



Les nanoparticules de silice mésoporeuses comme sondes pour l'imagerie biomédicale – purification, études *in vitro* et *in vivo*

Mémoire

Myriam Laprise-Pelletier

Maîtrise en génie des matériaux et de la métallurgie
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Myriam Laprise-Pelletier, 2015

Résumé

Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSNs) sont utilisées de plus en plus pour des applications d'imagerie médicale et d'élution de médicament. Bien qu'elles ne soient pas encore approuvées pour la clinique, ces produits font actuellement l'objet de plusieurs études précliniques. En particulier, notre groupe de recherche a démontré que les nanoparticules de silice poreuses marquées d'éléments paramagnétiques sont des agents de contraste efficaces en imagerie par résonance magnétique (IRM). La porosité ouverte de ces produits offre des pistes intéressantes pour des applications de livraison de médicament sous imagerie médicale. Ce projet de maîtrise porte plus particulièrement sur la préparation des particules de silice mésoporeuses marquées d'éléments paramagnétiques, en vue d'applications en imagerie cellulaire, et en imagerie vasculaire. Dans un premier temps, la possibilité de marquer des particules de silice au moyen d'un élément paramagnétique (Mn) a été démontrée. Ces produits ont fait l'objet d'une étude de caractérisation physico-chimique, et d'une étude de marquage cellulaire. Il a été démontré que les nanoparticules Mn-MSNs internalisées dans des cellules leucémiques de souris sont visibles en IRM. Or, avant traitement des cellules, tout comme pour la préparation d'une suspension de MSNs pour une injection intravasculaire, il est nécessaire de purifier les nanoparticules de la présence d'ions métalliques potentiellement toxiques (Gd^{3+} , Mn^{2+} , utilisés pour le marquage des nanoparticules et la visibilité en IRM). Afin de faciliter la purification des nanoparticules par une technique rapide, une méthode de chromatographie par exclusion stérique a été développée, optimisée et appliquée à une procédure de marquage de MSNs au moyen d'ions paramagnétiques (Gd^{3+}) et radioactifs ($^{64}Cu^{2+}$). Le développement de cette technique a été essentiel pour purifier les MSNs, qui ont ensuite été injectées dans des souris, et visualisées en IRM et en tomographie par émission de positons (TEP). Ces études ont permis de mesurer la biodistribution des particules de MSNs sur 48 h. Ce projet a également permis de démontrer que les biodistribution dynamiques sous TEP permettront de mieux comprendre la biodistribution, la rétention aux organes, et l'excrétion des nanoparticules de MSNs développées comme potentiel agent de vectorisation de médicaments.

Abstract

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) are increasingly used in medical imaging and drug delivery applications. They are still not approved for the clinic; however, these products have been used in several preclinical studies, and are being evaluated for clinical trials. Our group demonstrated that MSNs labeled with paramagnetic elements are efficient as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). The open porosity of these products leads to interesting applications for drug delivery under medical imaging. This master's degree project has focused on the preparation of MSNs labeled with paramagnetic elements, for applications in cellular imaging, and vascular imaging. First, MSNs labeled with paramagnetic element (Mn) were used to label and to visualize cells in MRI. These products were subjected to a physico-chemical characterization study, and a cellular labelling study. It was demonstrated that Mn-MSNs nanoparticles internalized in leukaemia mouse cells are visible using MRI. However, before cells treatment, just like for the preparation of MSNs suspension for intravascular injection, it is necessary to purify nanoparticles from the potentially toxic paramagnetic metal ions (Gd^{3+} , Mn^{2+}). To facilitate and accelerate the purification time, a size exclusion chromatography method was developed, optimized and applied to MSNs labelled with paramagnetic (Gd^{3+}) and radioactive ($^{64}Cu^{2+}$) ions. The development of this technique was essential to purify MSNs from both Gd^{3+} and $^{64}Cu^{2+}$, which were then injected in mice, and visualized with MRI and positron emission tomography (PET). These studies have made it possible to measure the biodistribution of MSN over 48 h in the mouse model. PET dynamic biodistributions studies allow a better understanding of biodistribution, organ retention, and excretion of MSNs nanoparticles developed as potential drug vectors.

Table des matières

Résumé	III
Abstract	V
Table des matières	VII
Liste des tableaux	XIII
Liste des figures	XV
Liste des abréviations	XIX
Remerciements	XXIII
Avant-propos	XXV
Chapitre 1 – Introduction	1
<i>Objectifs du projet de maîtrise</i>	2
<i>Structure du mémoire</i>	3
Chapitre 2 – Théorie	5
2.1. Modalités d'imagerie biomédicale	5
2.1.1. Imagerie par résonance magnétique	5
2.1.2. Contraste tissulaire	11
2.1.3. Agents de contraste pour l'IRM	12
2.1.3.1. Catégories d'agents de contraste	13
2.1.3.2. Relaxivités	16
2.1.4. Tomographie par émission de positons	16
2.1.4.1. Principes nucléaires et imagerie	17
2.1.4.2. Les radiotraceurs pour la TEP	19
2.1.4.3. Le cuivre-64 (⁶⁴ Cu) comme radiotraceur pour la TEP	21
2.1.4.4. Principes de radioprotection liés à l'utilisation du ⁶⁴ Cu	22
2.2. Purification des nanoparticules par chromatographie d'exclusion stérique	24
2.2.1. Choix de la chromatographie d'exclusion stérique parmi les autres méthodes de purification de nanoparticules	25
2.2.2. État de l'art sur l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique comme moyen de purification de nanoparticules	27
2.2.3. Principes théoriques de la chromatographie d'exclusion stérique	28
2.2.4. Sélection de la matrice de gel	31
2.2.4.1. Choix du gel Sephadex G-25 ' <i>coarse</i> '	32
2.2.5. Conditions de réussite de la purification par chromatographie d'exclusion stérique ..	37

2.2.5.1. Dimensions de la colonne	37
2.2.5.2. Concentration de la suspension de nanoparticules	38
2.2.5.3. Volume de l'échantillon	38
2.2.5.4. Nature et concentration de l'éluant	38
2.2.5.5. Vitesse d'éluion	39
2.3. Utilisation des nanoparticules de silice mésoporeuses comme vecteur pour la livraison de médicaments et le marquage cellulaire	39
2.4. Études cellulaires <i>in vivo</i> (cellules P388).....	40
2.5. Études de biodistribution des MSNs	41
2.5.1. Études par quantification élémentaire.....	41
2.5.2. Études par imagerie de fluorescence.....	41
2.5.3. Études par imagerie IRM.....	42
2.5.4. Études par imagerie TEP	43
2.5.5. Études par imagerie TEP couplée IRM	43
Chapitre 3 – Matériel et méthodes	45
3.1. Synthèse des nanoparticules de silice mésoporeuses MCM-48 (M48SNs)	45
3.2. Procédures de fonctionnalisation des M48SNs.....	46
3.2.1. Imprégnation du manganèse dans la structure de silice (Mn-M48SNs)	46
3.2.2. Fonctionnalisation de la surface des M48SNs pour le greffage des chélates	47
3.2.3. Chélation du cuivre radioactif ($^{64}\text{Cu}^{2+}$) et du gadolinium (Gd^{3+}).....	48
3.3. Caractérisation de la taille des nanoparticules M48SNs	48
3.3.1. Microscopie électronique à transmission (MET).....	49
3.3.2. Analyse de taille par diffusion de la lumière en mode dynamique (DLS).....	49
3.3.3. Potentiel zêta (stabilité colloïdale).....	50
3.4. Caractérisation texturale des nanoparticules M48SNs.....	51
3.4.1. Physisorption à l'azote.....	51
3.4.2. Diffraction des rayons X aux bas angles (DRX)	52
3.5. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules M48SNs	52
3.5.1. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	53
3.5.2. Spectroscopie photoélectronique induite par rayons X (XPS).....	53
3.5.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	54
3.5.4. Spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X (EDX) couplée à un MET.....	55
3.5.5. Thermogravimétrie (TGA)	55
3.5.6. Dosage de la teneur en gadolinium (Gd) et en silicium (Si).....	55

3.6.	Développement d'une procédure de chromatographie d'exclusion stérique comme méthode de purification	57
3.6.1.	Évaluation préliminaire de la suspension de nanoparticules en vue de la purification par chromatographie d'exclusion stérique.....	57
3.6.2.	Composantes du système de chromatographie.....	58
3.6.3.	Méthode d'évaluation de la purification.....	59
3.6.4.	Procédure complète de purification des nanoparticules Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs et Gd ³⁺ / ⁶⁴ Cu ²⁺ -DTPA-M48SNs	59
3.7.	Caractérisation <i>in vitro</i> des propriétés des M48SNs comme sondes d'imagerie (relaxivité et radioactivité).....	61
3.7.1.	Études relaxométriques à champ fixe.....	61
3.7.2.	Dispersion de résonance magnétique nucléaire (NMRD)	62
3.7.3.	Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	63
3.7.4.	Compteurs de dose	64
3.7.5.	Tomographie par émission de positons (TEP).....	64
3.8.	Imagerie IRM et TEP <i>in vivo</i>	64
3.9.	Marquage cellulaire et visualisation en IRM des nanoparticules Mn-M48SNs	65
3.9.1.	Préparation de la suspension de nanoparticules Mn-M48SNs	65
3.9.2.	Étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules Mn-M48SNs dans le milieu de culture avec sérum (DMEM complet).....	65
3.9.3.	Étude d'imagerie IRM des cellules marquées avec les nanoparticules Mn-M48SNs ..	66
3.9.3.1.	Gélification des cellules marquées.....	66
3.9.3.2.	Visualisation des cellules en IRM.....	66
3.9.3.3.	Dosage de la teneur en manganèse (Mn).....	67
3.9.3.4.	Préparation d'un échantillon cellulaire pour la microscopie électronique à transmission.....	67
Chapitre 4 – Résultats de la purification des nanoparticules par chromatographie d'exclusion stérique		69
4.1.	Essais de purification des particules MSNs par chromatographie d'exclusion stérique.....	69
4.2.	Comparaison entre l'efficacité de la purification par chromatographie d'exclusion stérique et celle par centrifugation	75
Chapitre 5 – Article 1.....		77
5.1.	Résumé	78
5.2.	Abstract.....	79

5.3.	Introduction.....	80
5.4.	Experimental section.....	82
5.4.1.	Materials	82
5.4.2.	Synthesis of MCM-48 nanoparticles	83
5.4.3.	Modification of M48SNs with Mn	83
5.4.4.	Transmission electron microscopy (TEM)	83
5.4.5.	X-ray diffraction (XRD).....	84
5.4.6.	Porosity measurements	84
5.4.7.	Physicochemical surface analysis.....	84
5.4.8.	Temperature-programmed reduction by hydrogen (H ₂ -TPR).....	85
5.4.9.	Colloidal suspensions of Mn–M48SNs.....	85
5.4.10.	Relaxometric analyses.....	85
5.4.11.	Cell labelling studies	86
5.4.12.	Magnetic resonance imaging (MRI)	87
5.4.13.	Contrast quantification	87
5.4.14.	TEM cell study.....	87
5.5.	Results and discussion	87
5.5.1.	Synthesis and porosity characterization of Mn–M48SNs.....	87
5.5.2.	Surface characterization and state of Mn in Mn–M48SNs.....	90
5.5.3.	Colloidal stability of Mn–M48SNs.....	93
5.5.4.	Relaxivity and Mn chemical stability measurements	95
5.5.5.	Cell labelling and MRI studies	98
5.6.	Conclusions.....	101
5.7.	Acknowledgements.....	102
5.8.	Supporting information.....	103
	Chapitre 6 – Article 2	109
6.1.	Résumé.....	110
6.2.	Abstract.....	111
6.3.	Introduction.....	112
6.4.	Experimental	114
6.4.1.	Material and methods.....	114
6.4.1.1.	Synthesis of DTPA-grafted mesoporous silica nanoparticles (M48SNs).....	114
6.4.1.2.	DTPA grafting on M48SNs	114
6.4.1.3.	M48SNs and DTPA-M48SNs textural properties.....	115

6.4.1.4. Nanoparticle size analysis with TEM	115
6.4.1.5. Labeling and purification of M48SNs with Gd ³⁺	116
6.4.2. M48SNs, APTES-M48SNs, DTPA-M48SNs, and Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs physico-chemical characterization	116
6.4.2.1. NMR	116
6.4.2.2. EDX	116
6.4.2.3. XPS	117
6.4.2.4. FTIR.....	117
6.4.2.5. Hydrodynamic diameter and zeta potential of Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs	117
6.4.2.6. Relaxometric studies of Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs.....	118
6.4.3. In vivo MR imaging and signal enhancement studies (Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs).....	118
6.4.4. PET and biodistribution studies.....	119
6.4.4.1. Labeling with ⁶⁴ Cu ²⁺ and Gd ³⁺ (Gd ³⁺ / ⁶⁴ Cu ²⁺ -DTPA-M48SNs)	119
6.4.4.2. Biodistribution studies	119
6.5. Results and discussion	120
6.5.1. Textural properties and TGA analysis.....	120
6.5.2. Physico-chemical characterization (NMR, XPS,FTIR, EDX)	121
6.5.3. Colloidal stability and relaxometric properties.....	123
6.5.4. In vivo stability assessment	125
6.6. Conclusion	129
6.7. Acknowledgements.....	129
6.8. Supporting information.....	131
6.8.1. M48SNs and DTPA-M48SNs textural properties	131
6.8.2. DTPA grafting quantification.....	133
6.8.3. Relaxometric studies of Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs	133
6.8.4. In vitro assessment of contrast media with MRI	134
6.8.5. Preparation of ⁶⁴ Cu ²⁺ radioisotope solution.....	135
6.8.6. PET images reconstruction and analysis	135
Discussion	137
Conclusion	141
Perspectives	143
Bibliographie	145
Annexe 1 : Gels de chromatographie d'exclusion stérique	157

Annexe 2 : Protocole de digestion dans l'acide en préparation de l'analyse élémentaire (GF-AAS et ICP-MS).....	158
Annexe 3 : Préparation du gel de Sephadex G-25 et mise en place de la colonne de chromatographie.....	159
Annexe 4 : Protocoles cellulaires.....	160

Liste des tableaux

Tableau 2.1 :	Paramètres d'acquisition TR et TE caractéristiques des pondérations T_1 , T_2 et de densité de protons.....	12
Tableau 2.2 :	Valeurs de T_1 et T_2 pour certains tissus humains.....	12
Tableau 2.3 :	Caractéristiques des principaux radio-isotopes utilisés en clinique	20
Tableau 2.4 :	Caractéristiques physiques du ^{18}F et du ^{64}Cu	21
Tableau 2.5 :	Comparaisons des méthodes de purification selon les principaux critères de sélection liés à l'utilisation de matière radioactive.....	27
Tableau 2.6 :	Caractéristiques physiques des différentes catégories de gels de Sephadex	33
Tableau 2.7 :	Limites d'exclusion des différents gels de Sephadex.....	33
Tableau 4.1 :	Mesures des temps de relaxation T_1 et T_2 après purification par chromatographie d'exclusion sérique/concentration tangentielle et par centrifugation	76
Table 5.1 :	Textural properties of M48SNs and Mn–M48SNs suspended in Nanopure water for various times	89
Table 5.2 :	Elemental contents of the particles (XPS).....	91
Table 5.3 :	Cell viability of P388 cells incubated for 4 h with Mn–M48SNs (2, 5, 7% (v/v))..	99
Table 5.4 :	Cell viability of P388 cells incubated for prolonged times with 7% (v/v) Mn–M48SNs.....	99
Table 6.1 :	Textural properties of M48SNs and DTPA-functionalized M48SNs.....	121
Table 6.2 :	Surface composition of nanoparticles (from XPS survey spectra).....	123
Table 6.3 :	Biodistribution of $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs after 48 hours (n = 4). Total injected activity (ID) is based on the average of 3 standards.....	129
Table 6.4 :	Relaxivities of Gd-chelated MSN materials.....	134

Liste des figures

Figure 2.1 :	Représentation d'un appareil d'imagerie par résonance magnétique.	6
Figure 2.2 :	En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques (μ) des protons sont orientés de façon aléatoire (gauche). Par contre sous l'effet du champ B_0 , ces derniers s'alignent dans le sens parallèle ou antiparallèle au champ (droite).....	7
Figure 2.3 :	Mouvement de précession du moment magnétique autour du champ magnétique B_0 à la fréquence de Larmor.....	7
Figure 2.4 :	Représentation schématique des vecteurs d'aimantation (M_z) et (M_{xy}) suite à l'impulsion RF.....	8
Figure 2.5 :	Mouvement de double précession induit par l'application simultanée des champs magnétiques B_0 et B_1	8
Figure 2.6 :	Courbes de relaxation longitudinale et transverse.	9
Figure 2.7 :	Séquence d'écho de spin et représentation du signal produit.	10
Figure 2.8 :	Image IRM du cerveau humain.	11
Figure 2.9 :	Différence de contraste en fonction des paramètres d'acquisitions TR et TE pour deux types de tissus (A et B).	11
Figure 2.10 :	Structures chimiques d'agents de contraste commerciaux.	14
Figure 2.11 :	Images IRM d'un cerveau humain en pondération T_1 (B-D) et T_2 (A-C) ainsi qu'après l'injection d'un agent de contraste positif.....	15
Figure 2.12 :	Représentation schématique de la désintégration par émission de positons (à gauche) et du processus d'acquisition des images TEP (à droite).....	18
Figure 2.13 :	Schémas des détecteurs composant l'imageur TEP et représentations d'une ligne de réponse et d'un sinogramme (en bas à gauche). À droite, une image TEP du cerveau humain. Les zones rouges correspondent aux endroits où s'accumule le radiotracer (^{18}F -FDG).....	19
Figure 2.14 :	Hotte plombée pour les synthèses radioactives.	23
Figure 2.15 :	Décroissance de l'activité du ^{64}Cu au cours du temps et comparaison entre la durée de la chromatographie d'exclusion stérique et la durée d'une dialyse.	24
Figure 2.16 :	Représentations schématiques du principe de purification par chromatographie d'exclusion stérique.....	28
Figure 2.17 :	Profil d'élution théorique d'une purification par chromatographie d'exclusion stérique.	29
Figure 2.18 :	Représentations graphiques de la résolution de deux pics d'élution.	30
Figure 2.19 :	Exemple de purification de l'hémoglobine des ions de Na^+ et Cl^- par chromatographie d'exclusion stérique (gel : Sephadex G-25).	34

Figure 2.20 :	Taille des sphères composant les gels de Sephadex G-25.	34
Figure 2.21 :	Représentation schématique de l'effet de la taille des sphères sur la dispersion.	35
Figure 2.22 :	Productivité théorique des gels de Sephadex G-25.....	36
Figure 2.23 :	Représentation de l'effet de l'augmentation du diamètre de la colonne sur la suspension de nanoparticules.....	37
Figure 2.24 :	Représentation de l'effet du volume de la suspension de nanoparticules dans la colonne.....	38
Figure 2.25 :	Images IRM d'une souris injectée par voie intraveineuse avec des particules marquées avec du Gd^{3+} (PEG-Gd-MSN). Les images correspondent à différents points dans le temps : avant injection (a), 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), and 45 min (e). Un rehaussement du contraste dans la vessie est visible après seulement 15 minutes. Celui-ci est dû au détachement des chélates de Gd^{3+} puis à leur excrétion par la voie rénale.....	43
Figure 3.1 :	Molécules d'APTES et de DTPA greffées à la surface des nanoparticules M48SNs.	47
Figure 3.2 :	Représentation schématique des composantes du Zetasizer (à gauche) et exemples des mesures de petites et de grosses particules (à droite).	49
Figure 3.3 :	Schéma du système de chromatographie.	58
Figure 3.4 :	Dispositif de concentration tangentielle.....	60
Figure 3.5 :	Séquence d'inversion-récupération employée pour mesurer le T_1	61
Figure 3.6 :	Séquence de Carr-Purcell utilisée pour mesurer le T_2	62
Figure 4.1 :	Colonne NAP-25.	69
Figure 4.2 :	Profil d'élution d'une purification de nanoparticules Gd-M48SNs sur une colonne NAP-25.....	70
Figure 4.3 :	Colonne de chromatographie utilisée pour purifier les nanoparticules de silice mésoporeuses des ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ résiduels (modèle XK-26/40).	71
Figure 4.4 :	Profil d'élution correspondant à une purification non réussie et nécessitant l'optimisation de certains paramètres (concentration et volume de la suspension). 71	71
Figure 4.5 :	Profil d'élution correspondant à une purification réussie.	73
Figure 5.1 :	(a) TEM images (80 keV) of Mn-M48SNs after thermal reduction treatment, and suspension in water for 3 h; (b) schematic representation of Mn-M48SNs; the 3-D mesopore network shows accessible porosity after impregnation with Mn and thermal treatments; and (c) TEM image of Mn-M48SNs embedded in a polymer resin, sliced at 60 nm and imaged at 200 keV.	88
Figure 5.2 :	(a) N_2 at 77 K adsorption/desorption isotherms and (b) corresponding NLDFT pore size distributions (from the adsorption branch) obtained for Mn-M48SNs after thermal reduction treatment and suspension in H_2O for various times.....	89

Figure 5.3 :	O, Mn and Si high-resolution XPS spectra of (a) Mn–M48SNs after thermal reduction treatment and suspension in H ₂ O for (b) 3 h, (c) 24 h and (d) 96 h.	91
Figure 5.4 :	Hydrodynamic diameter distributions of Mn–M48SNs after suspension in (a) H ₂ O or (b) acetate buffer (20 mM, pH = 5) for 3, 24 and 48 hours; (c) hydrodynamic diameter distributions of Mn–M48SNs after suspension in complete DMEM for two hours at various concentrations.	94
Figure 5.5 :	Longitudinal (r_1 , solid symbols) and transversal (r_2 , open symbols) relaxivities of Mn–M48SNs in H ₂ O at 60 MHz and 37 °C.	95
Figure 5.6 :	NMRD profiles of Mn–M48SNs in (a) H ₂ O and (b) in a borate buffer (20 mM, pH = 5), both performed at 37 °C.	97
Figure 5.7 :	TEM images (200 keV) of (a) P388 cells labelled with Mn–M48SNs; (b) nanoparticles taken up in vesicles, showing indications of a Mn radial concentration profile in the porous particles.	100
Figure 5.8 :	P388 cells labelled with Mn–M48SNs: (a) T_1 -w. MR images of cells incubated for 4 h with 0, 2, 5 and 7% (v/v) stock solutions of Mn–M48SNs obtained with different echo delay times and repetition times; (b) contrast-enhancement in P388 labelled cells suspended in gelatine was monitored by MRI for up to 24 h.	101
Figure 5.9 :	TEM images of Mn-M48SNs after (a) thermal reduction treatment and after suspension in H ₂ O for (b) 24 h or (c) 96 h and (d) corresponding particle size distributions.	103
Figure 5.10 :	TEM image of Mn-M48SNs after thermal reduction treatment (corresponding to the product in Figure 5.9 a).	103
Figure 5.11 :	XRD patterns of Mn-M48SNs after (a) thermal reduction treatment and after suspension in H ₂ O for (b) 3 h, (c) 24 h, or (d) 96 h.	104
Figure 5.12 :	H ₂ -TPR profiles of Mn-M48SNs after (a) thermal reduction treatment and after suspension in H ₂ O for (b) 3 h, (c) 24 h, or (d) 96 h.	104
Figure 5.13 :	Magnetometric profiles of Mn-M48SNs at different temperatures.	105
Figure 5.14 :	Colloidal stability assay for Mn-M48SN particles suspended in DMEM.	105
Figure 5.15 :	T_1 and T_2 relaxation times (60MHz, 37 °C) of Mn-M48SNs suspended for prolonged times in (a) H ₂ O and (b) acetate buffer (20 mM, pH 5). Before each measurement, suspensions were centrifuged at 5000 g and materials were suspended in fresh media.	106
Figure 5.16 :	NMRD profiles of Mn-M48SNs suspended in acetate buffer (20 mM, pH 5) performed at 37°C.	106
Figure 5.17 :	P388 cell proliferation assay, after 4 hours of incubation with 7 % (v/v) Mn-M48SNs.	107
Figure 5.18 :	T_1 -w. MR images of P388 cells incubated 4h with a 7 % (v/v) stock solution of M48SNs obtained with different echo delay times and repetition times. No	

	difference of signal was found between cells incubated with 7% (v/v) MSN, water and gelatin.....	108
Figure 6.1 :	M48SN synthesized as drug carriers were visualised by TEM (A-B). In (C), schematic representation of the <i>Ia3d</i> pore network, followed by grafting of APTES (D), DTPA (E), and labelling with Gd ³⁺ / ⁶⁴ Cu ²⁺ (F).....	115
Figure 6.2 :	Physico-chemical characterization of M48SNs: (A) grafting of DTPA demonstrated by ¹³ C CP/NMR profile; (B) grafting of APTES on the silica network demonstrated by the ²⁹ Si MAS NMR profile; (C) schematic representation of the Si-O bonds at the surface of M48SNs, as revealed by NMR; (D) FTIR profile of Gd-DTPA, DTPA-M48SNs and Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs.	122
Figure 6.3:	DLS hydrodynamic diameter profiles and colloidal stability (A). Contrast-enhancement potential of Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs, relaxivities (r ₁ , r ₂) measured at clinical magnetic field strength (1.41 T)(B), and (C) NMRD profiles of Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs (r ₁ , r ₂) at variable magnetic field strengths.	124
Figure 6.4 :	MRI images of mice injected i.v. with Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs (A). Empty arrow: vascular signal-enhancement effect after injection of the particles. PET images of mice injected with Gd ³⁺ / ⁶⁴ Cu ²⁺ -DTPA-M48SNs (B). Left: coronal “scout” CT map to localize liver and kidneys. Right: series of coronal, sagittal and axial PET images acquired at time points. No evidence of radioactive uptake or clearance was found in the kidneys.....	126
Figure 6.5 :	Dynamic blood clearance profiles measured by PET (A); uptake and retention of M48SNs in the liver and in the spleen (B-C).....	128
Figure 6.6 :	Low-angle XRD profile of DTPA-M48SNs.....	131
Figure 6.7 :	N ₂ physisorption isotherms of DTPA-M48SNs and M48SNs.....	132
Figure 6.8 :	NLDFT pore size distributions (N ₂ , 77 K).....	132
Figure 6.9 :	Thermogravimetric profiles of M48SNs and DTPA-M48SNs.....	133
Figure 6.10 :	T ₁ - weighted MR images of aqueous dilutions of Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs.....	134
Figure 6.11 :	Dynamic blood clearance profile measured by MRI (A), the signal enhancement ratio (S ₁ /S ₀) was calculated for liver and bladder, and plotted in (B) and (C).....	134
Figure i :	Limites d'exclusion et de fractionnement des gels de chromatographie d'exclusion stérique commerciaux.....	157

Liste des abréviations

Abréviations

A _s	Facteur de symétrie
APTES	Aminopropyltriéthoxysilane
ATR-FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (<i>attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
B ₀	Champ magnétique B ₀
BET	Brunnauer-Emmett-Teller
BIM	Laboratoire de Biomatériaux pour l'Imagerie Médicale
CAs	Agents de contraste (<i>contrast agents</i>)
CE	Capture électronique
CERMA	Centre de recherche sur les matériaux avancés
CIMS	Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke
CQMF	Centre québécois des matériaux fonctionnels
CR-CHUQ	Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Québec
CTAB	Bromure de n-cetyltriméthylammonium (<i>n-cetyltrimethylammonium bromide</i>)
DLS	Diffusion de la lumière en mode dynamique (<i>dynamic light scattering</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRX	Diffraction des rayons-X
DTPA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
ELS	Diffusion électrophorétique de la lumière (<i>electrophoretic light scattering</i>)
EDX	Spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X (<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
FBS	Sérum fœtal bovin (<i>foetal bovine serum</i>)
¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-Fluorodéoxyglucose
FOV	Champ de vue (<i>field of view</i>)
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GF-AAS	Spectroscopie d'absorption atomique à four au graphite (<i>graphite furnace atomic absorption spectroscopy</i>)
¹ H	Proton
HRTEM	Microscopie électronique à transmission de haute résolution (<i>high resolution transmission electron microscopy</i>)
HRXPS	Spectroscopie photoélectronique induite par rayons X de haute résolution (<i>high resolution X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
H ₂ -TPR	Réduction en température programmée (<i>Temperature-programmed reduction by hydrogen</i>)
ICP-AES	Spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (<i>inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i>)

