice, confirmed that the NPs are localized in the tumor vessel wall highlighting
323 their potential for VTP guided by MRI. Other experiments are in progress to fully describe the
324 biodistribution of these NPs and to evaluate their potential as MRI agent and PS. T1-weighted imaging
325 after intravenous injection of the targeted NPs will permit to define the real tumor volume taking into
326 account the proliferating part of the tumor tissues. Besides, the drug-light interval will be optimized in
327 real time according to the MRI signal intensity. Finally, the optimal irradiation scheme for iPDT will be
328 developed as part of efficiency, inflammation and vascular responses.

329

330 5. Experimental Section

331 *General*

332 All reactions involving porphyrin compounds were performed in the dark. Reactions were monitored by
333 thin-layer chromatography (TLC) using aluminium-backed silica gel plates (Macharey-Nagel
334 ALUGRAM® SIL >G/UV254). TLC spots were viewed under ultraviolet light. Product purifications
335 were performing using Silica Gel 60 (230-400 mesh) for column chromatography and Geduran 60 H
336 Silica Gel (63-200 mesh) for flash column chromatography. Reverse-phase high-performance liquid
337 chromatography (HPLC) was performed on Prostar HPLC (Varian). Analytical HPLC were done with a
338 Pursuit 5-C₁₈ column (2.5 μm, 4.6 × 150 mm, Varian) and preparative HPLC with Pursuit 5-C₁₈ column
339 (5 μm, 21.2 × 150 mm, Varian), both using a photodiode array detector (UV-Visible detection, Varian)
340 and a fluorescence detector (Varian).

341

342 *Chemicals*

343 Unless other stated, all chemicals were purchased as the highest purity commercially available and were
344 used without further purifications. 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (PS) was
345 purchased from Porphychem (France). The Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin, the Fmoc-Asp(OtBu)-Wang
346 resin, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc)-amino acids and HBTU were purchased from Iris biotech
347 GmbH (Germany). The *N*-hydroxysuccinimide, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, *N*-methylmorpholine
348 (NMM), *N*-methylpyrrolidinone(NMP), *N*-ε-maleimidocaproic acid, Trifluoroacetic acid (TFA) and
349 Triisopropylsilane (TIPS) were purchased from Alfa Aesar (United Kingdom). Sodium hydroxide
350 (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38 %), phosphate buffered saline (PBS, tablet),
351 dimethylsulfoxide (DMSO, >99.5 %) and Fmoc-Lys-OH.HCl were purchased from Aldrich Chemical
352 (France), Traut's reagent (2-iminothiolane hydrochloride, >97.0 %) was purchased from Alfa Aesar
353 (United Kingdom). Ellman's reagent (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), >98%) was purchased from
354 ThermoFisher Scientific. AGuIX particles were purchased from NH Theraguix (Lyon, France). All
355 products were used without further purification. Only Milli-Q water (ρ>18 MΩ.cm) was used for the
356 aqueous solution preparation.

357

358 *Synthesis of PS-NHS: 5-(4-carboxyphenylsuccinimide ester)-10,15,20-triphenylporphyrin*

359 In the dark and under inert atmosphere, PS-COOH (1 eq.) was dissolved in CH₂Cl₂ (20-50 mL) and *N*-
360 hydroxysuccinimide (3 eq.) and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (3 eq.) were added. The mixture was
361 stirred at 40 °C, for 4 h, under argon. Purification of the crude material was performed using a silica gel
362 column with DCM. PS-NHS was obtained, after recrystallization in DCM/hexane, as a purple solid with
363 a yield of 75 %.

364

365 *Synthesis of Fmoc-Lys(PS)-OH : 2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-6-[5-(4-carboxyphenyl)-* 366 *10,15,20-triphenylporphyrin]-hexanoic acid*

367 In the dark under a nitrogen atmosphere, to a solution of Fmoc-Lys-OH, HCl (82.8 mg, 0.20 mmol) in a
368 minimum of DMF were added *N*-hydroxysuccinimide activated porphyrin PS-NHS (152.4 mg, 0.20
369 mmol) and triethylamine (0.21 mmol, 28.3 μL) in 10 mL of CH₂Cl₂. After been stirred at ambient

370 temperature for 24 h, the solvent was removed and the crude material was purified by column
371 chromatography on silica gel using EtOH/CH₂Cl₂: 5/95 (v/v) as the eluent. Solvent was removed in vacuo
372 and the residue recrystallized using CHCl₃/*n*-hexane. The pure compound was isolated as a purple solid
373 (166.5 mg, 82 %).

374

375 *Synthesis of H-K(PS)DKPPR-OH*

376 The side chains of arginine, aspartic acid and lysine were respectively protected by 2,2,4,6,7-
377 pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), 5-*tert*-butyl ester (OtBu) and *N-tert*-butyloxy carbonyl
378 (Boc) groups. H-D(OtBu)K(Boc)PPR(Pbf)-Wang resin was synthesized on a multichannel peptide
379 synthesizer (Intavis AG, Köln, Germany), according to a classical Fmoc/*t*Bu solid phase methodology,
380 using a Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin on a 100 μmole scale. Double coupling was performed using a 3-
381 fold excess of *N*-Fmoc-amino acid, activation reagents HBTU (3 eq.), NMP (3 eq.) and NMM (9 eq.) in
382 DMF. The coupling of Fmoc-Lys(PS)-OH (2 eq. used) was the only one to be stirred for 5 days. Final
383 Fmoc protection was removed with piperidine. The resin obtained was dried under vacuum and then
384 cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5 %) for 2 h. The acidic resin was filtered and washed with 2
385 mL of TFA and 50 mL of CH₂Cl₂. The filtrate was dried under vacuum and lyophilized. The crude
386 product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100
387 % acetonitrile gradient in 25 min, followed by isocratic acetonitrile for 15 min. R_t = 17.8 min. Pure
388 product was isolated as a red powder (15.7 mg, 11 %).

389

390 *Synthesis of the maleimido-PS@KDKPPR (maleimido-K(PS)DKPPR-OH)*

391 The side chains of arginine, aspartic acid and lysine were respectively protected by 2,2,4,6,7-
392 pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), 5-*tert*-butyl ester (OtBu) and *N-tert*-butyloxy carbonyl
393 (Boc) groups. H-D(OtBu)K(Boc)PPR(Pbf)-Wang resin was synthesized on on a fully automated
394 ResPepXL peptide synthesizer (Intavis AG, Köln, Germany), according to a classical Fmoc/*t*Bu solid
395 phase methodology, using a Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin on a 150 μmole scale. Double coupling was
396 performed using a 3-fold excess of *N*-Fmoc-amino acid, activation reagents HBTU (3 eq.), NMP (3 eq.)
397 and NMM (9 eq.) in DMF. After Fmoc deprotection by piperidine, the coupling of Fmoc-Lys(PS)-OH
398 (1.5 eq. used) was performed in presence of HBTU (3 eq.), NMP (3 eq.) and NMM (9 eq.) in DMF and
399 the reaction mixture was stirred for 2 days. Final Fmoc protection was removed with piperidine and the
400 coupling of *N*-ε-maleimidocaproic acid (1.2 eq) was realized in the same conditions than the Fmoc-
401 Lys(PS)-OH coupling. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using
402 TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and
403 50 mL of CH₂Cl₂. The filtrate was dried under vacuum and lyophilized. The crude product was further
404 purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient
405 in 15 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 10 minutes. R_t = 17.8 min. Pure product was isolated
406 as a green powder (50 mg, 21 %).

407

408 *AGuIX@SH synthesis and purification*

409 AGuIX NPs (1 mmol of Gd^{3+}) were dispersed in PBS (0.2 M, pH = 8, 10 mL, $[Gd^{3+}] = 100 \text{ mM}$) for 1 h
410 at room temperature. The Traut's reagent (1 mmol) was dissolved in PBS ($[Traut's \text{ reagent}] = 50 \text{ mg.mL}^{-1}$)
411 and added slowly to the NPs. The mixture was let under stirring at room temperature for 1 h. Particles
412 were then purified by tangential filtration through Vivaspin® membranes (MWCO = 5 kDa) purchased
413 from Sartorius Stedim Biotech (France). The colloidal solution was introduced into Vivaspin tubes and
414 centrifuged; this step was repeated several times, by filling the tube centrifuging. The purification process
415 was followed by recording the absorbance spectra of the filtrated solution and stopped when no more
416 signal at 248 nm was detected (signal due to the non-reacted Traut's reagent, total purification time below
417 1 h). The Gd^{3+} yield was determined by ICP-OES and is of 80 %. The Traut yield was determined thanks
418 to the Ellman's reagent and is of 8 %.

419

420 *Thiol quantification*

421 Several samples ($V = 1 \text{ mL}$) containing the same amount of NPs ($n(Gd^{3+}) = 0.3 \text{ } \mu\text{mol}$) and an increasing
422 quantities of Ellman's reagent (0 to 60 nmol) were prepared in PBS (pH = 8). Samples were let in the
423 dark for 15 min to react and then their absorbance at 412 nm was measured using an UV-vis
424 spectrophotometer (Varian Cary50) and a Hellma semimicro cell, 1 cm light path, 1400 μL ,
425 manufactured from Suprasil quartz.

426

427 *AGuIX@PS@KDKPPR synthesis and purification*

428 AGuIX@SH NPs (500 μmol of Gd^{3+}) were diluted in PBS (0.2 M, pH = 8, 6 mL), then 1.4 mL of DMSO
429 were added and the mixture heated at 40 °C. The maleimido-PS@KDKPPR compound was dissolved in
430 DMSO (25 μmol , 15 mg.mL^{-1}) and added to the mixture in five additions, with a spaced out time of 30
431 min. The additions were made drop by drop, in the dark and under stirring. When all the maleimido-
432 PS@KDKPPR compound was added, the solution was let under stirring for 2 more hours
433 ($[Gd^{3+}] = 50 \text{ mM}$). The solution was then diluted into water to reach a ratio DMSO/water lesser than 4 %
434 and purified through tangential filtration as previously described. The particles solution was concentrated
435 to approximately $[Gd^{3+}] = 100 \text{ mM}$, the pH was adjusted to 7.4 and finally the solution was sterilized by
436 filtration through a 0.2 μm syringe filter in order to remove the large impurities. It was freeze-dried for
437 storage, using a Christ Alpha 1-2 lyophilizator. The Gd^{3+} yield was determined by ICP-OES and is of
438 45 %. The maleimido-PS@KDKPPR yield was determined by absorbance measurements and is of 60 %.
439 The same procedure is followed to synthesize AGuIX@PS@scramble.

440

441 *Affinity to NRP-1*

442 The surface of microplates (Dutscher) was coated with NRP-1 at 2 $\mu\text{g/mL}$ (R&D Systems, France) in
443 PBS, overnight at room temperature. The plates were blocked with PBS containing 0.5% bovine serum
444 albumin (blocking buffer) during 1 h at 37°C, to prevent non-specific interactions. Binding of compounds
445 to NRP-1 was assessed using 5 ng/mL of biotinylated VEGF-A₁₆₅ (R&D Systems) in blocking buffer
446 containing 2 $\mu\text{g/mL}$ heparin. Biotinylated VEGF-A₁₆₅ was added to the coated wells in competition with
447 the different compounds or excess of non labeled VEGF-A₁₆₅ (R&D Systems), as a positive control.
448 After a 2 h incubation at room temperature, the plates were washed and the amount of bound biotinylated
449 VEGF-A₁₆₅ stained with streptavidin horseradish peroxidase conjugate (R&D Systems). After 20 min at

450 room temperature, reaction was stopped by the addition of Stop Solution (R&D Systems). Optical
451 densities were measured at 450 nm. Results were expressed as relative absorbance to wells containing
452 only blocking buffer. Three wells per condition were used.

453

454 *Nanoparticles cellular uptake*

455 HUVEC obtained from Merck Millipore (Germany) were cultivated in EndoGRO-LS complete medium
456 (Merck Millipore, Germany) seeded in 24 wells plates at $5 \cdot 10^4$ cells/well. After one day, medium
457 containing NPs at the concentration of $1 \mu\text{M}$ was added. After 4 or 24 h, medium was removed; cells
458 were rinsed twice with cold PBS and trypsinized. After cell counting on a hemacytometer, cells were
459 centrifuged ($1200 \times g$ for 5 min) and re-suspended in lysis buffer (0.2 N NaOH, 0.5 % Triton X100). Cell
460 debris were removed by centrifugation ($3500 \times g$ for 15 min). Fluorescence (recorded at 650 nm following
461 excitation at 420 nm) was measured on a M200 pro spectrofluorimeter (TECAN, Austria). Results are
462 given as the fluorescence intensity by each cell. Experiments were carried out at least in triplicates.

463

464 *Dark cytotoxicity*

465 Cell survival after incubation with NPs in the dark was measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-
466 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, HUVEC were plated at an initial cell density of
467 5×10^4 cells/well in 24-well plates and allowed to attach overnight. Wells were rinsed twice with PBS
468 and filled with 500 μL HUVEC medium containing various concentrations of NPs (from 0.1 to $10 \mu\text{M}$).
469 After a 24 h incubation at 37°C , wells were rinsed twice with cold PBS and filled with 200 μL HUVEC
470 medium. Cell survival was measured by MTT assay as previously described.^[29] Experiments were carried
471 out in triplicates.

472

473 *Photocytotoxicity*

474 For photocytotoxicity, NPs at a final concentration of 1 or $10 \mu\text{M}$ were added in each well containing
475 HUVEC previously seeded at $5 \cdot 10^4$ cells/well. HUVEC were cultivated during 4 or 24 h kept in darkness.
476 Then, the cells were washed three times with growth medium to remove the un-internalized NPs. After
477 that, the cells were either exposed to various doses of light (5 or $10 \text{ J}/\text{cm}^2$) using a diode laser, Ceralas
478 PDT 652 (CeramOptec GmbH, Biolitec, Germany) to assess the photo-induced cytotoxicity of the NPs-
479 PS. Irradiation was carried out at 652 nm with an irradiance of $4.54 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Finally, cell survival was
480 measured by MTT assay 24 h post-irradiation as previously described.^[29] Each concentration of NPs was
481 tested in sixuplicate.

482

483 *In vivo experiments: Nanoparticles selectivity in a dorsal skinfold chamber*

484 All *in vivo* experiments were performed in accordance with the European Community guidelines
485 (2010/63/EU) for the use of experimental animals in the respect of the 3 Rs' requirements for Animal
486 Welfare (the project research n°APAFIS#2368-2015111611019576 was approved by the French
487 Ministry of Research). Animals were kept under standard conditions ($T = 21 \pm 1^\circ\text{C}$, hygrometry 60 ± 10
488 %, light on from 6 am to 6 pm) and had free access to standard diet and water. 8 to 10 weeks old *nude*
489 female mice were used for the experiments (Janvier, France).

490 U87 xenografts were obtained and implanted in skinfold chambers as previously described in Tylcz *et*
491 *al.*^[50] After 10 to 14 days after the tumor implantation, mice were divided into 3 lots: one lot received an

492 intravenous injection ($6 \mu\text{mol.g}^{-1}$, porphyrin equivalent) of NPs with DKPPR, one with the scramble
493 peptide and one without peptide.

494 Visualization of the vascular distribution of the NPs was performed of anesthetized mice bearing skinfold
495 chambers 1, 6 and 24h after the injection using the Nikon microscope AZ100 (Nikon, France) equipped
496 with a Digital Light DS-Qi1Mc camera, with a confocal device (Revolution DSD, Andor Technology,
497 United Kingdom).

498

499 *Statistical analysis*

500 All results were given as mean \pm standard error of the mean (SEM). Non-parametric Mann-Whitney test
501 was employed to determine the statistical significance with a limit set to $p < 0.05$ using GraphPad Prism
502 5 (GraphPad Software, US) *versus* AGuIX@PS@scramble.

503

504

505

506 **Acknowledgements:** This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale
507 Contre le Cancer and EURONANOMED II “PhotoBrain” project no. ANR-14-ENM2-0001-01. The
508 authors thankfully acknowledge Kévin Lemoine for his help on nanoparticles synthesis.

509

510 **Financial & competing interests disclosure**

511 F Lux, and O Tillement have one patent to disclose: WO2011135101. This patent protects some of the
512 nanoparticles described in this publication: AGuIX. The authors have no other relevant affiliations or
513 financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with
514 the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

515

516 **References**

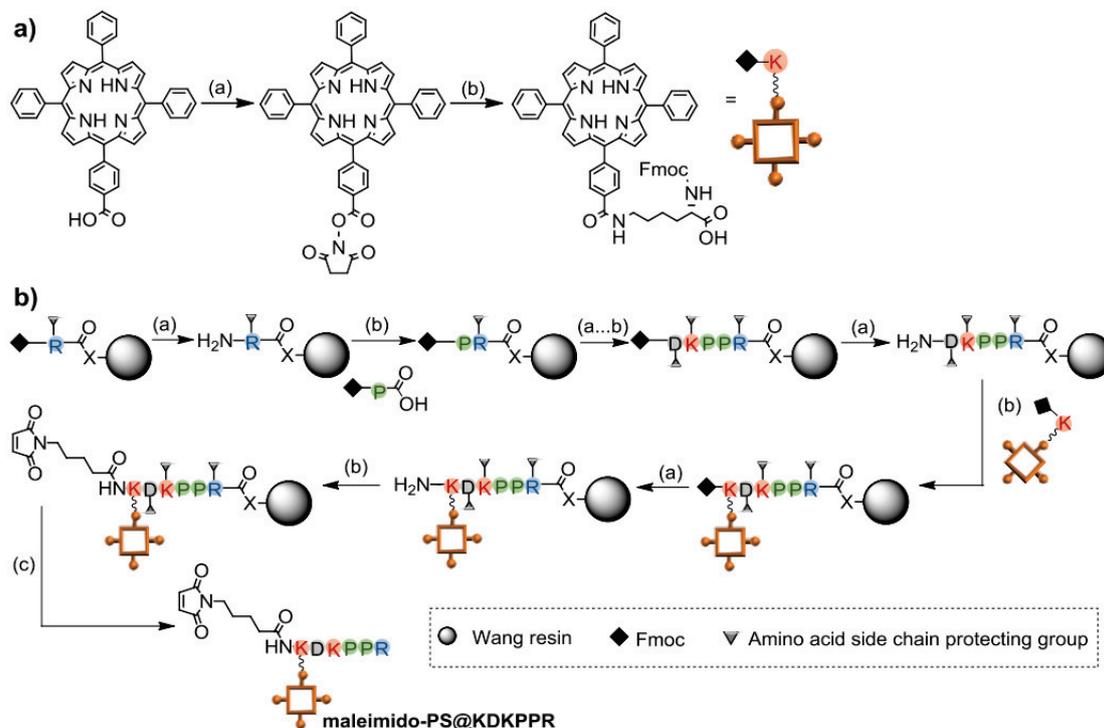
- 517 [1] S. Munthe, M. D. Sørensen, M. Thomassen, M. Burton, T. A. Kruse, J. D. Lathia, F. R. Poulsen,
518 B. W. Kristensen, *J. Neurooncol.* **2016**, *130*, 53.
- 519 [2] B. J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J. C. Vera, T. S. Mang, A. B. Foy, S. M. Lew, A. W. Girotti,
520 S. Jogal, P. S. LaViolette, J. M. Connelly, H. T. Whelan, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2015**,
521 *12*, 530.
- 522 [3] K. Hayashi, M. Nakamura, H. Miki, S. Ozaki, M. Abe, T. Matsumoto, T. Kori, K. Ishimura, *Adv.*
523 *Funct. Mater.* **2014**, *24*, 503.
- 524 [4] K. I. Du, R. Mick, T. m. Busch, T. c. Zhu, J. c. Finlay, G. Yu, A. g. Yodh, S. b. Malkowicz, D.
525 Smith, R. Whittington, D. Stripp, S. m. Hahn, *Lasers Surg. Med.* **2006**, *38*, 427.
- 526 [5] J. Swartling, O. V. Höglund, K. Hansson, F. Södersten, J. Axelsson, A.-S. Lagerstedt, *J. Biomed.*
527 *Opt.* **2016**, *21*, 028002.
- 528 [6] S. Eljamel, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, *7*, 76.
- 529 [7] D. Bechet, S. R. Mordon, F. Guillemain, M. A. Barberi-Heyob, *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 229.

- 531 [8] H. Kostron, In *Photodynamic Therapy*; Gomer, C. J., Ed.; Methods in Molecular Biology;
532 Humana Press, 2010; pp. 261–280.
- 533 [9] Y. Muragaki, J. Akimoto, T. Maruyama, H. Iseki, S. Ikuta, M. Nitta, K. Maebayashi, T. Saito, Y.
534 Okada, S. Kaneko, A. Matsumura, T. Kuroiwa, K. Karasawa, Y. Nakazato, T. Kayama, *J.*
535 *Neurosurg.* **2013**, *119*, 845.
- 536 [10] S. S. Lucky, K. C. Soo, Y. Zhang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1990.
- 537 [11] P. Couleaud, D. Bechet, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob, A.-C. Faure, S. Roux, O. Tillement,
538 S. Porhel, F. Guillemin, C. Frochot, *Nanomed.* **2011**, *6*, 995.
- 539 [12] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.-L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, *Trends*
540 *Biotechnol.* **2008**, *26*, 612.
- 541 [13] S. Wang, R. Gao, F. Zhou, M. Selke, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 487.
- 542 [14] Y.-E. L. Koo, G. R. Reddy, M. Bhojani, R. Schneider, M. A. Philbert, A. Rehemtulla, B. D.
543 Ross, R. Kopelman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1556.
- 544 [15] D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 2656.
- 545 [16] H. Gong, Z. Dong, Y. Liu, S. Yin, L. Cheng, W. Xi, J. Xiang, K. Liu, Y. Li, Z. Liu, *Adv. Funct.*
546 *Mater.* **2014**, *24*, 6492.
- 547 [17] Z.-T. Liu, L. Xiong, Z.-P. Liu, X.-Y. Miao, L.-W. Lin, Y. Wen, *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 1.
- 548 [18] L. Li, M. Nurunnabi, M. Nafiujjaman, Y. Y. Jeong, Y. Lee, K. M. Huh, *J. Mater. Chem. B* **2014**,
549 *2*, 2929.
- 550 [19] A. F. M. Ismail, M. M. Ali, L. F. M. Ismail, *J. Photochem. Photobiol. B* **2014**, *138*, 99.
- 551 [20] M. Yin, E. Ju, Z. Chen, Z. Li, J. Ren, X. Qu, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 14012.
- 552 [21] E. Secret, M. Maynadier, A. Gallud, A. Chaix, E. Bouffard, M. Gary-Bobo, N. Marcotte, O.
553 Mongin, K. El Cheikh, V. Hugues, M. Auffan, C. Frochot, A. Morère, P. Maillard, M.
554 Blanchard-Desce, M. J. Sailor, M. Garcia, J.-O. Durand, F. Cunin, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 7643.
- 555 [22] G. R. Reddy, M. S. Bhojani, P. McConville, J. Moody, B. A. Moffat, D. E. Hall, G. Kim, Y.-E.
556 L. Koo, M. J. Woolliscroft, J. V. Sugai, T. D. Johnson, M. A. Philbert, R. Kopelman, A.
557 Rehemtulla, B. D. Ross, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6677.
- 558 [23] W. Fan, W. Bu, J. Shi, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 3987.
- 559 [24] L. Colombeau, S. Acherar, F. Baros, P. Arnoux, A. M. Gazzali, K. Zaghdoudi, M. Toussaint, R.
560 Vanderesse, C. Frochot, **2016**, 113.
- 561 [25] M. Toussaint, S. Pinel, F. Auger, N. Durieux, M. Thomassin, E. Thomas, A. Moussaron, D.
562 Meng, F. Plénat, M. Amouroux, T. Bastogne, C. Frochot, O. Tillement, F. Lux, M. Barberi-
563 Heyob, *Theranostic* **2017**, *7*, 436.
- 564 [26] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.-L. Viriot, F.
565 Guillemin, M. Barberi-Heyob, *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 153.
- 566 [27] B. Zhang, H. Wang, Z. Liao, Y. Wang, Y. Hu, J. Yang, S. Shen, J. Chen, H. Mei, W. Shi, Y. Hu,
567 Z. Pang, X. Jiang, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4133.
- 568 [28] L. Tirand, T. Bastogne, D. Bechet, M. Linder, N. Thomas, C. Frochot, F. Guillemin, M. Barberi-
569 Heyob, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *75*, 244.
- 570 [29] H. Benachour, A. Sève, T. Bastogne, C. Frochot, R. Vanderesse, J. Jasniewski, I. Miladi, C.
571 Billotey, O. Tillement, F. Lux, M. Barberi-Heyob, *Theranostics* **2012**, *2*, 889.
- 572 [30] G. Graziani, P. M. Lacal, *Front. Oncol.* **2015**, *5*.

- 573 [31] N. Thomas, D. Bechet, P. Becuwe, L. Tirand, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemin, M.
574 Barberi-Heyob, *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *96*, 101.
- 575 [32] D. Bechet, L. Tirand, B. Faivre, F. Plénat, C. Bonnet, T. Bastogne, C. Frochot, F. Guillemin, M.
576 Barberi-Heyob, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 468.
- 577 [33] D. Bechet, F. Auger, P. Couleaud, E. Marty, L. Ravasi, N. Durieux, C. Bonnet, F. Plénat, C.
578 Frochot, S. Mordon, O. Tillement, R. Vanderesse, F. Lux, P. Perriat, F. Guillemin, M. Barberi-
579 Heyob, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 657.
- 580 [34] E. E. Kamarulzaman, R. Vanderesse, A. M. Gazzali, M. Barberi-Heyob, C. Boura, C. Frochot,
581 O. Shawkataly, A. Aubry, H. A. Wahab, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2016**, *1*.
- 582 [35] G. Le Duc, S. Roux, A. Paruta-Tuarez, S. Dufort, E. Brauer, A. Marais, C. Truillet, L. Sancey, P.
583 Perriat, F. Lux, others, *Cancer Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1.
- 584 [36] A. Stallivieri, L. Colombeau, G. Jetpisbayeva, A. Moussaron, B. Myrzakhmetov, P. Arnoux, S.
585 Acherar, R. Vanderesse, C. Frochot, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1.
- 586 [37] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*; Academic Press, 2013.
- 587 [38] M. Moser, T. Behnke, C. Hamers-Allin, K. Klein-Hartwig, J. Falkenhagen, U. Resch-Genger,
588 *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9376.
- 589 [39] C.-K. Lim, J. Heo, S. Shin, K. Jeong, Y. H. Seo, W.-D. Jang, C. R. Park, S. Y. Park, S. Kim, I.
590 C. Kwon, *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 176.
- 591 [40] F. Schmitt, L. Juillerat-Jeanneret, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.- Anti-Cancer Agents* **2012**,
592 *12*, 500.
- 593 [41] K. Ichikawa, T. Hikita, N. Maeda, S. Yonezawa, Y. Takeuchi, T. Asai, Y. Namba, N. Oku,
594 *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2005**, *1669*, 69.
- 595 [42] R. Kopelman, Y.-E. Lee Koo, M. Philbert, B. A. Moffat, G. Ramachandra Reddy, P.
596 McConville, D. E. Hall, T. L. Chenevert, M. S. Bhojani, S. M. Buck, A. Rehemtulla, B. D. Ross,
597 *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 404.
- 598 [43] S. Kotb, A. Detappe, F. Lux, F. Appaix, E. L. Barbier, V.-L. Tran, M. Plissonneau, H. Gehan, F.
599 Lefranc, C. Rodriguez-Lafrasse, C. Verry, R. Berbeco, O. Tillement, L. Sancey, *Theranostics*
600 **2016**, *6*, 418.
- 601 [44] A. Bianchi, D. Moncelet, F. Lux, M. Plissonneau, S. Rizzitelli, E. J. Ribot, N. Tassali, V.
602 Bouchaud, O. Tillement, P. Voisin, Y. Crémillieux, *NMR Biomed.* **2015**, *28*, 738.
- 603 [45] L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, E. Thomas, B. van der Sanden, J.-P. Klein,
604 B. Laurent, M. Cottier, R. Antoine, P. Dugourd, G. Panczer, F. Lux, P. Perriat, V. Motto-Ros, O.
605 Tillement, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2477.
- 606 [46] A. Mignot, C. Truillet, F. Lux, L. Sancey, C. Louis, F. Denat, F. Boschetti, L. Bocher, A. Gloter,
607 O. Stéphane, R. Antoine, P. Dugourd, D. Luneau, G. Novitchi, L. C. Figueiredo, P. C. de Morais,
608 L. Bonneviot, B. Albela, F. Ribot, L. Van Lokeren, I. Déchamps-Olivier, F. Chuburu, G.
609 Lemerrier, C. Villiers, P. N. Marche, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement, P. Perriat, *Chem. - Eur.*
610 *J.* **2013**, *19*, 6122.
- 611 [47] F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C.
612 Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. V. Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Jossierand, J.-L.
613 Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Rémy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat, O.
614 Tillement, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12299.