ICP-MS	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP-OES	Spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (<i>inductively-coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ID	Dose injectée (<i>injected dose</i>)
INSPQ	Institut national de santé publique du Québec
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IS	Sphère interne (<i>inner sphere</i>)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k_B	Constante de Boltzmann
K_S	Constante de stabilité
MAS	<i>Solid-state magic-angle spinning</i>
MEMRI	<i>Manganese-enhanced magnetic resonance imaging</i>
MET	Microscopie électronique à transmission
MLEM	<i>Maximum likelihood estimation method</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
MSNs	Nanoparticules de silice mésoporeuses (<i>mesoporous silica nanoparticles</i>)
M_r	Masse moléculaire relative (<i>relative molecular mass</i>)
N_A	Nombre d'Avogadro
NEX	Nombre d'excitations (<i>number of excitations</i>)
NIR	Proche infrarouge (<i>Near infrared</i>)
NLDFT	<i>Nonlocal density functional theory</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NMRD	Dispersion de résonance magnétique nucléaire (<i>nuclear magnetic resonance dispersion</i>)
NSF	Fibrose systémique néphrogène (<i>Nephrogenic systemic fibrosis</i>)
OS	Sphère externe (<i>outer sphere</i>)
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	PEG-polyéthylène imine
PET	<i>Positron emission tomography</i>
r_1	Relaxivité longitudinale
r_2	Relaxivité transverse
RF	Radiofréquence
R_H	Rayon hydrodynamique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
R_s	Facteur de résolution
ROI	Région d'intérêt (<i>region of interest</i>)
RT	Température de la pièce (<i>room temperature</i>)
S	Signal
SPIO	Particules superparamagnétiques d'oxyde de fer (<i>superparamagnetic iron oxide</i>)
$t_{1/2}$	Temps de demi-vie
T_1	Temps de relaxation longitudinale
T_2	Temps de relaxation transverse
TDM	Tomodensitométrie

TD-NMR	<i>Time-domain nuclear magnetic resonance</i>
TE	Temps d'écho
TEOS	Tetraéthylorthosilicate
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
TEP	Tomographie par émission de positons
TGA	Thermogravimétrie (<i>thermogravimetric analysis</i>)
TMS	<i>Tetramethylsilane</i>
TR	Temps de répétition
USPIO	Particules superparamagnétiques d'oxyde de fer ultra-fines (<i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>)
XPS	Spectroscopie photoélectronique induite par rayons X (<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
XRD	<i>X-ray diffraction</i>

Abréviations grecques

α	Angle de bascule
β^+	Positron (e^+)
β^-	Électron (e^-)
γ	Rayon gamma
γ_g	Rapport gyromagnétique du proton
ϵ	Constante diélectrique
ζ	Potentiel zêta
η	Viscosité du solvant
λ	Constante de désintégration
μ	Moment magnétique
ν	Neutrino
ρ_H	Densité de protons
τ	Temps
ω_0	Fréquence de précession de Larmor du proton

Remerciements

Au moment d'entreprendre cette maîtrise, jamais je n'aurais pu imaginer tous les défis et toutes les péripéties qui m'attendaient. Ces années de formation resteront gravées dans ma mémoire comme ayant été très intenses, mais parmi les plus enrichissantes et les plus stimulantes que j'ai vécues jusqu'à maintenant. La réalisation de cette maîtrise a évidemment été possible grâce au soutien et à l'aide de nombreuses personnes que je souhaite remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche le Pr Marc-André Fortin, pour avoir cru en moi et pour sa confiance. Je me sens privilégiée d'avoir travaillé sur un projet aussi passionnant, qui m'a permis d'acquérir des connaissances et des compétences dans plusieurs domaines. Je le remercie également pour toutes les belles opportunités, l'aide et le temps qu'il m'a accordé. Je tiens aussi à remercier le Pr Freddy Kleitz, qui, en tant que co-directeur de cette maîtrise, a contribué par son expérience et son expertise au développement et à l'enrichissement du projet.

La réussite d'un tel projet n'aurait pas été possible sans l'aide des professionnels de recherche. Vos compétences et vos connaissances sont essentielles à notre formation et contribuent à la très grande qualité de la recherche. Je vous remercie pour tout le temps que vous m'avez accordé au cours de ces années. Merci à Jean Lagueux pour son soutien et son implication au niveau de la chromatographie, ainsi que pour toutes les heures passées à l'IRM, à Pascale Chevallier, pour son aide apportée lors des caractérisations, des analyses et pour les révisions des articles, à Stéphane Turgeon, pour son aide dans la mise en place du laboratoire de radioactivité, et enfin, à Marie-France Côté et Jacques Lacroix, merci du support que vous m'avez apporté lors des expériences de culture cellulaire. Vos contributions ont fait toute la différence pour moi.

Je tiens à remercier les collègues passés (Luc Faucher, Andrée-Anne Guay-Bégin, Mathieu Létourneau, Rémy Guillet-Nicolas et Mélanie Tremblay) et les collègues présents (Meryem Bouchoucha, Diane Djoumessi Lekeufack, Fanny Silencieux, Mathieu Bouchard, Lilit Aboshyan Sorgho). Votre bonne humeur et votre convivialité ont fait en sorte que l'ambiance au laboratoire a toujours été très agréable. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous, et je vous remercie pour votre aide, votre support et vos encouragements. Je tiens aussi à remercier les étudiants des autres groupes de recherche, pour les nombreux échanges et discussions sur l'heure du dîner. Les fous rires partagés resteront dans mes souvenirs.

Un merci spécial à Andrée-Anne et Pascale, vous avez toujours été présentes pour moi dans les bons comme dans les moins bons moments et je tiens à vous remercier sincèrement pour votre amitié et votre écoute.

Finalement, à ma famille et mes amis, merci d'avoir célébré mes réussites, relativisé mes déceptions et de m'avoir rappelé qu'il y a un monde à l'extérieur des études graduées. Un gros merci à ma mère et à ma grande sœur, pour tout le support que vous m'apportez, votre intérêt, votre écoute et vos encouragements. Je vous en serai toujours reconnaissante. Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Avant-propos

Les travaux réalisés dans cette maîtrise s'inscrivent dans un vaste projet de recherche consistant à développer les nanoparticules de silice mésoporeuses comme sonde d'imagerie médicale et comme véhicules pour la livraison de médicaments. Ce projet de maîtrise porte plus particulièrement sur l'imagerie biomédicale. Les études ont été réalisées dans le contexte d'une collaboration entre le Laboratoire de Biomatériaux pour l'Imagerie Médicale (BIM, professeur Marc-André Fortin) et le Laboratoire des Matériaux Fonctionnels Nanoporeux (professeur Freddy Kleitz). Les travaux ont été effectués avec le soutien des professionnels de recherche Pascale Chevallier, Ph. D. (chimie), Jean Lagueux, Ph. D. (biologie), Stéphane Turgeon, Ph. D. (physique), Marie-France Côté, B. Sc. (biochimie) et Jacques Lacroix, B. Sc. (biologie), au CHU de Québec. Les résultats obtenus au cours de cette maîtrise sont présentés sous la forme de deux articles scientifiques (chapitres 5 et 6), ainsi que dans un chapitre portant plus spécifiquement sur la purification des nanoparticules de silice mésoporeuses par chromatographie d'exclusion stérique (chapitre 4).

La première publication est intitulée *Manganese-impregnated mesoporous silica nanoparticles for signal enhancement in MRI cell labelling studies*. Il a été démontré dans cet article que les particules de silice mésoporeuses dopées de l'élément paramagnétique manganèse sont efficaces comme agent de contraste en IRM et n'affectent pas la viabilité cellulaire. Dans le cadre de ce projet, les particules ont été synthétisées, fonctionnalisées et caractérisées par l'étudiant Rémy Guillet-Nicolas, candidat au doctorat, ainsi que par la professionnelle de recherche Dr Pascale Chevallier (CHU de Québec). La description complète de la méthodologie et de la caractérisation de ces nanoparticules se retrouve dans la thèse de cet étudiant. Ma principale contribution a été de concevoir, de planifier et d'exécuter les expériences de culture cellulaire et d'IRM cellulaire : marquage des cellules avec les nanoparticules, vérification de la stabilité colloïdale en milieu de culture, tests de viabilité et de prolifération cellulaire, mesure d'IRM (avec le professionnel de recherche Dr Jean Lagueux, CHU de Québec). J'ai également rédigé les sections correspondantes de l'article. Cet article a été publié dans le journal *Nanoscale* (2013, volume 5, numéro 23, pages 11 499-11 511).

Le second article est intitulé *Metal chelate grafting at the surface of mesoporous silica nanoparticles (MSNs): physico-chemical and biomedical imaging assessment*. Cet article porte sur la caractérisation physico-chimique et le suivi en IRM et en TEP de la biodistribution de

nanoparticules de silice mésoporeuses marquées avec du gadolinium (Gd^{3+} , pour l'IRM) et du cuivre radioactif (^{64}Cu , pour la TEP), en utilisant le modèle de la souris. À titre de première auteure de cet article, j'ai réalisé la majeure partie des expériences suivant la synthèse des nanoparticules. J'ai mis au point la méthodologie de marquage du gadolinium et du cuivre radioactif, j'ai développé la procédure de purification par chromatographie d'exclusion stérique et j'ai effectué la majorité des caractérisations sur les produits marqués. J'ai aussi assisté M. Jean Lagueux et l'équipe du Pr Roger Lecomte (Université de Sherbrooke) lors des études de biodistribution en IRM et en TEP. Finalement, j'ai participé à l'interprétation des résultats et à l'ensemble de la rédaction du manuscrit. La réalisation de ces expériences n'aurait toutefois pas été possible sans le travail de l'étudiante Meryem Bouchoucha (candidate au doctorat) et du Dr Jean-Luc Bridot (stagiaire postdoctoral), qui ont contribué à la synthèse, la fonctionnalisation et la caractérisation des particules avant marquage. Cet article a été publié dans la revue *Journal of Materials Chemistry B* (2015, volume 3, numéro 5, pages 748-758).

Chapitre 1 – Introduction

Depuis les trente dernières années, l'application de la nanotechnologie au domaine médical a permis le développement de nouveaux outils thérapeutiques et de diagnostic. Par l'entremise de nanoparticules, il est maintenant possible d'augmenter l'efficacité de détection de certaines modalités d'imagerie médicale et de livrer davantage d'agents thérapeutiques pour le traitement de certaines maladies.¹⁻³ Ce sont les propriétés intrinsèques des nanoparticules qui font d'elles d'excellentes candidates pour ce type d'applications. Au niveau thérapeutique, l'intérêt de les utiliser repose sur le fait qu'elles ont bien souvent une meilleure dispersion aqueuse et une hydrophilicité supérieure à certaines molécules médicamenteuses.^{2,4} De plus, certaines permettent une élution des médicaments contrôlée et ciblée, possèdent généralement une demi-vie biologique plus longue et offrent la possibilité de livrer plusieurs médicaments simultanément.^{3,4}

Cependant, avant de développer l'aspect thérapeutique de livraison de médicaments, il est essentiel d'étudier d'abord le comportement des nanoparticules dans des modèles *in vivo*. Il faut connaître leurs effets sur la viabilité et la prolifération cellulaire, leur biodistribution dans l'organisme, leur temps de rétention dans le sang et dans les organes, ainsi que leur voie d'élimination. Pour ce faire, la façon la moins invasive et la plus systématique est d'utiliser l'imagerie biomédicale. Les procédures d'imagerie permettent de collecter des données précises et en temps réel de la structure anatomique et de certains processus physiologiques. Il est aussi possible de faire un suivi sur plusieurs jours d'un même animal, ce qui limite significativement le nombre d'animaux utilisés. Parmi les nombreuses modalités d'imagerie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP) se démarquent par la qualité des informations qu'elles permettent de recueillir. L'IRM offre des images anatomiques d'une très haute résolution alors que la TEP est dotée d'une excellente sensibilité de détection. Dans le cadre d'études *in vivo*, l'IRM peut être utilisée pour confirmer l'internalisation cellulaire de nanoparticules, mais aussi pour observer le rehaussement du signal sanguin et suivre la route d'excrétion dans un modèle animal. La TEP, grâce à sa très grande sensibilité, peut fournir quant à elle des images et des données quantitatives sur la biodistribution des particules, leur rétention dans les organes, leur clairance sanguine et leur excrétion. La complémentarité de l'IRM et de la TEP soulève l'intérêt de conférer aux nanoparticules utilisées en marquage cellulaire et pour l'élution de médicaments, des sondes d'imagerie qui permettraient d'obtenir à la fois des informations anatomiques et fonctionnelles sur le comportement des nanoparticules dans des modèles *in vivo*.

Parmi les particules les plus prometteuses pour la livraison de médicaments, on retrouve les nanoparticules de silice mésoporeuses. Il s'agit d'un matériau biocompatible possédant une très grande surface spécifique et un grand volume poreux. Le greffage de groupements fonctionnels et d'agents thérapeutiques est donc envisageable. Toutefois, la silice n'étant détectable directement par aucune méthode d'imagerie, il est nécessaire d'intégrer à sa structure un élément paramagnétique (pour l'IRM) ou un radio-isotope émetteur de positons (pour la TEP) afin de permettre sa détection. Ainsi, il sera possible d'avoir une meilleure compréhension du comportement des nanoparticules de silice mésoporeuses dans des modèles *in vivo*.

Objectifs du projet de maîtrise

Le premier objectif de ce projet de maîtrise était de démontrer que les nanoparticules de silice mésoporeuses marquées avec du manganèse (Mn-M48SNs) peuvent être utilisées comme agent de contraste cellulaire. La stratégie employée dans le cadre de cette étude consistait à se servir de la porosité des nanoparticules pour tapisser leur surface interne avec le manganèse (Mn). La diffusion de l'eau dans les pores offre un contact direct avec l'élément paramagnétique, ce qui permet d'obtenir un excellent signal en IRM. Les nanoparticules MSNs ont donc été synthétisées et imprégnées de Mn ionique. Puis, une série d'analyses a permis d'en effectuer la caractérisation physico-chimique complète. Trois expériences cellulaires ont été menées afin d'étudier la cytotoxicité, la prolifération et le contraste en IRM produit par les nanoparticules. Pour ce faire, les particules ont été incubées avec des cellules leucémiques de la souris (P388). L'effet des nanoparticules sur la prolifération et la viabilité a été mesuré par des tests au Trypan bleu, alors que les effets de contraste ont été observés et quantifiés par IRM.

Le deuxième objectif consistait à étudier le comportement des nanoparticules de silice mésoporeuses dans un modèle *in vivo*, et ce, par l'entremise de l'IRM et la TEP. Pour ce faire, il était d'abord essentiel de développer un modèle de nanoparticules qui soit détectable en IRM et en TEP. Dans un premier temps, les nanoparticules de silice mésoporeuses ont été fonctionnalisées avec un agent chélateur puis marquées avec du gadolinium (Gd^{3+}) et du cuivre radioactif ($^{64}Cu^{2+}$). Cependant, cette stratégie de co-marquage a entraîné une problématique importante au niveau de la purification. La demi-vie du $^{64}Cu^{2+}$ étant de 12.7 h, il était essentiel de développer une procédure de purification efficace pour éliminer les ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ libres, et rapide pour demeurer bien en deçà de la demi-vie du $^{64}Cu^{2+}$. Ainsi, la chromatographie d'exclusion stérique a été utilisée comme moyen rapide de purification des nanoparticules. Cette technique n'étant pas couramment employée pour la purification des nanoparticules, son optimisation a nécessité beaucoup de travail.

Ensuite, les nanoparticules ont été caractérisées par plusieurs techniques d'analyse afin d'établir leurs propriétés physico-chimiques. Une première étude d'IRM *in vivo* a été réalisée chez la souris avec des nanoparticules seulement marquées de Gd^{3+} . Le rehaussement du contraste dans le sang, le foie et la vessie a été quantifié. Finalement, une étude de TEP *in vivo* dans le modèle de la souris avec des nanoparticules marquées de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ a été effectuée afin de quantifier la biodistribution, la rétention sanguine et aux organes, la biodégradation et la voie d'élimination des nanoparticules MSNs.

Structure du mémoire

Ce mémoire est composé de 6 chapitres. L'introduction met en contexte l'intérêt de développer différents systèmes de nanoparticules de silice mésoporeuses pour l'imagerie biomédicale. Le second chapitre regroupe l'ensemble des concepts théoriques nécessaires à la compréhension du projet ainsi qu'une revue de la littérature. Le troisième chapitre présente la méthodologie utilisée dans le cadre des différentes expériences. Le quatrième chapitre est consacré aux résultats de purification des nanoparticules MSNs par chromatographie d'exclusion stérique. L'importance de ces résultats dans la réussite du projet de maîtrise étant significative, cette section du mémoire démontre de façon pratique et théorique l'efficacité de la purification. Le cinquième chapitre présente un premier article publié dans la revue *Nanoscale* portant sur la conception de particules MSNs chargées de manganèse et leur utilisation comme marqueur cellulaire. Le sixième chapitre présente un deuxième article (publié dans la revue *Journal of Materials Chemistry B*) qui se concentre sur la caractérisation physico-chimique et la biodistribution des MSNs dans le modèle de la souris par imagerie IRM et TEP. Finalement, les derniers chapitres de ce mémoire sont consacrés à une discussion des résultats, une conclusion et aux perspectives du projet.

Chapitre 2 – Théorie

Ce chapitre présente les principaux aspects théoriques liés au projet de recherche. Dans un premier temps, la théorie relative aux modalités d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de tomographie par émission de positons (TEP) est expliquée, ainsi que celle concernant la purification des nanoparticules par chromatographie d'exclusion stérique. Ensuite, un survol de l'utilisation des nanoparticules MSNs pour la livraison de médicaments et le marquage cellulaire est présenté. Enfin, les dernières sections portent respectivement sur le choix des cellules immunitaires murines P-388 utilisées dans le projet, et sur les études de biodistribution des particules MSNs rapportées dans la littérature.

2.1. Modalités d'imagerie biomédicale

Puisque l'IRM et la TEP ont été utilisées dans la réalisation de ce projet, les concepts liés aux agents de contraste pour l'IRM et aux traceurs radioactifs pour la TEP sont également abordés dans cette section.

2.1.1. *Imagerie par résonance magnétique*

À partir de la seconde moitié du vingtième siècle, plusieurs équipes de recherche à travers le monde ont contribué au développement de l'IRM. Bien que les concepts de résonance magnétique nucléaire (RMN) aient été décrits dès 1946, ce n'est qu'au cours des années 1970 que l'IRM a connu une évolution remarquable. L'introduction des gradients de champ magnétique, l'utilisation de la transformée de Fourier pour le codage du signal et les progrès réalisés en informatique ont permis la reconstruction des images dans un temps raisonnable. Ainsi, dès le début des années 1980, l'IRM a été utilisée de façon courante en clinique.

L'intérêt de l'IRM est qu'elle permet d'obtenir des images anatomiques de haute résolution (~200 μm) et fournit un excellent contraste dans les tissus mous à faibles différences de densités (par ex. : la matière blanche, la matière grise, le liquide céphalo-rachidien, le foie, les tumeurs cancéreuses). Elle permet également d'imager le corps en entier et de faire des coupes dans les trois plans axiaux (transverse, sagittal et coronal). Il est aussi important de mentionner que comparativement à certaines autres techniques d'imagerie utilisées en clinique (par ex. : la tomодensitométrie (TDM) et la TEP), l'IRM n'utilise pas de rayonnements ionisants.

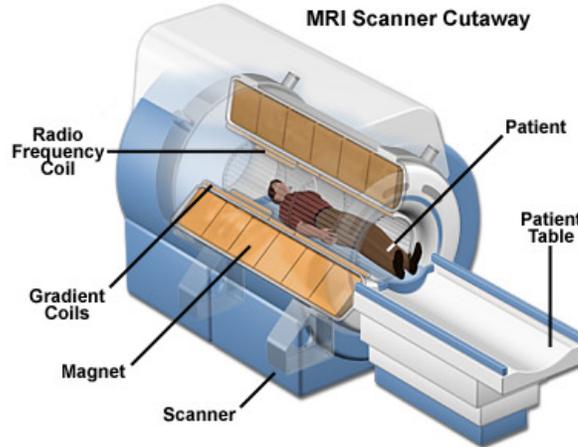


Figure 2.1. Représentation d'un appareil d'imagerie par résonance magnétique.

(Source : <http://www.biomedresearches.com/root/pages/researches/epilepsy/mri.html>)

L'IRM repose sur les mécanismes d'excitation et de relaxation des noyaux de certains éléments soumis à un champ magnétique. En raison de son abondance biologique élevée et son fort moment magnétique, l'hydrogène est l'élément le plus abondamment détecté en IRM. À la base, le proton constituant le noyau de l'atome d'hydrogène effectue une rotation autour de son axe central et donne naissance au spin nucléaire. Ce dernier engendre ensuite un moment magnétique ($\vec{\mu}$), qui en l'absence d'un champ magnétique externe, est orienté aléatoirement. Lors de l'application du champ magnétique sur une très grande population de protons, ceux-ci ont tendance à se séparer en deux populations distinctes. L'une oriente son moment magnétique dans la direction parallèle et l'autre dans la direction antiparallèle au champ magnétique B_0 (Figure 2.2).

Les deux populations ne se séparent pas de façon égale puisque les protons ont tendance à favoriser l'état de moindre énergie (dans la direction parallèle à B_0). Cette distribution des protons dans chaque état est décrite par l'équation de Boltzmann :

$$N_m = N_0 \frac{\exp\left(\frac{-E_m}{k_B T}\right)}{\sum_{n=-I}^{n=I} \exp\left(\frac{-E_n}{k_B T}\right)} \quad (2.1)$$

N_m : Nombre de spins dans l'état m

N_0 : Nombre total de spins de l'échantillon

I : Nombre quantique de spin

E_m : Énergie de l'état m

k_B : constante de Boltzmann ($1.3806503 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$)

T : Température

La différence entre les deux populations est infime, mais suffisante pour observer un phénomène d'aimantation au niveau macroscopique. En effet, la somme vectorielle des moments magnétiques dans l'état de plus faible énergie produit un vecteur d'aimantation macroscopique défini par \vec{M}_z .

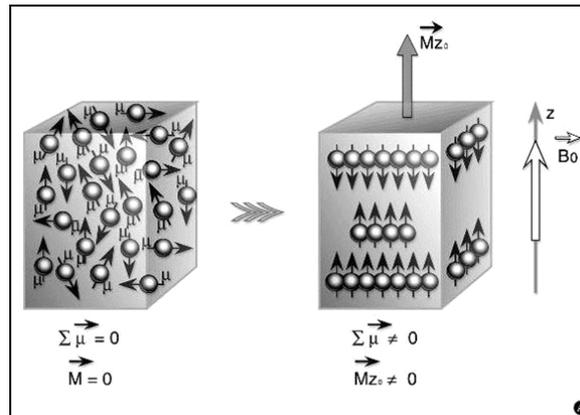


Figure 2.2. En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques (μ) des protons sont orientés de façon aléatoire (gauche). Par contre sous l'effet du champ B_0 , ces derniers s'alignent dans le sens parallèle ou antiparallèle au champ (droite).

(Source : http://www.themavision.fr/upload/docs/application/pdf/2012-08/monographie_electronique-et-medical.pdf)

Les moments magnétiques se mettent également à décrire un mouvement de précession autour de l'axe des z lors de l'application du champ magnétique (Figure 2.3). La vitesse angulaire (ω_0) de ce mouvement de rotation est appelée fréquence de Larmor et correspond à :

$$\omega_0 = \gamma_g \cdot B_0 \tag{2.2}$$

Elle dépend de la force du champ magnétique externe (B_0) et du rapport gyromagnétique (γ_g). La valeur du rapport gyromagnétique est intrinsèque à chaque noyau. Pour l'hydrogène elle équivaut à : $\gamma_g = 2.6752 \times 10^8 \text{ radian} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

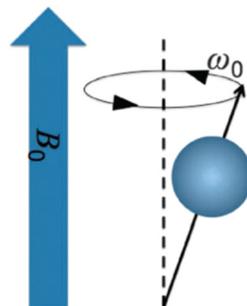


Figure 2.3. Mouvement de précession du moment magnétique autour du champ magnétique B_0 à la fréquence de Larmor.

(Source : ⁵)

Il est important de noter que la précession des moments magnétiques n'est pas cohérente. C'est-à-dire que les moments magnétiques individuels ne sont pas en phase les uns avec les autres. Ceci a pour conséquence d'annuler le vecteur d'aimantation macroscopique dans le plan xy ($\vec{M}_{xy} = 0$).

Pour parvenir à détecter un signal en IRM, il faut que le vecteur \vec{M}_z soit périodiquement basculé dans le plan xy afin de produire une fonction oscillante qui sera lue par une bobine de détection. Pour ce faire, une impulsion radiofréquence (RF) est dirigée perpendiculairement au champ B_0 (selon l'axe des x). L'impulsion RF est une onde électromagnétique dont la composante de champ magnétique (B_1) oscille à la fréquence de précession des protons (ω_0). La synchronisation de ces deux fréquences (résonance) est essentielle pour permettre au champ B_1 d'agir sur les protons.

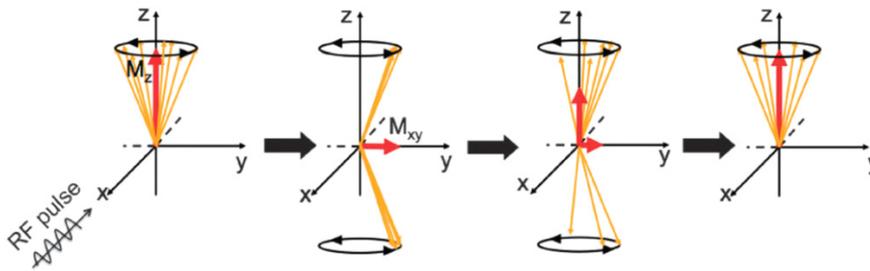


Figure 2.4. Représentation schématique des vecteurs d'aimantation (\vec{M}_z) et (\vec{M}_{xy}) suite à l'impulsion RF.

(Source :⁵)

Selon l'approche classique, l'application de ce deuxième champ magnétique induit le basculement du vecteur \vec{M}_z dans le plan xy puisque les protons effectuent maintenant un mouvement de précession autour de l'axe des x' . La combinaison des précessions selon l'axe des z et des x' provoque un mouvement de rotation en spirale du vecteur \vec{M}_z jusque dans le plan xy (Figure 2.5).

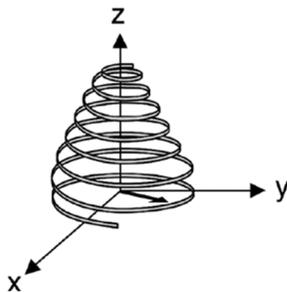


Figure 2.5. Mouvement de double précession induit par l'application simultanée des champs magnétiques B_0 et B_1 .

(Source :⁶)

Ainsi, lors de l'application de l'impulsion de RF, il y a diminution de l'aimantation longitudinale (\vec{M}_z) et apparition de l'aimantation transversale (\vec{M}_{xy}). Celle-ci est également due à la mise en phase des protons par la RF. Il est important de noter que l'angle de bascule dépend de la durée d'application de l'impulsion RF et de son champ magnétique (B_1). Généralement, les angles de bascule de 90° et 180° sont les plus fréquemment utilisés dans les procédures d'imagerie. D'ailleurs, c'est en appliquant un angle de 90° que les plus fortes valeurs d'aimantation transversale (\vec{M}_{xy}) sont obtenues.