- 615 [48] Z. Chu, S. Zhang, C. Yin, G. Lin, Q. Li, *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 827.
616 [49] W. Tang, H. Xu, R. Kopelman, M. A. Philbert, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 242.
617 [50] J.-B. Tylcz, K. El Alaoui-Lasmali, E.-H. Djermoune, N. Thomas, B. Faivre, T. Bastogne,
618 *Biomed. Signal Process. Control* **2015**, *20*, 52.
619
620

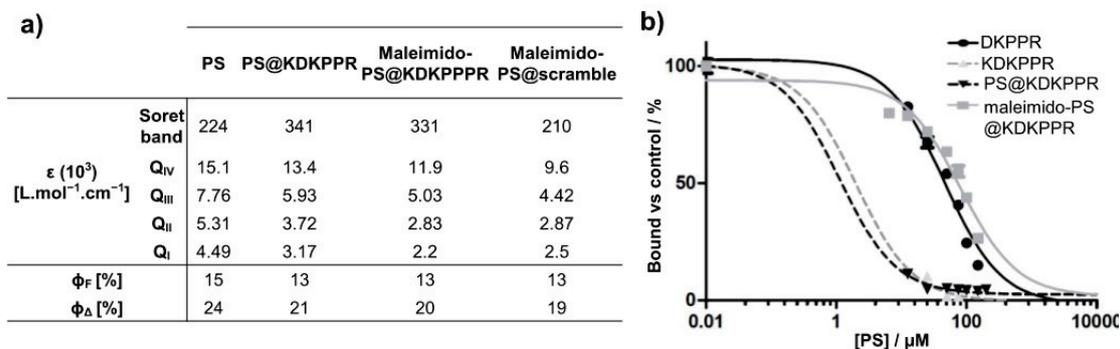
621



622

Figure 1. PS derivatives synthesis. **1.a)** Preparation of Fmoc-Lys(PS)-OH. (a) DCC, NHS, CH_2Cl_2 , 40°C , 4h, (b) Fmoc-Lys-OH.HCl, Et_3N , DCM, DMF, 0°C to RT, 24 h. **1.b)** Solid phase synthesis of the PS@KDKPPR compound. (a) N-deprotection: 20% piperidine in DMF; (b) coupling: HBTU/NMM/NMP; (c) cleaving: TFA/TIPS/ H_2O

627

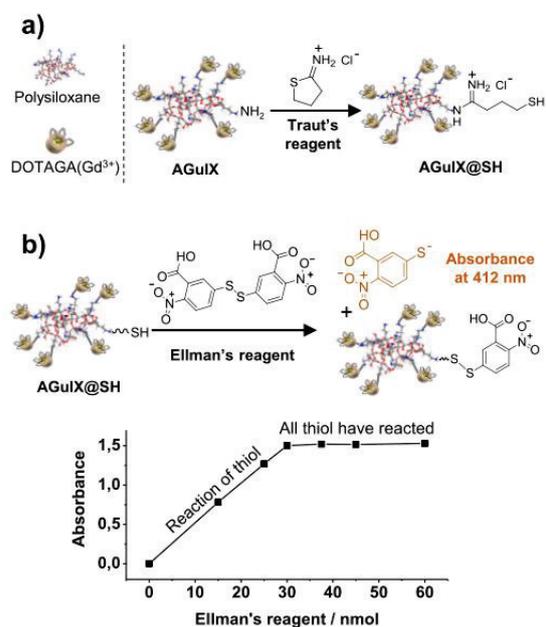


628

629

630 **Figure 2.** PS derivatives characterizations. **2.a)** Photophysical properties of PS derivatives
 631 (1) Absorption spectra at a single concentration of DMSO (stock solution prepared from 1 mg in 1 mL)
 632 and (2) fluorescence emission spectra at a single concentration of DMSO (equal Soret bands at 0.2 ± 0.05
 633 by dilution). (3) Fluorescence decay, (4) singlet oxygen emission spectra ($\lambda_{exc} = 419$ nm) and (5) singlet
 634 oxygen decay after excitation at a constant DMSO concentration (equal Soret bands at 0.2 ± 0.05 by
 635 dilution). **2.b)** Binding of the DKPPR peptide, the KDKPPR peptide, the PS@KDKPPR and the
 636 maleimido-PS@KDKPPR to recombinant NRP-1 protein. Binding of biotinylated VEGF (5 ng/mL;
 637 110 pM) to NRP-1 in the presence of 2 $\mu\text{g/mL}$ heparin was evaluated when increasing concentrations of
 638 compounds (6.5-200 μM) were added (data points show the mean \pm S.D., $n=3$). The values found for
 639 EC_{50} are 46 μM for DKPPR, 2 μM for KDKPPR, 1 μM for PS@KDKPPR and 81 μM for maleimido-
 640 PS@KDKPPR.

641

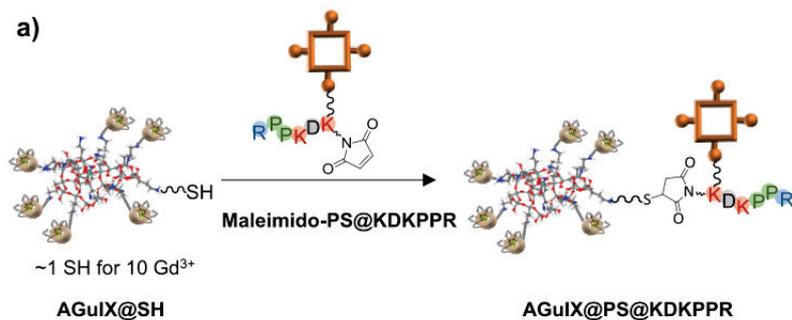


642

643

644 **Figure 3.** AGuIX@SH NPs: **3.a)** Reaction of the amino group with the Traut's reagent (PBS, pH=8,
 645 $[Gd^{3+}] = 80 \text{ mM}$, RT, 1 Traut's reagent for 1 Gd). **3.b)** Thiol quantification on AGuIX@SH using the
 646 Ellman's reagent and absorbance measurements ($n(Gd^{3+}) = 0.3 \text{ }\mu\text{mol}$ in PBS (pH=8), 15 min, RT). The
 647 change of slope indicates that there are around 30 nmol of thiol in the solution (1 SH for one particle).

648



b)

	AGuIX	AGuIX@SH	AGuIX@PS@KDKPPR	AGuIX@PS@scramble
Hydrodynamic diameter	$D_H = 3.3 \pm 0.8$ nm	$D_H = 4.7 \pm 1.2$ nm	$D_H = 9.0 \pm 2.3$ nm	$D_H = 10.6 \pm 2.3$ nm
Relaxometry (60 mHz, 37 °C)	$r_1 = 12.4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ $r_2/r_1 = 1.4$	$r_1 = 14.5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ $r_2/r_1 = 1.6$	$r_1 = 16.1 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ $r_2/r_1 = 1.6$	$r_1 = 15.4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ $r_2/r_1 = 1.6$
Φ_F [%]	-	-	10	9
Φ_Δ [%]	-	-	28	35

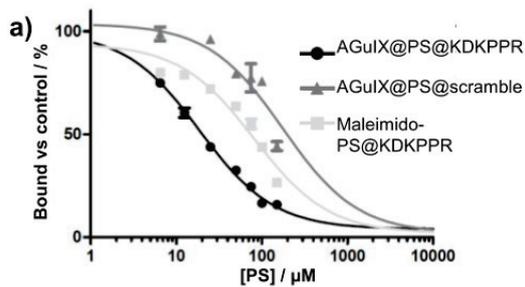
649

650

651 **Figure 4.** AGuIX@PS@KDKPPR NPs synthesis and characterizations: **3.a)** Grafting of the maleimido-
 652 PS@KDKPPR compound on AGuIX@SH particles (DMSO/PBS (pH = 8), 40 °C, 4 h, $[\text{Gd}^{3+}] = 50$ mM,
 653 1 PS for 2 SH). After purification, around one PS has been added for 1-2 NPs. For
 654 AGuIX@PS@scramble, the same procedure was followed and similar results were obtained. **3.b)** Size
 655 and magnetic properties of particles AGuIX, AGuIX@SH and AGuIX@PS@KDKPPR and
 656 AGuIX@PS@KDKPPR. All the NPs have a hydrodynamic diameter below or around 10 nm and
 657 magnetic properties consistent with their use as a positive contrast agent in MIR.
 658 AGuIX@PS@KDKPPR and AGuIX@PS@scramble present similar fluorescence quantum yield (Φ_F)
 659 and singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ) in D_2O .

660

661



b)

Compounds	EC ₅₀ [μM]
Maleimido-PS@KDKPPR	81
AGuIX@PS@KDKPPR	19
AGuIX@PS@scramble	176

662

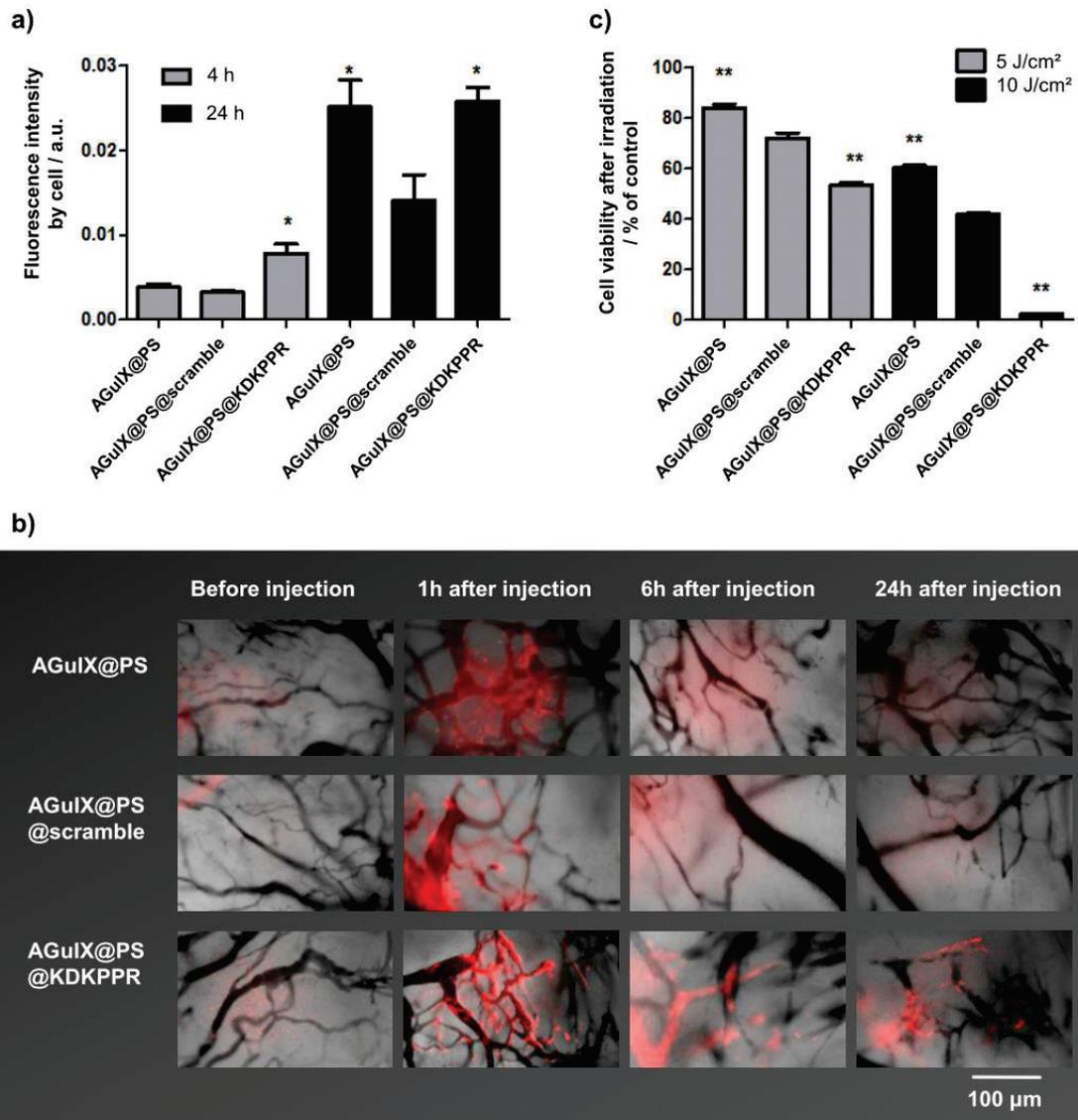
663

664 **Figure 5.** Binding of AGuIX@PS, AGuIX@PS@scramble and AGuIX@PS@KDKPPR to recombinant
 665 NRP-1 protein. Binding of biotinylated VEGF₁₆₅ (5 ng/mL; 110 pM) to NRP-1 in the presence of 2
 666 μg/mL heparin was evaluated when increasing concentrations of NPs (6.5-200 μM) were added (data
 667 points show the mean +/- S.D., n=3). AGuIX@PS@KDKPPR lead to a relevant affinity toward NRP-1
 668 receptor compared to maleimido-PS@KDKPPR or AGuIX@PS@scramble.

669

670

671



672

673

674 **Figure 6.** *In vitro* and *in vivo* selectivity and photodynamic efficiency of functionalized NPs on HUVEC.
 675 **6.a)** *In vitro* selectivity: uptake in HUVEC after 4 h and 24 h of incubation with functionalized NPs
 676 ([PS]=1 μM). **6.b)** *In vivo* selectivity: NPs selectivity using a dorsal skinfold chamber, before and 1, 6
 677 and 24 h after intravenous injection of AGuIX@PS, AGuIX@PS@scramble and
 678 AGuIX@PS@KDKPPR ([PS]= 6 μmol/kg). Blood vessels are represented in black and PS in red. On
 679 the contrary to AGuIX@PS or AGuIX@PS@scramble, thanks to the targeting peptide, the

680 AGuIX@PS@KDKPPR particles are fixed to the vessels walls of the tumor tissue. **6.c)** Influence of light
681 dose on cell viability after PDT (5 or 10 J.cm⁻²) following the exposition with NPs ([PS]=1 μM and
682 exposition time of 4 h); For *in vitro* experiments: n=3 or 6; * p <0.05, ** p<0.01 versus
683 AGuIX@PS@scramble. A statistically significant photocytotoxicity is obtained with
684 AGuIX@PS@KDKPPR.

4.4 CONCLUSION

L'objectif de ce chapitre était de développer des nanoplateformes pour la PDT interstitielle guidée par IRM des glioblastomes. Dans ce cadre, nous avons fonctionnalisé les particules AGuIX par des photosensibilisateurs de type porphyrine.

Dans un premier temps, une tétraphénylporphyrine non ciblante a été ajoutée sur les particules. Cela nous a permis d'améliorer la solubilité et la biodistribution du photosensibilisateur tout en conservant des propriétés photophysiques adaptées pour la PDT. Les nanoparticules obtenues s'accumulent dans les tumeurs après injection intraveineuse. L'IRM permet ensuite de détecter les tumeurs et de choisir le positionnement de la fibre optique afin de maximiser l'effet photocytotoxique des particules. Des études sur des rats portant des tumeurs cérébrales ont permis de mettre en évidence des marqueurs prédictifs précoces (coefficient de diffusion apparent, niveau de myo-inositol, choline et lipides) permettant de suivre l'efficacité du traitement et de discriminer rapidement les groupes répondants au traitement ou non. Ces informations permettent alors d'adapter au plus vite la suite de la thérapie.

Dans un deuxième temps, un peptide ciblant les cellules endothéliales des néovaisseaux des tumeurs a été ajouté à ces nanoplateformes AGuIX@PS. La VTP jouerait en effet un rôle important dans la destruction des tumeurs par PDT et permettrait d'améliorer l'efficacité du traitement. Les premières expériences *in vitro* et *in vivo* sont prometteuses quant au ciblage des vaisseaux des tumeurs. Des études plus poussées vont être réalisées afin de décrire complètement la biodistribution de ces nanoparticules et d'évaluer leur potentiel en tant qu'agent d'IRM et photosensibilisateur. L'imagerie pondérée T1 après injection intraveineuse de nanoparticules ciblantes devrait permettre de définir le volume tumoral réel en tenant compte de la partie proliférative des tissus tumoraux. De plus, l'intervalle entre l'administration des particules et l'irradiation pourra être optimisé en temps réel en fonction de l'intensité du signal IRM détecté dans les tumeurs. Afin de réaliser ces expériences *in vivo*, de grandes quantités de particules AGuIX@PS, AGuIX@PS@peptide et AGuIX@PS@scramble sont en cours de synthèse.

La plupart des photosensibilisateurs sont des molécules organiques mais quelques complexes inorganiques ont été développés pour la PDT. Les complexes de ruthénium (Ru) par exemple présentent l'avantage d'avoir une forte absorption et un long temps de demi-vie de l'état triplet ce qui permet d'éteindre efficacement l'oxygène. Un complexe de Ru a déjà été greffé sur les particules AGuIX, des expériences *in vitro* avaient validé leur utilisation en PDT.^[198] Prochainement, ce projet va être poursuivi ; les particules seront fonctionnalisées par des complexes de ruthénium et leur utilisation comme agent théranostic IRM/PDT sera évaluée *in vivo*.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Le cancer demeure l'une des premières causes de mortalité dans le monde et le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter. Il existe donc un fort intérêt pour le développement de nouveaux outils permettant à la fois d'améliorer le diagnostic et la thérapie de ces maladies. Dans ce contexte, mon laboratoire d'accueil a développé une nanoparticule appelée AGuIX (pour *Activation et Guidage de l'Irradiation X*). Cette nanoparticule est constituée d'ions gadolinium (Gd^{3+}) complexés par des ligands DOTAGA greffés de manière covalente à la surface d'un cœur de polysiloxane. Après injection dans l'organisme, ces particules peuvent s'accumuler dans les tumeurs avant d'être éliminées par les reins. Grâce à la présence des complexes de gadolinium, les particules (et donc les tumeurs) peuvent ensuite être détectées par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). De plus, les particules sont des agents radiosensibilisants, elles permettent d'augmenter la dose de rayons X délivrée aux cellules cancéreuses tout en épargnant les tissus sains. Ces nano-objets sont donc extrêmement intéressants à la fois pour l'IRM et la radiothérapie. Un essai clinique (phase I) a d'ailleurs débuté il y a quelques mois au CHU de Grenoble pour le traitement de métastases cérébrales grâce à l'association de la radiothérapie et des nanoparticules AGuIX.

Le but de cette thèse a été de développer une deuxième génération de particules AGuIX (voir **Figure 20**). On a cherché d'une part à améliorer l'effet radiosensibilisant de cette nanoplateforme et d'autre part à y ajouter de nouvelles fonctionnalités déjà utilisées en clinique : la scintigraphie et la photothérapie dynamique. Ces trois projets ont en commun une fonctionnalisation de la surface des particules par formation de liaisons covalentes entre les particules AGuIX et des molécules d'intérêt. Dans chaque cas, différentes techniques de caractérisation ont été mises en place pour obtenir une description précise de la structure des nano-objets obtenus (taille, pureté, propriétés magnétiques, composition,...).

Le premier projet auquel je me suis intéressée a consisté à augmenter l'effet radiosensibilisant des particules en y ajoutant des ions Bi^{3+} qui présentent un numéro atomique élevé ($Z = 83$). Le DOTA étant un très bon complexant de ces ions, l'idée était dans un premier temps d'augmenter le nombre de DOTA libres en surface de la particule. La stratégie la plus prometteuse que nous ayons mise au point consiste à greffer des chélates DOTA-NHS. On a alors pu obtenir environ 40 % de DOTA libres en surface des nanoparticules, ce qui nous a permis dans un second temps de complexer les ions Bi^{3+} . L'efficacité comme agent radiosensibilisant des particules AGuIX@DOTA@ Bi^{3+} obtenues a ensuite été évaluée *in vitro* et *in vivo*. Ces études ont été réalisées en collaboration avec l'université d'Harvard aux Etats-Unis pour un modèle de cancer du poumon. Face à des premiers résultats très prometteurs un brevet a été déposé entre la France et les Etats-Unis pour l'utilisation de ces particules pour la radiothérapie. Des études *in vivo* plus poussées vont être réalisées pour évaluer en détail l'intérêt de ces nanostructures et de leur transfert vers une application clinique.

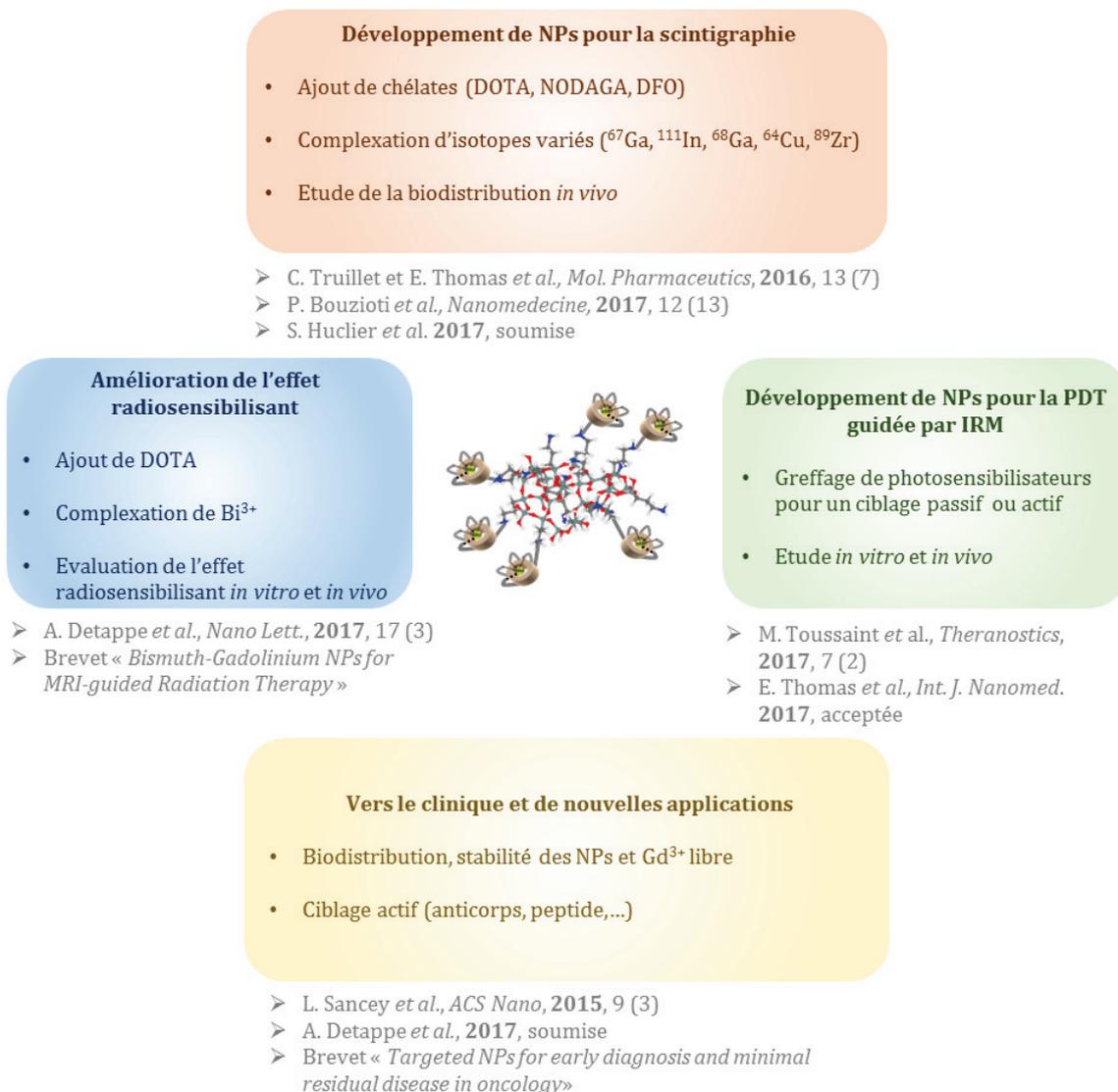


Figure 20 : Développement et caractérisations de nanoparticules de type AGuIX pour l'oncologie.

Un deuxième volet de mes projets a été consacré au développement de nanoparticules de type AGuIX pouvant être marquées par des radioisotopes afin de les utiliser pour la scintigraphie. Pour cela, plusieurs nanoplateformes ont été obtenues après fonctionnalisation par des ligands spécifiques des radiométaux visés. Nous avons pu optimiser leur radiomarquage par des isotopes pour la SPECT (^{111}In et ^{67}Ga) ou la PET (^{64}Cu , ^{68}Ga et ^{89}Zr) et nous avons obtenu des rendements de radiomarquage supérieurs à 80 %. Des études de biodistribution *in vivo* ont pu être réalisées en PET grâce à la mise en place de collaborations en Grèce (Institut Demokritos à Athènes) et aux Etats-Unis (Université de San Francisco et de Pittsburgh). Ces expériences ont montré le même profil de biodistribution pour les nanoparticules fonctionnalisées que pour les AGuIX avec une accumulation dans les tumeurs en quelques minutes et une rétention sur plusieurs jours ainsi qu'une élimination principalement rénale des particules. Le marquage par des isotopes possédant des temps de demi-vie très différents a permis d'étudier précisément la pharmacocinétique à différents temps. Nous avons aussi pu vérifier pour la première fois que ces nano-objets restaient intacts dans les tumeurs

après injection intraveineuse. Cette nouvelle génération de particules AGuIX nous offre donc la possibilité de complexer une large gamme de radioisotopes selon les applications visées ou leur disponibilité. Cette gamme peut d'ailleurs être agrandie par rapport à ce qui a été présenté dans le manuscrit. Par exemple, des études récentes s'intéressent au radiomarquage des nanoparticules AGuIX par du scandium 44 (^{44}Sc) et font l'objet d'une publication soumise au journal *Nuclear Medicine and Biology*. Ce radioisotope est présenté parfois comme un radioisotope alternatif du ^{68}Ga mais avec un temps de demi-vie plus long (3,97 h) et possède une grande stabilité avec le DOTA ($\log K = 27$).^[150]. D'autre part, face à l'intérêt du radiomarquage de cette nanoplateforme AGuIX, le laboratoire envisage de démarrer un essai clinique avec l'Institut Joliot Curie ou l'Institut Gustave Roussy à Paris concernant les particules AGuIX pour la PET couplée à l'IRM grâce aux nouveaux instruments réunissant ces deux fonctionnalités d'imagerie. Radiomarquées avec du ^{68}Ga ou du ^{64}Cu , les nanoparticules devraient permettre d'améliorer les diagnostics et traitements des cancers. Par exemple, il serait possible de quantifier précisément la quantité de nanoparticules dans les tumeurs et d'adapter les doses de radiothérapie en conséquence. Le couplage de l'IRM et de la scintigraphie permettrait de corréliser les cartes T_1 obtenues en IRM avec l'imagerie PET afin d'améliorer à terme la quantification par IRM. La détection de petites métastases, non visibles avec des techniques moins sensibles comme l'IRM, devrait de plus être possible.

Le dernier projet de cette thèse a consisté à développer des particules pour le traitement par PDT des glioblastomes. Pour cela nous avons fonctionnalisé les particules AGuIX avec des photosensibilisateurs de type porphyrine. Dans un premier temps, une tétraphénylporphyrine non ciblante (PS) a été ajoutée aux particules. Cela nous a permis d'améliorer la solubilité et la biodistribution du PS tout en conservant des propriétés photophysiques adaptées pour la PDT. Des études réalisées sur des rats porteurs de tumeurs cérébrales ont montré que les nanoparticules AGuIX@PS obtenues s'accumulaient dans les tumeurs après injection intraveineuse, l'IRM permettant ensuite de détecter les tumeurs et de choisir le positionnement de la fibre optique afin de maximiser l'effet photocytotoxique des particules. De plus, des marqueurs prédictifs précoces (coefficient de diffusion apparent, niveau de myo-inositol, choline et lipides) ont pu être définis grâce à l'IRM et permettent de discriminer les animaux répondant au traitement PDT ou n'y répondant pas. Ces données sont intéressantes puisqu'elles permettraient d'adapter rapidement la suite de la thérapie pour éradiquer les glioblastomes. Dans un deuxième temps, dans le cadre d'un projet ANR-EuroNanoMed (*PhotoBrain*), un peptide ciblant les cellules endothéliales des néovaisseaux des tumeurs a été ajouté aux nanoplateformes AGuIX@PS. Ce ciblage jouerait en effet un rôle important dans la destruction des tumeurs par PDT et permettrait d'améliorer l'efficacité du traitement. Les premières expériences *in vitro* et *in vivo* sont prometteuses quant au ciblage des vaisseaux des tumeurs. Des études plus poussées vont être réalisées afin d'évaluer le potentiel de ces nanoparticules fonctionnalisées en tant qu'agent de contraste IRM et de photosensibilisateur. La biodistribution, le schéma d'irradiation, l'effet vasculaire de la PDT ou encore la réponse inflammatoire vont ainsi être étudiés en détail. Pour réaliser l'ensemble de ces expériences *in vitro* et *in vivo*, des quantités importantes de nanoparticules sont en cours de synthèse et ce changement d'échelle de production a nécessité une optimisation des conditions de synthèse et de purification.

Tous ces travaux mettent en lumière la versatilité de la nanoplateforme AGuIX. Elle peut en effet être facilement fonctionnalisée par différentes molécules d'intérêt (chélates, molécules organiques hydrophobes,...) tout en conservant des propriétés physico-chimiques adaptées pour des applications biologiques (stabilité, diamètre,...). De ce fait, elle a pu être utilisée *in vivo* pour différentes applications thérapeutiques en oncologie.

En parallèle de ces différents projets, j'ai aussi mené des recherches afin de faciliter le passage en essai clinique de phase I des particules AGuIX pour le traitement de métastases cérébrales.

- Les nanoparticules ont ainsi été fonctionnalisées par différents fluorophores ce qui a permis une étude, publiée dans *ACS Nano* en 2015, de leur biodistribution par imagerie optique notamment au niveau des reins. De plus, cette étude a permis de mettre en lumière que des injections multiples de nanoparticules avaient uniquement un impact faible et temporaire sur la fonction rénale (la voie d'élimination de ces particules). Ces résultats étaient donc très encourageants dans l'optique d'un passage en clinique
- D'autre part, un effort a été réalisé afin de déterminer quelle était la stabilité des particules et de quantifier la quantité d'ions Gd^{3+} libres résiduels présents dans les lots cliniques. La mise en place de techniques spécifiques basées sur des protocoles d'HPLC couplée à l'ICP-Masse m'a permis d'obtenir de premiers résultats répondant à des questions cruciales de l'ANSM. Grâce à une collaboration avec l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Lyon, ces travaux vont maintenant être approfondis et les techniques optimisées pour préparer la suite des essais cliniques et l'analyse en routine des lots cliniques de nanoparticules AGuIX.

Ma thèse a été l'occasion de développer de nouvelles voies de fonctionnalisation des nanoparticules AGuIX ce qui permet d'ajouter à leur surface une grande diversité d'agents chimiques ou biologiques : petites molécules, peptides, protéines ou anticorps. Ceci ouvre la porte à des applications variées, notamment dans le domaine du ciblage actif. Dans ce manuscrit, l'ajout de fonctions thiol pour le greffage de PS et de peptide, ciblant les néovaisseaux des tumeurs, a par exemple été décrit. J'ai aussi développé l'utilisation de bras espaceurs pour la fonctionnalisation d'anticorps. Cette voie de greffage a fourni des résultats prometteurs, et confidentiels, quant à la détection précoce de certains types de cancers. Cela a conduit le laboratoire à commencer la rédaction d'un brevet en partenariat avec l'université d'Harvard aux Etats-Unis. Au-delà d'augmenter l'accumulation ou la rétention des particules dans les tumeurs, les stratégies venant d'être présentées permettront, dans les années qui viennent, d'utiliser les nanoparticules AGuIX pour le diagnostic et/ou la thérapie de tumeurs non solides ou d'autres pathologies.

Annexes

- Annexe A.1 : les NPs AGuIX et AGuIX fonctionnalisées. Synthèse et caractérisations. (p.219)
- Annexe A.2 : passage des NPs AGuIX en clinique (p.224)
- Annexe A.3 : fonctionnalisation des NPs AGuIX par des fluorophores (p.234)
- Annexe A.4 : liste des publications et brevets acceptés ou soumis (p.251)

5 ANNEXES

5.1 ANNEXE A.1 : LES NPs AGuIX ET AGuIX FONCTIONNALISEES. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATIONS.

Cette annexe rassemble les différentes techniques (appareils et protocoles) utilisées au cours de la thèse pour les synthèses et caractérisations des particules de type AGuIX. En fin de partie, la méthode mise en place pour quantifier le nombre d'amines primaires sur les particules est présentée.

5.1.1 Techniques de synthèse et de caractérisation

- **Préparation, purification et stockage des particules**

Pour la préparation d'une solution aqueuse de nanoparticules, seule de l'eau Milli-Q est utilisée. Les nanoparticules sont en général redispersées 1 h à température ambiante et à une concentration $[Gd^{3+}] = 100$ mM avant toute utilisation. Les purifications sont réalisées par filtration tangentielle sur des Vivaspin de Sartorius Stedim Biotech (France). Les membranes utilisées sont en polyéthersulfone et présentent un seuil de coupure de 3 ou 5 kDa. Les particules sont conservées sous forme de poudre lyophilisée ; la lyophilisation étant réalisée sur des solutions de pH 7,4 avec un lyophilisateur Christ Alpha 1-2.

- **ICP**

La détermination de la concentration précise en gadolinium est réalisée par spectrométrie à plasma induit et émission optique (ICP-OES : *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). Le principe repose sur l'ionisation d'échantillons en les injectant dans un plasma d'argon. Les éléments excités vont ensuite émettre des photons dont l'énergie est caractéristique des éléments en question. La lumière émise est enregistrée et permet de quantifier leur quantité en solution.

Tout d'abord, les particules sont dégradées pendant une nuit dans 5 mL d'eau régale (HNO_3 67 % mélangé avec HCl 37 %, 1:2; v:v) à 80°C et à une concentration estimée en gadolinium de 0,01 mM, 0,02 mM ou 0,05 mM. Puis les échantillons sont dilués dans une solution de HNO_3 à 5 % pour atteindre 50 mL et les échantillons sont filtrés sur un filtre de 0,2 μ M. Une courbe étalon est réalisée dans une solution de HNO_3 à 5 % à partir d'une solution étalon commerciale à 1000 ppm en Gd. Pour chaque particule, la composition en Gd^{3+} est obtenue par moyenne sur les trois échantillons préparés (à 0,01 mM, 0,02 mM et 0,05 mM).

- **Diffusion dynamique de la lumière (DLS)**

C'est une technique d'analyse permettant de donner le diamètre hydrodynamique de particules de tailles comprises entre 1 et 500 nm en suspension dans une solution. Lorsqu'une lumière laser est envoyée sur la

solution, elle est diffusée (diffusion Rayleigh). Le nombre important de particules dans la solution donne lieu à des interférences constructives ou destructives et par suite à une figure d'interférence particulière. Les particules sont en mouvement brownien dans la solution, la figure va donc évoluer au cours du temps. L'évolution dépend de la vitesse des particules, elle-même liée à leur taille. On a ainsi accès à la distribution des diamètres hydrodynamiques (donnés en nombre dans le manuscrit) pour les différents lots de nanoparticules.

Les mesures sont réalisées en général avec un laser de longueur d'onde 633 nm (Zetasizer NanoS, laser He-Ne, de Malvern Instruments). Dans quelques cas, lorsque les particules absorbent à 633 nm, les mesures sont réalisées avec un laser de longueur d'onde 532 nm (Nano S, laser He-Ne de Malvern Instruments). Les mesures sont faites à un pH = 7,4 et pour une concentration $[Gd^{3+}] = 10$ mM, la dilution est réalisée juste avant la mesure avec de l'eau Milli-Q.

- **Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**

C'est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange. L'échantillon à analyser est poussé par un liquide, la phase mobile, dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. Dans notre cas, nous sommes en phase stationnaire inverse, c'est-à-dire que la colonne utilisée est apolaire et hydrophobe, la phase mobile est, elle, un gradient d'acétonitrile dans l'eau. Plus les molécules sont hydrophobes ou de tailles importantes et plus elles sont retenues sur la colonne. La détection peut se faire simultanément en absorbance et en fluorescence, les longueurs d'onde sont choisies suivant les molécules étudiées. Cette technique permet de s'assurer de l'efficacité de la purification par l'absence de sous-produits de dégradation (temps de rétention autour de 3 minutes contre 12-14 min pour les particules). Dans le manuscrit, la pureté indiquée est déterminée par le chromatogramme obtenu en HPLC pour une absorbance à 295 nm.

L'appareil utilisé est une HPLC Prominence UFLC Shimadzu équipée d'un contrôleur de système CBM-20 A, d'une pompe LC-20 AD, d'un four à colonne CTO-20A, d'une colonne Jupiter C4 (150 x 4,60 mm; 5 μ m; 300 Angström; Phenomenex), d'un détecteur UV-visible SPD-20A et d'un détecteur de fluorescence RF-20A. Pour les analyses HPLC, les échantillons (20 μ L) sont d'abord élués pendant 7 min à 1 mL.min⁻¹ dans 99 % d'un solvant A et 1 % de C (A : eau Milli-Q/acide trifluoroacétique TFA 99,9 : 0,1 v : v; C : acétonitrile/acide trifluoroacétique TFA 99,9 : 0,1 v : v). Puis, les échantillons sont élués avec une quantité de C dans A variant de 1 % à 90 % en 15 min. La concentration en C est maintenue pendant 7 min. Ensuite, la concentration de C est diminuée jusqu'à 1 % en 1 min. Cette concentration est maintenue durant 8 min afin de re-équilibrer le système. Avant chaque analyse, une ligne de base est réalisée en injectant de l'eau Milli-Q. Si les échantillons nécessitent une dilution, elle est réalisée juste avant analyse dans de l'eau Milli-Q.

- **Relaxométrie**

La relaxométrie consiste à calculer les temps de relaxation longitudinaux T_1 et transversaux T_2 d'une solution. Le gadolinium étant paramagnétique, les deux temps de relaxation des protons de l'eau sont raccourcis en sa présence. Grâce à ce phénomène, les complexes de gadolinium peuvent servir d'agents de

contraste en IRM. Les vitesses de relaxation longitudinale et transversale sont liées aux relaxivités (ou relaxivités) longitudinale (r_1) et transversale (r_2). Celles-ci dépendent de plusieurs paramètres et notamment elles augmentent lorsque la taille ou la rigidité des particules sur lesquelles se situe le gadolinium augmentent. Les mesures nous donnent les temps de relaxation $T_{i,mesuré}$ de la solution, à partir de cela les relaxivités sont mesurées par la formule suivante :

$$\frac{1}{T_{i,mesuré}} = \frac{1}{T_{i,0}} + r_i \cdot [Gd^{3+}]$$

où r_i ($s^{-1}.mM^{-1}$) est la relaxivité, $[Gd^{3+}]$ (mM) est la concentration en gadolinium, $T_{i,mesuré}$ (s) est le temps de relaxation mesuré en présence de nanoparticules et $T_{i,0}$ (s) est le temps de relaxation en l'absence de particules.

La mesure des temps de relaxation est effectuée sur un relaxomètre Brüker Minispec MQ60 NMR de 60 MHz, 1,4 T et à 37°C.

- **Zétamétrie**

Le potentiel zéta représente la charge des particules. Il permet d'évaluer leurs interactions, la stabilité des suspensions ou de vérifier qu'une fonctionnalisation a bien eu lieu. Le principe repose sur l'application d'un champ électrique à des particules chargées en solution. Sous l'effet du champ électrique, les particules vont se mettre en mouvement. Celui-ci est étudié grâce à la diffusion de la lumière. En effet, la fréquence de la lumière diffusée dépend de la vitesse des particules (effet Doppler). La détermination de la vitesse permet ensuite de calculer le potentiel zéta des particules.

Dans notre cas, les mesures sont réalisées avec un appareil Zetasizer NanoS de Malvern Instruments. Elles sont faites sur des solutions contenant 10 mM de NaCl et 10 mM de Gd^{3+} (la dilution est réalisée juste avant le début des mesures). L'évolution du potentiel zéta en fonction du pH est obtenue par auto-titration en utilisant une unité MPT2.

- **Absorbance UV-visible et luminescence**

Les mesures d'absorption UV-Visible sont réalisées avec un spectrophotomètre UV-Visible Varian Cary50 et des cuves avec un chemin optique de 1 cm. Les mesures de luminescence (fluorescence ou phosphorescence) sont réalisées avec un spectrophotomètre Varian Carry Eclipse. La luminescence repose sur l'utilisation d'une source lumineuse externe d'énergie appropriée pour exciter une substance chimique. En se désexcitant, elle émet à son tour un photon, d'énergie plus faible. On distingue la fluorescence (excitation vers un état singulet excité, éventuelle désexcitation vers l'état singulet excité S1 et retour à l'état d'équilibre singulet S0) de la phosphorescence (excitation vers un état singulet excité, éventuelle désexcitation vers l'état excité S1, conversion intersystème vers un état triplet T1 et retour vers l'état d'équilibre singulet S0).

• Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres infrarouges sont obtenus avec un appareil IRAffinity-1 Shimadzu avec une plateforme ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared) dans la gamme de 550 à 4000 cm^{-1} en général. Les solutions de particules ($[\text{Gd}^{3+}] = 100 \text{ mM}$) sont acidifiées par ajout de HCl, puis elles sont séchées à l'étuve à 80°C. Les spectres sont réalisés à partir des poudres obtenues.

5.1.2 Quantification du nombre d'amines libres sur les NPs AGuIX

Le 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate (TNBS) est utilisé depuis les années 60 pour détecter les amines libres présentes sur les protéines, que ce soit de manière quantitative ou qualitative.^[105] Il réagit avec les amines primaires pour former un dérivé coloré orange, avec deux maxima d'absorption à 340 et 420 nm (**Figure 5-1**). Ce composé est donc tout à fait adapté pour mesurer la quantité d'amines libres présentes sur les particules AGuIX.

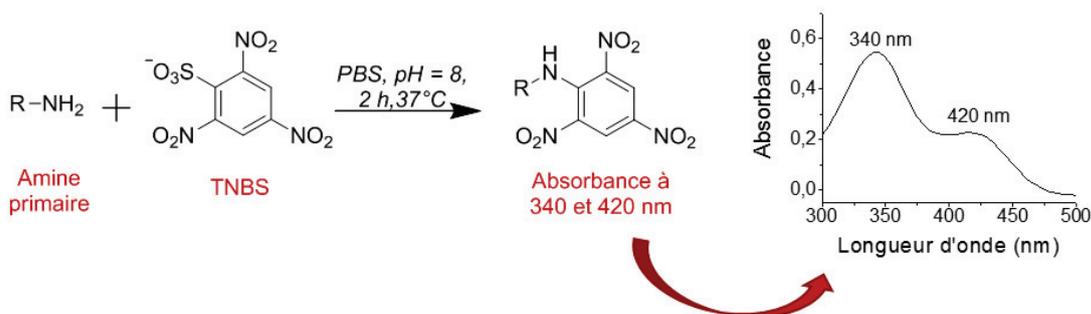


Figure 5-1 : La réaction des amines primaires avec le TNBS forme un composé orangé absorbant à 340 et 420 nm. Des mesures d'absorbance permettent ensuite de quantifier la quantité d'amines disponibles en solution.

L'idée du dosage consiste à ajouter une quantité croissante de TNBS aux particules AGuIX et de mesurer l'absorbance des solutions à 340 et 420 nm. Dans un premier temps, l'absorbance augmente. Quand toutes les amines ont réagi, le TNBS reste libre en solution et l'absorbance augmente moins rapidement (voir **Figure 5-2**). La rupture de pente nous permet de quantifier la quantité d'amines par particule. Dans notre cas, on trouve qu'il faut 125 nmol de TNBS pour 87,7 nmol de Gd^{3+} , soit 14 TNBS pour 10 Gd^{3+} . Les AGuIX présentant environ 10 Gd^{3+} par particules,^[89,172] on peut en déduire qu'il y a environ 14 amines par particule. Les mêmes résultats sont obtenus par analyse élémentaire (14,5 amines pour 10 Gd^{3+}). Il est donc tout à fait possible d'utiliser ces groupements pour fonctionnaliser les particules par des DOTA-NHS ou d'autres molécules d'intérêt.

Mode opératoire : Les manipulations sont réalisées dans un tampon PBS (Phosphate, Buffered Saline, 0,1 M en phosphate, pH = 8). La solution mère de TNBS est préparée juste avant utilisation à 1 mM dans le tampon. Différents échantillons sont préparés qui contiennent la même quantité de particules AGuIX ($V = 1 \text{ mL}$ et

$n_{Gd^{3+},particules} = 87,7 \text{ nmol}$) mais auxquels on ajoute une quantité croissante de TNBS. Les échantillons sont chauffés à 37°C durant 2 h. Le spectre UV-visible est ensuite enregistré.

Il faut noter qu'à ce pH et dans cette gamme de concentration, les liaisons $-\text{Si-O-Si}-$ du réseau de polysiloxane des AGuIX sont hydrolysées et que les nanoparticules se fragmentent. La destruction du squelette de polysiloxane permet donc de quantifier toutes les amines, même celles qui auraient été présentes au centre du réseau, et pas uniquement celles en surface de la particule.^[108]

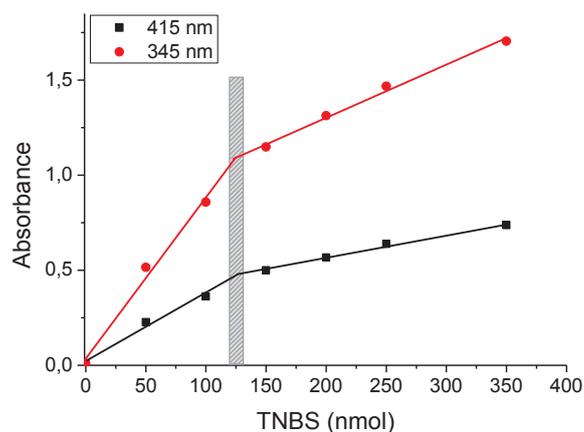


Figure 5-2 : Quantification du nombre d'amines primaires sur les particules AGuIX par réaction des amines avec le TNBS. $n(Gd^{3+}) = 87,7 \text{ nmol}$, PBS, pH = 8. Les résultats donnent environ 125 nmol d'amines libres soit 1,4 amines pour 1 Gd^{3+} .

5.2 ANNEXE A.2 : PASSAGE DES NPs AGuIX EN CLINIQUE

Les particules AGuIX sont actuellement en essai clinique de phase I au CHU de Grenoble pour le traitement des métastases cérébrales par radiothérapie en association avec les particules (Nanorad, référence ANSM 151519A-12 ; N° EudraCT : 2015-004259-30). Au préalable et afin d'obtenir l'autorisation de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), le laboratoire a dû répondre à plusieurs interrogations concernant les particules AGuIX. J'ai notamment réalisé des études sur la stabilité des particules AGuIX et la quantité de gadolinium (Gd^{3+}) libre. Ces expériences ont été réalisées sur les lots de particules synthétisés en conditions GMP (*Good Manufacturing Practices*, bonne pratique de fabrication) et utilisés en clinique.

5.2.1 Stabilité des NPs AGuIX

5.2.1.1 Problématique

Comme nous l'avons déjà mentionné, les particules AGuIX sont conservées sous forme de poudre lyophilisée, de couleur crème. Avant une injection sur des patients, les particules sont redispersées à 100 g.L^{-1} ($[Gd^{3+}] \sim 100\text{ mM}$) et la solution peut être conservée au réfrigérateur avant utilisation. Afin de vérifier l'intégrité de la particule après redispersion dans l'eau et de déterminer une date limite d'utilisation, nous avons étudié l'évolution de plusieurs caractéristiques physico-chimiques dans le temps.

5.2.1.2 Préparation des solutions

La solution est reconstituée directement dans le flacon avec de l'eau ultrapure à 100 g.L^{-1} et laissée pendant 1 h à température ambiante afin d'obtenir une bonne redispersion des particules. La solution obtenue est de couleur dorée (**Figure 5-3**). Les caractéristiques des nanoparticules sont ensuite déterminées ; si nécessaire des dilutions sont effectuées dans de l'eau ultrapure.

La solution est conservée au réfrigérateur et les caractéristiques vérifiées après 24 h, 96 h, 1 semaine, 1 mois, 2 mois, 4 mois et un an. Avant chaque mesure, la solution est laissée 30 minutes à température ambiante pour équilibrer la température des échantillons.



Figure 5-3 : Aspect des nanoparticules sous forme de poudre et en solution dans l'eau à 100 mg/mL .

5.2.1.3 Evolution des caractéristiques physico-chimiques des particules

- **pH**

Les mesures sont effectuées sur la solution à 100 mg/mL

	Jour de la redispersion	24 h	96 h	1 semaine	1 mois	2 mois	4 mois	12 mois
pH	7,16	7,09	7,09	6,99	7,01	6,98	7,12	7,17

- **DLS**

Les mesures sont effectuées sur une solution diluée à 10 mg/mL juste avant l'analyse.

	Jour de la redispersion	24 h	96 h	1 semaine	1 mois	2 mois	4 mois	12 mois
D_H en volume (nm)	4,13	3,96	4,05	4,03	4,12	4,83	4,23	4,49
Déviat ion standard (nm)	1,47	1,45	1,41	1,43	1,35	1,16	1,36	1,49

- **Relaxométrie**

Les mesures sont effectuées sur la solution à 100 mg/mL.

	Jour de la redispersion	24h	96h	1 semaine	1 mois	2 mois	4 mois	12 mois
T₁ (ms)	0,80	0,79	0,81	0,80	0,78	0,78	0,83	0,82

- **HPLC**

Les mesures sont effectuées sur une solution diluée à 5 mg/mL juste avant l'analyse. On mesure l'absorbance à 295 nm en fonction du temps.

	Jour de la redispersion	24 h	96 h	1 semaine	1 mois	2 mois	4 mois	12 mois
τ_R (min)	12,9	12,9	12,9	12,8	12,7	12,8	12,8	12,9
$t_{1/2}$ (min)	1,0	1,0	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7

D'autre part, on n'observe pas d'augmentation de la quantité de fragments, l'allure des spectres est tout à fait similaire.

- **Osmolarité**

Les mesures sont effectuées sur la solution à 100 mg/mL.

	Jour de la redispersion	24 h	96 h	1 semaine	1 mois	2 mois	4 mois	12 mois
Osmolarité (mosm)	+ 119	+119	+131	+110	+111	+108	+118	+109

- **Zétamétrie**

Les mesures sont effectuées sur une solution diluée à 10 mg/mL juste avant l'analyse.

	Jour de la redispersion	24 h	96 h	1 semaine	1 mois	2 mois	4 mois	12 mois
Potentiel (mV)	16,4	17,8	17,2	14,6	16,3	16,0	14,9	<i>problème d'appareil</i>

5.2.1.4 Conclusion

Aucune modification physico-chimique notable n'a été observée pendant 12 mois (aspect, pH, DLS, relaxométrie, HPLC, osmolarité et zétamétrie). Tout semble donc indiquer qu'il n'y a pas de dégradation des particules en un an après redispersion dans de l'eau ultrapure à 100 g.L⁻¹.

Cette étude a été réalisée sur un lot de particules lyophilisées depuis 10 mois environ. Pour vérifier la stabilité des particules sous forme de poudre lyophilisée, le même type d'expérience a été réalisé 6 mois plus tard c'est-à-dire 16 mois après conditionnement des particules sous forme de poudre. Les particules ont été redispersées dans de l'eau ultrapure et leurs propriétés physico-chimiques mesurées le jour de la redispersion et le jour suivant. Aucune différence n'est apparue que ce soit entre 10 mois ou 16 mois après lyophilisation ou entre 1 h ou 24 h après redispersion dans l'eau ce qui reflète bien la grande stabilité des particules dans ces conditions.

Des expériences supplémentaires vont être réalisées pour vérifier la stabilité des lots sous forme de poudre entre 0 et 10 mois après conditionnement et pour des durées supérieures à 16 mois. Les données vont aussi être complétées lorsque les particules sont redispersées dans l'eau : temps plus longs, concentrations plus faibles, influence du pH, de la température...

5.2.2 Le gadolinium libre dans les lots de NPs AGuIX

Comme on l'a mentionné dans le **chapitre 1** du manuscrit, les ions Gd^{3+} libres peuvent induire une certaine toxicité,^[13,15,17] il est donc nécessaire de quantifier la quantité de gadolinium libre par une méthode spécifique et suffisamment sensible dans le produit fini. Plusieurs techniques ont été envisagées pour cela.

5.2.2.1 Principe des méthodes de quantification envisagées

La première catégorie repose sur l'utilisation d'indicateurs colorés sensibles à la présence de Gd^{3+} comme l'orange de xylénol (utilisé dans ce manuscrit) ou l'arsenazo III. Malheureusement ces techniques ne semblaient pas assez sensibles pour la quantification de la proportion de Gd libre dans les lots de particules AGuIX. De plus, les lots cliniques sont conditionnés après ajout d'une petite quantité d'ions calcium Ca^{2+} afin de saturer les DOTAGA libres restants. Les ions Gd^{3+} et Ca^{2+} ont des rayons ioniques similaires et ils peuvent tous les deux être complexés par les indicateurs colorés. Ces techniques n'étaient donc pas spécifiques et adaptées pour la quantification du nombre de Gd^{3+} libres dans les lots de particules AGuIX. D'autres essais ont été réalisés en utilisant la luminescence des ions Gd^{3+} , la chromatographie ionique ou l'électrophorèse capillaire (en partenariat avec l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon, ISA). Elles n'ont pour le moment pas abouti.