Lorsque l'impulsion RF est terminée, le vecteur d'aimantation revient à sa position d'origine le long de l'axe des z. Ce phénomène est accompagné par l'émission d'un rayonnement électromagnétique qui constitue le signal de RMN. Le retour à l'équilibre ou relaxation est décrit par une courbe exponentielle croissante pour le recouvrement du vecteur \vec{M}_z et une courbe exponentielle décroissante pour la perte d'aimantation du vecteur \vec{M}_{xy} (Figure 2.6).

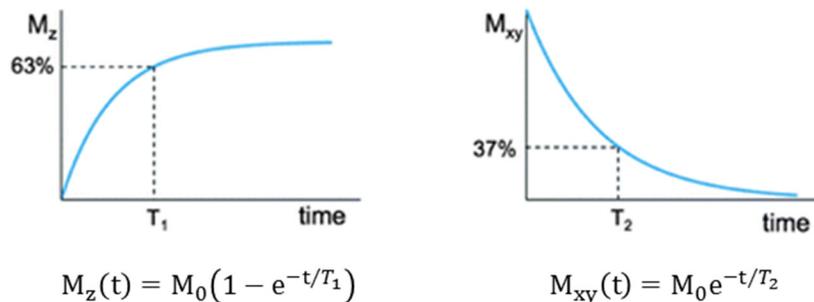


Figure 2.6. Courbes de relaxation longitudinale et transverse.

(Source :⁵)

Le phénomène de relaxation est aussi caractérisé par les temps de relaxation longitudinale (T_1) et transverse (T_2). Le T_1 est défini comme étant le temps nécessaire pour que le vecteur \vec{M}_z soit revenu à 63 % de sa valeur initiale, alors que le T_2 correspond au temps requis pour que la valeur de la composante transverse soit égale à 37 % de sa valeur initiale. Il est important de noter que les valeurs de T_1 et T_2 sont différentes puisque ce sont des mécanismes distincts qui sont à l'origine de leur relaxation. Dans le cas du T_1 , il s'agit d'un transfert d'énergie vers le milieu, alors que pour le T_2 il s'agit du déphasage progressif des protons. D'ailleurs, le T_2 est toujours plus court que le T_1 car l'aimantation transversale décroît plus rapidement que ne se produit le recouvrement du vecteur \vec{M}_z . La notion de temps de relaxation est très importante puisque ces derniers sont propres à chaque matériau et influencent ainsi les effets de contraste observés entre les différents tissus lors des examens d'IRM.

Au cours de l'acquisition d'une image IRM, les impulsions RF sont répétées à plusieurs reprises et selon une séquence bien précise afin d'acquérir toutes les coupes et de faire ressortir les effets de contraste. La séquence d'écho de spin est l'une des plus utilisées lors des procédures d'imagerie (Figure 2.7). Elle consiste à appliquer d'abord une impulsion RF de 90° (déphasage des spins des protons), suivie d'une impulsion de 180° après un certain temps τ . Il se produit alors un rephasage des protons qui permet de mesurer un maximum de signal au temps 2τ , aussi appelé temps d'écho (TE). Les impulsions sont ensuite répétées à un intervalle de temps précis, qui correspond au temps de répétition (TR). C'est en modifiant les paramètres TE et TR de la séquence d'écho de spin qu'il est possible de favoriser le contraste des images en fonction de T_1 , T_2 et de la densité de protons. C'est ce que l'on appelle la « pondération ».

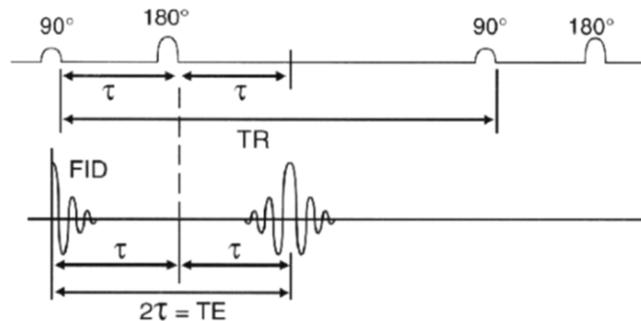


Figure 2.7. Séquence d'écho de spin et représentation du signal produit.

(Source : ⁶)

Ainsi, l'intensité du signal RMN pour une séquence écho de spin est dépendante des facteurs intrinsèques aux tissus tels que la densité de protons (ρ_H), le T_1 et le T_2 , mais aussi des deux paramètres d'acquisition; le temps de répétition (TR) et le temps d'écho (TE). L'équation suivante permet d'estimer l'intensité du signal pour une séquence écho de spin :

$$S \propto \rho_H (1 - e^{-TR/T_1}) (e^{-TE/T_2}) \quad (2.3)$$

Il est important de noter que plus la valeur du signal est élevée pour une certaine région, plus celle-ci apparaît brillante sur les images. C'est pour cette raison que l'on effectue une pondération, car on cherche à augmenter les effets de contraste entre les tissus. Selon l'expression présentée plus haut, il faut sélectionner un TR et un TE courts (tendant vers 0) pour avoir une image pondérée en T_1 . Une pondération en T_2 nécessite plutôt que le TR et le TE soient longs (tendant vers l'infini ∞). La pondération en densité de protons implique quant à elle un TR tendant vers l'infini et un TE tendant vers 0. Une description plus détaillée des effets de contraste est présentée dans la section suivante.

Pour terminer, la reconstruction des images s'effectue à partir de la codification spatiale des signaux émis par le sujet. L'application de trois gradients de champ magnétique (gradients de tranche, de fréquence et de phase) et le traitement des données par la transformée de Fourier permettent de localiser précisément l'endroit d'où proviennent les signaux. Il est alors possible de reconstruire les images en déterminant l'intensité du signal voxel par voxel.

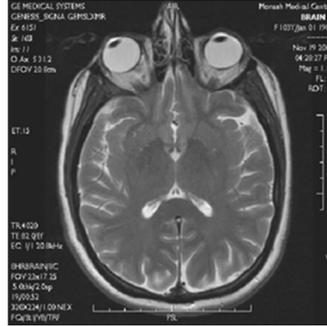


Figure 2.8. Image IRM du cerveau humain.

(Source : http://c21.phas.ubc.ca/sites/default/files/mri_brain_0.jpg)

2.1.2. *Contraste tissulaire*

Il a été mentionné que le contraste est influencé par les valeurs des temps de relaxation longitudinale (T_1) et transverse (T_2) de chaque tissu, ainsi que par le choix des paramètres d'acquisition TR et TE. Afin de bien comprendre l'impact de chacun de ces éléments sur le contraste, la Figure 2.9 présente les courbes de relaxation de deux tissus avec des valeurs de T_1 et T_2 différentes. Dans ce cas-ci, le tissu A possède de longs T_1 et T_2 , alors que le tissu B possède de courts T_1 et T_2 .

Pour une pondération en T_1 , on observe clairement que la différence entre les deux tissus est maximale lorsque le TR est court (TR_1 ; Figure 2.9 gauche). L'effet de contraste est alors beaucoup plus prononcé que dans le cas d'un TR long (TR_2).

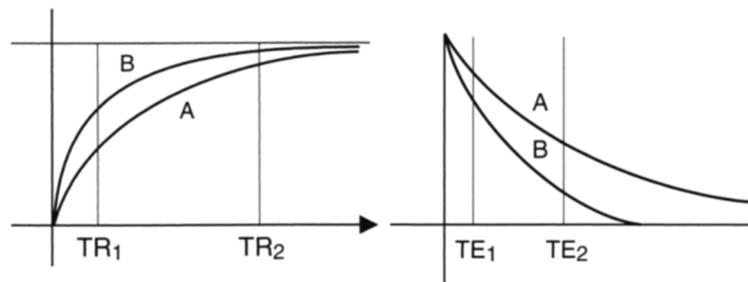


Figure 2.9. Différence de contraste en fonction des paramètres d'acquisitions TR et TE pour deux types de tissus (A et B).

(Source :⁶)

Pour une pondération en T_2 , la différence maximale entre les deux tissus est observée lorsque le TE est long (TE_2 ; Figure 2.9 droite). Pour cette raison, le contraste observé est beaucoup plus important pour un TE_2 long que pour un TE_1 court. Pour ce qui a trait à la pondération en densité de protons, il faut minimiser les effets en T_1 et en T_2 . La Figure 2.9 démontre que les différences minimales entre les tissus se produisent pour un TR long et un TE court. Il est donc nécessaire de fixer ces valeurs comme paramètres de séquence afin d'obtenir cette pondération.

Pour résumer, le Tableau 2.1 indique les valeurs typiques des temps de répétition et d'écho pour les différentes pondérations, et le Tableau 2.2 regroupe les valeurs des temps de relaxation T_1 et T_2 de différents tissus.

Tableau 2.1. Paramètres d'acquisition TR et TE caractéristiques des pondérations T_1 , T_2 et de densité de protons

Pondération	Temps de répétition (TR)	Temps d'écho (TE)
T_1	Court (400-600 ms)	Court (5-30 ms)
T_2	Long (1500-3500 ms)	Long (60-150 ms)
Densité de protons	Long (1500-3500 ms)	Court (5-30 ms)

(Source : ?)

Tableau 2.2. Valeurs de T_1 et T_2 pour certains tissus humains

Tissus	T_1 , 1.5 T (ms)	T_2 (ms)
Gras	260	80
Foie	500	40
Muscle	870	45
Matière blanche	780	90
Matière grise	900	100
Liquide céphalo-rachidien	2400	160

(Source : ?)

2.1.3. Agents de contraste pour l'IRM

Les agents de contraste sont utilisés en IRM pour amplifier les effets de contraste entre les tissus. Ils sont composés soit d'éléments paramagnétiques, ferromagnétiques ou superpara-magnétiques, qui agissent directement sur la relaxation des protons 1H en réduisant les temps de relaxation longitudinal et transverse. Ceci a pour conséquences de rehausser ou d'atténuer le signal en IRM des zones contenant l'agent. Il est important de souligner que ce n'est pas le produit de

contraste qui est détecté sur les images IRM, mais bien le signal émanant des protons ^1H situés à proximité de celui-ci, et avec lesquels l'agent de contraste interagit.

Actuellement, les produits de contraste sont employés dans environ 30% des examens cliniques d'IRM.⁸ Ces derniers facilitent les diagnostics en révélant certaines pathologies qui n'auraient pu être détectées autrement.

2.1.3.1. Catégories d'agents de contraste

Les agents de contraste sont répartis en deux grandes catégories; ceux provoquant un rehaussement du signal (qualifiés de positifs), et ceux générant une perte de signal (qualifiés de négatifs).

Agents de contraste positifs

Les agents de contraste positifs sont généralement composés d'éléments paramagnétiques. Ces derniers sont caractérisés par un moment magnétique électronique élevé en raison de leurs nombreux électrons non appariés. Lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, leur moment magnétique électronique s'aligne avec le champ magnétique externe (B_0) et génère une aimantation. Celle-ci est proportionnelle à l'intensité du champ appliqué et disparaît lorsque celui-ci est interrompu.

Parmi les éléments paramagnétiques d'intérêt, le gadolinium (Gd^{3+}) et le manganèse (Mn^{2+}) sont de ceux qui possèdent le plus grand nombre d'électrons non appariés. Ils ont respectivement 7 et 5 électrons célibataires, ce qui leur confère un moment magnétique élevé. Ce sont des interactions dipolaires entre les spins électroniques de l'élément paramagnétique et les spins nucléaires des protons ^1H qui entraînent une augmentation de la vitesse de relaxation. Il se produit alors un meilleur transfert de l'énergie dans le milieu environnant, ce qui réduit le temps de relaxation longitudinal (T_1) et entraîne une hausse du signal. Pour cette raison, la région où est localisé l'agent de contraste apparaît plus brillante sur les images IRM pondérées en T_1 .

Depuis les 25 dernières années, de nombreux produits ont été commercialisés comme agents de contraste positifs pour l'imagerie clinique. De façon générale, ils sont basés sur des agents de chélation séquestrant un ion paramagnétique. Parmi les principaux produits à base de gadolinium connus, on retrouve le Magnevist (Gd-DTPA), le ProHance (Gd-HP-DO3A), l'Omniscan (Gd-DTPA-BMA), l'OptiMARK (Gd-DTPA-BMEA), et le MultiHance (Gd-BOPTA).⁹ Il existe

également un produit commercialisé à base de chélate de manganèse, le Teslascan (Mn-DPDP). Celui-ci a surtout été utilisé pour l'imagerie du foie.¹⁰

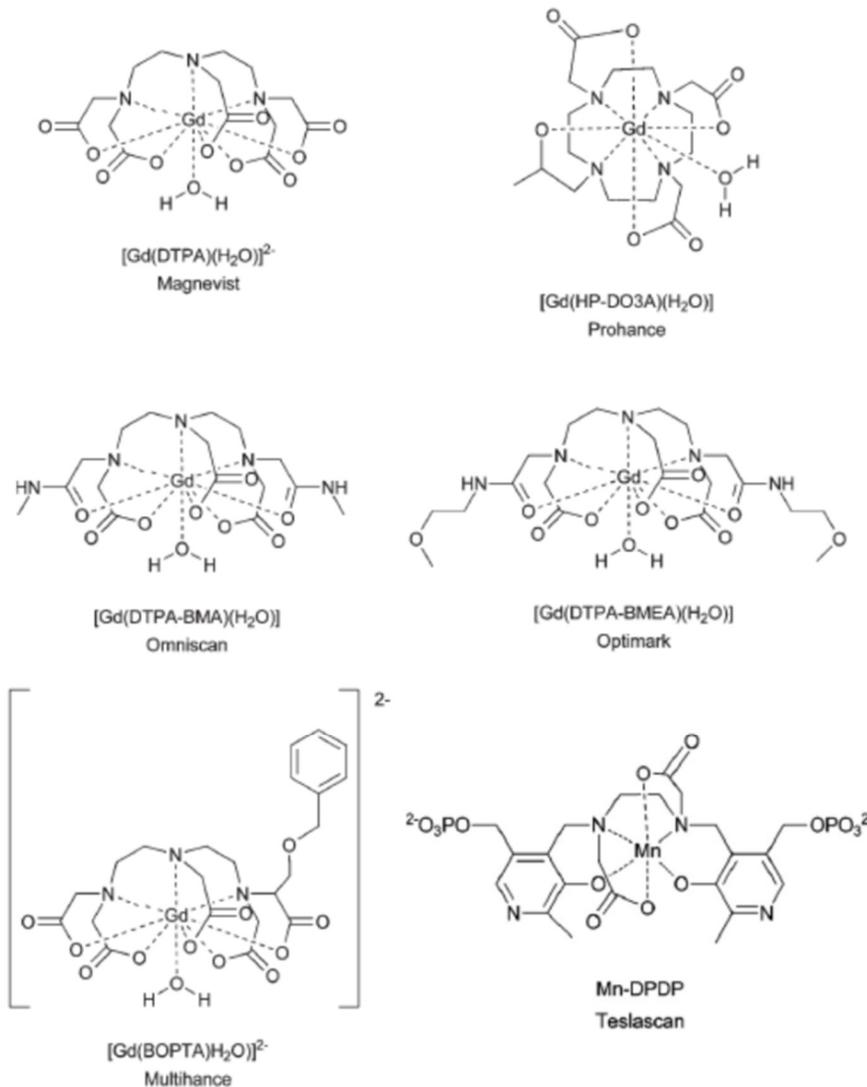


Figure 2.10. Structures chimiques d'agents de contraste commerciaux.

(Source :¹¹)

Le rôle du chélate est très important puisqu'il réduit la toxicité du gadolinium et du manganèse. En effet, sous leur forme ionique ces éléments peuvent causer de graves dommages à l'organisme (par ex. : fibrose systémique néphrogène dans le cas du Gd^{3+}).⁹ Il est donc essentiel que l'ion paramagnétique soit solidement lié à l'agent chélateur pour éviter une libération dans l'organisme. D'ailleurs, le fait que de fortes concentrations (> 0.1 mM) de produit soient requises pour obtenir un bon effet de contraste augmente aussi significativement le risque de toxicité.^{9,12} Les chélate de gadolinium ont toutefois l'avantage d'être rapidement excrétés par la voie rénale, ce qui limite les

risques liés à une éventuelle décomplexation des ions dans le corps. Une autre limitation importante de ces agents de contraste est le fait que très peu de chélates de gadolinium sont internalisés et retenus par les cellules.¹³ Ces produits ne sont donc pas adaptés pour le marquage cellulaire.

La Figure 2.11 présente les différents effets engendrés par les pondérations T_1 , T_2 et lorsqu'il y a présence d'un agent de contraste positif.

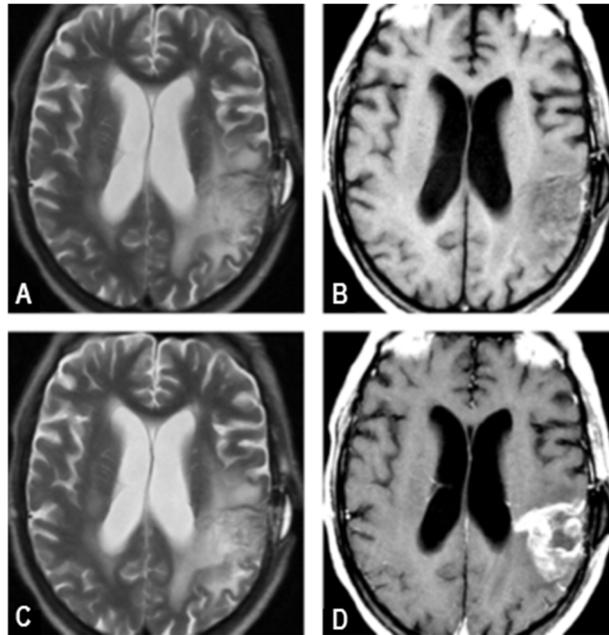


Figure 2.11. Images IRM d'un cerveau humain en pondération T_1 (B-D) et T_2 (A-C) ainsi qu'après l'injection d'un agent de contraste positif.

(Source :¹⁰)

Les images A et B de la figure 2.11 correspondent respectivement à une pondération T_2 et T_1 avant injection intraveineuse de l'agent de contraste (ProHance). Les images C et D ont quant à elles été acquises après injection. On voit clairement sur l'image D le rehaussement du contraste créée par les chélates de gadolinium à l'endroit où se trouve un glioblastome.

Agents de contraste négatifs

Brièvement, les principaux agents de contraste négatifs utilisés en clinique et en recherche sont les particules superparamagnétiques d'oxyde de fer (*SPIO* et *USPIO*). Elles induisent des inhomogénéités dans le champ magnétique qui accélèrent le déphasage des protons ^1H . Ceci a pour effet de diminuer le temps de relaxation transverse (T_2) et générer une perte de signal. Sur les images IRM pondérées en T_2 , la région contenant le produit de contraste apparaît plus foncée.

2.1.3.2. Relaxivités

L'efficacité des agents de contraste à accélérer la relaxation des protons est quantifiée au moyen des valeurs de relaxivités longitudinale (r_1) et transverse (r_2). Pour les agents paramagnétiques, ces valeurs sont directement liées aux temps de relaxation (T_1 et T_2) par l'équation suivante ¹⁴ :

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i [Gd] \text{ où } i = 1, 2 \quad (2.4)$$

Le taux de relaxation observé ($1/T_{i,obs}$) correspond à l'inverse du temps de relaxation, et résulte de l'addition d'un terme diamagnétique ($1/T_{i,d}$) et d'un terme paramagnétique ($1/T_{i,p}$). Le premier terme représente le taux de relaxation intrinsèque des protons du solvant, et le deuxième celui induit par la présence de l'espèce paramagnétique. Selon l'équation 2.4, cette dernière contribution s'exprime en fonction de la relaxivité (r_i) et de la concentration de l'élément paramagnétique dans le solvant. Les relaxivités sont exprimées en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et permettent d'évaluer le potentiel des produits de contraste. En effet, plus un agent diminue efficacement les temps de relaxation, plus les relaxivités sont élevées. Par le biais du rapport r_2/r_1 , il est aussi possible de comparer entre eux les différents agents et de distinguer le type de contraste qu'ils produisent. Un ratio r_2/r_1 près de l'unité est associé à un agent de contraste positif, alors qu'un r_2/r_1 élevé (> 5) correspond à un agent de contraste négatif. D'ailleurs, les chélates de gadolinium possèdent un r_2/r_1 près de 1, mais ont des valeurs de relaxivités plus faibles que celles de macromolécules de rayon dynamique plus élevé, contenant plusieurs ions paramagnétiques. L'efficacité des chélates simples n'est pas la plus élevée des agents de contraste pour l'IRM.

2.1.4. Tomographie par émission de positons

La TEP est une modalité d'imagerie nucléaire servant à imager des processus biologiques fonctionnels (par ex. : l'activité métabolique et le flux sanguin). Elle nécessite l'injection d'un radiotracer et se base sur la détection des photons émis suite à une désintégration radioactive par émission de positons. Historiquement, le développement de l'imagerie TEP est intimement lié à la production des isotopes radioactifs de courte demi-vie. L'arrivée des cyclotrons au cours des années 1930 a permis la production de radio-isotopes émetteurs de positons tels que le carbone-11, l'azote-13, l'oxygène-15 et le fluor-18. L'idée d'utiliser ces radio-isotopes comme traceurs biologiques s'est ensuite peu à peu imposée. Ce n'est toutefois qu'au début des années 1950 que le concept d'imagerie par émission de positons a réellement été développé. L'évolution de la technologie s'est poursuivie au cours des trois décennies suivantes avec l'arrivée de détecteurs plus performants et

l'utilisation de la tomographie pour la reconstruction des images. Ensuite, grâce à l'implantation de réseaux de distribution de radio-isotopes dans les années 1990, l'imagerie TEP a pu véritablement faire son entrée dans le domaine clinique. D'autres avancées technologiques ont ensuite permis le développement des premiers imageurs combinant à la fois la TEP et la tomodensitométrie (TDM). Aujourd'hui, l'avenir de la TEP tend vers la multimodalité, tel que la TEP/IRM. Quelques appareils sont actuellement commercialisés, mais il faudra attendre encore quelques années avant de pouvoir utiliser couramment cette nouvelle technologie en clinique.

La TEP est surtout utilisée en clinique pour faire de l'imagerie fonctionnelle du cerveau, du cœur et des tumeurs cancéreuses. Contrairement à l'IRM, elle fournit de l'information sur les mécanismes physiologiques plutôt que sur la structure anatomique. On retrouve parmi les principaux avantages de la TEP son excellente sensibilité de détection. Ceci signifie qu'elle peut détecter une très faible quantité d'un radio-isotope émetteur de positons. Cela est très utile pour détecter une petite quantité de cellules marquées (par ex. : une tumeur cancéreuse). La TEP est également une méthode quantitative puisqu'il est possible de mesurer l'activité accumulée dans un organe ou dans une tumeur. De plus, elle permet d'imager le corps en entier en 2-D et 3-D, en plus de pouvoir faire des coupes selon les trois plans axiaux.

2.1.4.1. Principes nucléaires et imagerie

À la base de l'imagerie TEP, on retrouve les éléments radioactifs émetteurs de positons. La désintégration par émission de positons se caractérise par un excès de protons dans le noyau de l'atome. Pour atteindre un état stable, le noyau se désintègre en convertissant un proton en neutron et en émettant un positon (β^+) et un neutrino (ν).



Le positon correspond à l'antiparticule de l'électron, c'est-à-dire qu'il possède la même masse mais sa charge est opposée.

Suite à son émission, le positon parcourt une certaine distance dans la matière, durant laquelle il perd toute son énergie cinétique. Il interagit alors avec un électron du milieu, entraînant une réaction d'annihilation qui provoque l'émission de deux photons gamma de 511 keV projetés dans des directions opposées (180°).

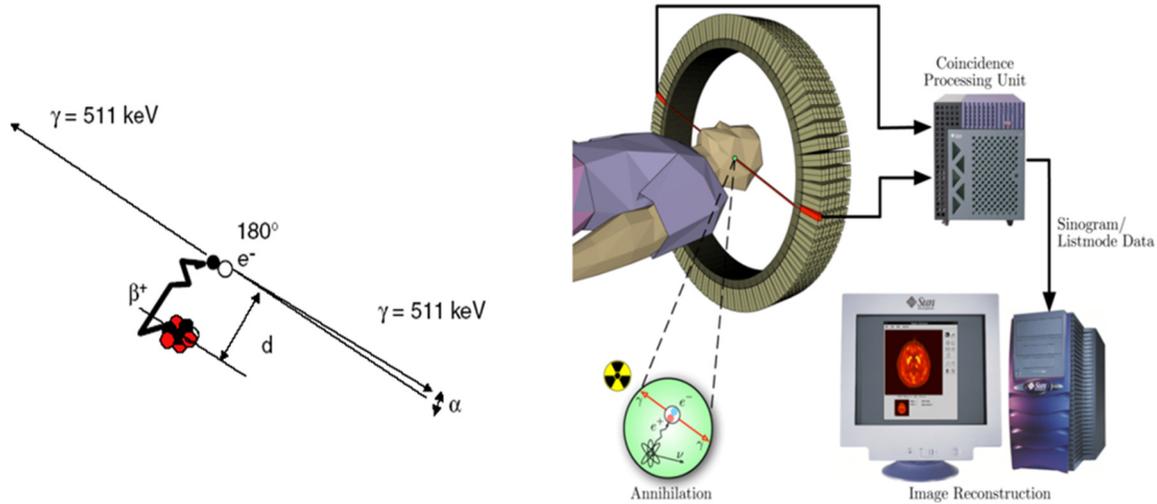


Figure 2.12. Représentation schématique de la désintégration par émission de positons (à gauche) et du processus d’acquisition des images TEP (à droite).

(Sources : ¹⁵, http://en.wikipedia.org/wiki/Positron_emission_tomography)

La détection simultanée des deux photons permet alors de faire une projection du lieu d’annihilation. Pour ce faire, l’imageur TEP est composé d’une série de détecteurs positionnés en cercle autour du patient. Le rôle de ceux-ci est alors de déterminer l’énergie des photons gamma incidents et le moment de leur détection. Les détecteurs sont constitués d’un cristal scintillateur (par ex. : le germanate de bismuth (BGO) ou l’orthosilicate de gadolinium (GSO)) qui émet de la lumière visible (photons de scintillation) suite à une interaction avec le photon gamma incident. Un photomultiplicateur convertit les photons de scintillation en signal électrique et l’amplifie. Ce signal est ensuite traité pour obtenir une mesure de l’énergie du photon gamma incident.

Le circuit électronique de détection discrimine les évènements selon une fenêtre en énergie (~511 keV) et une fenêtre temporelle (6 à 15 ns) afin d’enregistrer uniquement les coïncidences vraies, c’est-à-dire celles correspondant à la détection de deux photons de 511 keV provenant de la même annihilation. Le traitement des données permet par la suite d’établir des lignes de réponse entre les détecteurs ayant mesuré des photons en coïncidence. La position de la ligne de réponse est notée en coordonnées polaires et sauvegardée dans le système informatique. L’ensemble des lignes de réponse est enregistré sous la forme d’un sinogramme. Celui-ci correspond à une matrice dont la valeur de chaque pixel équivaut à la somme des coïncidences survenues sur une ligne de réponse particulière. Finalement, la reconstitution tomographique de l’image est effectuée à partir des données du sinogramme et grâce aux algorithmes de reconstruction. L’image obtenue correspond alors à la distribution du traceur radioactif dans l’organisme.

Lors de la détection des deux photons gamma de 511 keV par la caméra TEP, le lieu de l'annihilation est déterminé, mais pas celui de l'émission du positon. La distance entre ces deux sites dépend de l'énergie d'émission du positon et varie d'un évènement à l'autre. Elle peut toutefois être caractérisée par un libre parcours moyen. Le fait que le lieu d'émission ne soit pas exactement le même que celui de l'annihilation a pour conséquence de réduire la résolution spatiale. De plus, un défaut de colinéarité entre les deux photons peut apparaître lorsque le positon n'a pas complètement perdu son énergie cinétique au moment de l'annihilation. Un angle de l'ordre de 0.5° peut se former entre les deux photons. Ce phénomène constitue une autre limitation intrinsèque de la résolution spatiale de la TEP.

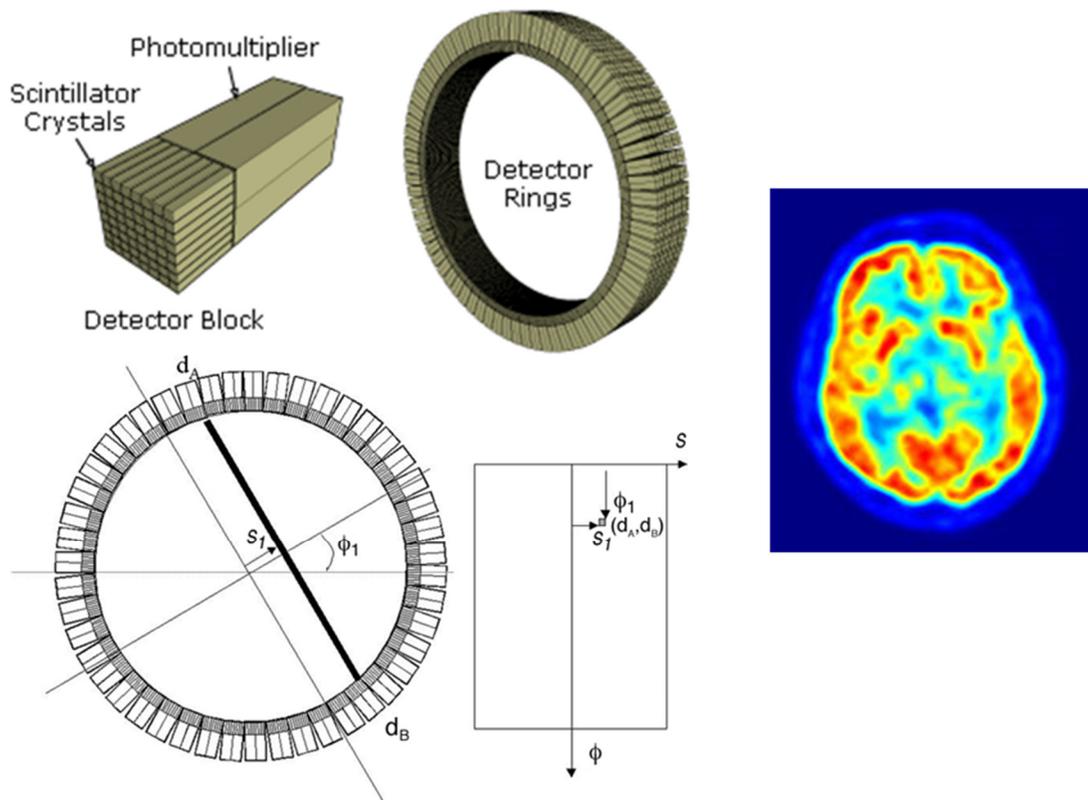


Figure 2.13. Schémas des détecteurs composant l'imageur TEP et représentations d'une ligne de réponse et d'un sinogramme (en bas à gauche). À droite, une image TEP du cerveau humain. Les zones rouges correspondent aux endroits où s'accumule le radiotracer (^{18}F -FDG).

(Sources : ¹⁵, http://en.wikipedia.org/wiki/Positron_emission_tomography)

2.1.4.2. Les radiotraceurs pour la TEP

Le développement de la chimie radiopharmaceutique a eu une importance majeure dans l'essor de l'imagerie TEP. Il existe actuellement sur le marché quelques composés à base de différents radio-isotopes, chacun ayant une particularité lui permettant de cibler un processus moléculaire. Ils

sont synthétisés selon une procédure bien établie, qui consiste à produire le radio-isotope, effectuer la conjugaison avec la molécule pharmaceutique, et procéder à la purification par chromatographie en phase liquide à haute performance.¹⁶ Il est important que tout ce mode opératoire soit réalisé dans le plus court laps de temps possible, car les radio-isotopes actuellement utilisés en clinique se désintègrent rapidement. En effet, l'une des plus importantes caractéristiques des radio-isotopes est leur temps de demi-vie ($t_{1/2}$). Il s'agit du temps nécessaire pour que la moitié des noyaux radioactifs se soient désintégrés. La demi-vie est reliée à l'activité radioactive (nombre de désintégrations par seconde) par l'équation de désintégration :

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} \quad (2.6)$$

A_t : Activité au temps t

A_0 : Activité initiale

λ : Constante de désintégration: $\ln(2)/t_{1/2}$

t : Temps

Le temps de demi-vie est un paramètre très important à prendre en considération dans la procédure des examens TEP, car l'activité radioactive injectée au patient doit être précisément rapportée à l'heure de l'injection. Le Tableau 2.3 regroupe les principaux radio-isotopes utilisés en clinique pour la TEP.

Tableau 2.3. Caractéristiques des principaux radio-isotopes utilisés en clinique

Radio-isotopes	Symbole	Temps de demi-vie	Énergie (β^+ max)	Mode de production	Utilisation
Carbone-11	^{11}C	20.4 min	0.97 MeV	Cyclotron	Oncologie
Azote-13	^{13}N	10 min	1.2 MeV	Cyclotron	Cardiologie
Oxygène-15	^{15}O	2 min	1.74 MeV	Cyclotron	Neurologie
Fluor-18	^{18}F	110 min	0.64 MeV	Cyclotron	Oncologie
Rubidium-82	^{82}Rb	75 sec	3.15 MeV	Générateur	Cardiologie

(Sources :^{17, 18})

Le radio-isotope le plus communément utilisé en imagerie clinique est le fluor-18. On le retrouve sous la forme du fluorodéoxyglucose (^{18}F -FDG), un analogue fluoré du glucose. Le ^{18}F -FDG est présentement utilisé dans plus de 80 % des examens cliniques de TEP.⁷ Ceci est largement dû au fait que les cellules cancéreuses métabolisent rapidement le déoxyglucose (et y concentrent les produits de dégradation). Dans l'organisme, il est pris en charge par les cellules qui consomment d'importantes quantités de glucose, comme dans le cerveau, le cœur et les tumeurs cancéreuses. C'est l'activité métabolique du glucose dans ces tissus qui est par la suite imagée lors de l'examen TEP.

Contrairement aux autres radio-isotopes utilisés en clinique (par ex. : ^{15}O , ^{11}C , ^{13}N), la demi-vie du ^{18}F est un peu plus longue (110 minutes). Le ^{18}F -FDG peut donc être distribué dans les centres hospitaliers disposant uniquement d'un imageur TEP (sans cyclotron adjacent aux installations).

Dans le cadre de cette maîtrise, le fluor-18 n'a pas été retenu comme radio-isotope, car sa demi-vie était trop courte pour la durée des protocoles de marquage et de purification des nanoparticules. Une activité initiale très élevée aurait été requise pour parvenir à faire une étude de biodistribution sur 48 h. Pour ces raisons, il était nécessaire de se tourner vers un radio-isotope non traditionnel pour l'imagerie TEP, soit le cuivre-64 (^{64}Cu).

2.1.4.3. Le cuivre-64 (^{64}Cu) comme radiotraceur pour la TEP

Le Tableau 2.4 résume les principales propriétés du ^{18}F et du ^{64}Cu . Cette comparaison permet de démontrer que le ^{64}Cu possède des caractéristiques aussi intéressantes pour l'imagerie TEP que le ^{18}F .

Tableau 2.4. Caractéristiques physiques du ^{18}F et du ^{64}Cu

	^{18}F	^{64}Cu
Temps de demi-vie	110 min	12.7 h
Énergie (β^+ max)	0.64 MeV	0.65 MeV
Énergie (β^+ moy)	0.25 MeV	0.28 MeV
Énergie (γ)	511 keV	511 keV
Libre parcours moyen dans l'eau	0.6 mm	0.56 mm
Mode de production	Cyclotron	Cyclotron
Rapport d'embranchement	β^+ : 97% CE: 3%	β^+ : 17.4 % β^- : 39 % CE : 43.6%
Produits de la désintégration	$^{18}_8\text{O}$	$^{64}_{28}\text{Ni}$ (β^+ , CE) $^{64}_{30}\text{Zn}$ (β^-)

(Sources :^{19, 15, 20}, <https://ehs.ucsd.edu/rad/radionuclide/Cu-64.pdf>)

Les données du tableau démontrent que le ^{18}F et le ^{64}Cu émettent sensiblement les positons et les photons gamma aux mêmes énergies. Pour ce qui est du libre parcours moyen, les valeurs entre les deux radio-isotopes sont aussi très proches. Ceci signifie que leur perte de résolution spatiale est du même ordre. Les grandes différences entre les deux éléments se situent plutôt au niveau de leur temps de demi-vie et de leur rapport d'embranchement. La demi-vie du ^{64}Cu étant près de 7 fois plus longue que celle du ^{18}F . Cependant, le ^{18}F a l'avantage d'avoir un rapport d'embranchement pour l'émission d'un positon de 97 %, ce qui est largement supérieur à celui du ^{64}Cu (17.4 %). Cette

valeur implique que le ^{18}F a une plus grande probabilité de se désintégrer par émission de positons que le ^{64}Cu , et donc que, pour chaque désintégration, le ^{64}Cu a 5 fois moins de chance de générer un positon. Ce taux de production de positons largement inférieur au ^{18}F doit être pris en compte pour la planification des études de biodistribution des nanoparticules.

Dans le cadre de ce projet, un des aspects les plus importants liés au choix du ^{64}Cu est son affinité avec l'agent chélateur (DTPA) greffé à la surface des nanoparticules de silice mésoporeuses. En effet, il est important que le Gd^{3+} et le $^{64}\text{Cu}^{2+}$ n'entrent pas en compétition lors du marquage. C'est-à-dire que le Gd^{3+} prend la place du $^{64}\text{Cu}^{2+}$ à l'intérieur du chélate. Les nanoparticules ne seraient alors plus détectables en TEP. Pour le vérifier, il faut se référer aux constantes de stabilité ($\log K_s$) du Cu et du Gd avec le DTPA. Les deux constantes étant très près l'une de l'autre ($\text{Cu} = 21.38$; $\text{Gd} = 22.46$)²¹, le risque de compétition entre les ions entraînant une déchélation est donc presque nul.

À partir des données présentées dans cette section, on peut conclure que le ^{64}Cu possède certaines caractéristiques similaires au ^{18}F , mais que grâce à son temps de demi-vie beaucoup plus long, il est plus adapté à l'imagerie de processus métaboliques ou diffusionnels dans l'organisme qui s'étendent sur plusieurs heures ou plusieurs jours.

2.1.4.4. Principes de radioprotection liés à l'utilisation du ^{64}Cu

L'utilisation de radio-isotopes complexifie grandement les manipulations des suspensions de nanoparticules. Les conditions de travail sont plus difficiles, car elles sont restreintes par le temps, l'espace et les risques liés à la manipulation du produit. Ceci exige d'adapter les moyens de radioprotection habituels (blindage, temps et distance) aux manipulations.

Premièrement, les manipulations sont effectuées dans une hotte plombée. Le blindage constitue une barrière physique de protection entre la source et l'utilisateur. Dans le cadre de nos expériences, l'utilisation de briques de plomb de 5 cm d'épaisseur permet d'atténuer suffisamment la radiation pour réduire les risques liés à l'exposition.²² Le blindage est ajouté à la structure de la hotte de synthèse, qui elle, est renforcée pour soutenir cette masse. Une vitre composée de verre plombé protège l'utilisateur et lui permet de voir ce qu'il manipule.

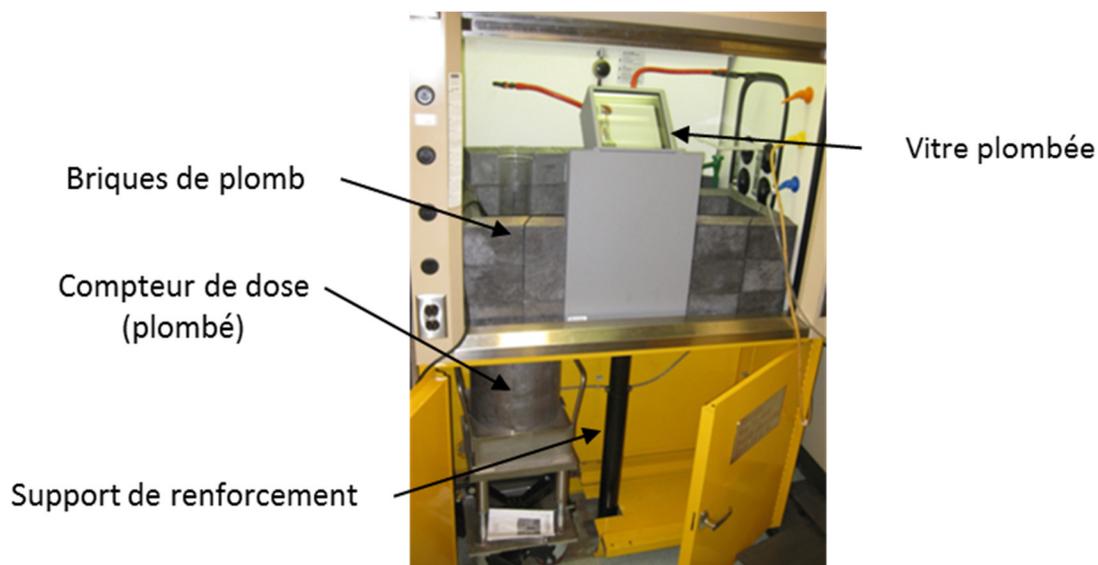


Figure 2.14. Hotte plombée pour les synthèses radioactives.

Deuxièmement, les manipulations doivent être exécutées rapidement pour minimiser le temps d'exposition de l'utilisateur aux radiations. Plus on s'expose longtemps aux radiations plus la dose absorbée est importante. Il faut donc travailler rapidement, mais sans faire d'erreur. Une des solutions est de répéter les manipulations à froid (sans radioactivité). Lorsque l'utilisateur est à l'aise avec les différentes étapes du protocole, ceci limite les manœuvres inutilement risquées. Ainsi, l'entraînement permet d'optimiser et de réduire la durée des manipulations, et du temps d'exposition.

Troisièmement, la distance est le moyen le plus efficace et économique de se prémunir des radiations. Pour une source ponctuelle, le débit de dose est inversement proportionnel au carré de la distance entre la source et l'utilisateur. Ceci implique que chaque fois que la distance entre la source et l'utilisateur est doublée, la dose est divisée d'un facteur 4. Dans le cadre d'une expérience de marquage qui dure plusieurs heures, les périodes de temps mort se passent à l'extérieur du laboratoire de radioactivité. Par ailleurs, des supports et de longues pinces peuvent être utilisés afin d'éviter de prendre trop longtemps dans ses mains les échantillons contenant du ^{64}Cu .

Finalement, le dernier aspect relié à la radioprotection consiste à gérer les déchets radioactifs. La méthode de gestion employée au laboratoire consiste à laisser décroître l'activité des déchets jusqu'à ce qu'ils aient atteint la limite réglementaire. Les déchets solides sont conservés pendant cette période dans la hotte plombée, tandis que les déchets liquides sont confinés dans un sarcophage de plomb (épaisseur de 5 cm). L'autorisation interne émise par le CHU de Québec nous

autorise à rejeter les déchets et les solutions synthétisées contenant du ^{64}Cu 21 jours après la date de réception de la fiole mère.

2.2. Purification des nanoparticules par chromatographie d'exclusion stérique

L'une des étapes les plus cruciales dans la préparation d'une suspension de nanoparticules est la technique de purification. Celle-ci est essentielle pour éliminer les sels de gadolinium (Gd^{3+}) et de cuivre radioactif ($^{64}\text{Cu}^{2+}$) qui n'ont pas été chélatés. La purification est abordée en détail dans cette section, car une problématique émanant de l'utilisation simultanée du gadolinium et du cuivre radioactif a nécessité l'application d'une technique peu utilisée pour la purification de nanoparticules : la chromatographie d'exclusion stérique.

Le temps de demi-vie des émetteurs de positons du ^{64}Cu (12.7 h) et la concentration importante d'ions de gadolinium non complexés dans la suspension sont à l'origine du choix de cette technique. Ceci implique que les suspensions de nanoparticules doivent être purifiées de façon efficace, et ce, dans un laps de temps relativement court.

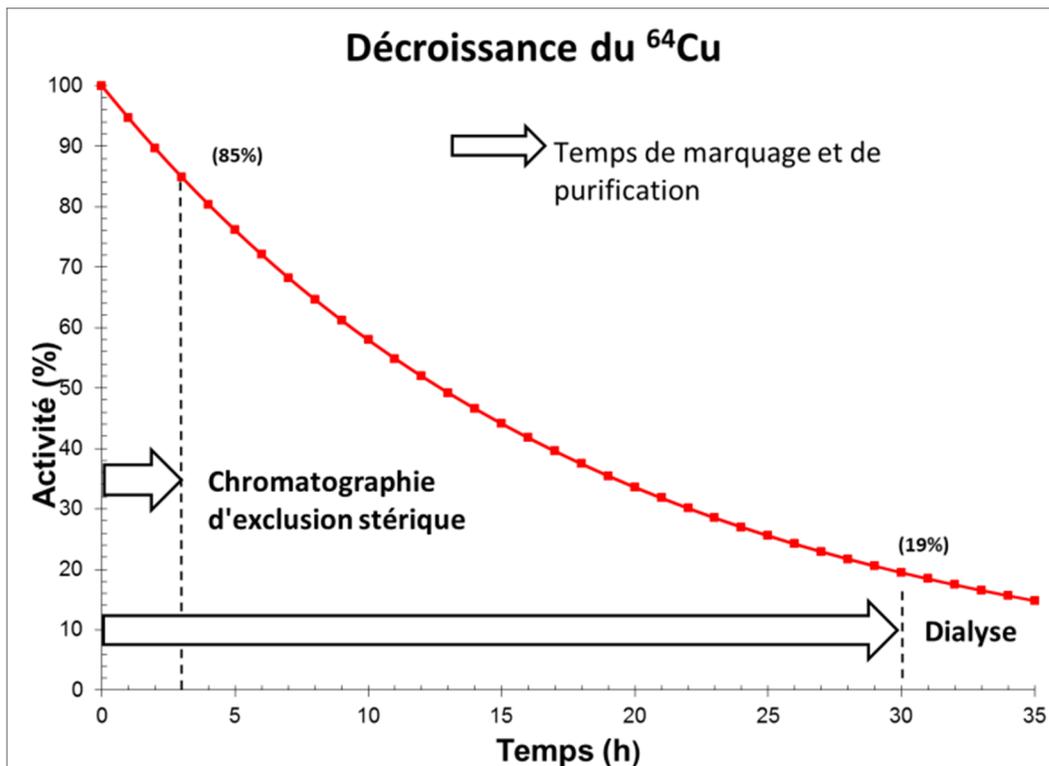


Figure 2.15. Décroissance de l'activité du ^{64}Cu au cours du temps et comparaison entre la durée de la chromatographie d'exclusion stérique et la durée d'une dialyse.

2.2.1. Choix de la chromatographie d'exclusion stérique parmi les autres méthodes de purification de nanoparticules

De façon générale, les techniques habituelles de purification utilisées en chimie sont très bien adaptées pour les suspensions de nanoparticules. Ainsi, parmi les autres techniques susceptibles de purifier les nanoparticules, on retrouve :

- La dialyse
- La centrifugation

Toutefois, avant de procéder à la sélection de la méthode de purification, il est nécessaire d'établir une liste de critères qui répondent aux exigences particulières que nécessite l'utilisation de matière radioactive. La sélection de cette nouvelle méthode repose donc sur des critères très précis :

- Rapidité et efficacité
- Simplicité d'utilisation
- Peu de déchets générés (les déchets radioactifs nécessitent un lieu d'entreposage)
- Compacité du montage expérimental
- Conformité avec les règles de radioprotection

La section suivante présente donc les deux méthodes de purification mentionnées plus haut et justifie le choix de la chromatographie d'exclusion stérique.

Dialyse

La méthode de purification la plus couramment utilisée pour la purification des nanoparticules est la dialyse. Elle repose sur le principe de diffusion des ions à travers une membrane semi-perméable. La suspension de nanoparticules à purifier est contenue dans une membrane permettant la sortie des ions vers l'extérieur, mais en retenant les nanoparticules à l'intérieur. La différence de concentration des ions des deux côtés de la membrane induit un gradient de concentration qui force les ions à rétablir l'équilibre. Lorsque cet équilibre est atteint, un changement du solvant est effectué afin de poursuivre la purification. En répétant les changements d'eau, les ions sont alors complètement éliminés de la suspension de nanoparticules. Pour augmenter l'efficacité de la dialyse, un rapport de 1 : 1000 entre le volume de la suspension et le solvant doit être maintenu. La durée complète d'une dialyse est généralement de 28 h. Les changements d'eau sont effectués toutes les 2 heures pendant les 8 premières heures puis à 24 h et 26 h. Il est évident qu'une aussi longue dialyse n'est pas envisageable pour une synthèse radioactive. D'autre part, en réduisant la

durée de la dialyse on limite alors son efficacité de purification. De plus, les changements d'eau fréquents deviennent un problème majeur puisque l'eau de dialyse est radioactive et doit être entreposée pour la durée de la décroissance. Ainsi, dans le cadre de synthèses radioactives, il est essentiel de remplacer la dialyse par une nouvelle méthode de purification beaucoup plus rapide et produisant peu de déchets liquides.

Centrifugation

À première vue, la centrifugation peut sembler une bonne solution pour la purification de nanoparticules. Elle est simple, efficace et peu coûteuse. Le principe repose sur la séparation des sels et des nanoparticules par la force centrifuge. Les ions étant de trop faible taille, ils demeurent en suspension dans le surnageant alors que les nanoparticules forment un culot. En effectuant plusieurs cycles de rinçages, on parvient à les éliminer complètement. L'un des désavantages majeurs de cette technique est la tendance qu'ont parfois les nanoparticules à s'agglomérer après plusieurs centrifugations. Leur remise en suspension est toujours plus difficile par la suite. De plus, en raison des nombreux cycles de rinçages, la centrifugation demande plus de temps que la chromatographie d'exclusion stérique. Finalement, la dernière raison pour laquelle la centrifugation n'a pas été retenue est qu'elle demande des dispositions plus complexes lors de synthèses radioactives. En effet, l'utilisation d'une centrifugeuse avec un produit radioactif implique des mesures supplémentaires pour la radioprotection des installations.

Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique s'est révélée être le meilleur choix pour accomplir cette purification, car cette dernière comporte de nombreux avantages :

- Rapidité et efficacité
- Simplicité d'utilisation
- Reproductibilité
- Réutilisation
- Peu de déchets générés
- Compacité du montage expérimental

Bien qu'il existe d'autres types de chromatographies (par échange d'ions, par affinité, en phase inverse, par hydrophobicité), l'exclusion stérique reste la solution la plus simple, car elle ne requiert pas d'interaction chimique entre les nanoparticules et la matrice de gel dans laquelle s'effectue la purification. De plus, il s'agit de la seule technique de chromatographie permettant d'éliminer les

ions en grande quantité en une seule étape. Étant donné la nature de nos suspensions de nanoparticules, seule la chromatographie d'exclusion stérique pouvait s'appliquer. Elle constitue la méthode la plus rapide pour la purification des nanoparticules de silice mésoporeuses.

Tableau 2.5. Comparaisons des méthodes de purification selon les principaux critères de sélection liés à l'utilisation de matière radioactive

Méthodes de purification	Rapide	Génère peu de déchets	Compacité du montage expérimental	Conforme aux règles de radioprotection
Dialyse	---	---	+++	++
Centrifugation	+	+++	---	---
Chromatographie d'exclusion stérique	+++	+++	+++	+++

2.2.2. *État de l'art sur l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique comme moyen de purification de nanoparticules*

L'application la plus fréquente de la chromatographie d'exclusion stérique en nanotechnologie consiste surtout à séparer des nanoparticules d'or en fonction de leurs différences de tailles et de leur forme.²³⁻²⁶ De cette façon, elle permet d'étudier les propriétés physico-chimiques dépendantes de la taille des particules sans devoir procéder systématiquement à une analyse par microscopie électronique à transmission (MET).^{23,27} La purification par chromatographie d'exclusion stérique a quant à elle surtout été développée dans le cadre de recherches sur les points quantiques (nanocristaux de semi-conducteurs).²⁸⁻³¹ Ces études ont été motivées par la nécessité de purifier plus efficacement les points quantiques d'impuretés susceptibles d'interférer dans certaines applications. Par exemple, Shen et al. ont démontré qu'il était possible de purifier efficacement des points quantiques (CdSe) de l'excès de ligands et d'impuretés présentes en solution.²⁸ La présence de ces contaminants étant responsable d'altérer la surface de réaction des points quantiques.

Plus récemment, plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur le développement de nanoparticules pour l'imagerie bimodale IRM/TEP, avec comme radiotracteur, le ⁶⁴Cu. La majorité de ces travaux se font à partir de nanoparticules d'oxyde de fer.³²⁻³⁶ La stratégie employée dans ces études consiste à synthétiser d'abord les nanoparticules d'oxyde de fer, de les purifier (par dialyse ou centrifugation), de fonctionnaliser leur surface à l'aide d'un agent de chélation et finalement de les marquer avec le ⁶⁴Cu.³²⁻³⁶ Le fait de purifier les nanoparticules d'oxyde de fer en premier permet d'éliminer tous les ions de fer résiduels de la suspension. Il ne reste ensuite qu'à éliminer les ions de

^{64}Cu , mais puisqu'ils sont en très faible concentration (de l'ordre du nanomolaire), une simple colonne commerciale PD-10 (GE Healthcare) est suffisante pour assurer la purification par chromatographie d'exclusion stérique.

Dans le cadre de ce projet, l'utilisation de ce type de colonne n'était pas envisageable étant donné la stratégie de co-marquage du ^{64}Cu et du Gd. En effet, le ^{64}Cu est ajouté en premier pour favoriser au maximum sa chélation, puis les ions de Gd^{3+} sont ajoutés pour saturer les sites de chélation restants. Puisque ces derniers sont en très grande quantité (de l'ordre du millimolaire) le développement d'une procédure avec une colonne de plus grande capacité de chargement était nécessaire afin d'assurer une purification efficace des particules.

2.2.3. Principes théoriques de la chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique est réalisée à partir d'une colonne en verre remplie d'un gel composé de sphères poreuses.^{37,38} Le principe de séparation repose sur le fait que les nanoparticules ne pénètrent pas à l'intérieur des pores des sphères. Elles descendent directement le long de la colonne. Les ions eux diffusent complètement dans le gel, ce qui les retarde par rapport aux particules.^{37,38} Il est alors possible de voir une séparation très nette entre les nanoparticules et les ions (Figure 2.16).