La collaboration avec l'ISA m'a permis de développer une technique utilisant l'HPLC couplée à une ICP-masse, cela nous a fourni les premières quantifications de la quantité de Gd^{3+} libre dans les lots de particules. Le principe est présenté sur la **Figure 5-4**. La méthode HPLC développée, et déjà décrite dans ce manuscrit de thèse, consiste à séparer sur une colonne C4 les produits de dégradations des particules grâce à un gradient d'éluant évoluant de 1 % en C à 90 % en C (acétonitrile + 0,1 % de TFA). Les fragments sortent lors du palier à 1 % en C (~3-4 minutes) alors que les particules sortent lors de l'augmentation de la proportion de C (~13 minutes). De plus, le gadolinium libre Gd^{3+} sort juste avant les produits de dégradation (~2 min). L'idée pour quantifier le gadolinium libre présent dans les lots de particules consiste à séparer ces produits sur colonne C4 et à analyser en sortie de colonne et au cours du temps la quantité de Gd^{3+} par ICP-Masse (ICP-MS). La différence par rapport à l'ICP-OES décrite dans l'**Annexe A1**, est que la détection du gadolinium se fait par spectrométrie de masse et non plus par spectroscopie d'émission optique. Un étalonnage en Gd^{3+} libre nous permet ensuite de quantifier précisément la quantité de Gd^{3+} libre présent dans les lots de particules.

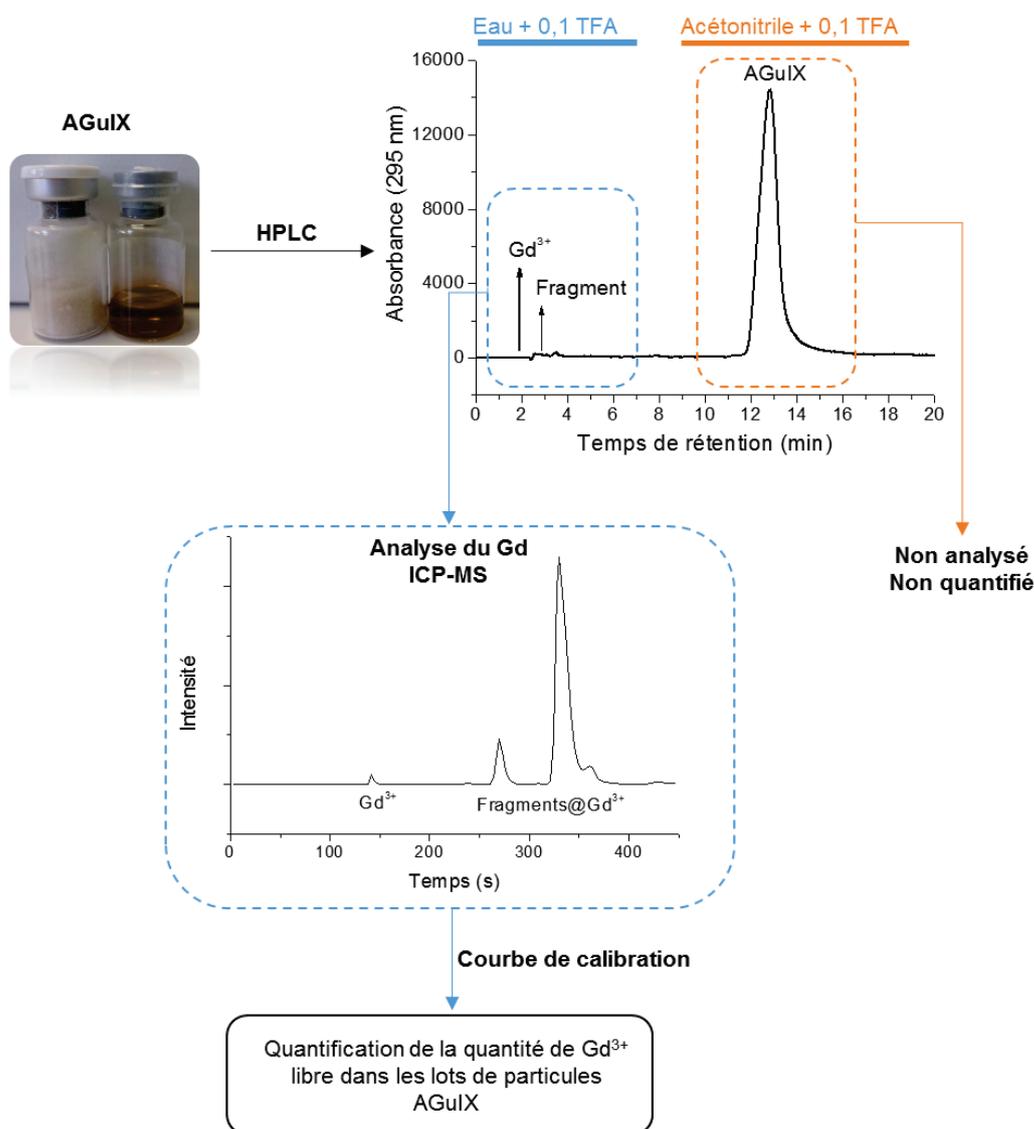


Figure 5-4 : Schéma de principe de la quantification de Gd³⁺ libres dans les lots de particules AGuIX par HPLC couplée à l'ICP-MS. Expérience réalisée à l'ISA de Lyon avec l'aide du Docteur Agnès Hagège.

L'injection de solvant organique tel que l'acétonitrile (donc la phase éluante C) n'est pas possible dans l'ICP-MS. La méthode HPLC doit donc être légèrement modifiée. Dans un premier temps, la phase éluante est constituée uniquement de A (eau + 0,1% de TFA) et non pas de 1 % de C. Cela permet d'éluier le gadolinium libre ainsi que les produits de dégradation. On analyse en ICP-MS la quantité de gadolinium présente en sortie de colonne. Lorsque le gadolinium libre et les produits de dégradation ont été analysés, on peut amener la solution de sortie de colonne vers une poubelle et commencer le gradient en C afin d'éliminer les particules et de laver la colonne avant de commencer une nouvelle analyse. On a pu remarquer que l'allure du chromatogramme HPLC (absorbance à 295 nm) n'est pas réellement modifiée par ce changement de méthode.

- **Préparation des solutions**

Une courbe d'étalonnage en Gd^{3+} libre est réalisée pour des concentrations allant de 0 à 10 μM . Les solutions sont préparées dans HNO_3 à 1 mM.

Les particules sont redispersées dans l'eau à 100 g/L (pH = 7). Elles sont laissées sous agitation pendant une heure à température ambiante. Au bout d'une heure, une partie des particules est diluée dans l'eau à 5 g/L et injectée en HPLC pour analyse. Le reste des particules est conservé au réfrigérateur. Un jour plus tard, la solution est ramenée à température ambiante et la quantité de Gd^{3+} libre est analysée de nouveau.

La détection du Gd^{3+} en ICP-MS est réalisée pour les isotopes 156, 157 et 158 du Gd et les résultats présentés correspondent à la moyenne obtenue pour ces trois isotopes.

- **Temps de rétention du Gd^{3+} libre, allure des chromatogrammes**

Les particules redispersées dans l'eau sont analysées et le chromatogramme enregistré. Puis on ajoute volontairement du Gd^{3+} libre dans le lot de particules et on effectue une deuxième analyse. Les chromatogrammes obtenus en ICP-MS sont présentés sur la **Figure 5-5** pour l'isotope 156 du Gd. On observe que seul le pic avec un temps de rétention de 140 secondes (soit 2 minutes 20 secondes) présente une différence significative d'intensité. Il s'agit donc bien du Gd^{3+} libre. Ce pic est bien séparé des autres (Gd présent dans les produits de dégradation des particules) ce qui nous permettra de quantifier la quantité de Gd^{3+} libre dans les lots de particules AGuIX. Le faible décalage temporel observé entre les deux chromatogrammes provient du fait que le déclenchement de l'enregistrement ICP-MS se fait manuellement mais cela ne gêne en aucune façon l'analyse. Les chromatogrammes obtenus pour les isotopes 157 et 158 du Gd sont identiques et ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

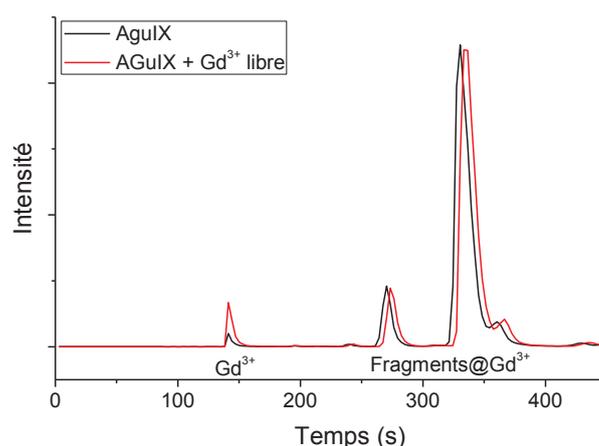


Figure 5-5 : Quantité de Gd au cours du temps dans un lot de particules à 5 g/L dans l'eau et dans un lot de particules à 5 g/L avec ajout volontaire de Gd^{3+} libre. Chromatogrammes obtenus pour l'isotope 156 du Gd.

- **Courbe d'étalonnage et reproductibilité**

Afin de quantifier précisément la quantité de Gd^{3+} libre dans les lots de particules, un étalonnage a été réalisé par injection d'échantillons de Gd^{3+} libre de concentrations connues. L'aire du pic est déterminée pour les trois isotopes du Gd et les trois courbes d'étalonnage peuvent être tracées, comme présenté sur la **Figure 5-6**. On obtient de très bons coefficients r^2 indiquant une bonne précision de la méthode pour les trois isotopes. On pourrait obtenir une détection précise jusqu'à au moins $1 \mu M$ de Gd^{3+} libre soit environ 30 ppm.

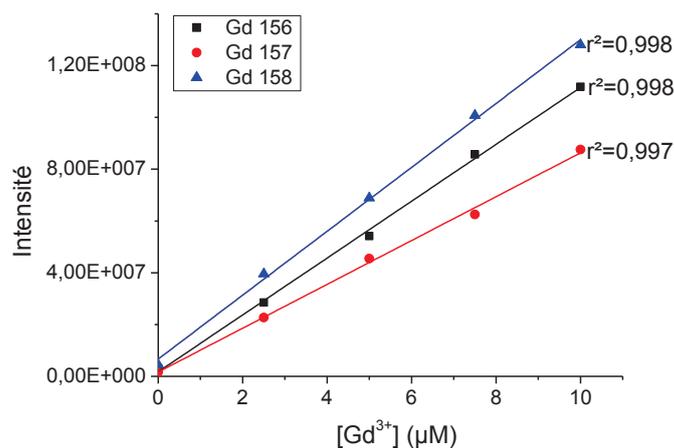


Figure 5-6 : Courbes d'étalonnage obtenues par injection d'échantillons de Gd^{3+} de concentrations connues en HPLC et intégration de l'aire du pic correspondant au Gd^{3+} libre.

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, on a aussi injecté trois fois un échantillon de Gd^{3+} libre à $7,5 \mu M$. Les écarts sont relativement faibles entre les trois mesures ($\sim 5 \%$).

- **Quantification du Gd^{3+} libre dans les lots de particules**

En moyenne sur les 3 isotopes du Gd (156, 157 et 158), on trouve une quantité de Gd^{3+} libre de 316 ppm avec un écart moyen de 19 ppm pour une solution redispersée depuis 1 h et 302 ppm avec un écart moyen de 10 ppm pour une solution redispersée depuis 30 h. Il n'y a donc pas de différence significative de la quantité de Gd^{3+} libre entre 1 h et 30 h après reconstitution des lots de particules AGuIX à 100 g/L dans l'eau ultra pure et à un pH de 7.

- **Conclusion et perspectives**

Le couplage de l'HPLC avec l'ICP-MS est une technique sensible et spécifique d'analyse du gadolinium libre. Cette technique nous a permis de quantifier la quantité de Gd^{3+} libre présent dans des lots de particules AGuIX 1 h et 30 h après leur reconstitution à 100 g/L dans l'eau ultra pure et à un pH de 7. Ces premiers résultats nous ont permis d'apporter des réponses à des questions cruciales de l'ANSM pour le passage en

essai clinique de phase I. Cependant la méthode doit être optimisée dans l'optique d'un passage en phase II et/ou une utilisation en routine pour caractériser les lots de particules AGuIX. En effet le débit et les quantités de Gd injectées sont élevés et risquent d'endommager l'appareil sur le long terme. De plus, le déclenchement de l'acquisition en ICP doit se faire manuellement ce qui entraîne alors de légers décalages dans les temps de rétention. Enfin, la méthode HPLC (colonne, éluant) nécessite d'être modifiée pour augmenter la séparation des produits et gagner en précision.

5.2.2.2 Transmétallation avec les ions Ca^{2+}

Les ions Gd^{3+} et Ca^{2+} ont des rayons ioniques similaires ce qui peut entraîner des échanges entre ces ions (transmétallation). Des expériences supplémentaires ont donc été réalisées afin de montrer qu'en présence d'un excès d'ions Ca^{2+} il n'y a pas de transmétallation des ions Gd^{3+} à pH physiologique et pour des solutions diluées. Un tel échange d'ions dans l'organisme entraînerait la libération d'ion Gd^{3+} ce qui augmenterait potentiellement la toxicité du produit.

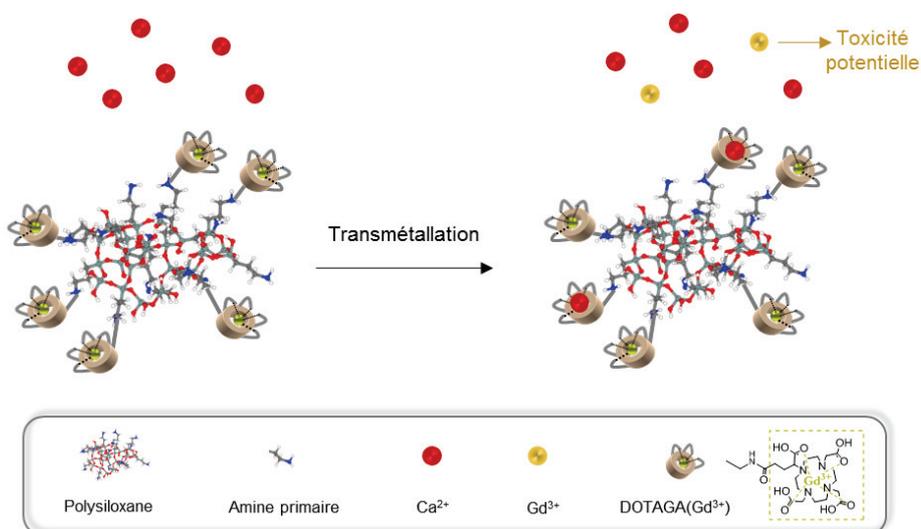


Figure 5-7 : La transmétallation des ions Gd^{3+} par les ions Ca^{2+} dans l'organisme conduirait à la libération de Gd^{3+} potentiellement toxiques.

• Principe de l'expérience

Cette expérience s'appuie sur l'article de N. Parac-Vogt *et al.* de 2005^[199]. Une étude de l'évolution temporelle de la vitesse de relaxation longitudinale $\frac{1}{T_1}$ d'une suspension de nanoparticules AGuIX (à 37°C et 1,4 T) a été effectuée dans 2 milieux différents : dans un tampon PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) à pH 7,4 et dans ce même tampon en présence d'un excès d'ions Ca^{2+} .

Une transmétallation des complexes DOTAGA@Gd^{3+} par des ions Ca^{2+} provoquerait une libération des ions Gd^{3+} , lesquels formeraient un complexe insoluble avec les ions phosphates présents en solution. Les ions Gd^{3+} complexés par les phosphates ne contribueraient plus à la vitesse de relaxation longitudinale paramagnétique mesurée pour la solution. Dès lors, en cas de transmétallation avérée, la courbe relative

aux AGuIX en présence de Ca^{2+} devrait évoluer différemment de celles relatives aux AGuIX en l'absence d'ions Ca^{2+} .

Nous avons ici étudié l'évolution temporelle de la vitesse de relaxation d'une solution de nanoparticules diluée. Dans ces conditions, les liaisons $-\text{Si-O-Si}-$ du cœur de polysiloxane peuvent être hydrolysées ce qui conduit à une diminution progressive de la taille des nanoparticules et donc de la vitesse de relaxation. En présence d'ions Ca^{2+} et s'il y a une transmétallation, la décroissance de la vitesse de relaxation longitudinale serait accentuée à cause du phénomène supplémentaire de précipitation des phosphates de gadolinium.

- **Protocole**

Les nanoparticules sont redispersées dans l'eau à 100 g/L pendant une heure à température ambiante et sous agitation. Au bout de trois heures, deux échantillons sont préparés simultanément : le premier à 1 g/L en nanoparticules dans du tampon PBS (pH = 7,4) et le deuxième à 1 g/L en nanoparticules et 2 mM en Ca^{2+} dans du tampon PBS (pH = 7,4). La mesure du temps de relaxation longitudinale T_1 des solutions est réalisée pendant environ 72 heures. Entre deux mesures, les échantillons sont conservés dans une étuve à 37°C.

- **Résultats et conclusion**

Les courbes d'évolution du facteur $\frac{1}{T_1}$ en fonction du temps sont représentées sur la **Figure 5-8**.

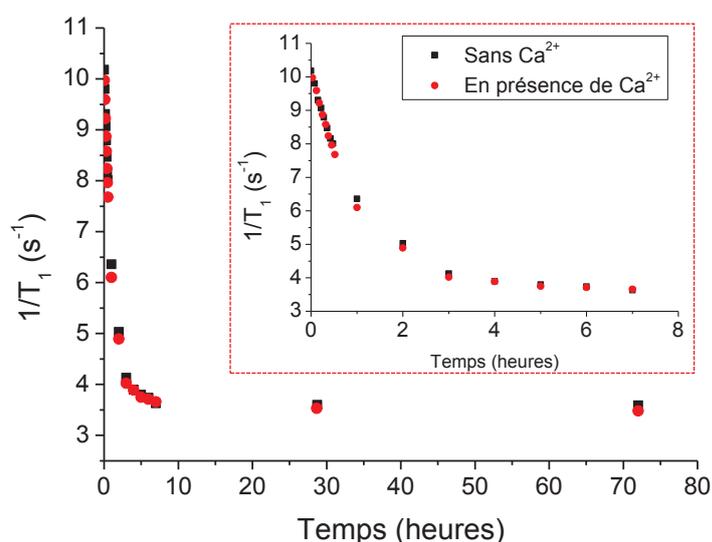


Figure 5-8 : Evolution du facteur $1/T_1$ en fonction du temps pour des solutions de particules AGuIX à 1 g/L dans un tampon PBS (pH = 7.4) en présence d'un excès d'ions Ca^{2+} (2 mM) ou en l'absence d'ions Ca^{2+} . Les deux courbes étant identiques, on ne détecte pas de transmétallation.

Les courbes ne présentent pas de différences significatives ce qui indique qu'il n'y a pas de transmétallation des ions Gd^{3+} présents sur les particules AGuIX avec les ions Ca^{2+} (en excès) dans ces conditions pendant au moins 72 h.

Ces résultats sont rassurants mais malheureusement la méthode n'est pas très précise. En effet, seules des libérations de 8-10 % de la quantité totale de Gd^{3+} peuvent être détectées à 72 h de manière significative. La technique présentée précédemment couplant l'HPLC et l'ICP-MS permettrait de réaliser des mesures beaucoup plus précises. Cela sera réalisé après optimisation de la méthode.

5.2.3 Conclusion

Les résultats de ces études ont permis d'apporter des réponses à des questions cruciales de l'ANSM qui a donné son autorisation pour un passage en essai clinique de phase I en 2016. Cet essai va évaluer l'intérêt des nanoparticules AGuIX pour le traitement des métastases cérébrales par radiothérapie. Les techniques présentées dans les paragraphes précédents sont actuellement en cours d'amélioration pour obtenir des réponses plus précises et/ou complètes que ce soit concernant la stabilité des particules ou la quantité de Gd^{3+} libre. L'idée est aussi de faciliter la mise en place de ces techniques pour permettre une utilisation en routine.

5.3 ANNEXE A.3 : FONCTIONNALISATIONS DES NPs AGuIX PAR DES FLUOROPHORES

5.3.1 Greffage de fluorophores sur les NPs AGuIX

La fluorescence est une technique très utilisée en biologie notamment en raison de sa grande sensibilité. Grâce à une source lumineuse externe d'énergie appropriée, on excite une substance chimique appelée fluorophore. En se désexcitant, le fluorophore émet à son tour un photon, que l'on peut détecter. Dans notre cas, le greffage de fluorophores sur les particules AGuIX nous permet de déterminer leur localisation *in vitro* ou *in vivo*, de mieux comprendre leur biodistribution et d'étudier leur toxicité.

Au cours de la thèse nous avons fonctionnalisé les particules AGuIX avec différents types de fluorophores dont les caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 5-1**.

Tableau 5-1 : Caractéristiques, dans l'eau, des fluorophores utilisés pendant la thèse.

Fluorophore	Forme activée utilisée	λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	$\epsilon(\lambda_{\text{abs}})$ (cm ⁻¹ .M ⁻¹)	Φ
Cyanine 5.5	Ester NHS	675	694	209 000	0,3
Rhodamine B	Isothiocyanate	543	565	106 000	0,54
Fluorescéine	Isothiocyanate	495	517	80 103	0,84
IRDye® 680 LT	Ester NHS	676	693	250 000	Non fourni

Ces fluorophores diffèrent selon leur longueur d'onde maximale d'absorption (λ_{abs}) ou d'émission ($\lambda_{\text{émission}}$), leur coefficient d'extinction molaire (ϵ) ou leur rendement quantique de fluorescence (Φ , défini comme le nombre de photons émis par nombre de photons absorbés). Le choix d'un fluorophore ou d'un autre dépend de ces propriétés, de leur prix, des appareillages disponibles, des applications visées... Pour des applications *in vivo* par exemple, des fluorophores absorbant et émettant dans le proche infrarouge (800-1000 nm) seront privilégiés. En effet, comme on l'a vu dans le **chapitre 4**, l'hémoglobine, l'eau, les lipides, etc absorbent la lumière ce qui limite la profondeur de pénétration de cette technique et ce qui représente son principal inconvénient. Ce phénomène est minimal entre 800 et 1000 nm, d'où l'intérêt de travailler dans cette plage de longueurs d'onde.^[168] Pour des applications *in vivo*, la Cyanine 5.5 ou l'IRDye® 680 LT (fourni par Licor, Etats-Unis) semblent donc particulièrement intéressants. D'un autre côté, la Rhodamine B ou la Fluorescéine sont beaucoup moins chers : moins de 100 euros les 100 mg contre 300 euros le mg pour la Cyanine 5.5 ou l'IRDye® 680 LT.

Pour les quatre fluorophores, le greffage sur les particules AGuIX se fait grâce à la présence des amines primaires à leur surface. Les réactions avec un ester NHS ou une fonction isothiocyanate ont été présentées dans les **chapitres 1 et 2** et sont schématisées sur la **Figure 5-9**. La fluorescence est beaucoup plus sensible que l'IRM, afin d'obtenir une plateforme bi-modale IRM/fluorescence, nous avons donc fonctionnalisé les particules AGuIX avec 1 fluorophore pour 500 ou 1000 Gd³⁺.

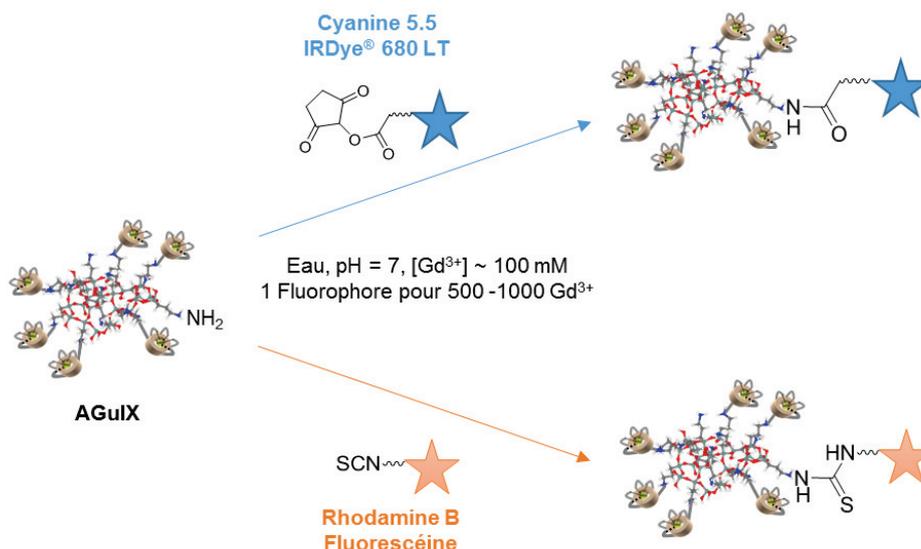


Figure 5-9 : Greffage de fluorophores sur les particules AGuIX : Cyanine 5.5, Rhodamine B, Fluorescéine et IRDye® 680 LT.

5.3.2 Mode opératoire et caractérisations des NPs

Les protocoles ont été réalisés dans un souci de simplification afin que les manipulations puissent être réalisées très simplement et par tous les collaborateurs si le besoin se présentait.

Mode opératoire : Les particules AGuIX sont redispersées dans l'eau ultrapure pour une concentration $[Gd^{3+}] = 100 \text{ mM}$ pendant 1 h à température ambiante. Le pH après redispersion est vérifié, il est normalement de 7. Le fluorophore (1 fluorophore pour 500 ou 1000 Gd^{3+}) est dissout juste avant utilisation dans du DMSO anhydre à 10 mg/mL, il est ensuite ajouté immédiatement et goutte à goutte aux NPs sous vive agitation. On laisse ensuite la réaction se dérouler pendant 5 h à l'abri de la lumière. Les particules sont diluées dans l'eau ultra pure pour avoir une proportion de DMSO inférieure à 4 % et purifiées par filtration tangentielle sur des membranes ayant un seuil de coupure de 5 kDa. A chaque cycle, on veille si possible à maintenir une concentration en gadolinium supérieure à 40 mM pour stabiliser les particules. Pour chaque cycle, le sous-nageant est prélevé et analysé en absorbance UV-visible. Les purifications sont arrêtées lorsque le sous-nageant ne contient plus de fluorophore et lorsque la quantité de DMSO est inférieure à 0,5 %. En général, une purification par 20 est suffisante (~4 cycles). Finalement, les particules sont concentrées pour atteindre une concentration $[Gd^{3+}]$ d'environ 100 mM, elles sont filtrées sur 0,2 μm puis lyophilisées pour leur stockage.

Le rendement en gadolinium est déterminé par ICP-OES au laboratoire. Celui en fluorophore est déterminé par des mesures d'absorbance UV-visible à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée dans l'eau pour le fluorophore non greffé. En général, les rendements pour ces synthèses sont élevés, que ce soit en gadolinium ou en fluorophores (~80 %). Cela s'explique par le fait que les conditions utilisées (pH, concentration, temps

de réaction et de purification) stabilisent les particules et évitent la formation de fragments. D'autre part, la fonctionnalisation est favorisée grâce au très large excès d'amine par rapport au fluorophore.

En raison du très faible taux de fonctionnalisation (1 fluorophore pour 500 ou 1000 Gd^{3+}), la taille et les propriétés magnétiques ne sont pas modifiées par le greffage du fluorophore sur les particules. La fonctionnalisation est vérifiée par HPLC comme présenté sur la **Figure 5-10** dans le cas de particules AGuIX fonctionnalisées avec de la cyanine 5.5.