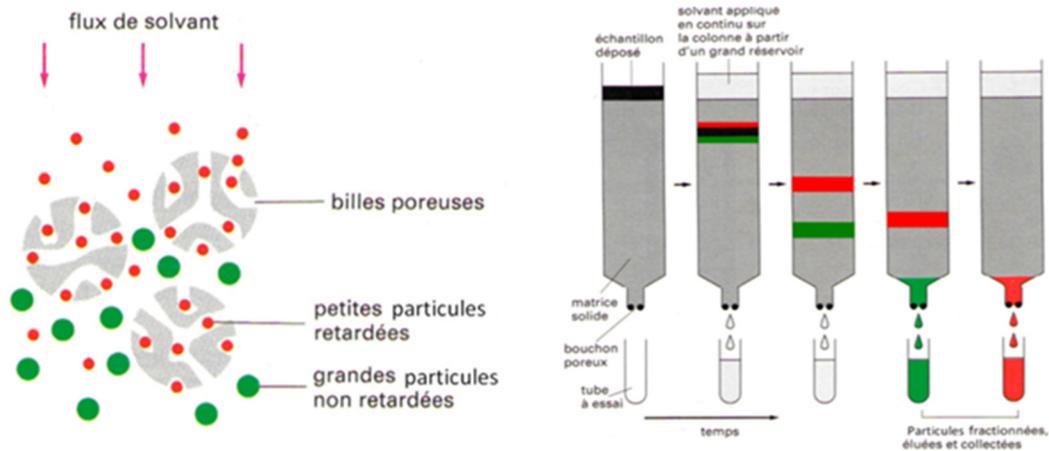


Figure 2.16. Représentations schématiques du principe de purification par chromatographie d'exclusion stérique.

(Source : ³⁹)

Généralement, un détecteur UV-visible est positionné à la sortie de la colonne et permet de tracer le profil d'élution des espèces contenues dans l'échantillon (Figure 2.17).

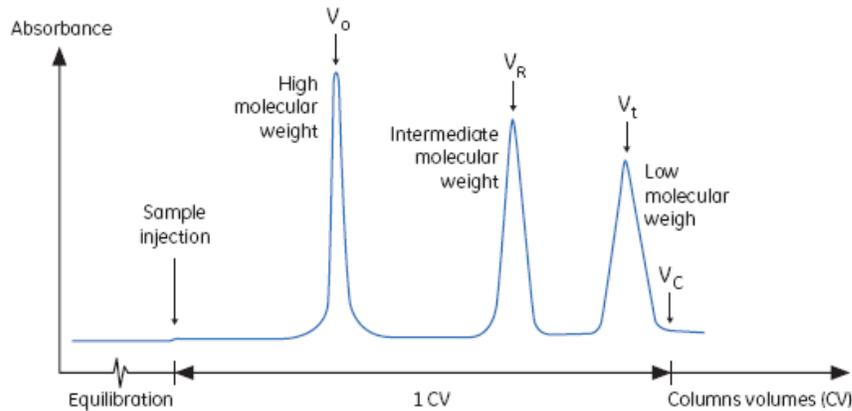


Figure 2.17. Profil d'élution théorique d'une purification par chromatographie d'exclusion stérique.

(Source :⁴⁰)

Afin que la chromatographie soit efficace, il faut une séparation complète entre les différentes espèces composant l'échantillon. On détermine la séparation selon deux principaux critères; la résolution et l'efficacité.^{37,38,41,42} La résolution est définie comme étant la capacité à établir une distance de séparation nette entre deux composantes alors que l'efficacité correspond plutôt à la capacité de produire des pics étroits et symétriques. L'évaluation de ces paramètres est effectuée à partir des données expérimentales et d'équations théoriques, et permet de démontrer la réussite de la purification des nanoparticules par chromatographie d'exclusion stérique.

Résolution

Une séparation totale est caractérisée par un facteur de résolution (R_s) entre 1 et 1.5. Ces valeurs sont établies en prenant en considération 2 courbes gaussiennes séparées respectivement à 97 % et 99 % (données établies par une table statistique, où $w_{b1,2} = 4\sigma$ et $V_{R2} - V_{R1} = 6\sigma$).⁴¹ Cela signifie qu'uniquement 3% et 1% des aires sous les courbes sont en contact (Figure 2.18). La résolution est calculée par l'équation suivante⁴¹ :

$$R_s = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})} \quad R_s = 1 \text{ à } 1.5 \quad (2.6)$$

V_R : Volume de rétention (mL)

w_b : Largeur des pics à la base (mL)

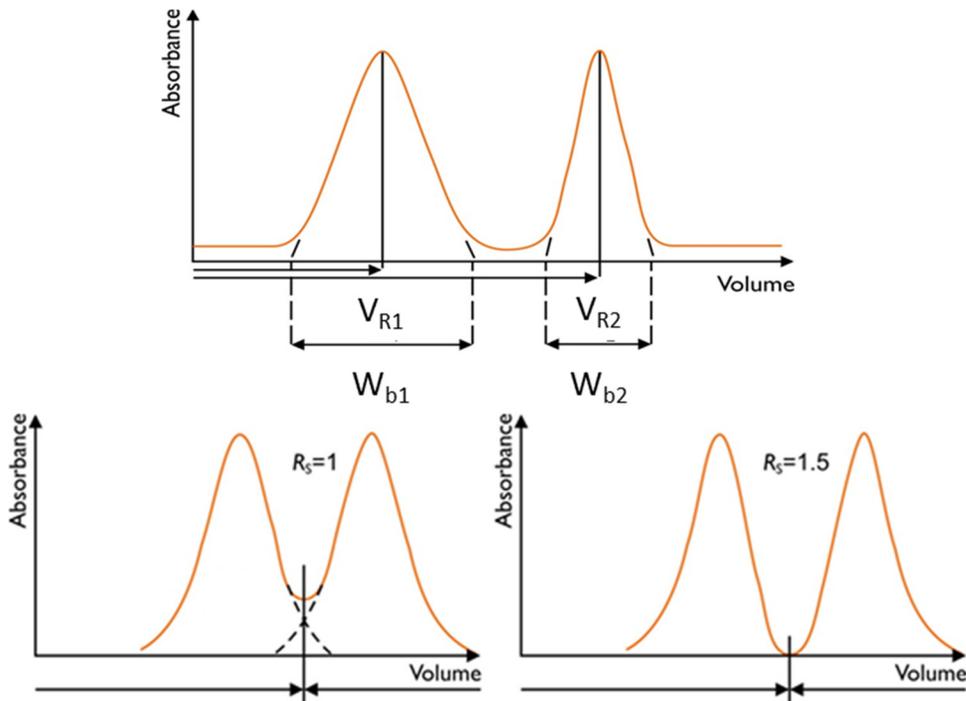


Figure 2.18. Représentations graphiques de la résolution de deux pics d'éluion.

(Source : http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/practical_biochemistry/ch06.html#d0e4174)

Dispersion

La dispersion est induite lors du passage de l'échantillon dans le gel et provoque une dilution de l'échantillon. Cet effet de dilution peut influencer la purification dans la mesure où la séparation complète entre les espèces n'est plus assurée (effet de chevauchement entre deux espèces). Il est intéressant de prévoir théoriquement la dispersion de l'échantillon de nanoparticules. La comparaison entre la valeur expérimentale et la valeur théorique de la dispersion est une bonne indication du comportement des nanoparticules à l'intérieur de la colonne. La dispersion est définie selon l'équation suivante ³⁷ :

$$w_b = 4(V_t) \left(\frac{2d_p}{L} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.7)$$

w_b : Largeur du pic à la base (mL)

V_t : Volume total de liquide de la colonne (mL)

d_p : Taille des sphères de la matrice (m)

L : Longueur de la colonne (m)

Il est important de noter que cette équation s'applique seulement pour les éléments qui ne diffusent pas à l'intérieur des sphères poreuses du gel.

Efficacité

L'efficacité dépend de beaucoup de facteurs; l'uniformité de la compaction du gel, les dimensions de la colonne, la vitesse d'élution, la taille des sphères composant le gel et le volume de l'échantillon.^{43,44} Elle est caractérisée selon des plateaux théoriques⁴² :

$$N = 5.54 \left(\frac{V_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (2.8)$$

V_R : Volume de rétention (mL)

$w_{1/2}$: Largeur des pics à mi-hauteur (mL)

Plus le nombre de plateaux théoriques est élevé, meilleure est l'efficacité.⁴² Une colonne est considérée comme efficace lorsqu'elle possède 30 000 plateaux par mètre (pic très étroit).⁴²

La symétrie du pic est quant à elle déterminée par l'équation suivante³⁷ :

$$A_s = b/a \quad (2.9)$$

a: Première moitié de la largeur du pic à 10% de hauteur

b: Deuxième moitié de la largeur du pic à 10 % de hauteur

Pour avoir une bonne symétrie le facteur A_s doit être près de 1.³⁷

2.2.4. Sélection de la matrice de gel

La sélection du gel pour la chromatographie d'exclusion stérique dépend de l'objectif de la purification. Celui-ci peut consister à séparer des particules de tailles variables ou à éliminer des sels résiduels. Ainsi, on distingue deux modes d'utilisation basés sur la différence de taille entre les espèces à séparer.^{37,38,45}

- Séparation de groupe : lorsque la différence de taille est supérieure d'un facteur 10 (ex : élimination des ions).
- Séparation de fractionnement : lorsque cette différence est d'un facteur de 2 à 5.

Plusieurs types de gel sont actuellement disponibles commercialement pour la chromatographie d'exclusion stérique (Superdex, Superose, Sephacryl et Sephadex). Ils se distinguent les uns des autres par leur composition chimique et leur limite d'exclusion. Le Sephadex est particulièrement recommandé pour les changements d'éluant (*buffer exchange*) et l'élimination des ions (*desalting*).^{38,45} Les autres gels sont conçus pour la séparation de haute résolution (séparation de fractionnement). Cela signifie qu'ils sont en mesure de séparer plusieurs composantes de différentes

tailles.^{37,38} Pour les besoins de ce projet, le Sephadex était donc le gel tout indiqué pour accomplir la purification des nanoparticules de silice mésoporeuses.

2.2.4.1. Choix du gel Sephadex G-25 ‘coarse’

Le Sephadex est principalement formé de chaînes de dextran réticulées. Son nom provient de l’acronyme : **S**eparation **P**harmacia **d**extran.⁴¹ Le dextran est un polysaccharide composé de glucose. Lorsqu’il est mélangé à de l’épichlorohydrine, il y a formation de réticulations ce qui permet d’obtenir le Sephadex.⁴⁶ La taille des sphères et la limite d’exclusion varient en fonction du degré de réticulation du dextran.³⁸ Ainsi, on retrouve du Sephadex G-10, G-15, G-25, G-50, G-75 et G-100 catégorisés par la taille de leurs pores. De plus, les catégories G-25 et G-50 possèdent un qualificatif qui repose sur la taille des sphères qui compose le gel (*superfine, fine, médium et coarse*). Il existe aussi une autre catégorie de Sephadex, le LH 20 qui est utilisé dans le cadre d’expériences nécessitant des solvants organiques.

Puisque les limites d’exclusion varient en fonction des catégories de gel, il est essentiel d’estimer d’abord les tailles des éléments que l’on désire séparer. Le principe de séparation repose sur le fait que les nanoparticules sont exclues des pores du gel alors que les ions pénètrent à l’intérieur. Les limites d’exclusion des gels sont définies en termes de poids moléculaire et il n’existe pas de conversion directe entre le poids moléculaire et la taille de particules. L’approximation la plus simple que l’on peut établir pour les nanoparticules est de considérer une protéine sphérique. Par exemple, en sachant que le Sephadex G-25 exclut les protéines globulaires de poids moléculaire de 5000 Da (voir Tableau 2.6), il est possible d’estimer le rayon hydrodynamique de viscosité de celle-ci par le calcul suivant⁴¹:

$$R_H \approx 0.81M^{1/3} \quad (2.10)$$

M:Poids moléculaire (Da)

Le rayon hydrodynamique est calculé à partir du volume hydrodynamique de viscosité et se base sur les données de viscosités intrinsèques des protéines globulaires.

Tableau 2.6. Caractéristiques physiques des différentes catégories de gels de Sephadex

TECHNICAL SPECIFICATIONS							
Medium	Working pH range	Particle size range wet bead (μm)	Bed vol. (ml/g) in distilled water	Fractionation Range (M_r): dextrans (Da)	Fractionation Range (M_r): globular proteins (Da)	Max. flow rate (ml/min)	Max. oper. pressure (bar)
Sephadex™ G-10	2-13	55-165	2-3	$< 7 \times 10^2$	$< 7 \times 10^2$	D	D
Sephadex™ G-15	2-13	60-180	2.5-3.5	$< 1.5 \times 10^3$	$< 1.5 \times 10^3$	D	D
Sephadex™ G-25 Coarse	2-13	170-520	4-6	1×10^2 - 5×10^3	1×10^3 - 5×10^3	D	D
Fine		35-140					
Medium		85-260					
Superfine		17-70					
Sephadex™ G-50 Coarse	2-10	200-610	9-11	5×10^2 - 1×10^4	1.5×10^3 - 3×10^4	D	D
Fine		40-160					
Medium		100-300					
Superfine		20-80					
Sephadex™ G-75	2-10	90-280	12-15	1×10^3 - 5×10^4	3×10^3 - 8×10^4	D	0.15

D. The beads behave as rigid spheres obeying Darcy's Law.

(Source: http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/TT%3AInstructions+fo%28233561730-C534%29?OpenDocument&hometitle=tech_support_service)

Le Tableau 2.7 indique les limites d'exclusion des gels de Sephadex selon le poids moléculaire et leur conversion en termes de diamètre hydrodynamique de viscosité.

Tableau 2.7. Limites d'exclusion des différents gels de Sephadex

Sephadex	Limites d'exclusion (Da)	Diamètre hydrodynamique de viscosité (nm)*
G-10	700	1.4
G-15	1500	2.3
G-25	5000	2.8
G-50	30 000	5.0
G-75	80 000	7.0

(Source: http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/TT%3AInstructions+fo%28233561730-C534%29?OpenDocument&hometitle=tech_support_service)
 *($R_H \approx 0.81M^{1/3}$)⁴¹

De ce fait, le diamètre de viscosité permet d'effectuer la comparaison avec les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules. Dans le cadre de ce projet, les nanoparticules de silice mésoporeuses ont un diamètre hydrodynamique d'environ 250 nm. Ainsi, selon cette

approximation, les nanoparticules sont exclues de toutes les matrices des gels. Pour faire la sélection du gel, il est donc nécessaire de se référer à la littérature. Dans le cas présent, le choix s'est porté sur le Sephadex G-25, car il s'agit du gel le plus documenté et le plus communément utilisé pour éliminer les sels.^{37,38,43}

Plusieurs études dans la littérature des 50 dernières années démontrent l'efficacité du Sephadex G-25 à éliminer les ions de suspension de macromolécules. Parmi les études de référence, on retrouve celle de Flodin et al. qui démontre la purification de l'hémoglobine d'une solution de NaCl (Figure 2.19).⁴⁷ L'expérience a été réalisée sur une colonne de 4 cm de diamètre et remplie avec 85 cm de gel de Sephadex G-25. Dix (10) mL de solution contenant 100 mg d'hémoglobine et 100 mg de NaCl ont été introduits sur la colonne (vitesse d'élution : 240 mL/h, éluant : non défini). On peut voir sur la Figure 2.19 que la purification est réussie puisque les deux composantes sont complètement séparées. L'hémoglobine a un volume d'élution d'environ ~375 mL alors que les ions Na⁺ et Cl⁻ commencent à être élués à 900 mL.

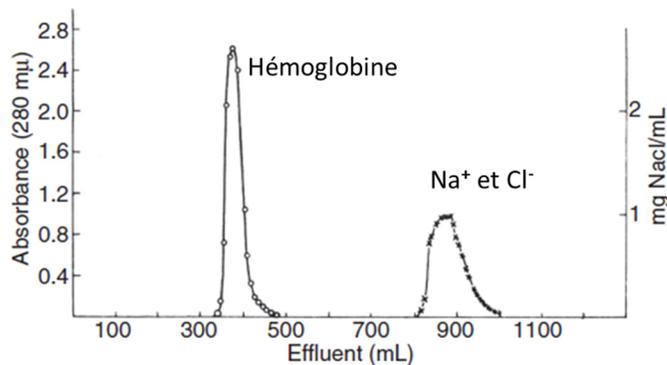


Figure 2.19. Exemple de purification de l'hémoglobine des ions de Na⁺ et Cl⁻ par chromatographie d'exclusion stérique (gel : Sephadex G-25).

(Source:⁴¹)

Maintenant que la sélection du gel est établie, il reste à choisir la catégorie de la taille des sphères formant le gel (*superfine, fine, medium* et *coarse*). Il s'agit d'une caractéristique importante puisqu'elle influence la dispersion de l'échantillon dans le gel, la vitesse d'élution et la productivité. C'est donc en fonction des paramètres privilégiés par l'expérimentateur que s'effectue ce choix.

Sephadex G-25	Dry particle diameter (μm)	Mean wet particle diameter (μm)	Maximum recommended fluid velocity (cm/h), L=15 cm
Superfine	20-50	52	50
Fine	20-80	88	65
Medium	50-150	140	100
Coarse	100-300	320	200

Figure 2.20. Taille des sphères composant les gels de Sephadex G-25.

(Source :⁴⁵)

Dispersion de l'échantillon dans le gel

Parmi les causes de la dispersion des nanoparticules dans la colonne, on retrouve la taille des sphères composant le Sephadex G-25. En effet, de petites sphères hydratées de moins de $100\ \mu\text{m}$ (Figure 2.20) ont un effet de dispersion moindre que celles de $300\ \mu\text{m}$ (voir équation 2.7).^{37,41,43} La raison est que les sphères de petite taille remplissent plus efficacement et de façon plus uniforme la colonne (Figure 2.21). Le gel étant plus compacté, le volume de la phase mobile (éluant) est réduit, ce qui diminue la dilution de l'échantillon.^{41,48}

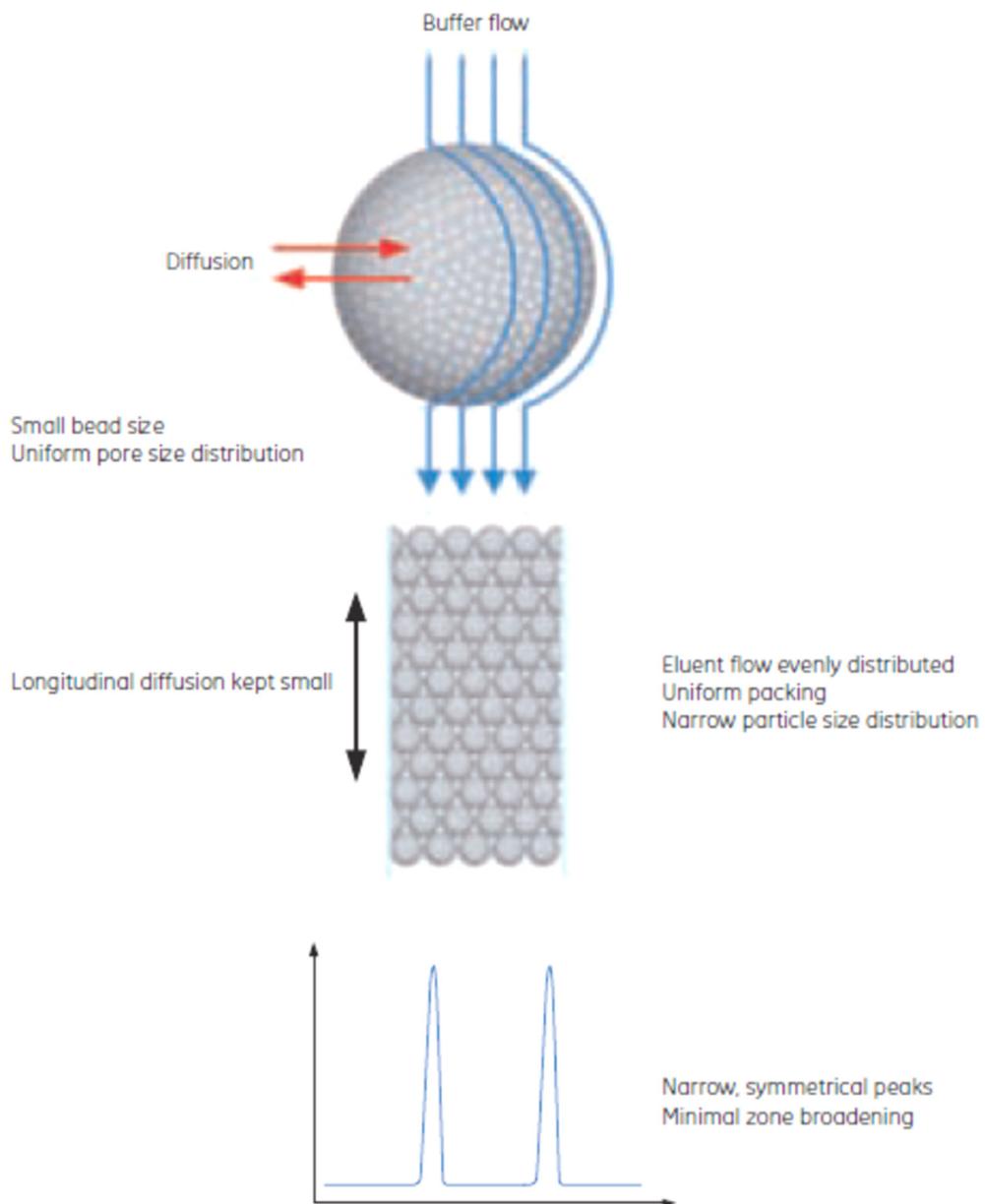


Figure 2.21. Représentation schématique de l'effet de la taille des sphères sur la dispersion.

(Source :⁴³)

Vitesse d'élution

La pression exercée sur le gel par la vitesse d'élution est un facteur très important. Le passage du produit à grande vitesse dans les minuscules canaux formés entre les sphères de petite taille induit de la friction et augmente la pression sur les sphères.^{41,45,49} En conséquence, le gel peut commencer à se compacter.^{41,45,49} L'avantage des gels constitués de sphères de grande taille est qu'il est possible d'atteindre un plus grand débit, car leur rigidité est supérieure aux gels constitués de sphères de petite taille. Ainsi, pour une purification rapide, il est préférable d'utiliser un gel comme le Sephadex G-25 *coarse*, capable de soutenir une élution à haut débit.

Productivité

La productivité de la purification s'exprime par la quantité du produit purifié par unité de temps en fonction de la hauteur de la colonne.⁴⁵ La quantité purifiée dépend de la concentration et du volume de l'échantillon, ainsi que du rendement. Le rendement pour la purification des ions est très élevé et peut atteindre près de 100 %.⁴⁵ La Figure 2.22 présente la productivité maximale théorique pour la purification de protéines en fonction des différents types de gels Sephadex G-25 et selon la hauteur de la colonne. La productivité a été déterminée en combinant le volume maximal d'échantillon qu'il est possible de déposer sur la colonne et le débit d'élution.

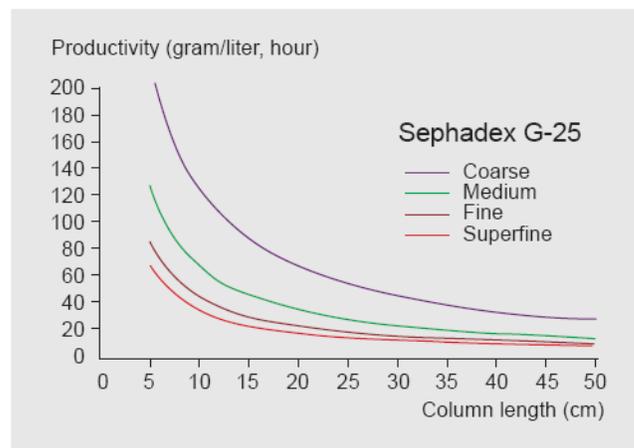


Figure 2.22. Productivité théorique des gels de Sephadex G-25.

(Source :⁴⁵)

Par cette analyse, on remarque que la meilleure efficacité de purification est obtenue par le Sephadex G-25 *coarse* et que celle-ci diminue en fonction de la hauteur de la colonne. Ceci implique qu'il est préférable d'utiliser des petites colonnes, mais avec un diamètre beaucoup plus large.

Pour la purification des suspensions de nanoparticules MSNs, le Sephadex G-25 *coarse* a été sélectionné en raison d'un meilleur taux d'efficacité de purification (Figure 2.22). Il est aussi possible de faire l'élution à haut débit (5 mL/min) sans risquer une compaction du gel. Cet aspect n'est pas négligeable puisqu'il réduit sensiblement la durée de la purification. Ces deux paramètres ont ainsi été favorisés par rapport à l'effet de dispersion induit par la taille des sphères. Enfin, les études tirées de la littérature démontrent bien que le Sephadex G-25 *coarse* est le gel par excellence pour éliminer rapidement les ions contenus dans une suspension.

2.2.5. Conditions de réussite de la purification par chromatographie d'exclusion stérique

Afin d'assurer une bonne purification, il est nécessaire de respecter plusieurs paramètres d'opération. L'optimisation de ces derniers demande beaucoup de travail, mais est essentielle à la réussite de la chromatographie.

2.2.5.1. Dimensions de la colonne

Les dimensions de la colonne sont des paramètres très importants puisqu'ils permettent d'améliorer la résolution et d'augmenter le volume de l'échantillon à purifier. Pour accroître la résolution entre les différentes espèces contenues dans l'échantillon, il suffit d'augmenter la hauteur de la colonne. En effet, doubler la hauteur de gel augmente la résolution d'un facteur $\sqrt{2}$.³⁸ Une colonne plus grande implique forcément une quantité de gel plus importante. Ceci permet aux sels de diffuser davantage dans le gel, ce qui favorise la séparation. Ainsi, pour une meilleure séparation il est préférable d'avoir une longue colonne. Par contre, le désavantage est qu'elle augmente le temps d'élution et le volume de dilution de l'échantillon. D'autre part, l'intérêt d'utiliser une colonne avec un plus grand diamètre est qu'elle permet de purifier un plus grand volume en maintenant la même résolution.

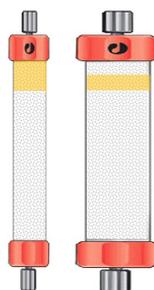


Figure 2.23. Représentation de l'effet de l'augmentation du diamètre de la colonne sur la suspension de nanoparticules.

2.2.5.2. Concentration de la suspension de nanoparticules

Il est important qu'il y ait suffisamment de nanoparticules dans l'échantillon passé en chromatographie pour obtenir un bon signal de détection. Dans ce projet-ci, chaque fraction éluée a été mesurée en relaxation du proton d'hydrogène pour détecter la présence d'éléments paramagnétiques (ions de Gd^{3+} et nanoparticules MSNs marquées de Gd^{3+}). L'effet de dilution occasionné par la dispersion de l'échantillon dans le gel nécessite que l'échantillon initial ait une concentration minimale de nanoparticules. En fait, si l'échantillon n'est pas suffisamment concentré dès le départ, la dilution induite peut faire disparaître toute trace des nanoparticules. Il est alors impossible d'obtenir un profil d'élution convenable. D'autre part, une concentration trop élevée en ions ou en nanoparticules peut également nuire à la séparation en surchargeant le gel, entraînant un colmatage du réseau poreux.

2.2.5.3. Volume de l'échantillon

Le volume d'échantillon déposé sur la colonne influence la séparation (résolution) entre les nanoparticules et les ions. La dispersion dans la colonne est évidemment plus importante pour un grand volume que pour un petit volume (Figure 2.24). Cette dispersion se répercute sur le profil d'élution par un élargissement des pics, ce qui implique que la séparation entre les espèces est moins grande. Pour obtenir la meilleure résolution, il est donc recommandé d'utiliser un volume d'échantillon correspondant entre 0.5 % et 4 % du volume total de la colonne.⁴⁰

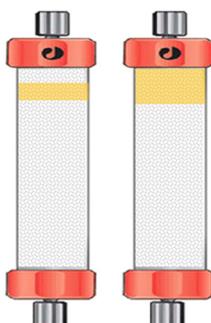


Figure 2.24. Représentation de l'effet du volume de la suspension de nanoparticules dans la colonne.

2.2.5.4. Nature et concentration de l'éluant

L'éluant sert à éviter les interactions ioniques non spécifiques avec la matrice et favorise la répulsion stérique entre les nanoparticules. Typiquement, l'éluant est une solution dont la nature (pH, force ionique) est compatible avec les particules, c'est-à-dire que l'éluant ne doit pas affecter

la forme ou la nature des particules. Dans ce projet, il sert également à changer la salinité de la suspension de nanoparticules. À la sortie de la colonne, les nanoparticules se trouvent dans une suspension concentrée à 154 mM de NaCl, qui correspond à la concentration d'un milieu physiologique.

2.2.5.5. Vitesse d'élution

Deux phénomènes sont reliés à la vitesse d'élution. D'abord, si l'élution est trop rapide, les ions sont entraînés trop rapidement et n'ont pas le temps de pénétrer complètement dans les fines porosités du gel. La séparation entre les espèces en est alors affectée. Dans le cas d'une élution trop lente, la séparation est également moins efficace, car les espèces ont tendance à trop diffuser. Ceci provoque un phénomène de chevauchement entre les particules et les ions.⁴⁰ Il est important de contrôler la vitesse d'élution par une pompe péristaltique permettant un débit constant et optimal.

2.3. Utilisation des nanoparticules de silice mésoporeuses comme vecteur pour la livraison de médicaments et le marquage cellulaire

Les matériaux à base de silice mésoporeuse ont été développés à partir des années 1990.⁵⁰⁻⁵⁴ Parmi les applications générales des silices mésoporeuses on retrouve la catalyse, la chromatographie et le tri moléculaire par adsorption.^{55,56} Depuis quelques années déjà ces matériaux de silice ont été développés sous forme de nanoparticules mésoporeuses et proposés comme agents de livraison de médicaments.⁵⁷⁻⁶⁹ Les nanoparticules de silice mésoporeuses possèdent de nombreuses caractéristiques physico-chimiques les avantageant par rapport aux systèmes de livraison de médicaments basés sur des polymères. Elles se distinguent par leur biocompatibilité, leur résistance mécanique, leur stabilité chimique et leur résistance aux attaques microbiennes.⁵⁹ Les MSNs sont aussi caractérisées par un diamètre variant de 50 à 300 nm, une distribution de taille pratiquement monodisperse, un grand volume poreux (0.6-1 cm³/g) et une grande surface spécifique (>1000 m²/g) permettant le greffage de molécules fonctionnelles (les groupements silanols permettent la fonctionnalisation des surfaces interne et externe). Toutes ces propriétés favorisent le chargement d'une grande quantité d'agents thérapeutiques et font en sorte que les MSNs sont parmi les matériaux les plus prometteurs pour la livraison de médicaments.

Actuellement, les principales nanoparticules utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie cellulaire sont les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (*SPIO* et *USPIO*). Bien que celles-ci soient efficacement internalisées et retenues par les cellules, elles ont certaines limitations qui restreignent leur utilisation pour le marquage cellulaire : impossibilité de corrélérer la concentration en fer et l'effet de contraste négatif produit, perte d'informations anatomiques en

raison d'artefacts d'image (à forte concentration) et difficulté à distinguer le signal engendré par les particules de celui du bruit de fond.^{70,71} Ainsi, le développement des MSNs comme agent de contraste positif offre une nouvelle alternative à l'imagerie cellulaire.

À l'heure actuelle, il existe quelques publications sur l'utilisation de nanoparticules de silice mésoporeuses paramagnétiques pour la visualisation de cellules par imagerie médicale.^{65,72-76} Deux modèles de nanoparticules ont été étudiés jusqu'à maintenant; le premier est composé de MSNs fonctionnalisées avec un agent chélateur et du gadolinium, alors que le second est composé de MSNs directement dopées avec du gadolinium ou du manganèse. Dans les deux cas, les études ont démontré que les particules sont toujours internalisées par les cellules et induisent un effet de contraste. De plus, la prolifération et la viabilité sont peu affectées par la présence des particules. Afin d'évaluer l'effet de contraste *in vivo*, Hsiao et al. ont effectué une implantation de cellules marquées de Gd-Dye@MSNs dans le cerveau d'une souris.⁷² Après 14 jours, un rehaussement de signal était toujours détectable au site de l'injection. Le fait que les cellules soient toujours visibles après une aussi longue période de temps démontre une très grande efficacité de marquage.

2.4. Études cellulaires *in vivo* (cellules P388)

Afin de démontrer le potentiel des nanoparticules comme agent de contraste pour l'imagerie cellulaire, des expériences *in vivo* doivent être conduites. Celles-ci servent à étudier le contraste produit en IRM par les particules ingérées, mais aussi à évaluer leur cytotoxicité et leur impact sur la prolifération cellulaire.

L'étude a d'abord porté sur le marquage cellulaire avec les nanoparticules Mn-M48SNs. Pour ce faire, les cellules P388 ont été utilisées. Il s'agit de cellules leucémiques provenant d'un modèle murin.⁷⁷ Celles-ci sont utilisées depuis près de 60 ans par l'évaluation d'agents anticancéreux et dans l'étude de la résistance croisée.⁷⁷ D'ailleurs, le fait que les particules Mn-M48SNs puissent éventuellement contenir des molécules médicamenteuses justifie l'intérêt d'utiliser dès maintenant ce modèle. En tant que macrophage, les cellules P388 sont phagocytaires, c'est-à-dire qu'elles ingèrent et dégradent les débris cellulaires, les pathogènes et les particules étrangères à l'organisme. Elles sont donc prédisposées à internaliser les nanoparticules Mn-M48SNs. Par ailleurs, il a été démontré que les macrophages P388 ont tendance à s'accumuler dans les tumeurs cérébrales.⁷⁸ On peut alors imaginer l'utilisation des macrophages pour transporter des particules chargées d'agents thérapeutiques jusqu'à ces tumeurs.^{79,80} Ainsi, les cellules P388 représentent une lignée cellulaire intéressante pour évaluer le potentiel des nanoparticules Mn-M48SNs comme marqueur cellulaire, mais aussi comme modèle de vectorisation pour la livraison ciblée de médicaments.

2.5. Études de biodistribution des MSNs

Avant que les nanoparticules de silice mésoporeuses soient approuvées pour l'utilisation chez l'humain, il est nécessaire d'étudier plusieurs aspects de cette technologie. Parmi les informations cruciales à obtenir, la dégradabilité des particules dans le corps humain, la biodistribution des produits lorsqu'ils sont injectés de façon intraveineuse (ou gastro-intestinale), et leur cinétique d'élimination sont autant de points cruciaux nécessaires à une meilleure compréhension du réel potentiel de ces produits.

2.5.1. Études par quantification élémentaire

Quelques études de biodistribution des nanoparticules de silice mésoporeuses ont été réalisées par quantification élémentaire.^{66,68,69,81,82} La procédure consiste à injecter aux souris les nanoparticules, puis à faire une analyse de la teneur en silice (Si) contenue dans leurs organes (dissection et digestion des organes après euthanasie). L'analyse élémentaire est effectuée par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) ou par spectrométrie d'émission optique (ICP-OES/AES). Ces études de biodistribution *ex vivo* demandent par contre beaucoup de temps à réaliser et l'utilisation d'un nombre important d'animaux (en effet il est impossible d'utiliser le même animal comme son propre contrôle). De plus, l'importante variabilité des conditions dans lesquelles ces études sont réalisées fait en sorte qu'il est difficile de comparer les résultats. Par exemple, Lu et al. ont démontré que les nanoparticules MSNs (100-130 nm de diamètre, 50mg/kg) n'étaient que faiblement prises en charge par le foie et la rate⁶⁶, alors que Souris et al. ont montré qu'une forte proportion de celles-ci (50-100 nm, 16 mg/kg) était présente dans le foie 10 minutes après l'injection.⁸¹ L'imagerie biomédicale, soit par utilisation de fluorescence, de marquage magnétique (imagerie par résonance magnétique) ou par marquage aux radio-isotopes (tomographie par émission de positons) est beaucoup plus appropriée pour permettre une évaluation précise, et en temps réel, de la biodistribution des nanoparticules, tout en utilisant l'animal comme son propre contrôle.

2.5.2. Études par imagerie de fluorescence

L'imagerie par fluorescence est basée sur la propriété qu'ont certaines molécules à émettre de la lumière suite une excitation par des photons de plus haute énergie. L'image obtenue est formée par la lumière émise par les fluorophores greffés aux nanoparticules. Dans une étude récente, Meng et al. ont imagé par fluorescence la biodistribution au cours du temps de particules MSNs (50 nm de diamètre) revêtues respectivement avec du polyéthylène glycol (PEG) et du PEG-polyéthylène

imine (PEI).⁸³ Cependant, les données obtenues n'étant pas quantitatives, les auteurs ont procédé à l'extraction des organes et ont mesuré l'intensité de la fluorescence de chacun. Les résultats ont démontré qu'au moins 20 % des nanoparticules se trouvent toujours dans le foie 72 h après l'injection. Les autres organes (rate, poumon, rein et le sang) en contiennent quant à eux moins de 5 %. Une autre étude *ex vivo* a également permis d'effectuer la quantification de la distribution de MSNs et de PEG-MSNs (80 nm de diamètre).⁸⁴ L'intensité de la fluorescence a aussi été mesurée suite à l'extraction des organes. Les résultats démontrent que le foie et la rate sont les principaux organes contenant les nanoparticules, et ce, 24 h après l'injection. Les deux études présentent des résultats similaires, indiquant que les nanoparticules sont séquestrées dans le foie. Toutefois, le manque de standardisation de la méthode empêche de comparer les valeurs obtenues. Celles de la deuxième expérience étant exprimées en µg/mg d'organe plutôt qu'en pourcentage de dose injectée.

En résumé, l'imagerie par fluorescence permet de voir une certaine distribution des MSNs, mais demeure une méthode invasive, puisqu'il est nécessaire d'extraire les organes des animaux pour obtenir des données quantitatives.

2.5.3. Études par imagerie IRM

Il n'existe encore que très peu d'études d'IRM *in vivo* réalisées avec les MSNs.⁸⁵⁻⁸⁷ La principale raison est que l'IRM exige une grande concentration locale de nanoparticules. La répartition de celles-ci dans les organes tels que le foie, la rate ou les reins dilue le signal IRM, ce qui ne produit pas d'effet de contraste. L'IRM est plutôt utilisée pour visualiser le rehaussement du signal vasculaire et l'excrétion par la voie rénale.⁸⁵⁻⁸⁷ Il est possible d'observer un effet de contraste très important dans la vessie suite à l'excrétion par les reins de chélates de gadolinium s'étant détachés de la surface des nanoparticules.⁸⁷ Ces derniers sont rapidement filtrés par les reins (en moins de 15 minutes) et s'accumulent au cours du temps dans la vessie (Figure 2.25). Il s'agit également d'un très bon moyen pour évaluer la dégradation des nanoparticules puisque les fragments de très faible taille se retrouveront aussi dans la vessie. Ces études n'ont pas permis de quantifier la distribution des nanoparticules, mais elles ont démontré que l'IRM pouvait être utilisée pour faire le suivi du rehaussement sanguin et de l'excrétion rénale de façon systématique et non invasive sur un même animal. Dans le cadre de l'étude présentée au chapitre 6 (article 2), l'IRM a précisément été utilisée pour suivre ces deux paramètres (rétention vasculaire des MSNs et excrétion rénale).

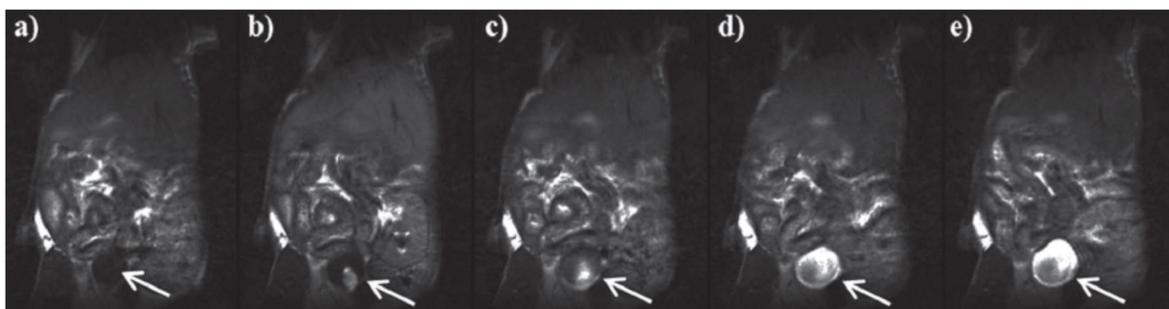


Figure 2.25. Images IRM d'une souris injectée par voie intraveineuse avec des particules marquées avec du Gd^{3+} (PEG-Gd-MSN). Les images correspondent à différents points dans le temps : avant injection (a), 5 min (b), 15 min (c), 30 min (d), and 45 min (e). Un rehaussement du contraste dans la vessie est visible après seulement 15 minutes. Celui-ci est dû au détachement des chélates de Gd puis à leur excrétion par la voie rénale.

(Source :⁸⁷)

2.5.4. Études par imagerie TEP

Les études de biodistribution des MSNs basées sur l'imagerie TEP sont encore peu nombreuses dans la littérature. Une première étude par Chen et al. a démontré que des particules MSNs (80 nm de diamètre) revêtues de PEG et marquées par du ^{64}Cu (^{64}Cu -NOTA- $mSiO_2$ -PEG) se retrouvent dans le foie (16 % DI/g) 30 minutes après l'injection.⁸⁸ Pour confirmer ces résultats, une étude de biodistribution *ex vivo* (prélèvement des organes et mesures de leur activité) a été réalisée 5 heures après l'injection. Encore une fois, la majorité des particules MSNs se trouvent dans le foie (19 % DI/g) alors que les autres principaux organes (rate, reins, poumons, cœur, intestins) en contiennent moins de 10 % DI/g. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans l'étude de Miller et al. dans laquelle des particules MSNs (180 nm de diamètre) ont été marquées avec du zirconium radioactif (^{89}Zr -DFO-MSN).⁸⁹ Les images TEP ont montré la présence de particules dans le foie, la rate et le cœur. Cependant, aucune valeur quantitative n'a été extraite de ces images. Une biodistribution *ex vivo* a été réalisée, permettant de démontrer que les particules se retrouvent majoritairement dans le foie (49.3 % DI/g) et la rate (45.4 % DI/g) 1 h après l'injection.

2.5.5. Études par imagerie TEP couplée IRM

À l'heure actuelle, un seul modèle de nanoparticules de silice mésoporeuses combinant à la fois l'imagerie optique (ZW800), IRM (Gd^{3+}) et TEP ($^{64}Cu^{2+}$) a été rapporté dans la littérature.⁷⁴ Ces particules ont été injectées par voie sous-cutanée dans la patte d'une souris. L'accumulation des particules dans un nodule lymphatique situé à proximité de la patte a été mesurée au cours du temps. Bien que cette étude ne soit pas une biodistribution, elle a permis de démontrer que la TEP est une excellente technique pour imager et quantifier la distribution de nanoparticules, que l'IRM

permet de visualiser leur accumulation dans la tumeur et que l'imagerie optique peut être utilisée comme guide dans le cadre de procédures chirurgicales.

Chapitre 3 – Matériel et méthodes

Ce chapitre porte sur la description générale de l'ensemble des procédures utilisées au cours de ce projet de maîtrise. Chacune des procédures, des techniques, des technologies utilisées sont abordées et justifiées. Une description détaillée des procédures est quant à elle décrite dans les sections *Materials and Methods* présentées dans les articles publiés (chapitres 5 et 6).

3.1. Synthèse des nanoparticules de silice mésoporeuses MCM-48 (M48SNs)

Il existe un très grand nombre de voies de synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuses.⁵³ Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de nous concentrer principalement sur les nanoparticules MCM-48. Cette synthèse développée par Kim et al., offre une excellente reproductibilité et permet d'obtenir des nanoparticules sphériques d'une taille d'environ 150 nm de diamètre avec une porosité de l'ordre de 3 nm (diamètre moyen des pores).⁹⁰ Il s'agit d'une taille représentative d'une large gamme de nanoparticules de silice mésoporeuses proposées dans la littérature pour des applications biomédicales.

La première étape de cette synthèse consiste à dissoudre les agents structurants (le bromure de n-cetyltriméthylammonium (CTAB) et le Pluronic F127) dans un solvant hydro-alcoolique alcalin à température ambiante. Le CTAB étant composé d'une tête hydrophile et d'une longue chaîne carbonée hydrophobe, sa mise en solution génère la formation de micelles sphériques. L'ajout de tétraéthylorthosilicate (TEOS), un précurseur de silice, entraîne l'organisation de la structure par un mécanisme d'auto-assemblage coopératif et la polymérisation de la silice autour des micelles, formant ainsi un réseau de silice mésostructuré. L'architecture des particules est influencée par la présence du Pluronic F127, un copolymère à trois (3) blocs (EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆), qui contrôle la taille des particules et permet d'obtenir une distribution pratiquement monodisperse.⁹⁰ Ce sont les conditions de synthèse (la vitesse et la durée d'agitation, le temps de réaction, la nature du solvant, la température, la concentration de précurseur de silice, le type et la concentration des agents structurants) qui assurent la formation de la structure tridimensionnelle cubique (*Ia3d*) des MCM-48.

Après l'assemblage des oligomères de silice, et afin d'obtenir un matériau poreux, il est essentiel de retirer les agents structurants du réseau. Deux voies sont possibles; l'extraction chimique ou la calcination. L'extraction chimique consiste à extraire les surfactants au moyen d'une imprégnation des nanoparticules avec un solvant composé d'alcool et parfois d'acide. La procédure

de calcination implique quant à elle de chauffer les particules à haute température (ex : 550 °C pendant 5 h, avec une rampe de chauffe de l'ordre de 1 °C/min). Ces deux méthodes d'extraction ont été utilisées dans le cadre des études présentées dans ce mémoire; la calcination pour les particules Mn-M48SNs et la voie chimique pour les particules Gd³⁺/⁶⁴Cu²⁺-DTPA-M48SNs.

3.2. Procédures de fonctionnalisation des M48SNs

Tout juste après leur synthèse et purification initiale, les M48SNs n'ont pas les propriétés physiques pour être visualisées en imagerie. L'ajout d'éléments paramagnétiques (IRM) et radioactifs (TEP) à leur structure est nécessaire pour assurer leur détection. Dans le cadre des travaux présentés ici, l'imprégnation (avec sels de Mn) et le greffage de chélates (avec ions Gd et ⁶⁴Cu) sont les deux stratégies de fonctionnalisation utilisées. Le Mn et le Gd servent à la détection en IRM grâce à leurs électrons non-appariés permettant d'observer un contraste positif pondéré en T₁. Le ⁶⁴Cu est quant à lui utilisé comme émetteur de positons pour la détection en TEP.

3.2.1. Imprégnation du manganèse dans la structure de silice (Mn-M48SNs)

Pour obtenir un bon signal d'IRM lors d'un marquage cellulaire, il est essentiel d'avoir une quantité élevée d'éléments paramagnétiques par nanoparticule et plusieurs nanoparticules par cellule. La technique d'imprégnation offre une capacité de chargement intéressante puisque la surface interne des nanoparticules est imprégnée de l'élément paramagnétique. De plus, l'excellente diffusion des molécules d'eau dans le réseau poreux permet d'obtenir des relaxivités élevées. Le développement d'agents de contraste à base de Mn a connu un nouvel intérêt suite à la découverte du lien de causalité entre les ions de Gd³⁺ et la fibrose systémique néphrogène (maladie de la peau et des organes).⁹ Comme il a été mentionné précédemment, le Mn constitue le deuxième élément d'intérêt pour l'IRM grâce à ses 5 électrons non appariés. Il est également moins toxique que le Gd³⁺ puisqu'il est naturellement présent dans l'organisme, où il contribue à certaines réactions enzymatiques.⁹¹ Ainsi, dans le cadre d'une étude de marquage cellulaire impliquant l'imprégnation d'un élément paramagnétique dans la structure de silice, les risques de toxicité liés au relargage des ions Mn²⁺ sont plus limités que ceux du Gd³⁺.

L'imprégnation des particules est réalisée dans un solvant d'alcool dans lequel le sel précurseur de manganèse (Mn(NO₃)₂·xH₂O) est dissous. Cette stratégie a été utilisée avec le gadolinium, dans une publication antérieure du partenariat Fortin-Kleititz.⁹² Une petite quantité (2 g) de nanoparticules (M48SNs, sous forme de poudre) est ensuite mélangée au solvant. Par diffusion, le solvant pénètre les pores et permet aux ions de manganèse de tapisser la surface interne des nanoparticules. Une

période de séchage permet l'évaporation du solvant et une série de calcinations (500 °C) assurent l'imprégnation du manganèse. Suite à cette procédure, les particules contiennent maintenant suffisamment de matériel paramagnétique pour être détectables en imagerie par résonance magnétique.

3.2.2. Fonctionnalisation de la surface des M48SNs pour le greffage des chélates

Les nanoparticules marquées d'éléments paramagnétiques (Gd, Mn) par imprégnation et calcination sont malheureusement inadaptées pour une utilisation chez l'humain. En effet, afin de limiter le plus possible le risque lié à une éventuelle lixiviation des ions Mn^{2+} et Gd^{3+} , il est nécessaire de procéder au greffage d'un agent de chélation à la surface des MSNs. Une fois chélatés, les ions de Mn^{2+} et de Gd^{3+} présentent un risque de toxicité beaucoup plus faible et leur excrétion par voie rénale est largement favorisée advenant un détachement des éléments paramagnétiques de la structure des MSNs. Les agents de chélation peuvent aussi être utilisés pour chélater les ions métalliques radioactifs tels que le ^{64}Cu .

Dans le cas de la fonctionnalisation par greffage de chélates, la procédure est un peu plus complexe et nécessite plusieurs étapes. Il faut d'abord mentionner que sur les surfaces externes et internes des particules se trouvent des groupements silanols (-Si-OH). Ces derniers ne pouvant réagir directement avec les chélates, il est nécessaire de recourir à l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) pour faire le lien entre les particules de silice et les agents de chélation.

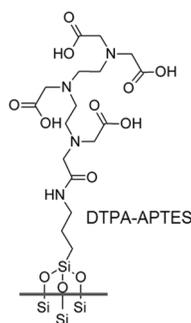


Figure 3.1. Molécules d'APTES et de DTPA greffées à la surface des nanoparticules M48SNs.

Premièrement, les nanoparticules (M48SNs) sont dispersées dans le toluène anhydre en présence des molécules d'APTES. La réaction se fait à la température ambiante pendant 24 h. Les particules, nommées APTES-M48SNs, sont ensuite collectées par centrifugation et rincées à l'éthanol. Il a été mentionné précédemment qu'une procédure d'extraction est essentielle pour éliminer les agents structurants et libérer la porosité. Dans le cas présent, cette procédure est effectuée après le greffage de l'APTES. Il est important de noter que malgré le fait que l'agent

structurant soit toujours dans les pores, cela n'empêche pas certaines molécules d'APTES de réagir à l'intérieur de la structure. Ceci s'explique par le fait que les molécules d'APTES sont plus petites que le diamètre des pores et réussissent à s'introduire entre les molécules de l'agent structurant puis à se lier aux silanols. L'extraction chimique est effectuée pendant 24 h dans un solvant composé d'éthanol et d'acide chlorhydrique. Il se produit alors une substitution des cations de l'agent structurant par les ions H^+ présents dans le solvant.⁵⁴ L'éthanol permet quant à lui de solubiliser l'agent structurant. Les particules sont ensuite rincées à l'éthanol et isolées par centrifugation pour éliminer les agrégats. Elles sont finalement séchées à l'air (70 °C) pendant toute une nuit.

Le dernier greffage est celui des agents de chélation à base d'acide diéthylènetriaminopentaacétique (DTPA). La réaction est réalisée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) sec et consiste à laisser réagir, sous agitation et à température ambiante, les particules (APTES-M48SNs) avec les molécules de DTPA bis-anhydride pour toute une nuit. La liaison se fait entre un des acides carboxyliques du DTPA et le groupement amine de l'APTES. Finalement, les particules sont de nouveau isolées par centrifugation, rincées avec du DMSO et conservées dans celui-ci jusqu'au marquage avec le Gd^{3+} et le $^{64}Cu^{2+}$.

3.2.3. Chélation du cuivre radioactif ($^{64}Cu^{2+}$) et du gadolinium (Gd^{3+})

Avant de procéder à la chélation, les nanoparticules sont rincées à trois reprises avec de l'eau nanopure (eau déionisée) pour éliminer toute trace du DMSO dans lequel elles ont été conservées. Brièvement, la procédure consiste à laisser réagir les nanoparticules de silice mésoporeuses avec les sels précurseurs de cuivre radioactif ($^{64}Cu^{2+}(CH_3CO_2)_2$) et de gadolinium ($Gd(CH_3CO_2)_3 \cdot xH_2O$). Les ions de $^{64}Cu^{2+}$ et de Gd^{3+} sont alors chélatés par le DTPA greffés aux particules. Il est essentiel de respecter l'ordre d'addition des sels précurseurs pour éviter une compétition entre les ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$. Le $^{64}Cu^{2+}$ étant en très faible concentration (de l'ordre du nanomolaire), celui-ci doit d'abord être mis en contact avec les particules (90 minutes) pour maximiser sa chélation. Une solution d'acétate de gadolinium (100 mM) est ensuite ajoutée à la suspension. Le gadolinium est ajouté en excès pour saturer le reste des sites de chélation. Un temps de réaction de 30 minutes est alors suffisant pour permettre sa chélation. Il est important de noter que les deux étapes de chélation sont réalisées à température ambiante et sous une légère agitation magnétique.

3.3. Caractérisation de la taille des nanoparticules M48SNs

La caractérisation des M48SNs nécessite l'utilisation de plusieurs techniques d'analyse. Il est nécessaire de mesurer précisément la taille moyenne des nanoparticules, d'abord par microscopie

électronique à transmission, et ensuite, lorsque les particules sont suspendues dans un solvant aqueux, par diffusion de la lumière en mode dynamique (DLS).

3.3.1. Microscopie électronique à transmission (MET)

L'observation des nanoparticules par microscopie électronique à transmission est essentielle afin de mesurer la taille des particules. Elle procure les informations concernant la taille, la forme et permet de faire une analyse de distribution des tailles. La préparation de l'échantillon consiste d'abord à mettre en suspension les nanoparticules dans l'eau nanopure (5 mg/mL), puis à déposer une goutte de la suspension sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. À cette concentration, les particules sont réparties de façon uniforme sur la grille, ce qui procure de meilleures images et facilite l'analyse de la distribution des tailles. Une période de séchage de 24 h à température ambiante est nécessaire afin d'éliminer l'eau contenue dans l'échantillon. Il est également important de conserver la grille à l'abri des poussières pour la durée de la procédure et jusqu'au moment de l'analyse MET.

3.3.2. Analyse de taille par diffusion de la lumière en mode dynamique (DLS)

Cette technique de caractérisation est utilisée pour mesurer le diamètre hydrodynamique des particules, qui comprend aussi la sphère d'hydratation qui se forme autour de la particule lorsqu'elle est en suspension dans l'eau. Pour cette raison, le diamètre hydrodynamique est toujours un peu plus élevé que le diamètre des particules obtenu par microscopie électronique à transmission. Pour effectuer une mesure de DLS, la suspension de nanoparticules est déposée dans une cellule transparente qui s'insère dans l'instrument de mesure (Zetasizer).