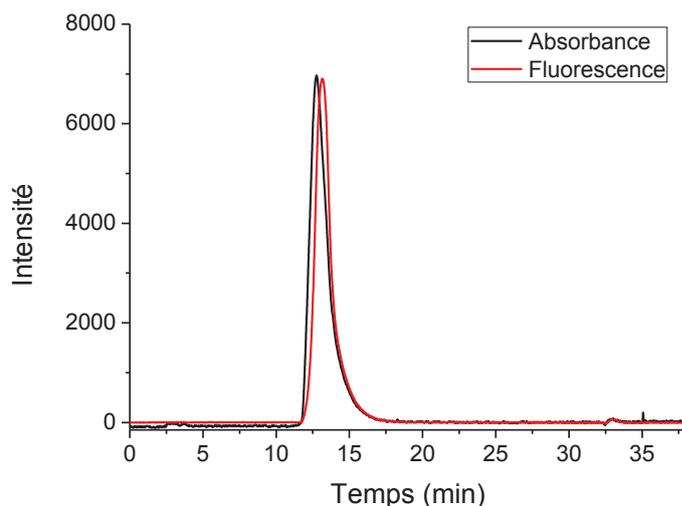


Figure 5-10 : Chromatogramme des particules AGuIX@Cyanine5.5. Détection en absorbance à 295 nm (particules) et en fluorescence (cyanine) avec $\lambda_{excitation} = 675$ et $\lambda_{émission} = 694$ nm. La corrélation entre les deux chromatogrammes indique que le greffage a bien eu lieu.

Avec l'appareil HPLC disponible au laboratoire, on peut en effet détecter les particules en mesurant leur absorbance à 295 nm et enregistrer simultanément la fluorescence de la cyanine 5.5 ($\lambda_{excitation} = 675$ nm et $\lambda_{émission} = 694$ nm). On détecte un signal en fluorescence en même temps que les particules ($\tau_R \sim 12$ min) mais plus aucune cyanine 5.5 non greffée ($\tau_R \sim 35$ min). Seule une petite partie des particules est fonctionnalisée. En raison de la présence de la cyanine, leur surface est plus hydrophobe et donc leur temps de rétention plus long. Ceci explique la légère différence des temps de rétentions entre les chromatogrammes en absorbance et en fluorescence.

5.3.3 Etude de la biodistribution des NPs AGuIX fluorescentes, publication

5.3.3.1 Résultats

Les particules fluorescentes ont été fournies à différents collaborateurs en France ou à l'étranger pour de nombreuses études portant sur leur toxicité ou leur localisation *in vitro* ou *in vivo*. Les particules AGuIX@RhodamineB et AGuIX@Fluorescéine ont notamment été utilisées pour étudier l'élimination des particules par les reins. Les résultats ont été présentés en 2014 dans le journal *ACS Nano*.

Cet article présente une étude de l'élimination des particules AGuIX par les reins après injection intraveineuse sur un modèle de souris. Différentes techniques, présentant toutes des avantages et des inconvénients, ont été utilisées (**Figure 5-11**). Elles apportent des informations complémentaires du niveau subcellulaire au niveau de l'organe entier. Les techniques utilisées sont la spectroscopie sur plasma induit par laser (LIBS, *laser-induced breakdown spectroscopy*), la microscopie intravitale à deux photons, l'ICP-OES, la microscopie électronique à transmission (TEM, *transmission electron microscopy*), la spectrométrie de masse par électrospray (ESI-MS, *electrospray ionization mass spectrometry*) et l'histologie.

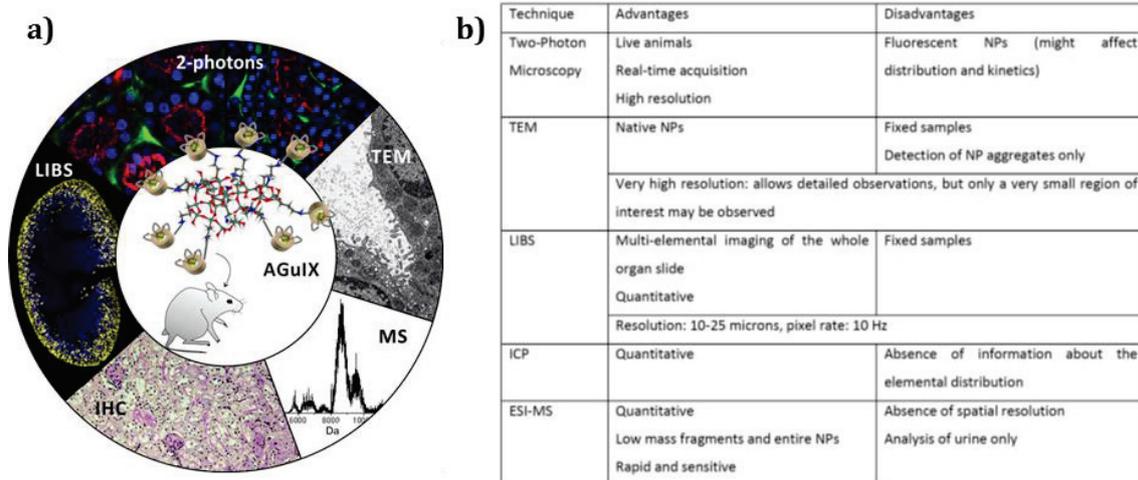


Figure 5-11 : (a) Etude de l'élimination des particules AGuIX à l'aide de techniques complémentaires : le LIBS, la microscopie intravitale à 2 photons, la TEM, l'ESI-MS et l'histologie. (b) Avantages et défauts de chaque technique.

Le LIBS a permis de mettre en évidence, sur l'échelle de l'organe entier, une accumulation rapide dans les reins (dès les 5 premières minutes après injection intraveineuse) et une distribution hétérogène dans le cortex rénal. Cette technique nécessite de fixer les échantillons avant analyse. Pour éviter cela, des études en microscopie intravitale à deux photons ont été réalisées avec des AGuIX@RhodamineB sur les animaux vivants (**Figure 5-12**). Là encore, on observe une accumulation des particules dans les reins avec les premiers battements de cœur. La plus grande accumulation a lieu 4 h après administration des particules et la rétention tubulaire est hétérogène, en particulier 48 h après injection. Les mêmes résultats sont obtenus pour des particules AGuIX@Fluorescéine. Des mesures quantitatives ont aussi été obtenues par ICP-OES pour le rein entier ou des sections de rein. La grande sensibilité de la technique, a permis de déterminer que seule 0,5 % de la dose de particules injectée demeurait dans les reins 4 semaines après injection intraveineuse. Les résultats obtenus avec ces différentes techniques concernant la cinétique d'élimination des AGuIX sont similaires mais complémentaires en raison de différence d'échelle, de préparation d'échantillons ou de sensibilité. D'autre part, des mesures TEM ont révélé une accumulation des particules dans les tubules proximaux tandis que les tubules distaux éliminent rapidement les particules.

Pour évaluer la biodégradation des particules, des mesures de spectrométrie de masse (ESI-MS) ont été réalisées et ont permis d'identifier les produits éliminés par les urines. Dans un premier temps, un mélange

de nanoparticules de petites tailles et de fragments est détecté. Ces fragments proviennent de l'hydrolyse des liaisons -Si-O-Si- du cœur de polysiloxane après dilution des particules dans le sang. Au bout de quelques minutes, des nanoparticules entières sont éliminées.

Finalement, l'impact des particules sur la fonction rénale a été évalué par des analyses histologiques ainsi que des mesures du taux de créatinine dans le sérum. Les analyses histologiques ont été faites après des injections répétées de particules AGuIX (1 fois par semaine durant 3 semaines). Elles ont révélé un très faible impact sur la fonction rénale et la microstructure des reins avec une vacuolisation faible et temporaire des tubules proximaux.

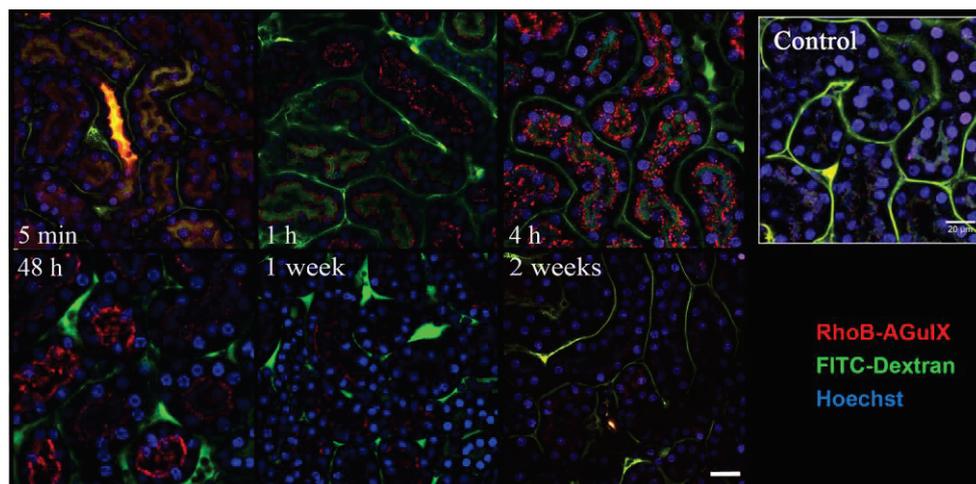


Figure 5-12 : Images obtenues par microscopie intravivante à 2 photons sur des reins de souris, de 5 min à 2 semaines après injection intraveineuse de 200 μL de particules AGuIX@RhodamineB (rouge) à 40 mM en Gd^{3+} . Le noyau et les vaisseaux ont été colorés par injection de 50 μL d'une mixture de Hoechst 33342 (bleu) et FITC-Dextran 70 kDa (vert) 5 minutes avant acquisition. Echelle : 20 μm . Les NPs atteignent le rein dès 5 min après l'injection (signal rouge diffus observé dans les vaisseaux sanguins et les tubules). Au bout de 1 h, les NPs sont extravasées et atteignent les tubules (taches rouges distinctes à l'intérieur des cellules tubulaires). Au bout de 2 semaines, le très faible signal rouge indique une élimination efficace des particules.

Tous ces résultats ont permis de mieux comprendre l'élimination des particules AGuIX (dégradation des particules, voie et cinétique d'élimination). Elle se fait par voie rénale et l'impact de multiples injections sur les reins reste faible et temporaire. Cette étude présente donc des résultats indispensables et encourageants concernant les particules AGuIX dans l'objectif d'un passage en clinique.

5.3.3.2 Publication

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.

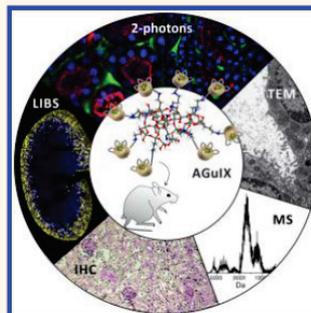


Long-Term *in Vivo* Clearance of Gadolinium-Based AGuIX Nanoparticles and Their Biocompatibility after Systemic Injection

Lucie Sancey,^{*,#,\dagger} Shady Kotb,^{#,†} Charles Truillet,[†] Florence Appaix,[‡] Arthur Marais,[†] Eloïse Thomas,[†] Boudewijn van der Sanden,[‡] Jean-Philippe Klein,[§] Blandine Laurent,[§] Michèle Cottier,[§] Rodolphe Antoine,[†] Philippe Dugourd,[†] Gérard Panczer,[†] François Lux,[†] Pascal Perriat,^{||} Vincent Motto-Ros,[†] and Olivier Tillement[†]

[†]Institut lumière matière, UMR5306, Université Claude Bernard Lyon1-CNRS, Université de Lyon 69622 Villeurbanne cedex, France, [‡]GIN INSERM U836 UJF, Grenoble, 38706, France, [§]LINA EA 4624—Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées, Saint Etienne, 42023, France, and ^{||}MATEIS, UMR 5510 INSA Lyon—CNRS, INSA Lyon, 69621 Villeurbanne, France. ^{*}These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT We previously reported the synthesis of gadolinium-based nanoparticles (NPs) denoted AGuIX (activation and guiding of irradiation by X-ray) NPs and demonstrated their potential as an MRI contrast agent and their efficacy as radiosensitizing particles during X-ray cancer treatment. Here we focus on the elimination kinetics of AGuIX NPs from the subcellular to whole-organ scale using original and complementary methods such as laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), intravital two-photon microscopy, inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), transmission electron microscopy (TEM), and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). This combination of techniques allows the exact mechanism of AGuIX NPs elimination to be elucidated, including their retention in proximal tubules and their excretion as degraded or native NPs. Finally, we demonstrated that systemic AGuIX NP administration induced moderate and transient effects on renal function. These results provide useful and promising preclinical information concerning the safety of theranostic AGuIX NPs.



KEYWORDS: nanoparticle · gadolinium · theranostic · two-photon microscopy · laser-induced breakdown spectroscopy · renal function · toxicity

In the past two decades, the imaging and therapeutic capabilities of nanoparticles (NPs) have demonstrated high usefulness for biomedical applications.^{1,2} Independent of their chemical composition, shape, or charge, most NPs between 20 and 200 nm are partially eliminated by the liver, contributing to retention within the reticuloendothelial system (RES), which includes macrophages and macrophage precursors, specialized endothelial cells that line the liver sinusoids, bone marrow, and spleen. Long-term retention of NPs could induce toxicity.^{3–5} It is sensible to assume that biodistribution, accumulation, metabolism, and excretion of NPs will affect the toxicity of this nanoagent in the organism. The ability of the

nanoparticles to affect the normal physiology as well as the normal structure of organs and tissues depends on physicochemical parameters such as particle size, shape, surface charge, chemistry, composition, and stability. Thus, research has focused either on the development of biodegradable NPs or on NPs with a hydrodynamic diameter (HD) smaller than 6 nm to prevent any undesired accumulation and promote renal clearance.^{6,7} However, an HD smaller than the theoretical glomerular filtration limit (<6 nm)⁸ may not be sufficient to promote glomerular filtration. Ultrasmall gold NPs ($D < 2$ nm) have been reported to be either mainly excreted through the liver several days after injection⁹ or rapidly eliminated via the kidneys.¹⁰

* Address correspondence to lucie.sancey@univ-lyon1.fr.

Received for review August 2, 2014 and accepted February 21, 2015.

Published online February 22, 2015
10.1021/acsnano.5b00552

© 2015 American Chemical Society

Considering the use of MRI contrast agents, supermagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) or gadolinium-based MRI agents, the process of imaging should be a safe diagnostic procedure. SPIONs are often eliminated through both kidney and liver, which might lead to RES retention or migration of the particles through the organism.^{11–13} This specific retention in the liver is sometimes the purpose of the SPION, dedicate to hepatic imaging. Nevertheless, the SPIONs family, including their byproducts, might trigger an immunological or an inflammatory response, processes that should be investigated before clinical transfer.^{4,14} The gadolinium-based MRI contrast agents were approved by the FDA and European agencies in the early 2000s. Among them, some nanoparticles were correlated with high (>0.1 case/million applications) relative frequency of nephrogenic systemic fibrosis (NSF).^{15–18} This serious and sometimes fatal disease has been related to transmetalation which leads to the release of free gadolinium from the chelates in the body, due to previous renal dysfunction, extensive administration of gadolinium, and/or coexistence of disease such as inflammation.¹⁹ The transmetalation occurs particularly with acyclic chelates. Therefore, the guidelines issued by the regulatory authorities allowed a reduction of the number of new cases of NSF to almost zero; these guidelines include providing patients a possible benefit that outweighs the risk, limiting the amount of injected gadolinium, and measuring the glomerular filtration rate prior to the administration of Gd-chelate.²⁰

We previously developed original polysiloxanes nanoparticles containing gadolinium ions (Gd) called AGuIX (activation and guiding of irradiation by X-ray) NPs, with an HD of approximately 3 nm for therapeutic application including radiosensitization and multimodal imaging.^{2,21–23} The process of elimination and safety of AGuIX NPs has to be evaluated as a part of the preclinical evaluation. AGuIX NPs are mainly eliminated through the kidneys. Twenty-four hours after injection, less than 0.2% of the injected dose of radiolabeled particles was observed in any other organ.^{2,24–26} However, the mechanism of AGuIX elimination remained unclear. To determine the exact mechanism underlying of AGuIX elimination, the study was determined in a mice model. The AGuIX NPs were administered intravenously (IV) to mice prior to investigation of renal function. Using either native or fluorescently labeled particles, we combined intravital and fixed-sample explorations at the subcellular to whole-organ scale using two-photon microscopy, inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), transmission electron microscopy (TEM), and a method we have developed for biological tissue application, laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). Exposure to Gd-containing agents was associated with the occurrence of NSF; such pathology might be due to the

release of Gd from the agent and seems to occur for acyclic agents.²⁷ However, the AGuIX NPs possess cyclic chelating agents and exhibit a very strong complexation constant ($\log\beta_{110} = 24.78$), which prevent Gd release.²¹ In this study, we analyzed renal function, identified the NP's metabolites in urine samples by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), and obtained evidence of the safe biodegradation of the NP *in vivo*. In addition, histological analysis of kidney sections performed after repeated treatment with AGuIX confirmed the low impact of multiple injections on renal function and microstructure.

PRELIMINARY RESULTS: BRIEF DESCRIPTION OF THE NANOPARTICLE

The Gd-based AGuIX NPs were developed and designed for theranostic approaches in cancer radiotherapy.^{2,21,23} AGuIX NPs are composed of a polysiloxane network surrounded by Gd chelates covalently grafted to the polysiloxane inorganic matrix and are synthesized by a top-down process (Figure 1A and Supporting Information).^{2,21} These NPs exhibit an ultrasmall size, with an HD of approximately 3 ± 0.1 nm (Figure 1B). The complexation constant ($\log\beta_{110}$) of these NPs for Gd is 24.78.²¹ This value is very close to the complexation constant of the commercial agent DOTAREM (25.58) determined under the same conditions. AGuIX NPs contain approximately 10 chelates per NP, with a mass of approximately 9 kDa. A representative MS measurement and the corresponding deconvolution of native full NPs are shown in Figure 1C.²⁸ In human serum, the particles are slowly degraded with time, in a dose-dependent manner, until reaching an equilibrium of stability (Figure 1D). This partial degradation occurs on the polysiloxane matrix level, with the hydrolysis of the Si–O–Si bonds and without releasing any of the gadolinium ions.²⁸

RESULTS

I. AGuIX Renal Kinetics and Mechanism of Elimination. Previous studies of the Gd-based AGuIX NP indicated both rapid kidney accumulation and renal clearance of the particles, as expected for their small size.^{2,25,29} Twenty-four hours after intravenous (IV) injection, a fraction of the injected dose (ID, approximately 10% ID/g) was still observed in the kidney, whereas all other organs exhibited less than 0.2% of the total ID. Different techniques employing both native and fluorescently labeled NPs were employed to precisely investigate and understand the renal elimination of AGuIX NPs after injection of a therapeutic dose (8 μ mol of Gd in mice). These techniques present simultaneously advantages and drawbacks (see Supporting Information, Table S1) as well as different resolutions and sensitivities, resulting in a strong complementarity.

Whole-Organ Imaging Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). LIBS scanning imaging studies

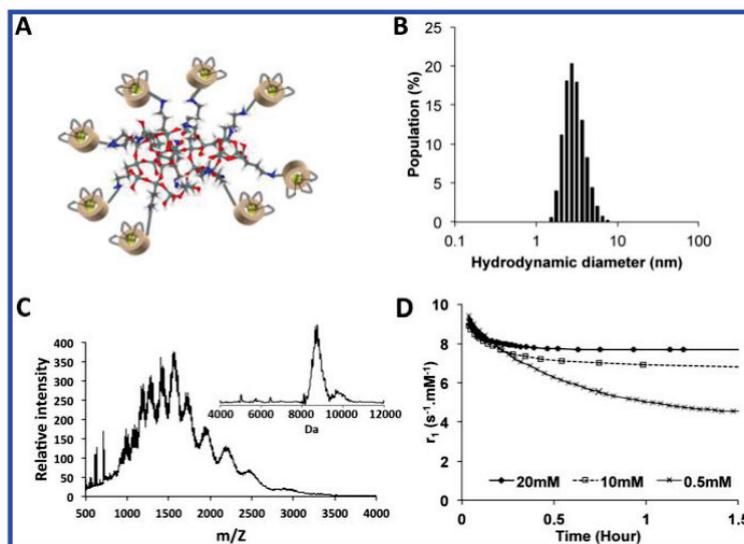


Figure 1. Gd-based AGuIX NP. (A) The components of AGuIX NPs are schematically represented as follows: Gd atoms chelated by DOTA derivatives are indicated in green, and the polysiloxane matrix comprising mainly silicon and oxygen is indicated in gray and red, respectively. The average molecular mass of a AGuIX NP is 8.7 ± 0.3 kDa, with a high Gd content (15 wt %). AGuIX NP has an average chemical formula $\text{Gd}_{10}\text{Si}_{40}\text{C}_{200}\text{N}_{50}\text{O}_{150}\text{H}_x$. (B) The HD distribution of AGuIX NPs as determined by DLS indicates a size of 3 nm. (C) ESI-MS measurements as recorded on the global spectrum. The inset indicates the spectrum generated after deconvolution with a multiplicative correlation algorithm. (D) Temporal evolution of the longitudinal relaxivity (r_1) of the particles, related to their stability, in human serum. The curve fittings, represented by lines, were determined by a monoexponential decay model.

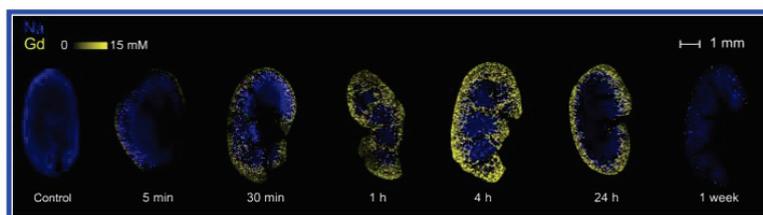


Figure 2. Quantitative imaging of Gd and sodium (Na) by LIBS, related to the distribution of AGuIX NPs in the kidney as a function of elapsed time after administration. Images have been recorded with a spatial resolution of $40 \mu\text{m}$. See also Supporting Information, Table S1.

were first performed at the entire organ scale. Label-free NPs were injected IV in mice. Kidneys were subsequently collected, epoxy-embedded, and sliced for LIBS analysis. We recently adapted this technique to image and quantify multielemental elements in biological tissues (see Supporting Information, Figure S1).^{30–32} This novel approach possesses an all-optical design and allows multielemental scanning imaging and quantification with a maximal spatial resolution of $10 \mu\text{m}$.

To evaluate the kinetics of AGuIX NP elimination, kidneys were collected at different elapsed times after AGuIX NP administration (ranging from 5 min to 1 week) and imaged for Gd, a major element of AGuIX NPs (Figure 2). AGuIX NPs rapidly reached the kidneys, as indicated by the detection of the Gd signal as early as 5 min after IV injection, indicating that the NPs were distributed throughout the organism and reached the kidney during the first passage of blood through the

organ. As for all components filtered by the kidneys, AGuIX NPs were first observed in close proximity to the cortex region, where the Bowman's capsules are located and in excellent agreement with previous nuclear imaging studies,² before diffusing throughout the entire organ (see Supporting Information, Figure S2). The elimination process resulted in the production of an increasing Gd signal that reached a maximum at 4 h postadministration, followed by a subsequent decrease. One week after injection, most of the signal had been cleared, indicating effective particle elimination from the body *via* urine. One week after IV injection, a weak Gd signal was still observed; this could be attributable to a specific entrapment of the particles in the tubules. We also performed high-resolution screening of a kidney sampled 3 h after IV injection of AGuIX NPs. As indicated in Figure 3, the Gd signal was heterogeneous in the cortex region, suggesting a specific accumulation in this region.

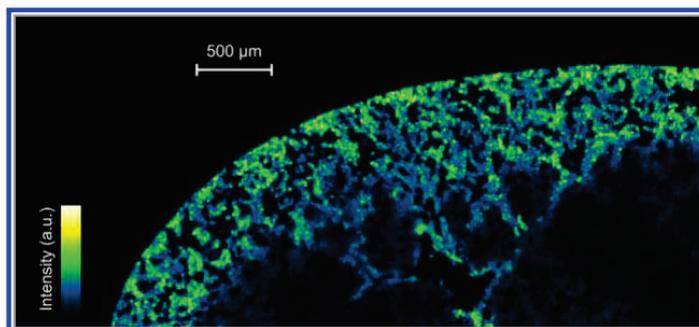


Figure 3. High-definition image of Gd obtained by LIBS. The kidney was screened with a spatial resolution of $10\ \mu\text{m}$ (80 000 pixels), currently the highest resolution that might be obtained using LIBS. The heterogeneous distribution of Gd in the kidney cortex is readily apparent 4 h postinjection.

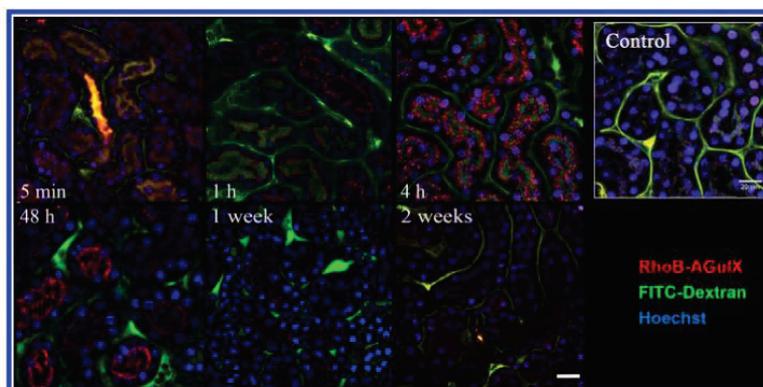


Figure 4. Two-photon microscopy of mice kidneys, from 5 min to 2 weeks after a single injection of $200\ \mu\text{L}$ of Rhodamine B-AGuIX (red) at $40\ \text{mM}$ Gd. The nucleus and vessels were stained by injecting $50\ \mu\text{L}$ of a mixture of Hoechst 33342 (blue) and FITC-Dextran $70\ \text{kDa}$ (green) 5 min before acquisition. The control condition was obtained after injection of staining mixture only (Hoechst 33342 and FITC-Dextran). Scale bar: $20\ \mu\text{m}$. Also see Supporting Information, Figure S5 for 5 min to 1 h *in vivo* kinetics.

Dynamic Approach of the Cortex Uptake. To prevent the use of fixative during the determination of the elimination kinetics, we used intravital two-photon microscopy analysis of functional kidneys. Intravital two-photon microscopy is a high-resolution, real-time, fluorescence imaging technique that permits the analysis of structural and functional changes in a given tissue at the single cell to the millimeter level.^{33,34} To visualize the renal elimination of the NPs, fluorescent Rhodamine B-labeled AGuIX NPs were injected IV in mice 5 min to 2 weeks prior to two-photon microscopy imaging. During anesthesia, the kidney was maintained in a humidified environment at $37\ ^\circ\text{C}$ outside the mouse body to eliminate movement due to breathing and maintain kidney function and blood circulation and placed under the microscope objective (see Supporting Information, Figure S3). A mix of fluorescent dyes was also injected IV to better localize both nuclei and vessels (counterstaining).