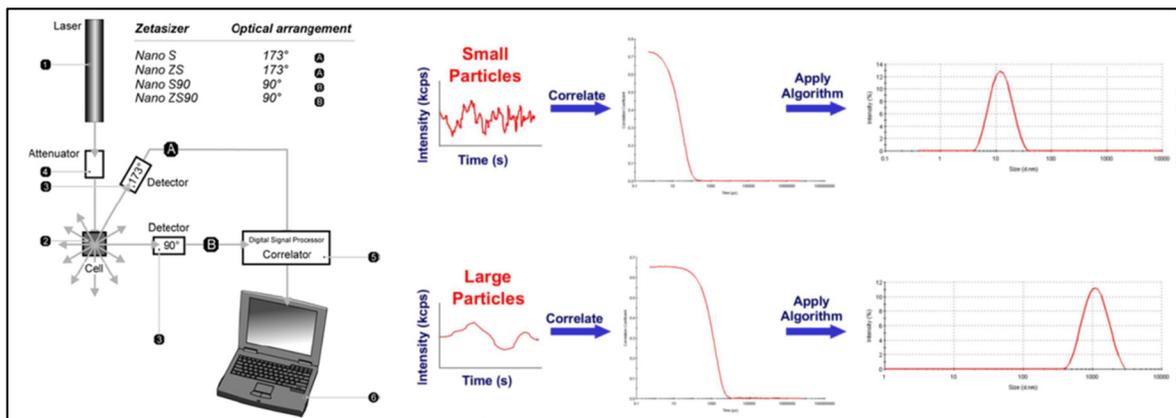


Figure 3.2. Représentation schématique des composants du Zetasizer (à gauche) et exemples des mesures de petites et de grosses particules (à droite).

(Source : <http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/dls.pdf>, <http://www.malvern.com/fr/support/events-and-training/recorded-events/webinar-recorded/RW121211FromTheApplicationLaboratory.aspx>)

Lors de la mesure, un laser émet un faisceau dont l'intensité diffusée est mesurée à l'aide d'un détecteur placé à 173° par rapport au faisceau incident (Figure 3.2). L'analyse est basée sur la mobilité des particules due au mouvement Brownien. Celui-ci est très important puisque la vitesse à laquelle les particules se déplacent est liée à leur taille. Les particules de faibles tailles se déplacent plus rapidement que celles de tailles élevées, ce qui influence la fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée. En analysant cette fluctuation, il est alors possible d'obtenir le coefficient de diffusion et de calculer le diamètre hydrodynamique des particules par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (3.1)$$

k_B : Constante de Boltzmann

T: Température

η : Viscosité du solvant

D: Coefficient de diffusion

Pour réaliser la mesure, il est donc nécessaire de connaître les paramètres suivants : l'indice de réfraction du produit, son coefficient d'absorption, la nature du solvant, la température et le temps d'équilibration. Ce dernier permet d'ajuster l'échantillon à la température désirée alors que la nature du solvant et la température influencent directement le mouvement Brownien. Les données brutes sont exprimées en intensité, mais un calcul à l'aide d'algorithmes et basé sur l'indice de réfraction et le coefficient d'absorption permet d'exprimer les résultats en volume et en nombre. Ceci permet de déterminer si un échantillon contient beaucoup de petites particules ou simplement quelques grosses. En terminant, il est important de mentionner qu'il est possible d'évaluer la stabilité colloïdale d'une suspension en effectuant des analyses de taille DLS. En effet, si le diamètre hydrodynamique des particules augmente au cours du temps, ceci est signe d'agrégation et implique que la suspension n'est pas stable.

3.3.3. Potentiel zêta (stabilité colloïdale)

Le potentiel zêta représente la charge électrique induite par la présence d'ions à la surface d'une particule en solution. L'intérêt de cette mesure est qu'elle permet de connaître la nature de la charge (positive ou négative), en plus de constituer un autre indicateur de la stabilité colloïdale. En effet, lorsque le potentiel zêta est supérieur à ± 30 mV la suspension est généralement stable (pas d'agglomération ou de floculation des particules). La mesure de potentiel zêta est obtenue en déterminant d'abord la mobilité électrophorétique des particules. Cette valeur est obtenue par une analyse de diffusion de la lumière et correspond à la vitesse à laquelle se déplacent les particules

suite à l'application d'un champ électrique aux bornes de la cellule. La lumière émise par le laser est dirigée vers la cellule et sa diffusion par les particules en mouvement induit une fluctuation de l'intensité détectée. La fréquence de fluctuation de la lumière étant proportionnelle à la vitesse de la particule, il est possible d'extraire la mobilité électrophorétique, puis de calculer la valeur du potentiel zêta par l'équation d'Henry :

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (3.2)$$

U_E : Mobilité électrophorétique

ε : Constante diélectrique

ζ : Potentiel zêta

$f(Ka)$: Fonction d'Henry = 1.5

η : Viscosité du solvant

Dans le cadre de ce projet, il était important de mesurer le potentiel zêta des particules de Gd³⁺-DTPA-M48SNs au pH physiologique (7.5) afin de s'assurer de leur stabilité au moment des expériences *in vivo*. L'analyse a été effectuée à l'aide d'un appareil Zetasizer (le même instrument ayant servi à faire l'analyse de taille DLS, mais possédant la composante supplémentaire permettant de mesurer le potentiel zêta). Ainsi, pour réaliser une mesure, il suffit de déposer l'échantillon de la suspension de nanoparticules dans la cellule munie d'électrodes, d'insérer cette dernière dans l'instrument et d'entrer les paramètres nécessaires à l'analyse (indices de réfraction, coefficient d'absorption, nature du solvant, temps d'équilibration, température).

3.4. Caractérisation texturale des nanoparticules M48SNs

Puisque les nanoparticules M48SNs sont un matériau poreux, il est nécessaire d'en caractériser la fraction volumique et la surface spécifique par physisorption à l'azote. De plus, la morphologie des pores doit être mesurée par une technique de diffraction des rayons X aux bas angles. Dans le cadre de ce projet de recherche, ces techniques n'ont pas été directement utilisées puisque les particules avaient été synthétisées et mesurées (porosimétrie) par les autres étudiants collaborant au projet (Rémy Guillet-Nicolas et Meryem Bouchoucha). Néanmoins, les principes de ces techniques sont décrits ici.

3.4.1. Physisorption à l'azote

La physisorption est l'une des principales méthodes de caractérisation des matériaux poreux. Elle permet de déterminer les propriétés intrinsèques des particules comme la surface spécifique, le volume poreux et la taille moyenne des pores. Le principe de la physisorption repose

essentiellement sur l'adsorption de l'azote à la surface d'un matériau solide. Pour les besoins de l'analyse, un échantillon de nanoparticules sous forme de poudre est donc déposé dans une cellule de mesure. L'instrument détermine alors le volume de gaz adsorbé, en mesurant précisément le changement de pression qu'induit la présence d'un matériau poreux dans la cellule. L'isotherme d'adsorption est ensuite obtenue en traçant le volume de gaz adsorbé (cm^3/g) en fonction de la pression relative (P/P_0) pour une température fixe. La forme de l'isotherme est une donnée très importante puisqu'elle est caractéristique du type de matériau analysé (non poreux, microporeux, macroporeux et mésoporeux).⁹³ C'est aussi à partir de l'isotherme d'adsorption que sont calculées les différentes propriétés texturales des nanoparticules. L'utilisation d'algorithmes mathématiques standardisés est toutefois nécessaire pour le traitement de ces données. Par exemple, la surface spécifique est calculée selon le modèle BET (Brunnauer, Emmett, Teller), alors que la dimension des pores résulte de l'application du modèle NLDFT (*Nonlocal Density Functional Theory*).⁹³ Le volume poreux est quant à lui déterminé par une simple conversion du volume adsorbé pour la valeur de $P/P_0 = 0.95$ (pression relative correspondant au volume total de gaz pouvant être adsorbé).⁹⁴

3.4.2. Diffraction des rayons X aux bas angles (DRX)

Cette technique de caractérisation est utilisée pour étudier l'ordre des nanoparticules de silice mésoporeuses en se basant sur la diffraction des rayons X. Pour obtenir un patron de diffraction, un échantillon de nanoparticules sous forme de poudre est exposé à un faisceau de rayons X. Dans le cas des nanoparticules de silice mésoporeuses, les rayons sont diffractés aux bas angles, car l'ordre est issu de l'organisation régulière des parois des pores plutôt que des atomes. Ce sont les pics présents sur le spectre de l'échantillon analysé qui permettent d'identifier sa structure comme étant celle des MCM-48 puisque chaque type de matériau ordonné possède un patron de diffraction qui lui est propre.

3.5. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules M48SNs

La fonctionnalisation des nanoparticules au moyen de sondes d'imagerie nécessite de procéder à une analyse physico-chimique par différentes techniques de caractérisation: spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), spectroscopie des photoélectrons X (XPS), spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR), spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X (EDX), thermogravimétrie (TGA) et quantification élémentaire.

Le lecteur verra que cette section est consacrée à la description des analyses effectuées pour caractériser les suspensions de nanoparticules fonctionnalisées avec le DTPA (article 2). La raison pour laquelle cette partie est axée uniquement sur ce produit est qu'il s'agit du projet ayant mené à l'élaboration de la méthodologie de chromatographie d'exclusion stérique et permis le développement des nanoparticules pour l'imagerie bimodale IRM/TEP. Cela signifie que j'ai procédé à la majeure partie des caractérisations effectuées sur ces nanoparticules. J'ai aussi été appuyée par l'étudiante Meryem Bouchoucha (candidate au doctorat) pour les caractérisations de RMN, physisorption, MET, DRX et TGA. D'autre part, dans le cadre du projet avec les nanoparticules de Mn-M48SNs, l'ensemble des analyses a été réalisé par l'étudiant Rémy Guillet-Nicolas (candidat au doctorat). Par conséquent, la méthodologie des caractérisations de ce produit n'est pas décrite ici. Elle est toutefois présentée en détail dans la partie *Experimental section* de l'article *Manganese-impregnated mesoporous silica nanoparticles for signal enhancement in MRI cell labelling studies* présenté au chapitre 5 de ce mémoire.

3.5.1. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'intérêt d'utiliser la RMN du ^{13}C et du ^{29}Si pour ce projet réside dans le fait que ces éléments permettent de confirmer les greffages de l'APTES et du DTPA sur la structure des M48SNs. En effet, l'apparition des pics caractéristiques de ces molécules sur les spectres constitue une preuve de la réussite des greffages. D'autre part, il est possible de révéler la nature des liaisons Si-O faites à la surface des particules M48SNs. Pour les besoins de l'analyse, ~50 mg de nanoparticules (DTPA-M48SNs) sous forme de poudre sont déposés dans un tube RMN de 4 mm de diamètre. Ce dernier est inséré dans le spectromètre RMN. L'acquisition des spectres est ensuite réalisée pour chaque élément (^{13}C et ^{29}Si). Le tétraméthylsilane et l'adamantane sont respectivement utilisés comme références pour les déplacements chimiques du ^{29}Si et du ^{13}C .

3.5.2. Spectroscopie photoélectronique induite par rayons X (XPS)

La spectroscopie XPS s'impose comme une technique d'analyse incontournable pour la caractérisation des particules. Elle utilise l'effet photoélectrique comme principe de base pour déterminer la composition élémentaire et l'état des liaisons chimiques des atomes de surface (profondeur maximale de l'analyse: entre 5 et 10 nm). Pour ce faire, l'échantillon est d'abord irradié par un faisceau de rayons X monochromatique d'énergie connue. L'effet photoélectrique se manifeste après l'interaction d'une fraction des rayons X avec les électrons de cœur des atomes. Le photon X incident cède une partie de son énergie à l'électron, ce qui provoque l'expulsion de ce dernier hors de son orbitale. Les électrons émis sont collectés et comptés par le spectromètre en

fonction de l'énergie cinétique avec laquelle ils sont éjectés. En connaissant la valeur de l'énergie cinétique, il est ensuite possible de déduire leur énergie de liaison. Cette dernière étant caractéristique à chaque atome, elle permet d'identifier la nature des éléments présents dans les nanoparticules. Il est important de noter que la quantité exacte d'atomes présents à la surface de l'échantillon n'est pas connue. Cependant, en procédant à l'intégration de l'aire sous les pics du spectre en énergie, ce sont les pourcentages relatifs de chaque élément qui sont obtenus. Il s'agit d'une méthode quantitative permettant d'extraire les différents ratios des éléments chimiques. Dans le cadre du projet, plusieurs échantillons ont été préparés afin de suivre la composition atomique après chaque étape de greffages (par ex. : M48SNs, APTES-M48SNs, DTPA-M48SNs et Gd^{3+} -DTPA-M48SNs). Ainsi, les principaux pics mesurés (survol et haute résolution) sont ceux du carbone, de l'oxygène, de l'azote, de la silice et du gadolinium. Aucun échantillon contenant du cuivre radioactif n'a été analysé, car sa concentration se trouve en dessous des limites de détection de l'XPS. La préparation des échantillons consiste à déposer une goutte de suspension de nanoparticules sur un substrat d'or sur silicium. Le substrat est préalablement nettoyé avec une solution TL1 composée d'eau nanopure, de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 30 %) et d'ammoniaque (NH_4OH 25 %) selon les proportions suivantes 5:1:1. Lorsque la température de la solution a atteint 80 °C, le substrat est plongé à l'intérieur pour une durée de 10 minutes. La surface est ensuite rincée à l'eau nanopure et à l'éthanol (≥ 99 %) puis séchée à l'air. Par la suite, une goutte de l'échantillon est déposée sur le substrat d'or, puis celui-ci est placé dans un dessiccateur pendant une heure à 40 °C pour que l'eau s'évapore complètement. L'échantillon est ensuite prêt à être inséré dans l'XPS. Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme d'un spectre en énergie sur lequel apparaissent les raies caractéristiques des éléments.

3.5.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est utilisée pour identifier la nature des liaisons chimiques présentes dans les nanoparticules, surtout les groupements organiques en surface. Elle est basée sur le phénomène d'absorption énergétique engendré par l'exposition d'un échantillon au rayonnement infrarouge. La nature du rayonnement est caractérisée par une énergie beaucoup plus faible que celle utilisée en XPS (les rayons X étant beaucoup plus énergétiques). Le rayonnement infrarouge interagit avec la matière en faisant vibrer les liaisons chimiques. Cette technique se révèle indispensable pour confirmer la présence des molécules greffées aux nanoparticules. Pour les besoins de l'étude, deux suspensions de nanoparticules (DTPA-M48SNs, Gd^{3+} -DTPA-M48SNs) et une solution de Gd-DTPA (5 mM DTPA complexé avec 5 mM $Gd(CH_3CO_2)_3 \cdot xH_2O$) ont été analysées. Dans le cas présent, la solution de Gd-DTPA est utilisée

comme référence pour l'attribution des groupements chimiques. Pour terminer, la préparation des échantillons consiste simplement à déposer sur le cristal ATR (*attenuated total reflectance*) une goutte de l'échantillon puis de le laisser sécher sous vide à 40 °C. Le cristal est ensuite inséré dans le porte-échantillon du spectromètre et l'acquisition du spectre d'absorbance est lancée.

3.5.4. Spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X (EDX) couplée à un MET

La spectroscopie EDX est une technique d'analyse élémentaire basée sur l'émission de rayons X caractéristiques aux éléments chimiques présents dans l'échantillon. L'intérêt de cette analyse est qu'elle permet de cartographier la distribution du gadolinium dans la structure de silice des particules. Puisque le spectromètre EDX est intégré à un microscope électronique à transmission, ceci implique de déposer sur une grille de microscopie l'échantillon de nanoparticules à analyser (Gd³⁺-DTPA-M48SNs). La procédure consiste d'abord à sélectionner une particule à l'aide du microscope. Ensuite, la sonde EDX extrait le spectre élémentaire de deux régions ciblées; le centre et la périphérie de la particule. Il est alors possible d'obtenir les rapports de Gd/Si pour ces régions et de les comparer. Cette procédure est répétée sur deux autres particules afin d'avoir les données en triplicata. Encore une fois, il est important de noter que l'analyse a été effectuée sur un échantillon de nanoparticules uniquement marquées de Gd³⁺, l'EDX n'étant pas suffisamment sensible pour détecter la très faible concentration de cuivre radioactif présent sur les nanoparticules.

3.5.5. Thermogravimétrie (TGA)

La thermogravimétrie est une technique permettant de mesurer la variation de la masse d'un échantillon soumis à un changement de température. Elle permet ainsi de caractériser la composition d'un matériau en fonction de sa perte de masse subie lors d'une décomposition thermique. Dans le cadre du projet, elle a été utilisée pour déterminer les quantités d'APTES et de DTPA greffées aux particules M48SNs. Pour réaliser l'analyse, un échantillon de nanoparticules sous forme de poudre est inséré dans le module de pesée de l'instrument. La mesure est exprimée sous la forme d'une courbe de décomposition thermique correspondant au pourcentage de la masse en fonction de la température. Les données sont ensuite extraites pour calculer le pourcentage de molécules greffées, relativement à la masse de produit non organique.

3.5.6. Dosage de la teneur en gadolinium (Gd) et en silicium (Si)

La quantification élémentaire est une analyse très importante pour la caractérisation des nanoparticules. Premièrement, il est nécessaire de connaître la concentration molaire de Gd (et de Mn) dans les suspensions de MSNs afin de compléter les études relaxométriques. Les valeurs

découlant de ces dernières sont extrêmement importantes pour comparer ce produit paramagnétique avec d'autres agents de contraste. D'autre part, la quantification de la teneur en silicium constitue une information essentielle puisque le produit sera injecté dans l'animal. Ceci implique que la concentration ne doit pas être toxique. Pour effectuer l'analyse, la méthode de quantification retenue est la spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS). Il s'agit de la technique la plus précise et la plus sensible (1 µg/L) pour mesurer la concentration d'éléments en solution. À ce propos, il aurait été intéressant de connaître la teneur en cuivre des particules $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs, mais la concentration en Cu radioactif est malheureusement trop faible pour être détectée. Par exemple, dans une fiole de 1 mL contenant 5 mCi de ^{64}Cu on retrouve :

$$A = 5 \text{ mCi} = \lambda N = \frac{\ln(2) \cdot N}{t_{1/2}} \quad (3.3)$$

N: Nombre d'atomes radioactifs

$$t_{1/2}: 12.7 \text{ h} = 45720 \text{ s}$$

$$5 \text{ mCi} = 1.85 \times 10^8 \text{ désintégration par seconde}$$

$$1.85 \times 10^8 \text{ dps} = \frac{\ln(2) \cdot N}{45720 \text{ s}}$$

$$N = 1.22 \times 10^{13} \text{ atomes radioactifs}$$

$$N_A: \text{Constante d'Avogadro: } 6.022 \times 10^{23} \text{ atomes mol}^{-1}$$

$$\frac{N}{N_A} = \frac{1.22 \times 10^{13} \text{ atomes}}{6.022 \times 10^{23} \text{ atomes mol}^{-1}} \cong 2 \times 10^{-11} \text{ mol}$$

$$[^{64}Cu] = \frac{2 \times 10^{-11} \text{ mol}}{1 \times 10^{-3} \text{ L}} \cong 20 \text{ nM} \cdot 64 \text{ g/mol} \cong 1 \mu\text{g/L}$$

Avant l'analyse en ICP-MS, il est nécessaire de procéder à une digestion des particules (Gd^{3+} -DTPA-M48SNs) afin de dégrader entièrement la matière organique (chélate) et permettre aux ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ de passer en solution. La procédure de digestion est présentée dans l'annexe 2. Les échantillons digérés sont ensuite transférés et analysés à l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) pour l'analyse ICP-MS.

Dans le cas du dosage du silicium, un échantillon de la suspension de nanoparticules Gd^{3+} -DTPA-M48SNs est transféré au Laboratoire de Radioécologie de l'Université Laval où il est digéré à l'acide fluorhydrique (HF) dans un four micro-ondes, et analysé en ICP-MS.

3.6. Développement d'une procédure de chromatographie d'exclusion stérique comme méthode de purification

Une fois les nanoparticules marquées, elles peuvent être détectées par IRM et par TEP. Cependant, advenant que tous les ions métalliques ne soient pas chélatés, ou advenant qu'une partie des chélates de Gd ou de ^{64}Cu se soient détachés de la structure des M48SNs pendant le processus de marquage sous agitation mécanique, il est nécessaire d'éliminer ces produits contaminants, qui risquent de biaiser les études d'imagerie. En particulier, avant l'administration dans l'animal, la suspension de nanoparticules doit être purifiée afin d'éliminer les ions résiduels.

C'est au cours de l'utilisation des nanoparticules de Mn-MSN, et en prévision de la planification des procédures d'injection de nanoparticules marquées au Gd et au ^{64}Cu , qu'est apparu la nécessité de développer une technique de purification rapide, permettant l'élimination des ions métalliques dans un temps inférieur à une heure. La chromatographie par exclusion stérique a donc été sélectionnée comme technique de purification, en raison de la possibilité de l'adapter efficacement à une vaste gamme de nanoparticules de tailles et de propriétés de surface différentes.

La procédure développée dans le cadre de ce projet de maîtrise est utilisée exclusivement pour purifier les nanoparticules fonctionnalisées avec du DTPA (Gd^{3+} -DTPA-M48SNs et les $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs), tel que décrit dans le deuxième article de ce mémoire.

3.6.1. Évaluation préliminaire de la suspension de nanoparticules en vue de la purification par chromatographie d'exclusion stérique

Il a été mentionné précédemment que l'efficacité de la purification par chromatographie d'exclusion stérique repose sur différents paramètres qu'un protocole d'évaluation des suspensions de nanoparticules strict permet de mieux contrôler. Il s'agit d'une série d'étapes préliminaires qui assurent que le produit est adéquat pour être purifié par la colonne de chromatographie.

Tout d'abord, il est important de débiter par une analyse de taille de la suspension de nanoparticules par DLS (voir section 3.3.2). Cette analyse permet de déterminer les tailles des différents composants de la suspension et d'évaluer à quel volume les nanoparticules seront éluées de la colonne. Par la suite, un test de stabilité colloïdale des nanoparticules dans une solution saline (154 mM NaCl) et sur une période de quelques heures doit être réalisé. Ceci permet de vérifier le comportement colloïdal des nanoparticules en fonction du temps. Il s'agit de vérifier si les particules précipitent ou s'agglomèrent dans ce milieu. Ceci est très important puisque cette même solution saline est utilisée pour éluer les particules. La concentration de 154 mM de NaCl est

utilisée pour deux raisons. D'abord, parce qu'elle correspond à la salinité du milieu physiologique, et ensuite parce qu'elle induit une force ionique suffisante pour éviter des interactions ioniques entre les particules et la matrice de gel.³⁸ Les effets de rétention dus à la charge sont ainsi minimisés. Dans l'éventualité que de fortes liaisons ioniques se produisent, une mesure de la charge des nanoparticules (potentiel zêta) et des particules de Sephadex peut aussi être effectuée. La force ionique de la solution d'éluion peut alors être ajustée pour limiter les interactions. Il est aussi essentiel de s'assurer que les particules soient stables dans l'intervalle de pH allant de 4.5 à 7.5 parce qu'il s'agit du pH correspondant aux conditions physiologiques (par ex. : pH des lysosomes : 4.5-5, pH sanguin : 7.4). S'il y a formation de composantes supplémentaires comme des hydroxydes, celles-ci peuvent interagir avec le Sephadex G-25 par des liaisons chimiques ou précipiter et colmater le gel. D'ailleurs, une évaluation du comportement de la suspension lorsque mise en contact avec le Sephadex G-25 est nécessaire. Un essai sur une colonne de type NAP-5 ou NAP-25 (GE Healthcare) est généralement suffisant pour observer toute anomalie. Pour conclure, cette procédure doit être réalisée pour toute nouvelle suspension de nanoparticules avant de passer à sa purification sur la colonne du laboratoire.

3.6.2. Composantes du système de chromatographie

L'équipement nécessaire pour réaliser la purification par chromatographie d'exclusion stérique comprend une colonne de verre avec deux adaptateurs (commerciallement disponibles), des tuyaux, des connecteurs et une pompe péristaltique.

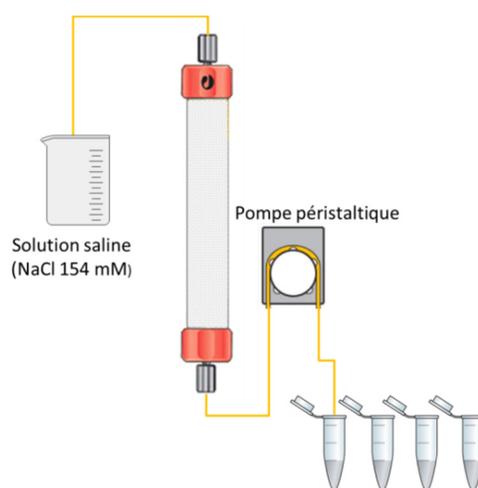


Figure 3.3. Schéma du système de chromatographie.

Dans le cadre des expériences réalisées pour ce projet, une colonne de 2.6 cm de diamètre comprenant deux adaptateurs (modèle XK-26/40, Pharmacia) est utilisée. Celle-ci est maintenue à

la verticale par un support et doit être au niveau par rapport aux trois axes. Si ce n'est pas le cas, le gel ne se compactera pas de façon uniforme. L'intérêt d'utiliser la pompe péristaltique (5 mL/min) est qu'elle assure un débit constant et permet d'éluer plus rapidement que par simple gravité.

3.6.3. Méthode d'évaluation de la purification

La stratégie utilisée pour confirmer la purification des nanoparticules consiste à faire passer sur la colonne un échantillon de nanoparticules (Gd^{3+} -DTPA-M48SNs) contenant des ions de Gd^{3+} résiduels et de collecter des fractions d'élution successives de 0.5 mL. En se basant sur le fait que les nanoparticules et les ions résiduels sont paramagnétiques, il est possible d'obtenir un profil d'élution en mesurant les temps de relaxation de chaque fraction à l'aide d'un relaxomètre 1H -RMN (Minispec 60 mq, 60 MHz (1.41 T), Bruker). Si le temps de relaxation de la fraction est inférieur à celui de l'eau pure ($T_2 \sim 2500$ ms), ceci indique la présence de matériel paramagnétique. Étant donné la taille plus importante des nanoparticules, leur sortie de la colonne se fait directement après le volume mort (48 mL). Les ions sont quant à eux retardés, et élués à un volume de plus de 100 mL. Cette différence permet d'obtenir une séparation distincte entre la sortie des nanoparticules et celle des ions. Une analyse de taille au DLS des fractions permet ensuite de confirmer la nature du matériel paramagnétique. Pour des raisons d'efficacité, seuls les temps de relaxation transverse (T_2) ont été mesurés lors de l'optimisation de la chromatographie, la mesure du T_2 étant beaucoup plus rapide que celle du temps de relaxation longitudinal (T_1). Tous les résultats démontrant l'efficacité de la purification par chromatographie d'exclusion stérique sont présentés dans le chapitre 4 de ce mémoire.

3.6.4. Procédure complète de purification des nanoparticules Gd^{3+} -DTPA-M48SNs et $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs

Avant de commencer la purification, il est important de s'assurer que la colonne soit préalablement nettoyée avec 300 mL d'une solution de NaOH à 0.2 M (filtrée à 0.2 μ m) et équilibrée avec 600 mL d'une solution saline de NaCl à 154 mM (filtrée à 0.2 μ m). Pour le vérifier, le pH à la sortie de la colonne doit se situer entre 6-7 et le temps de relaxation transverse (T_2) doit correspondre à celui de l'eau nanopure (~ 2500 ms). Suite à de nombreux essais, il a été établi qu'un millilitre (1 mL) de suspension nanoparticules est le volume optimal pour assurer une purification efficace. En actionnant la pompe péristaltique (5 mL/min) les nanoparticules sont aspirées vers la colonne et se dispersent dans le gel. La colonne est alimentée par de la solution saline pour permettre l'élution des nanoparticules. Les 48 premiers millilitres correspondent au volume mort de

la colonne et sont collectés dans un cylindre gradué. Les nanoparticules sont quant à elles collectées dans les 27 mL suivants.

L'une des conséquences à la chromatographie d'exclusion stérique est la dilution de la suspension de nanoparticules après la dispersion dans le gel. En effet, 1 mL de suspension de nanoparticules au sommet de la colonne correspond à un volume total d'élution de 27 mL à la sortie. Cette dilution a pour conséquence d'augmenter les temps de relaxation de la suspension de nanoparticules. En effet, une solution plus concentrée en ions paramagnétiques, montre des temps de relaxation (T_1 et T_2) plus courts, car l'élément paramagnétique a une plus grande influence sur la relaxation des spins des protons d'hydrogène de l'eau. Sachant qu'il faut les temps de relaxation les plus courts possible pour obtenir un rehaussement de signal en IRM, il est donc essentiel de reconcentrer les nanoparticules.