Rhodamine B-labeled AGuIX NPs reached the kidney as soon as 5 min after injection, as indicated by a diffuse red signal observed in both the blood vessels

and the tubules (Figure 4). In vessels, the colocalization of FITC-dextran ($70\ \text{kDa}$; green) with Rhodamine B (red) produced a high yellow signal. The NPs were rapidly extravasated and reached the tubules 1 h after injection, as indicated by precise red spots inside the tubule cells. For all investigations performed after longer than 1 h postinjection, a negligible signal was detected in the nuclei and the vessels, indicating efficient filtration of the particles. Similar results were observed at 4 and 48 h postinjection, with a high red fluorescent signal in the cytoplasm of tubule cells. At all time points between 1 and 48 h, some of the tubules appeared to contain the highest number of particles, as previously observed by LIBS; however, without more specific labeling, intravital microscopy analysis could not reveal whether this uptake was predominant in the proximal or distal convoluted tubules. One week after administration, AGuIX was poorly detected in some tubules, whereas others appeared completely empty. The renal elimination of AGuIX by 2 weeks after injection was indicated by a very weak red signal similar to that observed in the control (Supporting Information, Figure S4a).

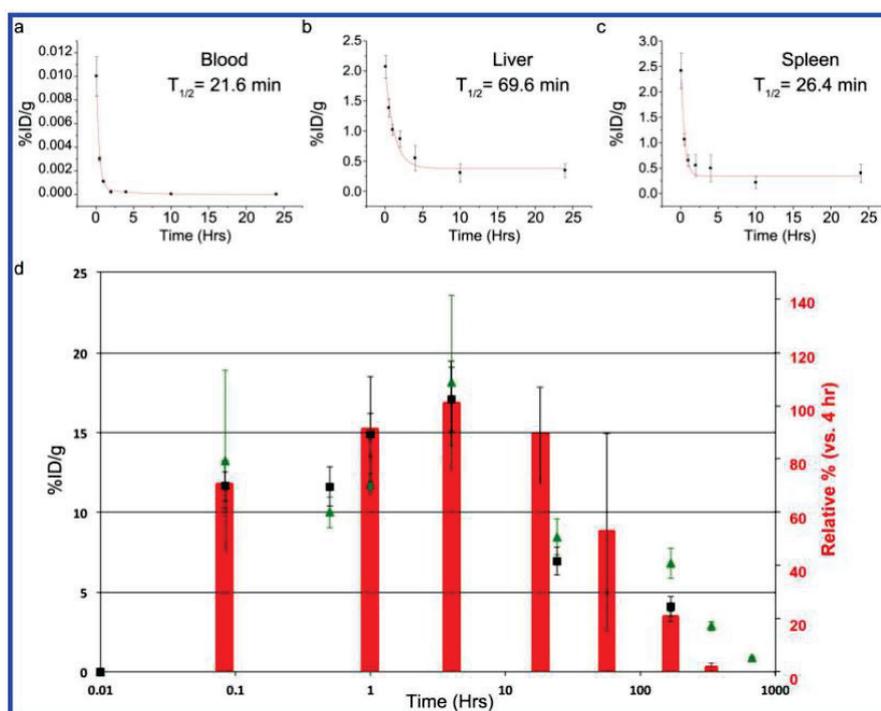


Figure 5. Evaluation of nanoparticle's kinetics of distribution. The nanoparticle's half-life was determined in (a) blood, (b) liver, and (c) spleen. (d) Direct comparison of the quantitative and relative data obtained after LIBS (black), and ICP-OES (green) experiments (both expressed as %ID/g) or two-photon microscopy (relative % vs 4 h, red), for kidney.

Replacement of Rhodamine B with FITC had no effect on the kinetics (also see Supporting Information, Figure S4b).

Nanoparticle's Pharmacokinetic. The elimination kinetics were quantified in the blood, the liver, the spleen, and the kidneys (Figure 5). The biodistribution profiles of the kidney obtained by LIBS and intravital microscopy were also compared to the ones obtained by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). As demonstrated by Figure 5d, the kinetics of uptake and elimination determined by two-photon microscopy and LIBS were in accordance with the values determined by ICP-OES.³⁵ For more representative results, ICP-AES was used to analyze the kidneys of three animals, including the contralateral kidney of the kidney used in the LIBS experiments.

The kinetics of accumulation and elimination determined by the three methods were in accordance and indicated a rapid inflow of AGuIX as soon as 5 min postinjection, a maximum peak after 4 h and a slow decrease until quasi-complete elimination 2 weeks after injection. Prior sample preparation was required prior to the LIBS experiments, including vascular perfusion of the kidney by a fixative that removed and replaced the blood. This step might explain the difference observed in the first minutes postinjection. One and two weeks post injection, the data obtained by two-photon microscopy and ICP-OES were significantly

different, possibly due to the limitations of fluorescence microscopy, that is, the analysis of the surface of the kidney (300 μm depth), autofluorescence of the tissue, and high probability of enzymatic degradation of the labeled particle compared to the high sensitivity of the ICP-OES method. At 48 h postinjection, two-photon microscopy analysis revealed a heterogeneous distribution of AGuIX NPs, as indicated by a very high standard deviation (Figure 4). Nevertheless, the kinetics observed using the three different methods were highly comparable and complementary.

Investigation at the Cell Level Using Transmission Electron Microscopy (TEM). As observed in the previous experiments (Figures 3 and 4), some tubules retained particles for several days, whereas others tubules did not. To identify the type of convoluted tubules implicated in this specific retention in the renal cortex, TEM was used to analyze samples collected 5 min to 2 weeks postinjection. As demonstrated in Figure 6, a large quantity of particles was detected as early as 5 min after IV injection in both proximal and distal convoluted tubules. Similar results were observed 1 h after AGuIX NP administration. The samples collected 1 week after IV injection revealed a smaller quantity of particles, as indicated by the small number of vacuoles present in the proximal tubules, whereas in the distal tubules, particles were rarely detected. This

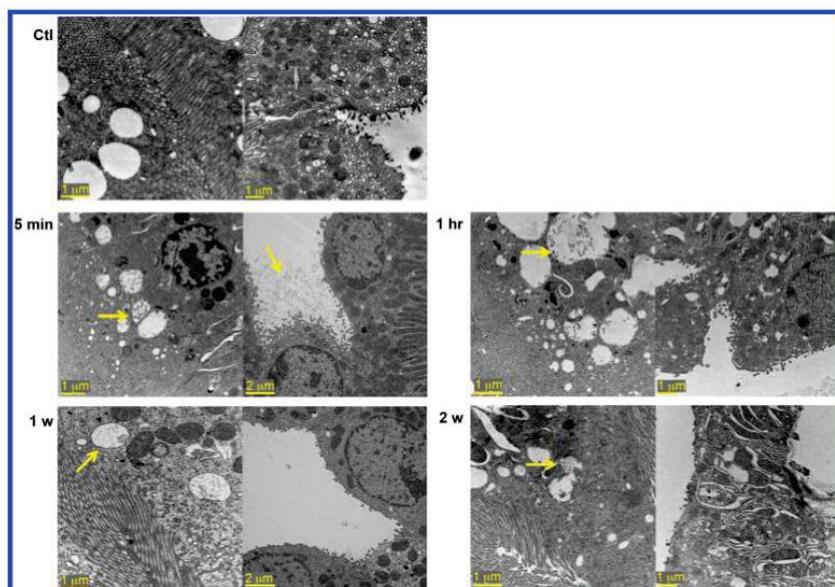


Figure 6. TEM images of the distribution of AGuIX NPs in the proximal (left panels) and distal convoluted tubes or glomerular region (right panels) as a function of elapsed time since a single injection. AGuIX particles are indicated by the arrows. At 2 weeks, few particles remained, and most of the observed regions were vacant. (See also Supporting Information, Figure S6 for a more detailed figure.)

specific retention in the proximal tubules under physiological conditions has been described, and the filtration process may occur for several days before excretion.³⁶ Finally, 2 weeks after injection, limited AGuIX aggregates were observed, although most of the particles were eliminated from both the proximal and distal tubules.

In summary, the results obtained by the different techniques used to determine the kinetics of AGuIX NP elimination were similar and indicated a rapid accumulation of AGuIX NPs in the kidneys from the first minutes to approximately 4 h postinjection. This accumulation was mainly observed in the proximal convoluted tubules, where some particles remained entrapped for several days after IV injection before excretion in urine.

II. AGuIX NP Biodegradation and Toxicity Studies. *Ila. Nanoparticle Metabolism.* On the basis of the results of the previous investigations, we can hypothesize that either (i) AGuIX NPs are eliminated as full native NPs from the body without any degradation or (ii) they are degraded in a long, specific process involving the proximal tubules. We performed mass spectrometry analysis of mouse urine to elucidate the process of degradation and evaluate this hypothesis. The urine was either withdrawn from the bladder to obtain the first 24 h samples or collected over 24 h beyond this time ($n = 3$ minimum/point). The relative intensity of the total ion signal recorded on the mass spectrometer detector was recorded as a function of time (Supporting Information, Figure S7). The deconvolution

of the ESI spectra (Figure 7A) revealed two main distributions of NPs at 8.75 kDa (± 320 Da) and 9.6 kDa (± 670 Da), as well as several secondary distributions corresponding to the macromolecules observed at 4 and 7.7 kDa. At low mass (< 8 kDa), the macromolecules, which were identified by their isotopic distribution (Supporting Information, Figure S6, inset), corresponded perfectly with those obtained from artificially degraded NPs²⁸ and were mainly observed 5 min postinjection of AGuIX NPs before strongly decreasing with time (Figure 7A). From 5 min to 4 weeks post-IV injection, the full native AGuIX NPs were present in the urine. A mathematical deconvolution of the mass spectra associated with the NPs brings to light two distribution masses, one observed at 8.75 kDa and the second at 9.6 kDa. The smallest NPs corresponding to 8.75 kDa were eliminated more rapidly than those constituting the 9.6 kDa population, as indicated by the decrease in their relative intensities with time; this result indicates that the elimination of NPs is related to their mass. After 4 weeks, the very weak signal measured by mass spectrometry still corresponded to the signal of the native AGuIX NPs, indicating that some particles remained in the kidneys.

A comparison of the results obtained by mass spectroscopy and ICP-OES was performed (Figure 7B). The relative quantity of AGuIX NPs quantified in the urine by mass spectrometry perfectly matched the quantity of particles measured by ICP-OES when standardized to 4 h postinjection. Thus, the NPs that enter the kidney may be excreted in comparable proportions.

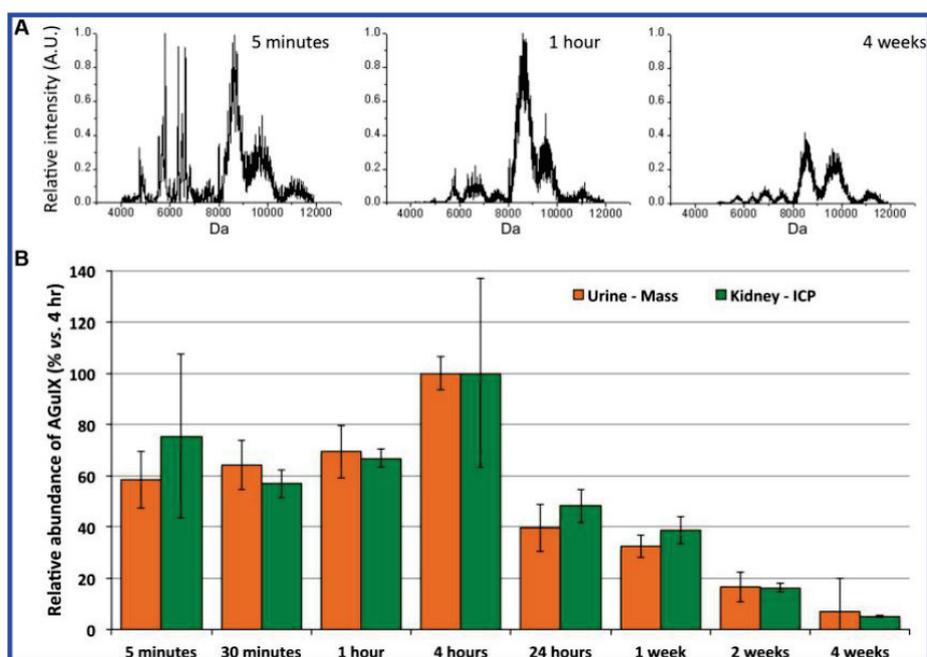


Figure 7. Urine analysis by mass spectroscopy after IV injection of AGuIX NPs. (A) Deconvoluted ESI mass spectra from m/z spectra of urine samples collected at 5 min, 1 h, and 4 weeks after a single injection of AGuIX NPs, expressed as mass (Da). (B) Comparison of the relative quantities of AGuIX NPs measured in the urine by mass spectrometry and ICP-AES.

TABLE 1. Serum Creatinine Concentration after a Single Injection of AGuIX NPs ($8 \mu\text{mol}/\text{mouse}$), Expressed as $\text{mg}/\text{L} \pm \text{SD}^a$

	control	5 min	30 min	1 h	4 h	24 h	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Creatinine level	8.7 ± 0.5	8.0 ± 1.7	$12.7 \pm 2.2^*$	6.5 ± 3.5	7.8 ± 1.8	5.5 ± 0.2	6.4 ± 1.4	7.0 ± 1.3	8.7 ± 0.4	8.5 ± 2.0

^aThe concentration was measured using the Jaffé method and compared to that measured in control mice ($n = 3$).

During the elimination process, small degraded particles were eliminated from the body in the first minutes postinjection, whereas full native AGuIX NPs were entrapped in the proximal convoluted tubules from a few hours to several days before elimination from the organism as native AGuIX NPs.

IIb. Evaluation of Safety: Renal Function and Maximum Tolerated Dose (MTD). An evaluation of global toxicity is necessary prior to the clinical application of a compound. In the present context, the fine evaluation of renal function is crucial to confirm the absence of side effects in this major elimination organ. Renal function was evaluated based on serum creatinine levels and histological analysis of the kidneys after different elapsed times post AGuIX administration. A study of MTD was also conducted to determine the main observable effects of AGuIX on mice after bolus injection.

Renal function was first evaluated by measuring serum creatinine concentrations.^{29,37} As shown in Table 1, the serum creatinine concentration was significantly increased 30 min after NP administration ($p = 0.042$), but the serum level returned to physiological

levels as soon as 1 h after IV injection, indicating a transient perturbation that may be attributable to the bolus injection of the particles.

A histological study of the kidney was then performed after three repeated injections of AGuIX NPs (1 injection per week for 3 weeks) to determine the impact of multiple injections on renal function at the microscopic scale. Standard periodic acid-Schiff (PAS) staining was used to identify structural modifications, the presence of infiltrate cells and glomerular fibrosis. As shown in Figure 8, after three consecutive IV administrations of AGuIX NPs, some tubular vacuoles appeared (+2 weeks). This slight modification might be transient and insignificant. To assess the reversibility of this phenomenon and study the long-term impact of AGuIX NPs administration, kidneys were collected 4 and 8 weeks after treatment and analyzed by PAS staining. Neither atrophic tubules nor necrotic cells were observed in the tubules. Some focal vacuoles appeared without necrosis but decreased with time (+8 weeks). Local abrasion of the brush border (+2 weeks) was completely repaired after 4 weeks. For all samples, staining in the glomeruli indicated the

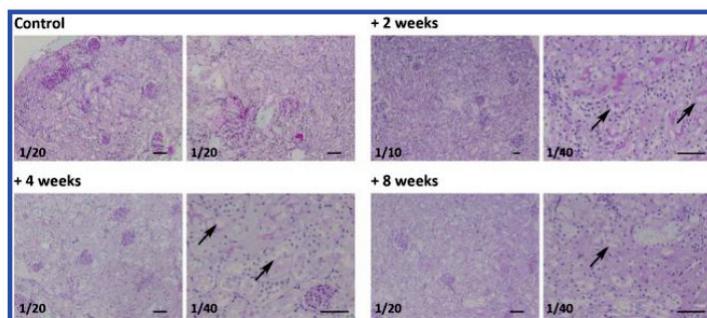


Figure 8. PAS staining of renal sections after repeated injection of AGuIX NPs (1 injection every week for 3 weeks). The arrows indicate tubular vacuoles. The magnification is indicated at the left bottom corner of each image. Scale bar: 50 μm .

TABLE 2. Determination of the MTD of AGuIX in Non-tumor-bearing Mice after a Single IV Injection^a

dose/inj $\mu\text{mol}/\text{mouse}$	AGuIX NPs concn g/L	experimental state score (ESS)				total	wt variation	
		diarrhea	lethargy	closed eyes	difficulty waking after anesthesia		%	no. of deaths
30	150	0	0	0	0	0	+3.2	0
40	200	0	0	0	1	1	+5.4	0
50	250	0	0	0	2	2	+0.8	0
75	500 ^c	0	0	0	3	3	+0.5	1 ^b

^aThe ESS was calculated based on the absence (0) or presence (1) of the evaluated settings. The total ESS was calculated by summing the individual scores. ^bDeath occurred a few seconds after bolus injection. ^cInjected volume = 150 μL .

absence of lesions, absence of cell proliferation, and absence of deposits. At the vessel level, no lesions were observed. The interstitial tissue indicated the absence of fibrosis or edema, a limited number of inflammatory cells (<1%, see also Supporting Information, Figure S8) and some peritubular dilated capillaries containing erythrocytes. In summary, the observed modifications were slight and transient after three consecutive injections of AGuIX NPs.

Finally, a specific study was performed to evaluate the MTD of AGuIX NPs. AGuIX NPs were IV injected into six mice per group, and the mice were followed for 10 days to detect any adverse effects (Table 2). For *in vivo* applications in mice, the therapeutic dose (TD) corresponds to an injection of 8 μmol of $[\text{Gd}^{3+}]$ (a volume of 200 μL at a concentration of 40 mM $[\text{Gd}^{3+}]$). The TD is defined as the quantity of Gd per body mass mostly used in clinical MRI applications. Increasing doses in the same volume were IV injected in mice to determine the MTD, which is defined as the highest single dose of AGuIX NPs that does not cause any animal fatalities in a group, a maximal weight loss of 10% of total body weight at the end of the experiment, and the smallest experimental score, as defined in Table 2. For single doses, no death was observed 10 days after AGuIX NPs injection, maximal weight losses were less than 10% of total body weight, and the experimental state scores (ESS) were low, even at doses 10-fold higher than the intended safe dose. Thus, a dose 10-fold higher than the TD could be used before

fatalities occurred. In these experiments, colloidal AGuIX NP solutions with a concentration of 500 g/L, the highest concentration at which the particles were soluble, were injected *via* a bolus.

These first results of the investigations of the safety of AGuIX NPs indicate promise for translation to the clinic. The very weak observed effects transiently altered renal function, as indicated by serum creatinine levels and the repair of tubular vacuolation within several weeks after repeated treatment. The MDT in mice was nearly 10-fold higher than the TD after bolus injection; slow IV injection may increase tolerance. Taken together, these results indicate promise for future regular studies of AGuIX NPs.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The 3 nm Gd-based AGuIX NPs were previously developed and designed for theranostic approaches in cancer radiotherapy. In parallel with investigations of efficacy, preliminary *in vivo* safety studies are required to determine their pharmacokinetics, elimination pathway, metabolism, and potential degradation.

The rapid renal elimination of AGuIX NPs after IV administrations was confirmed and characterized in this study.^{2,26,35} The retention of AGuIX NPs in the renal cortex and their clearance was demonstrated by LIBS elemental imaging. This innovative method can map and precisely quantify several elements, including Gd, one of the main constitutive elements of the particles. The heterogeneous distribution of Gd in the cortex was

also determined by a high-definition investigation (Figure 3). Intravital two-photon microscopy revealed fast renal entry of the particles,³⁸ following the first heartbeats. This method also indicated that the highest uptake occurred 4 h after administration and that tubular retention was heterogeneous, particularly 48 h after administration (Figure 4). The fluorescent signal was mainly lost 2 weeks after IV injection, possibly due to partial degradation of the labeled particles and consequent dye excretion and/or the limitation of the technique itself, as some native particles were still detected by the ICP-OES method. Spectrometric methods, i.e., ICP-OES and LIBS, confirmed these kinetics but also generated quantitative information for either the entire kidney or kidney sections. The fine sensitivity of ICP-OES enabled the detection of particles several weeks after administration; only 0.5% of the injected dose was measured in the kidney 4 weeks after IV injection. These three methods provided similar but complementary information about AGuIX NPs elimination due to their different sensitivities and biological scales.

The comparison of the different methods revealed high standard deviations (SD) for ICP-OES in the first hours after IV administration; this SD might be due to the presence of particles in the bloodstream or diuresis (Figure 5). By contrast, the high SD measured by two-photon microscopy at 48 h post-IV injection demonstrated the heterogeneity of the distribution of AGuIX NPs between proximal and distal tubules. Thus, more than 95% of the particles were efficiently eliminated within the first week after IV administration, with approximately 99% removal after 4 weeks. These rates of removal are consistent with the pattern of elimination of other small, silicon-based particles: major elimination in the first days and complete elimination after several weeks.^{6,7,39,40} We were able to determine precisely the different byproducts excreted from the body in urine. The first excreted products corresponded to both degraded AGuIX NPs that were most likely biodegraded after dilution in the bloodstream and entire particles, whereas only intact particles were released after a couple of minutes. This pattern of biodegradation and elimination favors safe elimination of the compound.

TEM revealed renal accumulation of AGuIX NPs in the proximal tubules, whereas the distal tubules were rapidly cleared. The functions of the proximal tubule cells include the degradation of compounds after

glomerular filtration by exposure to low pH (pH 4 in lysosomes) and return of the byproducts, consisting of a piece of polysiloxane surrounded by chelating moiety and Gd, to the bloodstream or elimination through urine. The long accumulation of AGuIX NPs in these cells might be explained partially by the high stability of AGuIX NPs in acidic medium, which prevents their degradation in lysosomes before their elimination in urine.⁴¹ However, a single bolus injection was very well tolerated in rodents, even at high concentrations, as indicated by the MDT assay.

Histological analysis indicated that repeated injections led to transient vacuolation of the proximal convoluted tubules, a phenomenon that was mainly restored 8 weeks after a 3-week treatment. Renal tubules have a regenerative capacity;⁴² however, the turnover of proximal tubule cells in adult rodents is very low, and less than 20% of the proximal tubule cells may regenerate during a 2 week period.⁴³ AGuIX NPs, which were efficiently eliminated, exerted a moderate and transient effect on proximal cells. The restoration of the proximal convoluted tubules may be due to self-repair as well as natural turnover.

To conclude, AGuIX Gd-based NPs, designed for theranostic applications in radiosensitizing cancer treatment, are eliminated *via* the urinary route in a two-step process involving rapid elimination of biodegraded and smaller particles and slower elimination of larger particles. The effect of AGuIX NPs on renal function was limited to the vacuolation of the proximal tubules cells; this phenomenon was moderate, transient, and did not affect renal function itself. All together, these results indicate the appropriate elimination of NPs from the organism, which is a prerequisite for the clinical development of such agents. In this paper, we combine different analytical methods to identify, image, and quantify the NPs *in vivo* and *ex vivo*. The interest of such a combination of imaging techniques and analytical measurements may be useful in nanomedicine with a wide range of materials that may be distinct from the background, especially for LIBS imaging. In particular, the correlation between analytical measurements and imaging of the compound of interest appear to be a good standard operating procedure in nanopharmacology and nanotoxicology, and may be exploited in different organs as a milestone protocol for distribution, accumulation/elimination, and toxicity of a wide range of NPs and materials in both physiological and pathological conditions.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and Reagents. The fluorescent dyes used for two-photon microscopy were fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran 70-kDa (50 mg/mL in saline, No. FD70S-1G, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier France) and Hoechst 34580 (Life

Technologies SAS, Saint Aubin, France). Diethylene glycol (DEG, 99%) was purchased from SDS Carlo Erba (France). DOTAGA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic acid) was furnished by Chematech (Dijon, France). Gadolinium chloride hexahydrate ($[\text{GdCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}]$, 99%) and gadolinium oxide cores were furnished by Nano-H S.A.S (Saint-Quentin

Fallavier, France). Only Elga Purelab Ultra water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega$) was used to prepare aqueous solutions.

Synthesis of the Gd-Based AGuIX NPs. AGuIX NPs were synthesized as previously described.²¹ Detailed information can be found in the Supporting Information.

Relaxometry. Relaxation time measurements were performed using a Bruker Minispec MQ60 NMR analyzer, operating at 1.4 T magnetic field.

Animals and Ethics. Six- to eight-week-old Balb/c and NMRI nude mice were purchased from Janvier, France. All mice were housed in a specific pathogen-free (SPF) environment, and procedures were performed in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Lyon and Grenoble. The research involving animals was authorized under the agreement number (L. Sancey, Ph.D., permit number 38 09 22 and project in accordance with French Guidelines No. LS-2013-004). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering during the experimental procedure. Animals were housed in cages with food and water ad libitum and a 12 h light/dark cycle at $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Anesthetized mice were injected with AGuIX NPs as follows: single administration, $200 \mu\text{L}$ at 40 mmol/L ; repeated injections (for the histology study) a similar dose administered once each week for three weeks.

Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Kidney Sample Preparation. Mice were initially anesthetized with 4% isoflurane, and anesthesia was maintained with $\sim 2\%$ isoflurane. Gd-based NPs (AGuIX, $8 \mu\text{mol}$ of Gd) were IV injected into the mice under anesthesia. The kidneys were sampled at various times from 5 min to 1 week after injection and were embedded in epoxy, as described elsewhere.²² In brief, after sampling, each kidney was perfused and fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH of 7.4) overnight at room temperature to preserve both the tissue structure and the distribution of the particles. The samples were then rinsed three times for 15 min each in 0.2 M sodium cacodylate buffer. After washing, the samples were dehydrated in a series of ethanol solutions of increasing concentration, ending with propylene oxide. The samples were then embedded in EPON (1:1 mixture of diglycidyl ether and dodecylsuccinic anhydride, density of 1.22 g/L). The sample surfaces were prepared using a microtome. For elemental quantification, standards containing AGuIX NPs were embedded in the same EPON resin, at five concentrations ranging from 1 to 40 mM . The powders were mixed with the resin (for a minimum of 4 h), warmed for 2 days ($60 \text{ }^\circ\text{C}$), and finally prepared using a microtome.

LIBS Settings. The instrumental setup was based on a home-made optical microscope that combined a LIBS laser injection line, a standard optical-imaging apparatus, and a three-dimensional motorized platform for sample positioning. The LIBS experiment has been described elsewhere,³⁵ and only its main features are described in the following. Quadruple Nd:YAG laser pulses of 266 nm with a duration of 5 ns and a 10 Hz repetition rate were focused onto the sample by a high-power $15\times$ magnification objective (LMU-15X-266, Thorlabs). During the experiments, the sample was translated along 2 axes by an X–Y motorized stage. The measurements were performed at room temperature with argon gas flowing through the plasma region. During the sample scan, trigonometric surface positioning was used to compensate for any flatness anomalies and to accurately control the focalization distance (the objective-to-sample distance). A beam shutter was used to control the delivery of the laser pulse to the sample such that only one plasma plume was produced for each position in the sample. The light emitted by the plume was collected by a quartz lens with a focal distance of 2 cm and focused onto the entrance of an optical fiber bundle. The output of the fiber bundle was connected to a Czerny–Turner spectrometer equipped with a 1200-L/mm grating blazed at 300 nm and an intensified charge-coupled device (ICCD) camera (Shamrock 303 and iStar, Andor Technology). The ICCD camera was synchronized with the Q-switch of the laser, and the spectrum acquisition was performed with a delay of 300 ns and a gate of $3 \mu\text{s}$. A spectral measurement range of typically 30 nm was accessible with a spectral resolution of approximately 0.15 nm . The laser energy was stabilized

throughout the experiment using a servo control loop to ensure the long-term stability of the laser output. Customized software developed in the LabVIEW environment controlled the entire system and enabled the performance of automated sequences to scan the region of interest of the tissue sample with a specific lateral resolution.³⁰

Intravital Microscopy—Two-Photon Microscopy. Two-photon microscopy was performed using a LSM 7 MP (Zeiss, Germany) equipped with a $20\times$ water-immersion objective (NA 1.0; Zeiss) and ZEN 2010 software. Laser excitation was performed at 800 nm with a Ti:sapphire laser (Chameleon vision II; Coherent, UK) using a constant laser power of approximately 60 mW . Fluorescence emissions were detected simultaneously by three nondescanned photomultiplier tubes with a 492/SP25 nm filter (Semrock, US) for “blue” fluorescence emission, a 542/50 nm filter (Semrock, US) for “green” fluorescence emission, and a 617/73 nm filter (Semrock, US) for “red” fluorescence emission (Rhodamine B). The blue and green channels were collected for specific labeling of the nucleus (Hoechst 34580) and blood vessels (FITC (fluorescein isothiocyanate)—Dextran), respectively. Autofluorescence and second harmonic generation of biological structures could also be collected in the three channels owing to the presence of collagen, lectin, and elastin.

During *in vivo* two-photon microscopy, animals were anesthetized with $1\text{--}2\%$ isoflurane in a 70% air, 30% O_2 gas mixture. Body temperature was maintained at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ using a heating blanket. A small incision was made in the mouse's back to expose the kidney. After imaging the kinetic elimination of AGuIX NPs for 1 or 2 h, a mixture of FITC–dextran and Hoechst was IV injected. Ten minutes later, the kidney was removed either for *ex vivo* imaging or chemical fixation and/or freezing in pentobarbital, followed by storage in liquid nitrogen until further analysis.

Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) Analysis. ICP-OES analysis was used to determine the Gd content in both the NPs themselves and the kidneys. After a single injection of mice with AGuIX NPs, the kidneys were dispersed in 5 mL of aqua regia (67% HNO_3 / 37% hydrochloric acid (w/w)) for 4 h at $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Subsequently, the samples were diluted with a HNO_3 5% (w/w) matrix to adjust the volume to 10 mL ; the samples were then filtered ($0.22 \mu\text{m}$) and analyzed by ICP-OES at the lab or at the “Service Central d'Analyses du CNRS” (Solaize, France) to determine the elemental content with a precision of 2% . For calibration of the ICP-OES, single-element standard solutions were prepared by successive dilution in a HNO_3 5% (w/w) matrix from a 1000-ppm Gd standard acquired from SCP Science. Importantly, for comparison with the LIBS experiment, the right kidney of each animal was sectioned for imaging, and the left kidney of the same animal was used for ICP-OES.

Transmission Electron Microscopy. Sampled kidneys were fixed as described previously or LIBS analysis and postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h. After washing, the samples were dehydrated in an ethanol series of increasing concentrations, ending with propylene oxide. The samples were then embedded in EPON (1:1 mixture of diglycidyl ether and dodecylsuccinic anhydride). Thin sections of approximately 70 nm were prepared with a Reichert Ultracut E ultramicrotome. The sections were observed using a Philips CM120 electron microscope operating at 120 kV .

Electrospray Ionization (ESI) Mass Spectrometry. Full-scan mass spectra were obtained using a linear quadrupole ion trap mass spectrometer (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) with enlargement for the high $2000\text{--}4000 \text{ Th}$ range. The NP solution was electrosprayed at a flow rate of $20 \mu\text{L/min}$ in positive ion mode.

Two different tunes were used: one for high mass observation (Tune 1 between 200 m/z and 4000 m/z) and the other for low mass (Tune 2 between 150 m/z and 2000 m/z). The low mass tune allowed us to study AGuIX fragments. Isotopic distributions of fragment ions were recorded using the zoom scan mode of the LTQ ion trap mass spectrometer. Because AGuIX NPs contain multiple groups capable of being ionized (e.g., Gd-DOTA complexes), the ESI source can produce highly charged ions. For those macromolecules that can sustain multiple charges, a distribution of charge states is often observed in

the mass-to-charge spectrum. This multiplicity of states gives rise to an "envelope" of peaks in the spectrum. Such a distribution of charges was observed in the m/z range 1000–4000 after electrospraying in positive mode a water solution containing AGuIX NPs. A multiplicative correlation algorithm (MCA) was used to estimate the mass of the NPs from the mass-to-charge spectra produced by ESI-MS.⁴⁴ The multiplicative correlation is designed to enhance the deconvoluted signal when the parent molecule is distributed into several charge states in the measured spectrum.

Creatinine Level. Total blood samples were collected from the right ventricular cavity. The serum was separated by centrifugation at 3000g for 10 min at 4 °C, and the creatinine concentration was analyzed according to the manufacturer's instructions (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, France). Briefly, 2-point kinetics mode was used to measure the red-orange complex formed with picric acid in alkaline medium according to the Jaffe method. *In vivo* TPLSM imaging was performed at the Two-Photon Microscopy Platform (GIS-IBISA ISdV, Photonic Imaging Center - Grenoble Institute of Neuroscience). Measurements were obtained with a 50 scan UV-visible spectrophotometer (Varian Cary Eclipse).

Maximal Tolerated Dose. Groups of six mice received a single bolus injection of AGuIX NPs at doses ranging from 30 to 75 μmol , that is, a single IV injection of 150 to 200 μL at concentrations from 150 to 500 g/L. After being injected, the mice were weighed and observed every day to evaluate the general clinical state. For each animal, a score was calculated based on the absence (value 0) or presence (value 1) of diarrhea, lethargy, closed eyes, and difficulty waking after anesthesia. An experimental state score (ESS) was then calculated for each group by summing the individual scores. Loss of weight and mortality were also recorded. The MTD was defined as the highest single dose that met all of the following criteria: absence of death in the group, maximal weight loss of 10% in nontumor-bearing animals, and ESS value as low as possible.

Histology. Histology was performed on kidney samples after repeated injections of AGuIX NPs (1 injection/week for 3 weeks). Kidneys were sampled at the indicated time after injection. Kidneys were then fixed in a Japanese fixative at 4 °C for a minimum of 1 h; next, kidneys were washed in cacodylate sodium, dehydrated in pure acetone, and incubated in glycol-methacrylate (GMA) for 3 h before embedding in GMA containing 0.8% aniline propanol. Japanese fixative is a solution of 6% paraformaldehyde, 8.5% sodium cacodylate, 0.073% calcium chloride, and 0.2% picric acid, adjusted at pH 7.4.

Resin sections with a thickness of 2 μm were prepared and stained with periodic acid-Schiff (PAS) using standard protocols. Briefly, 2- μm slides were treated with 0.5% periodic acid for 10 min, washed with water, colored with Schiff stain for 20 min, rinsed again with water, and then counter-stained with Harris hematoxylin for 30 min. Sections were mounted with resinous mounting medium.

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment. The authors gratefully acknowledge the LABEX iMUST (ANR-10-LABX-0064) and PRIMES (ANR-11-LABX-0063) of Lyon 1 University within the programs "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007 and ANR-11-IDEX-0063, respectively), operated by the French National Research Agency (ANR) within the project EMILL, the ANR Multimage ANR-12-RPIB-0010, as well as the Lyon Science Transfert, for financial support. We also heartily acknowledge the CT μ (A. Rivoire and C. Boule), F. Pelascini (CRIT Matériaux Alsace) for fruitful discussions and advice regarding epoxy samples and standards, and F. Rossetti for AGuIX synthesis.

Supporting Information Available: Synthesis of the NPs; kinetics of elimination; advantages and disadvantages of the different techniques. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES AND NOTES

- Hainfeld, J. F.; Smilowitz, H. M.; O'Connor, M. J.; Dilmanian, F. A.; Slatkin, D. N. Gold Nanoparticle Imaging and

- Radiotherapy of Brain Tumors in Mice. *Nanomedicine* **2013**, *8*, 1601–1609.
- Lux, F.; Mignot, A.; Mowat, P.; Louis, C.; Dufort, S.; Bernhard, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Brunet, C.; Antoine, R.; *et al.* Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 12299–12303.
- Cho, W. S.; Cho, M.; Jeong, J.; Choi, M.; Han, B. S.; Shin, H. S.; Hong, J.; Chung, B. H.; Jeong, J.; Cho, M. H. Size-Dependent Tissue Kinetics of PEG-Coated Gold Nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *245*, 116–123.
- Dufort, S.; Sancey, L.; Coll, J. L. Physico-Chemical Parameters that Govern Nanoparticles Fate also Dictate Rules for their Molecular Evolution. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 179–189.
- Han, S. G.; Lee, J. S.; Ahn, K.; Kim, Y. S.; Kim, J. K.; Lee, J. H.; Shin, J. H.; Jeon, K. S.; Cho, W. S.; Song, N. W.; *et al.* Size-Dependent Clearance of Gold Nanoparticles from Lungs of Sprague-Dawley Rats after Short-Term Inhalation Exposure. *Arch. Toxicol.* **2014**, *10.1007/s00204-014-1292-9*.
- Huang, X.; Li, L.; Liu, T.; Hao, N.; Liu, H.; Chen, D.; Tang, F. The Shape Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles on Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility *In Vivo*. *ACS Nano* **2011**, *5*, 5390–5399.
- Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Iyety Ipe, B.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Renal Clearance of Quantum Dots. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165–1170.
- Deen, W. M. What Determines Glomerular Capillary Permeability? *J. Clin Invest* **2004**, *114*, 1412–1414.
- Semmler-Behnke, M.; Kreyling, W. G.; Lipka, J.; Fertsch, S.; Wenk, A.; Takenaka, S.; Schmid, G.; Brandau, W. Biodistribution of 1.4- and 18-nm Gold Particles In Rats. *Small* **2008**, *4*, 2108–2111.
- Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Focella, T. M.; Smilowitz, H. M. Gold Nanoparticles: A New X-ray Contrast Agent. *Br. J. Radiol.* **2006**, *79*, 248–253.
- Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- Morana, G.; Salviato, E.; Guarise, A. Contrast Agents for Hepatic MRI. *Cancer Imaging* **2007**, *7* Spec No A, S24–S27.
- Markides, H.; Rotherham, M.; El Haj, A. J. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *J. Nanomater* **2012**, 614094.
- Heverhagen, J. T.; Krombach, G. A.; Gizewski, E. Application of Extracellular Gadolinium-Based MRI Contrast Agents and the Risk of Nephrogenic Systemic Fibrosis. *R. College Radiol.* **2014**, *186*, 661–669.
- Thomsen, H. S.; Morcos, S. K.; Almen, T.; Bellin, M. F.; Bertolotto, M.; Bongartz, G.; Clement, O.; Leander, P.; Heinz-Peer, G.; Reimer, P.; *et al.* Nephrogenic Systemic Fibrosis and Gadolinium-Based Contrast Media: Updated ESUR Contrast Medium Safety Committee Guidelines. *Eur. J. Radiol.* **2013**, *23*, 307–318.
- Perazella, M. A. Nephrogenic Systemic Fibrosis, Kidney Disease, and Gadolinium: Is There a Link? *Clin J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *2*, 200–202.
- Deo, A.; Fogel, M.; Cowper, S. E. Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Population Study Examining the Relationship of Disease Development to Gadolinium Exposure. *Clin J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *2*, 264–267.
- Jalandhara, N.; Arora, R.; Batuman, V. Nephrogenic Systemic Fibrosis and Gadolinium-Containing Radiological Contrast Agents: An Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *89*, 920–923.
- Advisory, F.P.H. *Gadolinium-Containing Contrast Agents for MRI*; Faculty of Public Health: London, **2006**.
- Mignot, A.; Truillet, C.; Lux, F.; Sancey, L.; Louis, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Bocher, L.; Gloter, A.; Stephan, O.; *et al.* A Top-Down Synthesis Route to Ultrasmall Multifunctional

- Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications. *Chemistry* **2013**, *19*, 6122–6136.
22. Rima, W.; Sancey, L.; Aloy, M. T.; Armandy, E.; Alcantara, G. B.; Epicier, T.; Malchere, A.; Joly-Pottuz, L.; Mowat, P.; Lux, F.; et al. Internalization Pathways into Cancer Cells of Gadolinium-Based Radiosensitizing Nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, *34*, 181–195.
 23. Sancey, L.; Lux, F.; Kotb, S.; Roux, S.; Dufort, S.; Bianchi, A.; Cremillieux, Y.; Fries, P.; Coll, J. L.; Rodriguez-Lafrasse, C.; et al. The Use of Theranostic Gadolinium-Based Nanoparticles to Improve Radiotherapy Efficacy. *Br. J. Radiol.* **2014**, *14*–00134.
 24. Bridot, J. L.; Faure, A. C.; Laurent, S.; Riviere, C.; Billotey, C.; Hiba, B.; Janier, M.; Jossierand, V.; Coll, J. L.; Elst, L. V.; et al. Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast Agents for *in Vivo* Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5076–5084.
 25. Kryza, D.; Taleb, J.; Janier, M.; Marmuse, L.; Miladi, I.; Bonazza, P.; Louis, C.; Perriat, P.; Roux, S.; Tillement, O.; et al. Biodistribution Study of Nanometric Hybrid Gadolinium Oxide Particles as a Multimodal SPECT/MR/Optical Imaging and Theranostic Agent. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1145–1152.
 26. Miladi, I.; Duc, G. L.; Kryza, D.; Berniard, A.; Mowat, P.; Roux, S.; Taleb, J.; Bonazza, P.; Perriat, P.; Lux, F.; et al. Biodistribution of Ultra Small Gadolinium-Based Nanoparticles as Theranostic Agent: Application to Brain Tumors. *J. Biomater. Appl.* **2013**, *28*, 385–394.
 27. Thomsen, H. S. Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Serious Late Adverse Reaction to Gadodiamide. *Eur. Radiol.* **2006**, *16*, 2619–2621.
 28. Truillet, C.; Lux, F.; Tillement, O.; Dugourd, P.; Antoine, R. Coupling of HPLC with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Studying the Aging of Ultrasmall Multifunctional Gadolinium-Based Silica Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10440–10447.
 29. Bianchi, A.; Dufort, S.; Lux, F.; Courtois, A.; Tillement, O.; Coll, J. L.; Cremillieux, Y. Quantitative Biodistribution and Pharmacokinetics of Multimodal Gadolinium-Based Nanoparticles for Lungs Using Ultrashort TE MRI. *Magma* **2013**, *27*, 303–316.
 30. Motto-Ros, V.; Negre, E.; Pelascini, F.; Panczer, G.; Yu, J. Precise Alignment of the Collection Fiber Assisted by Real-Time Plasma Imaging in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Spectrochim Acta, Part B* **2014**, *92*, 60–69.
 31. Motto-Ros, V.; Sancey, L.; Ma, Q. L.; Lux, F.; Bai, X. S.; Wang, X. C.; Yu, J.; Panczer, G.; Tillement, O. Mapping of Native Inorganic Elements and Injected Nanoparticles in a Biological Organ with Laser-Induced Plasma. *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *101*, 223702.
 32. Sancey, L.; Motto-Ros, V.; Kotb, S.; Wang, X. C.; Lux, F.; Panczer, G.; Yu, J.; Tillement, O. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: A New Approach for Nanoparticle's Mapping and Quantification in Organ Tissue. *J. Vis. Exp.* **2014**, e51353.
 33. Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. Nonlinear Magic: Multiphoton Microscopy in the Biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369–1377.
 34. Pittet, M. J.; Weissleder, R. Intravital Imaging. *Cell* **2011**, *147*, 983–991.
 35. Sancey, L.; Motto-Ros, V.; Busser, B.; Kotb, S.; Benoit, J. M.; Piednoir, A.; Lux, F.; Tillement, O.; Panczer, G.; Yu, J. Laser Spectrometry for Multi-elemental Imaging of Biological Tissues. *Sci. Rep* **2014**, *4*, 6065.
 36. Abdelhalim, M. A.; Abdelmottaleb Moussa, S. A. The Gold Nanoparticle Size and Exposure Duration Effect on the Liver and Kidney Function of Rats. *In Vivo. Saudi J. Biol. Sci.* **2013**, *20*, 177–181.
 37. Chromy, V.; Rozkosna, K.; Sedlak, P. Determination of Serum Creatinine by Jaffe Method and How To Calibrate To Eliminate Matrix Interference Problems. *Clin Chem. Lab Med.* **2008**, *46*, 1127–1133.
 38. Ashworth, S. L.; Sandoval, R. M.; Tanner, G. A.; Molitoris, B. A. Two-Photon Microscopy: Visualization of Kidney Dynamics. *Kidney Int.* **2007**, *72*, 416–421.
 39. He, X.; Nie, H.; Wang, K.; Tan, W.; Wu, X.; Zhang, P. *In Vivo* Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9597–9603.
 40. Popplewell, J. F.; King, S. J.; Day, J. P.; Ackrill, P.; Fifield, L. K.; Cresswell, R. G.; di Tada, M. L.; Liu, K. Kinetics of Uptake and Elimination of Silicic Acid by a Human Subject: A Novel Application of ³²Si and Accelerator Mass Spectrometry. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *69*, 177–180.
 41. Le Duc, G.; Roux, S.; Paruta-Tuarez, A.; Dufort, S.; Brauer, E.; Marais, A.; Truillet, C.; Sancey, L.; Perriat, P.; Lux, F.; et al. Advantages of Gadolinium Based Ultrasmall Nanoparticles vs Molecular Gadolinium Chelates for Radiotherapy Guided by MRI for Glioma Treatment. *Cancer Nanotechnol.* **2014**, *5*.
 42. Thadhani, R.; Pascual, M.; Bonventre, J. V. Acute Renal Failure. *New Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1448–1460.
 43. Fujigaki, Y. Different Modes of Renal Proximal Tubule Regeneration in Health and Disease. *World J. Nephrol.* **2012**, *1*, 92–99.
 44. Hagen, J. J.; Monning, C. A. Method for Estimating Molecular Mass from Electrospray Spectra. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1877–1883.

5.4 ANNEXE A.4 : LISTE DE PUBLICATIONS ET BREVETS

Publications

- A. Detappe, M. Reidy, Y. Yu, H. V.-T. Nguyen, T. H. Mouhieddine, T. P. Coroller, F. Lam, P. Jarolim, **E. Thomas**, O. Tillement, J. A. Johnson, P. P. Ghroghchian, I. M. Gobrial.
"An Antibody-targeted Gadolinium Nanoparticle Enables Early Detection of Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma".
2017, soumise
- **E. Thomas**, L. Colombeau, M. Gries, T. Peterlini, N. Thomas, C. Boura, C. Mathieu, C. Frochot, R. Vanderesse, F. Lux, M. Barberi-Heyob, O. Tillement.
"Ultrasmall AGuIX Nanoparticles for Vascular-Targeted Interstitial Photodynamic Therapy of Glioblastoma".
International Journal of Nanomedicine, **2017**, acceptée.
- S. Huclier-Markai, E. Ntsiba, L. Leost, **E. Thomas**, C. Alliot, F. Lux, O. Tillement.
"Multimodal AGuIX[®] Nanoparticles: Optimization of the radiolabeling with various SPECT/PET/theranostic tracers".
2017, soumise.
- P. Bouziotis, D. Stellas, **E. Thomas**, C. Truillet, C. Tsoukalas, F. Lux, T. Tsotakos, S. Xanthopoulos, M. Paravatou-Petsotas, A. Gaitanis, L. Mouloupoulos, V. Koutoulides, C.D. Anagnostopoulos, O. Tillement.
"⁶⁸Ga-radiolabeled AGuIX nanoparticles as dual-modality imaging agents for PET/MRI-guided radiation therapy".
Nanomedicine, **2017**, 12 (13), p. 1561 – 1574, doi: 10.2217/nnm-2017-0032.
- A. Detappe, **E. Thomas**, M.W. Tibbitt, S. Kunjachan, O. Zavidij, N. Parnandi, E. Reznichenki, F. Lux, O. Tillement, R. Berbeco.
"Ultrasmall silica-based bismuth gadolinium nanoparticle for dual MR-CT image guided radiation therapy".
Nano Letters, **2017**, 17 (3), p. 1733–1740, doi :10.1021/acs.nanolett.6b05055
- M. Toussaint, S. Pinel, F. Auger, N. Durieux, M. Thomassin, **E. Thomas**, A. Moussaron, D. Meng, F. Plénat, M. Amouroux, T. Bastogne, C. Frochot, O. Tillement, F. Lux, M. Barberi-Heyob.
"Proton MR spectroscopy and diffusion MR imaging monitoring to predict tumor response to interstitial photodynamic therapy for glioblastoma".
Theranostics, **2017**, 7 (2), p.436 - 451, doi :10.7150/thno.17218

- C. Truillet*, **E. Thomas***, F. Lux, L. T. Huynh, O. Tillement, M. J. Evans.
*"Synthesis and characterization of ⁸⁹Zr-labeled ultrasmall nanoparticles". *Contribution égale.*
Mol. Pharmaceutics, 2016, 13 (7), p.2596 - 2601, doi :10.1021/acs.molpharmaceut.6b00264.
- L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, **E. Thomas**, B. van der Sanden, J.-P. Klein, B. Laurent, M. Cottier, R. Antoine, P. Dugourd, G. Panczer, F. Lux, P. Perriat, V. Motto-Ros, O. Tillement.
"Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection".
ACS Nano, 2015, 9 (3), p.2477 - 2488, doi :10.1021/acsnano.5b00552.

Brevets

- A. Detappe, I. Ghobrial, P. Ghoroghchian, F. Lux, M. Reidy, O. Tillement, E. Thomas.
"Targeted nanoparticles for early diagnosis and minimal residual disease in oncology".
2017, en cours de dépôt.
- R. Berbeco, A. Detappe, G. Le Duc, F. Lux, O. Tillement, E. Thomas.
"Bismuth-Gadolinium nanoparticles for MRI-guided Radiation Therapy".
2016, US62431607.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. Bhattacharjee, *J. Controlled Release* **2016**, *235*, 337.
- [2] N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, O. C. Farokhzad, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971.
- [3] D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 2656.
- [4] W.-Y. Huang, J. J. Davis, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6087.
- [5] D. Jaque, L. M. Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J. L. Plaza, E. M. Rodríguez, J. G. Solé, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9494.
- [6] L. Bregoli, D. Movia, J. D. Gavigan-Imedio, J. Lysaght, J. Reynolds, A. Prina-Mello, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12*, 81.
- [7] C. A. Schütz, L. Juillerat-Jeanneret, H. Mueller, I. Lynch, M. Riediker, *Nanomed.* **2013**, *8*, 449.
- [8] A. D. Sherry, P. Caravan, R. E. Lenkinski, *J. Magn. Reson. Imaging* **2009**, *30*, 1240.
- [9] F. Lux, L. Sancey, A. Bianchi, Y. Crémillieux, S. Roux, O. Tillement, *Nanomed.* **2015**, *10*, 1801.
- [10] M. Mahmoudi, H. Hosseinkhani, M. Hosseinkhani, S. Boutry, A. Simchi, W. S. Journeay, K. Subramani, S. Laurent, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 253.
- [11] L. Sancey, F. Lux, S. Kotb, S. Roux, S. Dufort, A. Bianchi, Y. Crémillieux, P. Fries, J.-L. Coll, C. Rodriguez-Lafrasse, M. Janier, M. Dutreix, M. Barberi-Heyob, F. Boschetti, F. Denat, C. Louis, E. Porcel, S. Lacombe, G. Le Duc, E. Deutsch, J.-L. Perfettini, A. Detappe, C. Verry, R. Berbeco, K. T. Butterworth, S. J. McMahon, K. M. Prise, P. Perriat, O. Tillement, *Br. J. Radiol.* **2014**, *87*, 20140134.
- [12] M. Vaneckova, M. Herman, M. P. Smith, M. Mechl, K. R. Maravilla, J. Weichet, M. V. Spampinato, J. Žižka, F. J. Wippold, J. J. Baima, R. Babbel, E. Bültmann, R. Y. Huang, J.-H. Buhk, A. Bonafé, C. Colosimo, S. Lui, M. A. Kirchin, N. Shen, G. Pirovano, A. Spinazzi, *Am. J. Neuroradiol.* **2015**, *36*, 1589.
- [13] A. Spencer, S. Wilson, E. Harpur, *Hum. Exp. Toxicol.* **1998**, *17*, 633.
- [14] N. M. Rofsky, A. D. Sherry, R. E. Lenkinski, *Radiology* **2008**, *247*, 608.
- [15] D. Xia, R. L. Davis, J. A. Crawford, J. L. Abraham, *Acta Radiol.* **2010**, *51*, 1126.
- [16] C.-T. Yang, P. Padmanabhan, B. Z. Gulyás, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 60945.
- [17] R. e. Kalb, T. n. Helm, H. Sperry, C. Thakral, J. l. Abraham, E. Kanal, *Br. J. Dermatol.* **2008**, *158*, 607.
- [18] L. A. Kunz-Schughart, A. Dubrovska, C. Peitzsch, A. Ewe, A. Aigner, S. Schellenburg, M. H. Muders, S. Hampel, G. Cirillo, F. Iemma, R. Tietze, C. Alexiou, H. Stephan, K. Zarschler, O. Vittorio, M. Kavallaris, W. J. Parak, L. Mädler, S. Pokhrel, *Biomaterials* **2017**, *120*, 155.
- [19] F. Lux, A. Detappe, S. Dufort, L. Sancey, C. Louis, S. Carme, O. Tillement, *Cancer/Radiothérapie* **2015**, *19*, 508.
- [20] C. Rancoule, N. Magné, A. Vallard, J.-B. Guy, C. Rodriguez-Lafrasse, E. Deutsch, C. Chargari, *Cancer Lett.* **2016**, *375*, 256.
- [21] A. Detappe, F. Lux, O. Tillement, *Nanomed.* **2016**, *11*, 997.
- [22] D. G. Brachman, S. L. Pugh, L. S. Ashby, T. A. Thomas, E. M. Dunbar, S. Narayan, H. I. Robins, J. A. Bovi, J. K. Rockhill, M. Won, W. P. Curran, *Int. J. Radiat. Oncol.* **2015**, *91*, 961.
- [23] S. W. Young, F. Qing, A. Harriman, J. L. Sessler, W. C. Dow, T. D. Mody, G. W. Hemmi, Y. P. Hao, R. A. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 6610.

- [24] H. Dehnad, H. B. Kal, T. Stam, I. S. Gademan, R. J. A. van Moorselaar, B. P. J. van der Sanden, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2003**, *57*, 787.
- [25] D. Francis, G. M. Richards, A. Forouzannia, M. P. Mehta, D. Khuntia, *Expert Opin. Pharmacother.* **2009**, *10*, 2171.
- [26] S. R. Thomas, D. Khuntia, *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 195.
- [27] A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, F.-G. Rong, R. F. Barth, I. M. Codogni, J. G. Wilson, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1515.
- [28] J. P. Pignol, J. C. Abbe, J. Sahel, A. Methlin, G. Methlin, In *Journal de chimie physique*; EDP Sciences, 1994; Vol. 91, pp. 1243–1253.
- [29] N. a. P. Franken, J. W. J. Bergs, T. T. Kok, R. R. N. Kuperus, F. Stecher-Rasmussen, J. Haveman, C. Van Bree, L. J. A. Stalpers, *Oncol. Rep.* **2006**, *15*, 715.
- [30] A. Deagostino, N. Protti, D. Alberti, P. Boggio, S. Bortolussi, S. Altieri, S. G. Crich, *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 899.
- [31] V. Khokhlov, P. Yashkin, D. Sillin, E. Djorova, R. Lawaczeck, *Acad. Radiol.* **1995**, *2*, 392.
- [32] M. Luchette, H. Korideck, M. Makrigiorgos, O. Tillement, R. Berbeco, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1751.
- [33] J. Fang, P. Chandrasekharan, X.-L. Liu, Y. Yang, Y.-B. Lv, C.-T. Yang, J. Ding, *Biomaterials* **2014**, *35*, 1636.
- [34] J. Y. Park, M. J. Baek, E. S. Choi, S. Woo, J. H. Kim, T. J. Kim, J. C. Jung, K. S. Chae, Y. Chang, G. H. Lee, *Acs Nano* **2009**, *3*, 3663.
- [35] A. T. M. Anishur Rahman, P. Majewski, K. Vasilev, *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 92.
- [36] N. J. J. Johnson, W. Oakden, G. J. Stanisiz, R. S. Prosser, F. C. J. M. van Veggel, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 3714.
- [37] F. Evanics, P. R. Diamente, F. van Veggel, G. J. Stanisiz, R. S. Prosser, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2499.
- [38] G. Liang, L. Cao, H. Chen, Z. Zhang, S. Zhang, S. Yu, X. Shen, J. Kong, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 629.
- [39] H. Hifumi, S. Yamaoka, A. Tanimoto, D. Citterio, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15090.
- [40] F. Chen, S. Zhang, W. Bu, Y. Chen, Q. Xiao, J. Liu, H. Xing, L. Zhou, W. Peng, J. Shi, *Chem.-Eur. J.* **2012**, *18*, 7082.
- [41] G.-L. Davies, I. Kramberger, J. J. Davis, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9704.
- [42] E. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterbur, *Magn. Reson. Med.* **1994**, *31*, 1.
- [43] J. L. Turner, D. Pan, R. Plummer, Z. Chen, A. K. Whittaker, K. L. Wooley, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1248.
- [44] Y. Li, S. Laurent, L. Esser, L. V. Elst, R. N. Muller, A. B. Lowe, C. Boyer, T. P. Davis, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 2592.
- [45] T. Liu, Y. Qian, X. Hu, Z. Ge, S. Liu, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 5020.
- [46] S. R. Bull, M. O. Guler, R. E. Bras, T. J. Meade, S. I. Stupp, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1.
- [47] M. de Smet, S. Langereis, S. van den Bosch, H. Grull, *J. Controlled Release* **2010**, *143*, 120.
- [48] H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 999.
- [49] S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7031.

- [50] S. V. Fedorenko, S. L. Grechkina, A. R. Mustafina, K. V. Kholin, A. S. Stepanov, I. R. Nizameev, I. E. Ismaev, M. K. Kadirov, R. R. Zairov, A. N. Fattakhova, R. R. Amirov, S. E. Soloveva, *Colloids Surf. B-Biointerfaces* **2017**, *149*, 243.
- [51] A. Mignot, C. Truillet, F. Lux, L. Sancey, C. Louis, F. Denat, F. Boschetti, L. Bocher, A. Gloter, O. Stéphan, R. Antoine, P. Dugourd, D. Luneau, G. Novitchi, L. C. Figueiredo, P. C. de Morais, L. Bonneviot, B. Albela, F. Ribot, L. Van Lokeren, I. Déchamps-Olivier, F. Chuburu, G. Lemercier, C. Villiers, P. N. Marche, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement, P. Perriat, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 6122.
- [52] C. Alric, J. Taleb, G. L. Duc, C. Mandon, C. Bilotey, A. L. Meur-Herland, T. Brochard, F. Vocanson, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5908.
- [53] G. Laurent, C. Bernhard, S. Dufort, G. J. Sánchez, R. Bazzi, F. Boschetti, M. Moreau, T. H. Vu, B. Collin, A. Oudot, N. Herath, H. Requardt, S. Laurent, L. V. Elst, R. Muller, M. Dutreix, M. Meyer, F. Brunotte, P. Perriat, F. Lux, O. Tillement, G. L. Duc, F. Denat, S. Roux, *Nanoscale* **2016**, *8*, 12054.
- [54] M. R. Longmire, M. Ogawa, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 993.
- [55] H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. I. Ipe, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165.
- [56] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941.
- [57] H. A. A. Aly, *J. Immunol. Methods* **2012**, *382*, 1.
- [58] M. E. Fox, F. C. Szoka, J. M. J. Frechet, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1141.
- [59] Y. Nakamura, A. Mochida, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2225.
- [60] H. Maeda, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 797.
- [61] C.-K. Lim, J. Heo, S. Shin, K. Jeong, Y. H. Seo, W.-D. Jang, C. R. Park, S. Y. Park, S. Kim, I. C. Kwon, *Cancer Lett.* **2013**, *334*, 176.
- [62] Z. Cheng, A. Al Zaki, J. Z. Hui, V. R. Muzykantov, A. Tsourkas, *Science* **2012**, *338*, 903.
- [63] R. Anbazhagan, Y.-A. Su, H.-C. Tsai, R.-J. Jeng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 1827.
- [64] J. Kim, Y. Piao, T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 372.
- [65] J. Zheng, J. Liu, M. Dunne, D. A. Jaffray, C. Allen, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1193.
- [66] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.
- [67] Y.-X. J. Wang, *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 13400.
- [68] R. Bhavesh, A. V. Lechuga-Vieco, J. Ruiz-Cabello, F. Herranz, *Nanomaterials* **2015**, *5*, 1880.
- [69] C. Truillet, E. Thomas, F. Lux, L. T. Huynh, O. Tillement, M. J. Evans, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 2596.
- [70] M. Baker, *Nature* **2010**, *463*, 977.
- [71] R. Weissleder, M. J. Pittet, *Nature* **2008**, *452*, 580.
- [72] I. Debergh, C. Vanhove, W. Ceelen, *Eur. Surg. Res.* **2012**, *48*, 121.
- [73] M. D. Pagel, *Nanomed.* **2011**, *6*, 945.
- [74] A. Y. Louie, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3146.
- [75] J. Park, S. Bhuniya, H. Lee, Y.-W. Noh, Y. T. Lim, J. H. Jung, K. S. Hong, J. S. Kim, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3218.
- [76] R. R. Flavell, D. M. Wilson, S. C. Behr, *Curr. Radiol. Rep.* **2016**, *4*, 22.
- [77] J.-L. Bridot, D. Dayde, C. Rivière, C. Mandon, C. Bilotey, S. Lerondel, R. Sabattier, G. Cartron, A. L. Pape, G. Blondiaux, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2328.

- [78] E. Porcel, O. Tillement, F. Lux, P. Mowat, N. Usami, K. Kobayashi, Y. Furusawa, C. Le Sech, S. Li, S. Lacombe, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1601.
- [79] A. Detappe, S. Kunjachan, L. Sancey, V. Motto-Ros, D. Biancur, P. Drane, R. Guieze, G. M. Makrigiorgos, O. Tillement, R. Langer, R. Berbeco, *J. Controlled Release* **2016**, *238*, 103.
- [80] K.-W. Hu, K.-C. Hsu, C.-S. Yeh, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6843.
- [81] I. Miladi, C. Alric, S. Dufort, P. Mowat, A. Dutour, C. Mandon, G. Laurent, E. Bräuer-Krisch, N. Herath, J.-L. Coll, M. Dutreix, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement, *Small* **2014**, *10*, 1116.
- [82] D. Bobo, K. J. Robinson, J. Islam, K. J. Thurecht, S. R. Corrie, *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373.
- [83] Y. Min, J. M. Caster, M. J. Eblan, A. Z. Wang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11147.
- [84] G. Le Duc, S. Roux, A. Paruta-Tuarez, S. Dufort, E. Brauer, A. Marais, C. Truillet, L. Sancey, P. Perriat, F. Lux, others, *Cancer Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1.
- [85] J. Morlieras, S. Dufort, L. Sancey, C. Truillet, A. Mignot, F. Rossetti, M. Dentamaro, S. Laurent, L. Vander Elst, R. N. Muller, R. Antoine, P. Dugourd, S. Roux, P. Perriat, F. Lux, J.-L. Coll, O. Tillement, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1584.
- [86] J. Morlieras, J.-M. Chezal, E. Miot-Noirault, A. Vidal, S. Besse, D. Kryza, C. Truillet, A. Mignot, R. Antoine, P. Dugourd, F. Redini, L. Sancey, F. Lux, P. Perriat, M. Janier, O. Tillement, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3046.
- [87] F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. V. Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Josserand, J.-L. Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Rémy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12299.
- [88] L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, E. Thomas, B. van der Sanden, J.-P. Klein, B. Laurent, M. Cottier, R. Antoine, P. Dugourd, G. Panczer, F. Lux, P. Perriat, V. Motto-Ros, O. Tillement, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2477.
- [89] Mignot, Anna, "A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications." Université Claude Bernard Lyon1, Villeurbanne **2012**.
- [90] P. Retif, S. Pinel, M. Toussaint, C. Frochot, R. Chouikrat, T. Bastogne, M. Barberi-Heyob, *Theranostics* **2015**, *5*, 1030.
- [91] K. T. Butterworth, S. J. McMahon, F. J. Currell, K. M. Prise, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4830.
- [92] S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, G. Schettino, G. R. Dickson, A. R. Hounsell, J. M. O'Sullivan, K. M. Prise, D. G. Hirst, F. J. Currell, *Radiother. Oncol.* **2011**, *100*, 412.
- [93] F. Taupin, M. Flaender, R. Delorme, T. Brochard, J.-F. Mayol, J. Arnaud, P. Perriat, L. Sancey, F. Lux, R. F. Barth, M. Carrière, J.-L. Ravanat, H. Elleaume, *Phys. Med. Biol.* **2015**, *60*, 4449.
- [94] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, H. M. Smilowitz, *Phys. Med. Biol.* **2004**, *49*, N309.
- [95] K. T. Butterworth, J. R. Nicol, M. Ghita, S. Rosa, P. Chaudhary, C. K. McGarry, H. O. McCarthy, G. Jimenez-Sanchez, R. Bazzi, S. Roux, O. Tillement, J. A. Coulter, K. M. Prise, *Nanomed.* **2016**, *11*, 2035.
- [96] Yuri Sano, Hiroshi Satoh, Chiba, Momoko, Okamoto, Masahide, Serizawa, Koji, Nakashima, Hiroshi, Omoe, Kazuyuki, *J Occup Health* **2005**, *47*, 293.
- [97] Y. Luo, C. Wang, Y. Qiao, M. Hossain, L. Ma, M. Su, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 2563.

- [98] K. Bogusz, M. Tehei, C. Stewart, M. McDonald, D. Cardillo, M. Lerch, S. Corde, A. Rosenfeld, H. K. Liu, K. Konstantinov, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 24412.
- [99] M. Yao, M. Ma, Y. Chen, X. Jia, G. Xu, H. Xu, H. Chen, R. Wu, *Biomaterials* **2014**, *35*, 8197.
- [100] Z. Li, Y. Hu, K. A. Howard, T. Jiang, X. Fan, Z. Miao, Y. Sun, F. Besenbacher, M. Yu, *ACS Nano* **2016**, *10*, 984.
- [101] M. Hossain, M. Su, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 23047.
- [102] E. Porcel, S. Liehn, H. Remita, N. Usami, K. Kobayashi, Y. Furusawa, C. L. Sech, S. Lacombe, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 085103.
- [103] I. Miladi, M.-T. Aloy, E. Armandy, P. Mowat, D. Kryza, N. Magné, O. Tillement, F. Lux, C. Billotey, M. Janier, C. Rodriguez-Lafrasse, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 247.
- [104] V. Stavila, R. L. Davidovich, A. Gulea, K. H. Whitmire, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2782.
- [105] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*; Academic Press, 2013.
- [106] X. Wang, T. Jin, V. Comblin, A. Lopez-Mut, E. Merciny, J. F. Desreux, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1095.
- [107] J. P. Patterson, M. P. Robin, C. Chassenieux, O. Colombani, R. K. O'Reilly, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2412.
- [108] C. Truillet, F. Lux, O. Tillement, P. Dugourd, R. Antoine, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10440.
- [109] M. Stoia, O. Ștefănescu, G. Vlase, L. Barbu-Tudoran, M. Barbu, M. Ștefănescu, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2012**, *62*, 31.
- [110] B. L. Frey, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3187.
- [111] S. L. Wu, W. D. Horrocks, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 1497.
- [112] A. Barge, G. Cravotto, E. Gianolio, F. Fedeli, *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1*, 184.
- [113] G. Anderegg, F. Arnaud-Neu, R. Delgado, J. Felcman, K. Popov, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1445.
- [114] E. Protopopoff, P. Marcus, *Electrochimica Acta* **2005**, *51*, 408.
- [115] C. Truillet, P. Bouziotis, C. Tsoukalas, J. Brugière, M. Martini, L. Sancey, T. Brichart, F. Denat, F. Boschetti, U. Darbost, I. Bonnamour, D. Stellas, C. D. Anagnostopoulos, V. Koutoulidis, L. A. Mouloupoulos, P. Perriat, F. Lux, O. Tillement, *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10*, 309.
- [116] J. J. Wilson, M. Ferrier, V. Radchenko, J. R. Maassen, J. W. Engle, E. R. Batista, R. L. Martin, F. M. Nortier, M. E. Fassbender, K. D. John, E. R. Birnbaum, *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42*, 428.
- [117] É. Csajbók, Z. Baranyai, I. Bányai, E. Brücher, R. Király, A. Müller-Fahrnow, J. Platzek, B. Radüchel, M. Schäfer, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 2342.
- [118] P. P. Boldyrev, S. M. Deev, V. A. Golovachenko, V. A. Zagryadskii, A. S. Zakharov, V. I. Nikolaev, R. F. Nurtdinov, M. A. Proshin, D. Y. Chuvilin, Y. A. Yashin, *Radiochemistry* **2014**, *56*, 194.
- [119] T. Volk, E. Jahde, H. Fortmeyer, K. Glusenka, M. Rajewsky, *Br. J. Cancer* **1993**, *68*, 492.
- [120] R. A. Gatenby, R. J. Gillies, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 891.
- [121] D. Kantcheva, P. Nenova, B. Karadakov, *Talanta* **1972**, *19*, 1450.
- [122] C. Xu, L. Mu, I. Roes, D. Miranda-Nieves, M. Nahrendorf, J. A. Ankrum, Weian Zhao, J. M. Karp, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 494001.
- [123] S. M. Qaim, *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *44*, 31.
- [124] S. F. Mirshojaei, A. Ahmadi, E. Morales-Avila, M. Ortiz-Reynoso, H. Reyes-Perez, *J. Drug Target.* **2016**, *24*, 91.
- [125] H. Choi, Y.-S. Lee, D. W. Hwang, D. S. Lee, *Eur. J. Nanomedicine* **2016**, *8*, 71.

- [126] Mura, Simona, P. Couvreur, C. Richard, B.-T. Doan, N. Mignet, S. Laurent, L. V. Elst, D. Stanicki, R. N. Muller, L. Sancey, F. Lux, G. Le Duc, S. Carme, O. Tillement, G. Bort, M. A. Borden, J. D. Dove, T. W. Murray, T. Lars Andresen, A. L. Petersen, A. E. Hansen, J. R. Henriksen, M. Deshpande, S. K. Sriraman, V. Torchilin, M. Juenet, M. Varna, C. Chauvierre, D. Letourneur, B. Yameen, J. Wu, C. Vilos, A. Whyte, D. Werstler, L. Pollit, O. C. Farokhzad, I. S. Vizirianakis, C. Karavasili, E. P. Amanatiadou, D. G. Fatouros, *Nanotheranostics for Personalized Medicine*; World Scientific.
- [127] A. Rahmim, H. Zaidi, *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29*, 193.
- [128] J. Oxboel, C. Schjoeth-Eskesen, H. H. El-Ali, J. Madsen, A. Kjaer, *Int. J. Mol. Imaging* **2012**, *2012*, e379807.
- [129] M. Fani, J. P. André, H. R. Maecke, *Contrast Media Mol. Imaging* **2008**, *3*, 53.
- [130] D. N. Pandya, N. Bhatt, H. Yuan, C. S. Day, B. M. Ehrmann, M. Wright, U. Bierbach, T. J. Wadas, *Chem Sci* **2017**.
- [131] K. Öberg, B. Eriksson, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *19*, 265.
- [132] C. Love, C. J. Palestro, *Semin. Nucl. Med.* **2013**, *43*, 102.
- [133] M. M. Welling, A. Bunschoten, J. Kuil, R. G. H. H. Nelissen, F. J. Beekman, T. Buckle, F. W. B. van Leeuwen, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 839.
- [134] T. Uehara, T. Rokugawa, M. Kinoshita, S. Nemoto, G. G. Fransisco Lazaro, H. Hanaoka, Y. Arano, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 2038.
- [135] T. Ohya, K. Nagatsu, H. Suzuki, M. Fukada, K. Minegishi, M. Hanyu, T. Fukumura, M.-R. Zhang, *Nucl. Med. Biol.* **2016**, *43*, 685.
- [136] M. A. Deri, B. M. Zeglis, L. C. Francesconi, J. S. Lewis, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 3.
- [137] D. J. Vugts, G. A. M. S. van Dongen, *Drug Discov. Today Technol.* **2011**, *8*, e53.
- [138] M. J. W. D. Vosjan, L. R. Perk, G. W. M. Visser, M. Budde, P. Jurek, G. E. Kiefer, G. A. M. S. van Dongen, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 739.
- [139] M. Sun, D. Hoffman, G. Sundaresan, L. Yang, N. Lamichhane, J. Zweit, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *2*, 122.
- [140] Y. Zhao, D. Sultan, L. Detering, S. Cho, G. Sun, R. Pierce, K. L. Wooley, Y. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 156.
- [141] J. Marik, M. S. Tartis, H. Zhang, J. Y. Fung, A. Kheirrolomoom, J. L. Sutcliffe, K. W. Ferrara, *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 165.
- [142] M. Benezra, O. Penate-Medina, P. B. Zanzonico, D. Schaer, H. Ow, A. Burns, E. DeStanchina, V. Longo, E. Herz, S. Iyer, J. Wolchok, S. M. Larson, U. Wiesner, M. S. Bradbury, Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma **2011**.
- [143] E. Phillips, O. Penate-Medina, P. B. Zanzonico, R. D. Carvajal, P. Mohan, Y. Ye, J. Humm, M. Gönen, H. Kalaigian, H. Schöder, H. W. Strauss, S. M. Larson, U. Wiesner, M. S. Bradbury, *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 260ra149.
- [144] Y. Xing, J. Zhao, P. S. Conti, K. Chen, *Theranostics* **2014**, *4*, 290.
- [145] C. F. Ramogida, J. F. Cawthray, E. Boros, C. L. Ferreira, B. O. Patrick, M. J. Adam, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 2017.
- [146] S. Srivastava, E. A. Ferguson-Cantrell, R. I. Nahas, J. R. Lever, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 6127.

- [147] S. Massa, N. Vikani, C. Betti, S. Ballet, S. Vanderhaegen, J. Steyaert, B. Descamps, C. Vanhove, A. Bunschoten, F. W. B. van Leeuwen, S. Hernot, V. Caveliers, T. Lahoutte, S. Muyldermans, C. Xavier, N. Devoogdt, *Contrast Media Mol. Imaging* **2016**, *11*, 328.
- [148] Z. Hua, L. Nan, Z. Hong, L. Xinfeng, L. Zhenfu, Y. Zhi, *Acta Chim. Sin.* **2015**, *73*, 36.
- [149] E. W. Price, J. F. Cawthray, G. A. Bailey, C. L. Ferreira, E. Boros, M. J. Adam, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8670.
- [150] A. Majkowska-Pilip, A. Bilewicz, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 313.
- [151] D. J. Berry, Y. Ma, J. R. Ballinger, R. Tavaré, A. Koers, K. Sunassee, T. Zhou, S. Nawaz, G. E. D. Mullen, R. C. Hider, P. J. Blower, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7068.
- [152] J. Lee, K. Garmestani, C. Wu, M. W. Brechbiel, H. K. Chang, C. W. Choi, O. A. Gansow, J. A. Carrasquillo, C. H. Paik, *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 225.
- [153] M. K. Moi, C. F. Meares, M. J. McCall, W. C. Cole, S. J. DeNardo, *Anal. Biochem.* **1985**, *148*, 249.
- [154] C. J. Anderson, P. A. Rocque, C. J. Weinheimer, M. J. Welch, *Nucl. Med. Biol.* **1993**, *20*, 461.
- [155] J. Lux, A. G. White, M. Chan, C. J. Anderson, A. Almutairi, *Theranostics* **2015**, *5*, 277.
- [156] Z. Liu, Z.-B. Li, Q. Cao, S. Liu, F. Wang, X. Chen, *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 1168.
- [157] R. Farkas, K. Siwowska, S. M. Ametamey, R. Schibli, N. P. van der Meulen, C. Müller, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1979.
- [158] W. E. Meijs, J. D. Herscheid, H. J. Haisma, H. M. Pinedo, *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* **1992**, *43*, 1443.
- [159] J. P. Holland, V. Divilov, N. H. Bander, P. M. Smith-Jones, S. M. Larson, J. S. Lewis, *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1293.
- [160] E. Brucher, S. Cortes, F. Chavez, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 2092.
- [161] E. Farkas, H. Csóka, G. Micera, A. Dessi, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *65*, 281.
- [162] M.-A. Enrique, O.-R. Mariana, S. F. Mirshojaei, A. Ahmadi, *J. Drug Target.* **2015**, *23*, 191.
- [163] D. Bechet, S. R. Mordon, F. Guillemain, M. A. Barberi-Heyob, *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 229.
- [164] S. S. Lucky, K. C. Soo, Y. Zhang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1990.
- [165] L. B. Josefsen, R. W. Boyle, *Met.-Based Drugs* **2008**, *2008*.
- [166] K. I. Du, R. Mick, T. m. Busch, T. c. Zhu, J. c. Finlay, G. Yu, A. g. Yodh, S. b. Malkowicz, D. Smith, R. Whittington, D. Stripp, S. m. Hahn, *Lasers Surg. Med.* **2006**, *38*, 427.
- [167] H. Benachour, A. Sève, T. Bastogne, C. Frochot, R. Vanderesse, J. Jasniewski, I. Miladi, C. Billotey, O. Tillement, F. Lux, M. Barberi-Heyob, *Theranostics* **2012**, *2*, 889.
- [168] R. Weissleder, V. Ntziachristos, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123.
- [169] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, J. Golab, *Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250.
- [170] E. I. Altinoglu, J. H. Adair, *Wiley Interdiscip. Rev.-Nanomedicine Nanobiotechnology* **2010**, *2*, 461.
- [171] J. Swartling, O. V. Höglund, K. Hansson, F. Södersten, J. Axelsson, A.-S. Lagerstedt, *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 028002.
- [172] Truillet, Charles, "Nanosondes AGuIX pour le théranostic. Etudes des marquages par des radioéléments et émetteurs pour de la thérapie photodynamique (PDT)". Université Claude Bernard Lyon1, Villeurbanne **2013**.
- [173] L. B. Josefsen, R. W. Boyle, *Theranostics* **2012**, *2*, 916.

- [174] S. Eljamel, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, *7*, 76.
- [175] S. Munthe, M. D. Sørensen, M. Thomassen, M. Burton, T. A. Kruse, J. D. Lathia, F. R. Poulsen, B. W. Kristensen, *J. Neurooncol.* **2016**, *130*, 53.
- [176] B. J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J. C. Vera, T. S. Mang, A. B. Foy, S. M. Lew, A. W. Girotti, S. Jogal, P. S. LaViolette, J. M. Connelly, H. T. Whelan, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 530.
- [177] H. Kostron, In *Photodynamic Therapy*; Gomer, C. J., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press, 2010; pp. 261–280.
- [178] Y. Muragaki, J. Akimoto, T. Maruyama, H. Iseki, S. Ikuta, M. Nitta, K. Maebayashi, T. Saito, Y. Okada, S. Kaneko, A. Matsumura, T. Kuroiwa, K. Karasawa, Y. Nakazato, T. Kayama, *J. Neurosurg.* **2013**, *119*, 845.
- [179] P. Couleaud, D. Bechet, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob, A.-C. Faure, S. Roux, O. Tillement, S. Porhel, F. Guillemain, C. Frochot, *Nanomed.* **2011**, *6*, 995.
- [180] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.-L. Viriot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 612.
- [181] S. Wang, R. Gao, F. Zhou, M. Selke, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 487.
- [182] Y.-E. L. Koo, G. R. Reddy, M. Bhojani, R. Schneider, M. A. Philbert, A. Rehemtulla, B. D. Ross, R. Kopelman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1556.
- [183] H. Gong, Z. Dong, Y. Liu, S. Yin, L. Cheng, W. Xi, J. Xiang, K. Liu, Y. Li, Z. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 6492.
- [184] R. Kopelman, Y.-E. Lee Koo, M. Philbert, B. A. Moffat, G. Ramachandra Reddy, P. McConville, D. E. Hall, T. L. Chenevert, M. S. Bhojani, S. M. Buck, A. Rehemtulla, B. D. Ross, *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 404.
- [185] M. Toussaint, S. Pinel, F. Auger, N. Durieux, M. Thomassin, E. Thomas, A. Moussaron, D. Meng, F. Plénat, M. Amouroux, T. Bastogne, C. Frochot, O. Tillement, F. Lux, M. Barberi-Heyob, *Theranostic* **2017**, *7*, 436.
- [186] Z. Chu, S. Zhang, C. Yin, G. Lin, Q. Li, *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 827.
- [187] W. Tang, H. Xu, R. Kopelman, M. A. Philbert, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 242.
- [188] B. Zhang, H. Wang, Z. Liao, Y. Wang, Y. Hu, J. Yang, S. Shen, J. Chen, H. Mei, W. Shi, Y. Hu, Z. Pang, X. Jiang, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4133.
- [189] F. Schmitt, L. Juillerat-Jeanneret, *Anti-Cancer Agents Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2012**, *12*, 500.
- [190] K. Ichikawa, T. Hikita, N. Maeda, S. Yonezawa, Y. Takeuchi, T. Asai, Y. Namba, N. Oku, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2005**, *1669*, 69.
- [191] G. Graziani, P. M. Lacal, *Front. Oncol.* **2015**, *5*.
- [192] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.-L. Viriot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 153.
- [193] N. Thomas, D. Bechet, P. Becuwe, L. Tirand, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *96*, 101.
- [194] D. Bechet, L. Tirand, B. Faivre, F. Plénat, C. Bonnet, T. Bastogne, C. Frochot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 468.

- [195] D. Bechet, F. Auger, P. Couleaud, E. Marty, L. Ravasi, N. Durieux, C. Bonnet, F. Plénat, C. Frochot, S. Mordon, O. Tillement, R. Vanderesse, F. Lux, P. Perriat, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 657.
- [196] E. E. Kamarulzaman, R. Vanderesse, A. M. Gazzali, M. Barberi-Heyob, C. Boura, C. Frochot, O. Shawkataly, A. Aubry, H. A. Wahab, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2016**, *1*.
- [197] M. Moser, T. Behnke, C. Hamers-Allin, K. Klein-Hartwig, J. Falkenhagen, U. Resch-Genger, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9376.
- [198] C. Truillet, F. Lux, J. Moreau, M. Four, L. Sancey, S. Chevreux, G. Boeuf, P. Perriat, C. Frochot, R. Antoine, P. Dugourd, C. Portefaix, C. Hoeffel, M. Barberi-Heyob, C. Terryn, L. van Gulick, G. Lemerrier, O. Tillement, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 12410.
- [199] T. N. Parac-Vogt, K. Kimpe, S. Laurent, L. Vander Elst, C. Burtea, F. Chen, R. N. Muller, Y. Ni, A. Verbruggen, K. Binnemans, *Chem. – Eur. J.* **2005**, *11*, 3077.