Afin de permettre une reconcentration efficace, la concentration tangentielle a été retenue. Ce dispositif est composé de membranes tubulaires poreuses dont les dimensions correspondent à un poids moléculaire de 10 kD. Le principe repose sur le fait que les nanoparticules ne traversent pas la membrane et se concentrent au fur et à mesure qu'une partie du solvant est évacué.

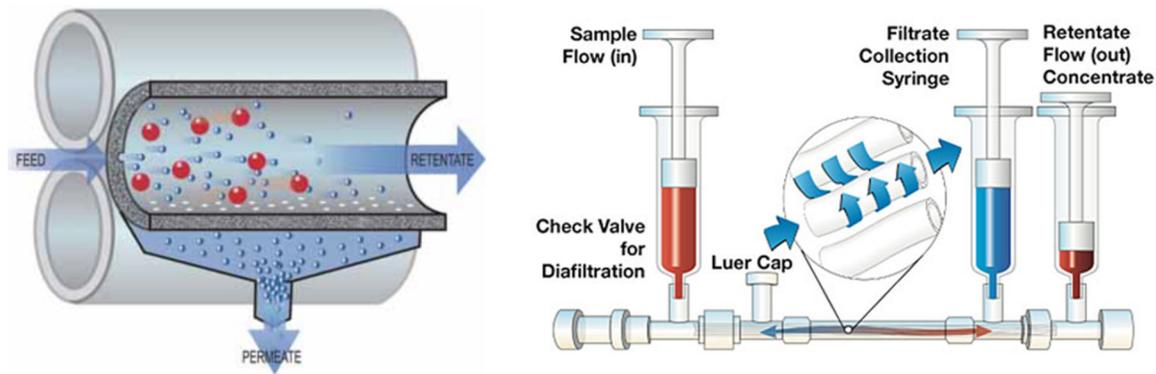


Figure 3.4. Dispositif de concentration tangentielle.

(Source : <http://www.spectrumlabs.com/lit/abc.pdf>)

La procédure consiste à conditionner d'abord les membranes avec de l'éthanol et de les rincer avec de l'eau nanopure. Le volume contenant les nanoparticules est ensuite injecté à l'intérieur des membranes à l'aide d'une seringue. Par la suite, ce sont les passages successifs qui permettent de concentrer les nanoparticules jusqu'à un volume de 1 à 1.5 mL, ce qui assure l'obtention de propriétés relaxométriques suffisantes pour la visualisation en IRM. Au final, la purification complète (chromatographie et concentration) a l'avantage de durer moins de 60 minutes, ce qui est compatible avec l'utilisation de l'isotope ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12.7$ h).

3.7. Caractérisation *in vitro* des propriétés des M48SNs comme sondes d'imagerie (relaxivité et radioactivité)

Une fois les nanoparticules purifiées des ions paramagnétiques et radioactifs non chélatés, les propriétés de relaxivité, c'est-à-dire la capacité des suspensions paramagnétiques à induire un contraste en IRM par le biais de leur effet sur le temps de relaxation longitudinal (T_1) et transverse (T_2), sont mesurées. L'activité présente dans la suspension de nanoparticules est également mesurée par compteur de dose et imagée par TEP.

3.7.1. Études relaxométriques à champ fixe

Les études de relaxométrie servent à mesurer les temps de relaxation T_1 et T_2 d'une suspension de nanoparticules (Gd^{3+} -DTPA-M48SNs). Les propriétés relaxométriques, c'est à dire l'efficacité à laquelle les ions paramagnétiques affectent la relaxation des protons d'hydrogène, varie en fonction du champ magnétique. Pour des mesures de relaxivité à champ fixe, la suspension est diluée pour former des aliquotes (100, 75, 50, 25 % v/v) ayant différentes concentrations de l'élément paramagnétique. Les mesures des T_1 et T_2 sont effectuées à l'aide d'un relaxomètre (Minispec 60 mq, 60 MHz (1.41 T), Bruker).

Pour effectuer la mesure de T_1 , une séquence d'inversion-récupération est utilisée (Figure 3.5).⁹⁵ Celle-ci consiste à appliquer une première impulsion de radiofréquence (RF) permettant de faire basculer le vecteur d'aimantation longitudinal (M_z) de 180° (axe $+z \rightarrow -z$). Après un certain temps τ , le vecteur d'aimantation a retrouvé une certaine valeur de son aimantation initiale. Cependant, pour obtenir une mesure du signal correspondant, il faut appliquer une impulsion de radiofréquence de 90° qui fait basculer le vecteur d'aimantation dans le plan xy. En répétant la même séquence, mais avec un temps τ toujours plus long entre les impulsions RF de 180° et 90° , la courbe exponentielle croissante de T_1 est générée point par point. C'est à partir de cette courbe que la valeur du temps de relaxation longitudinal (T_1) est finalement déterminée.

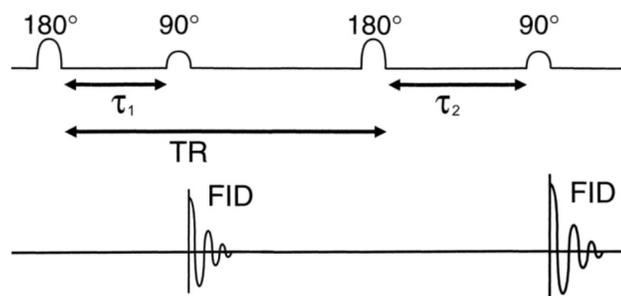


Figure 3.5. Séquence d'inversion-récupération employée pour mesurer le T_1 .

(Source : Document pré-doctorat de Luc Faucher)

Pour la mesure de T_2 , c'est la séquence de Carr-Purcell qui est employée (Figure 3.6).⁹⁵ Dans ce cas-ci, une première impulsion RF de 90° est appliquée pour faire basculer le vecteur d'aimantation (M_z) dans le plan xy (mesure du signal). Après un certain temps τ , une impulsion de 180° est appliquée afin de permettre le rephasage des spins. Une mesure du signal est alors prise au moment où les spins sont en phase (écho). Par la suite, les spins perdent de nouveau leur cohérence. Après un autre délai équivalent au temps τ , une seconde impulsion de 180° est appliquée, ce qui provoque un nouveau rephasage et donc, la mesure d'un nouvel écho. Puisque la valeur du temps τ correspond au temps d'un demi-écho ($\tau = TE/2$, où TE correspond au temps d'écho), une mesure du signal est toujours effectuée à des temps équivalents à $2 TE$, $3 TE$, $4 TE$, etc. Toutes ces mesures permettent ainsi d'obtenir une courbe exponentielle décroissante à partir de laquelle est déterminée la valeur du temps de relaxation transverse (T_2).

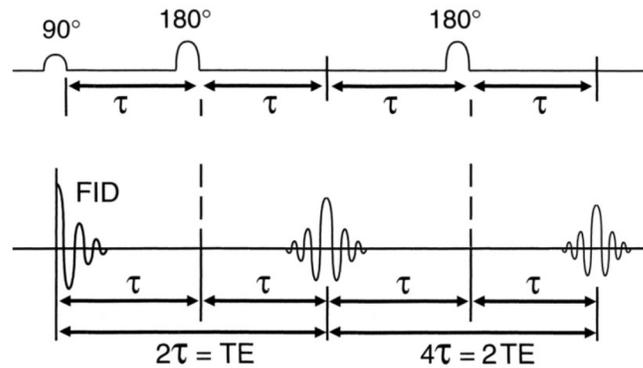


Figure 3.6. Séquence de Carr-Purcell utilisée pour mesurer le T_2 .

(Source : Document pré-doctorat de Luc Faucher)

Avec les mesures de T_1 et T_2 , il est possible de tracer le graphique des relaxivités (r_1 et r_2). Celui-ci est obtenu en traçant l'inverse des temps de relaxation ($1/T_1$ et $1/T_2$) en fonction de la concentration de l'élément paramagnétique (obtenue par analyse élémentaire, voir sections 3.5.6 et 3.9.3.3). Il suffit alors d'extraire les équations des droites tracées pour obtenir les relaxivités (ces dernières correspondent aux valeurs des pentes). La connaissance de ces propriétés relaxométriques est essentielle afin de comparer entre eux différents agents de contraste. D'ailleurs, lorsque le rapport r_2/r_1 est près de l'unité, ceci indique que l'agent est efficace en contraste positif.⁹⁶

3.7.2. Dispersion de résonance magnétique nucléaire (NMRD)

L'analyse de la dispersion de résonance magnétique nucléaire (NMRD) consiste également à mesurer les relaxivités (r_1 , r_2) d'un agent de contraste, mais à différents champs magnétiques. Cette étude permet d'identifier les mécanismes de relaxation et de déterminer les valeurs des paramètres

influençant la relaxivité. Selon la théorie développée par Solomon et Bloembergen, il existe deux catégories d'interactions impliquées dans les mécanismes de relaxation: celles de la sphère interne (IS) et celles de la sphère externe (OS).⁸ Elles se distinguent par la nature des échanges qu'elles entretiennent avec les protons d'hydrogène du milieu. Les interactions de la sphère interne sont considérées comme étant intramoléculaires (interactions entre les spins des électrons de l'élément paramagnétique et les protons des molécules d'eau) alors que celles de la sphère externe sont considérées comme étant intermoléculaires (interactions dipolaires entre le moment magnétique de l'élément paramagnétique et le spin nucléaire des protons d'hydrogène).^{8,97} Dépendamment du type d'agent de contraste (chélates de gadolinium, macromolécules ou nanoparticules), la contribution de chaque type d'interaction varie et influence la relaxivité.

L'intérêt de l'analyse NMRD est qu'elle permet d'obtenir le profil relaxométrique de la suspension de nanoparticules. Celui-ci correspond aux valeurs de relaxivités (r_1 , r_2) mesurées à différents champs magnétiques. Les mesures de r_1 et r_2 de la suspension de Gd³⁺-DTPA-M48SNs ont été obtenues à l'aide de relaxomètres (0.015 à 40 MHz, 20 MHz et 60 MHz, 1T = 42.6 MHz) et de spectromètres RMN (300 MHz et 500 MHz).

À partir du profil NMRD, il est possible de déterminer certains paramètres contribuant aux mécanismes de relaxation en appliquant les équations de la théorie de Solomon et Bloembergen (par ex. : τ_M : le temps de résidence des molécules d'eau coordonnées, τ_S : le temps de relaxation électronique).⁹⁸ La forme du profil relaxométrique est également sujette à interprétation puisque certains de ces paramètres sont dépendants du champ magnétique. Par exemple, il est établi que les chélates de gadolinium présentent une diminution de la relaxivité pour les champs magnétiques compris entre 1 et 10 MHz, alors que les macromolécules marquées avec des chélates de gadolinium présentent plutôt un maximum autour de 20 MHz.⁸ L'étude NMRD permet ainsi de distinguer les différents systèmes d'agent de contraste (chélates, nanoparticules, etc.) et de comprendre leurs mécanismes de relaxation.

3.7.3. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

La caractérisation des matériaux par IRM consiste à imager différentes concentrations de la suspension de nanoparticules (Gd³⁺-DTPA-M48SNs) et d'observer l'effet de contraste généré. Pour ce faire, les tubes contenant l'agent de contraste sont déposés dans un support spécialement conçu afin de les maintenir immergés dans l'eau et sont imagés avec un IRM du petit animal possédant un champ magnétique de 1 T (M2M, Aspect Imaging). L'acquisition est réalisée avec une séquence d'imagerie écho de spin 2D pondérée en T_1 .

3.7.4. Compteurs de dose

Deux types de détecteurs ont été utilisés dans le cadre des expériences radioactives; la chambre à ionisation et le compteur gamma (détecteur à scintillation). La chambre à ionisation (Atomlab 100) a été utilisée lors de la procédure de chélation du $^{64}\text{Cu}^{2+}$ pour faire le suivi de l'activité en temps réel et évaluer le rendement, alors que le compteur gamma (Auto-gamma, Cobra II) a été utilisé lors des expériences *ex vivo* avec les animaux, où il a servi à mesurer l'activité présente dans les organes. Pour les deux instruments, la mesure s'effectue simplement en déposant les échantillons dans le puits de comptage.

3.7.5. Tomographie par émission de positons (TEP)

Afin de confirmer la chélation du cuivre radioactif, une série de tubes contenant différentes concentrations (15, 10, 7.5, 5 % v/v) de la suspension de nanoparticules marquées de Gd^{3+} et de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ($\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs) ont été imagés en TEP (LabPET8, Gamma Medica). Les images ont été acquises 24 h après la chélation avec un temps d'acquisition de 45 minutes et reconstruites par l'algorithme *Maximum Likelihood Estimation Method* (MLEM 3D) avec 10 itérations.

3.8. Imagerie IRM et TEP *in vivo*

Afin de bien démontrer le potentiel clinique des $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs, il était essentiel d'étudier leur distribution dans un modèle *in vivo*. Deux études d'imagerie, l'une en IRM et l'autre en TEP, ont permis de suivre la répartition des particules dans les différents organes de la souris. Étant donné que l'accès à un scanner IRM\TEP n'était pas possible (rare), les études d'imagerie ont été réalisées de façon distincte. D'abord, une première expérience d'IRM impliquant des nanoparticules marquées seulement avec du Gd^{3+} a été effectuée au Laboratoire de Biomatériaux pour l'Imagerie Médicale (Québec). Ensuite, l'étude de biodistribution en TEP a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Roger Lecompte au Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS). Pour cette seconde expérience, les nanoparticules ont été marquées à la fois avec du Gd^{3+} et du $^{64}\text{Cu}^{2+}$. Le marquage et la purification ont été effectués à Québec, puis le produit a été transporté à Sherbrooke où l'étude TEP a été effectuée. Les protocoles de ces expériences sont décrits en détail dans l'article 2 (chapitre 6).

3.9. Marquage cellulaire et visualisation en IRM des nanoparticules Mn-M48SNs

Cette section décrit la méthodologie utilisée dans le cadre des expériences de marquage des cellules P388 (cellules leucémiques de la souris) avec les nanoparticules Mn-M48SNs. Pour démontrer le réel potentiel de ces particules comme marqueur cellulaire, il est évidemment essentiel d'étudier les effets de contraste en IRM, mais il est aussi très important de réaliser les études de stabilité colloïdale, de cytotoxicité et de prolifération cellulaire. Les protocoles de ces études sont décrits en plus amples détails dans l'article 1 (chapitre 5) et dans l'annexe 4. Seuls les protocoles n'ayant pas fait l'objet d'une description dans l'article 1 sont présentés dans cette section.

3.9.1. Préparation de la suspension de nanoparticules Mn-M48SNs

La suspension de nanoparticules utilisée pour les études d'internalisation cellulaire est réalisée à partir des particules Mn-M48SNs sous forme de poudre. Ces dernières sont mises en suspension dans de l'eau nanopure à une concentration de 20 mg/mL. Afin d'assurer une mise en suspension complète, le produit est mélangé au vortex et passé aux ultrasons à plusieurs reprises avant d'être centrifugé une première fois. Cette étape a pour but d'exclure les grosses particules de la suspension. Le surnageant est alors prélevé et centrifugé afin d'éliminer les ions qui auraient pu être libérés. Cette fois-ci, le surnageant est éliminé et le culot de particules est remis en suspension dans 3 mL d'eau nanopure.

3.9.2. Étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules Mn-M48SNs dans le milieu de culture avec sérum (DMEM complet)

Il a été mentionné précédemment qu'il est très important d'étudier la stabilité colloïdale des nanoparticules dans le milieu physiologique afin de s'assurer qu'elles n'agglomèrent pas. Pour le vérifier, trois échantillons contenant des nanoparticules diluées dans le milieu de culture complet (7 % v/v) ont été produits. Le milieu de culture complet est composé de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, GIBCO) contenant 5 g/L de D-glucose, de la L-glutamine, 110 mg/L de pyruvate de sodium, 10 % de FBS inactivé (*Foetal Bovine Serum*) et 1 % d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). Cette concentration de 7 % v/v de nanoparticules correspond à la valeur la plus élevée testée dans toutes les expériences sur les cellules présentées dans ce mémoire. Les cuvettes contenant les particules ont ensuite été fermées et mises à l'incubateur (37 °C et 5 % CO₂). Un échantillon de 70 µL a été prélevé toutes les deux heures pendant 12 heures ainsi qu'à 24 heures. Des analyses de taille au DLS de ces échantillons ont permis de confirmer s'il y avait agglomération au cours du temps (voir Figure 5.14).

3.9.3. Étude d'imagerie IRM des cellules marquées avec les nanoparticules Mn-M48SNs

L'intérêt de cette étude est d'évaluer le contraste en IRM produit par les cellules P388 marquées avec différentes concentrations de nanoparticules Mn-M48SNs. Les trois concentrations testées correspondent à 2 %, 5 % et 7 % v/v (le protocole complet de cette étude est présenté dans la section 5.4.11 et dans l'annexe 4). Brièvement, les cellules sont incubées avec les nanoparticules pendant 4 h (37 °C, 95 % d'humidité et 5 % CO₂), puis rincées par centrifugation, et finalement suspendues dans la gélatine pour la visualisation en IRM.

3.9.3.1. Gélification des cellules marquées

Pour une visualisation plus homogène du contraste produit par les nanoparticules internalisées dans les cellules, ces dernières sont suspendues dans de la gélatine. Cette technique a pour avantage de limiter la formation d'artefacts d'image puisque les cellules sont dispersées de façon uniforme, et ne sédimentent pas. Ainsi l'image obtenue représente l'effet de rehaussement du signal provenant d'une concentration de cellules, et non d'un culot localisé de cellules. La procédure consiste d'abord à mélanger la gélatine (*gelatin from bovin skin*, type B) dans du DMEM (ratio de 2 % m/v). Celle-ci est alors placée dans un bain à 37 °C pour faciliter sa solubilisation. Elle est ensuite filtrée (0.2 µm) pour la stériliser, puis conservée à 37 °C afin qu'elle reste liquide (elle se solidifie en quelques minutes à la température ambiante). Après les rinçages, chaque tube contenant des cellules (2×10^6 cellules) est centrifugé une dernière fois pour obtenir un culot. Ce culot est alors suspendu dans 150 µL de gélatine et transféré dans un puits d'une plaque de 96 puits. Par la suite, quelques contrôles sont ajoutés dans les puits restants de la plaque; de l'eau nanopure, de la gélatine et les trois concentrations des suspensions nanoparticules (2 %, 5 %, 7 %). Cela permet de comparer les effets de contraste des cellules marquées avec des références qui ne contiennent pas de matériel paramagnétique (eau nanopure, gélatine), et avec certaines qui en contiennent beaucoup (suspensions de nanoparticules).

3.9.3.2. Visualisation des cellules en IRM

La visualisation en IRM des cellules marquées est réalisée avec l'IRM du petit animal (1T, M2M, Aspect Imaging). Une antenne spécialement conçue pour les plaques de 96 puits permet d'imager les cellules de façon optimale. L'acquisition des images est réalisée avec une séquence d'imagerie écho de spin 2D pondérée en T_1 . Les différences de contraste étant difficiles à détecter à l'œil nu, il est nécessaire de procéder à une analyse quantitative du signal. Pour ce faire, des régions d'intérêt sont tracées sur les puits contenant uniquement des cellules et sur ceux contenant les

cellules marquées avec les particules Mn-M48SNs (2 %, 5 %, 7 %). En traitant ces données, il est possible de quantifier l'augmentation du contraste. Trois différents temps de répétition (400 ms, 700 ms, 1000 ms) sont utilisés pour mettre en évidence visuellement le rehaussement du signal. Enfin, pour étudier la variation du contraste au cours du temps, la plaque est imagée après 1 h, 18 h et 24 h. Pour chaque point dans le temps et chaque concentration, le pourcentage d'augmentation du contraste est quantifié.

3.9.3.3. Dosage de la teneur en manganèse (Mn)

Une analyse élémentaire est effectuée pour quantifier la concentration en Mn de la suspension de nanoparticules Mn-M48SNs mise en contact avec les cellules. La même procédure de digestion que dans le cadre du dosage du gadolinium est utilisée (voir annexe 2). Toutefois, l'analyse est réalisée par spectroscopie d'absorption atomique à four au graphite (GF-AAS). Cette technique est tout à fait adaptée au dosage du Mn et moins dispendieuse que l'ICP-MS.

3.9.3.4. Préparation d'un échantillon cellulaire pour la microscopie électronique à transmission

Un échantillon cellulaire pour le TEM est produit afin de confirmer l'internalisation des nanoparticules dans les cellules. Pour ce faire, 100 µL de cellules restantes marquées avec une concentration de 7 % v/v sont prélevés et mélangés avec une solution de fixation pendant 24 h à 4 °C. L'échantillon est ensuite transféré au service de microscopie-histologie de l'Université Laval, où il est traité afin d'obtenir des coupes minces (voir section 5.4.14) qui seront observées en microscopie électronique à transmission.

Chapitre 4 – Résultats de la purification des nanoparticules par chromatographie d'exclusion stérique

Dans ce chapitre sont présentés les résultats liés au développement de la procédure de purification des nanoparticules par chromatographie d'exclusion stérique. Étant donné l'importance de cette étape dans la réalisation des expériences avec le cuivre radioactif, il est essentiel de démontrer que cette méthode est en mesure d'éliminer efficacement et rapidement les ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ résiduels. Pour ce faire, deux approches sont exposées ici. Dans un premier temps, trois exemples de chromatographie sont présentés. Ils servent à démontrer la nécessité de respecter certains paramètres essentiels à la réussite de la purification. Ensuite, l'efficacité de purification par chromatographie d'exclusion stérique est comparée à celle d'une purification par centrifugation.

4.1. Essais de purification des particules MSNs par chromatographie d'exclusion stérique

Les premiers essais de chromatographie ont été effectués à l'aide d'une colonne NAP-25 de la compagnie GE Healthcare (Figure 4.1). Celle-ci est composée de Sephadex G-25 et ses dimensions correspondent à 1.5 cm de diamètre et 5 cm de gel de hauteur. Dans un premier temps, certains paramètres comme le volume de l'échantillon, la nature et la concentration de l'éluant ont été optimisés à partir de données de la littérature. Par exemple, il est établi que le volume de l'échantillon doit se situer entre 0.5 % et 4 % du volume total de la colonne pour assurer une purification efficace.³⁸ Ensuite, la force ionique de la solution d'éluant doit être d'au moins 25 mM afin d'éviter les interactions ioniques entre le gel et les nanoparticules.³⁸

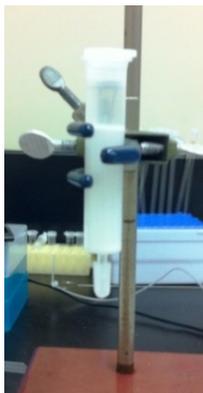


Figure 4.1. Colonne NAP-25.

La Figure 4.2 correspond au profil d'éluant d'une suspension de nanoparticules mésoporeuses marquée avec du gadolinium. 500 μ L de cette suspension ont été déposés sur la colonne NAP-25 et

l'élution a été effectuée avec une solution de 100 mM de NaCl. Aucune pompe n'a été utilisée dans ce cas-ci, seule la force de gravité assurait l'élution. Comme il a été mentionné précédemment (voir section 3.6.3), le profil d'élution est tracé en fonction du temps de relaxation (T_2) de différentes fractions d'élutions. Chaque point représente une fraction de 500 μ L.

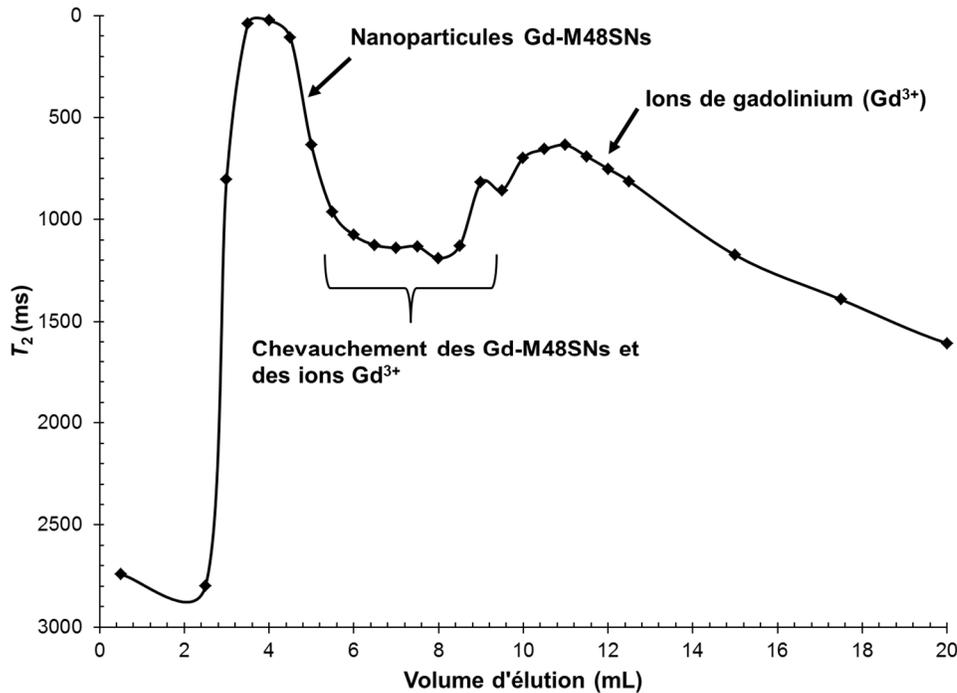


Figure 4.2. Profil d'élution d'une purification de nanoparticules Gd-M48SNs sur une colonne NAP-25.

Cet essai ne s'est pas révélé totalement concluant puisqu'il n'y a pas de séparation nette entre la sortie des nanoparticules et celles des ions de Gd. Le premier pic sur la Figure 4.2 correspond à la sortie des nanoparticules de la colonne. Une analyse DLS des fractions composant ce pic confirme la présence de nanoparticules de diamètre hydrodynamique de ~ 260 nm. On remarque ensuite que pour les fractions suivantes, les temps de relaxation augmentent légèrement pour atteindre ~ 1100 ms, puis diminuent de nouveau pour atteindre ~ 600 ms. Ce deuxième pic indique la sortie des ions de Gd. Aucune nanoparticule n'est détectée au DLS pour ces fractions. Ce profil démontre que la purification n'est pas complète puisque le pic correspondant aux nanoparticules n'est pas complètement défini. Ceci indique que les ions et les nanoparticules sont élués en même temps (même volume d'élution). La principale raison expliquant ce chevauchement est que la colonne n'est pas suffisamment longue pour permettre une séparation complète. Il n'y a pas assez de gel dans lequel les ions peuvent diffuser pour être retardés par rapport aux nanoparticules. Ainsi, il est nécessaire d'augmenter la hauteur de gel pour parvenir à purifier les particules MSNs.

Le second essai de purification présenté ici a été réalisé sur une colonne de 2.6 cm de diamètre remplie de gel Sephadex G-25 *coarse* (hauteur de 28 cm, Figure 4.3).



Figure 4.3. Colonne de chromatographie utilisée pour purifier les nanoparticules de silice mésoporeuses des ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ résiduels (modèle XK-26/40).

Pour cette expérience, 2.5 mL de suspension de nanoparticules (~ 0.65 M de Si) ont été chélatés avec du gadolinium (250 mM) puis introduits dans la colonne. Une solution saline de NaCl (100 mM) a été utilisée comme éluant et une vitesse d'éluant de 5 mL/min a été employée. Celle-ci correspond au débit recommandé par le fournisseur pour le Sephadex G-25 *coarse*.⁴⁵

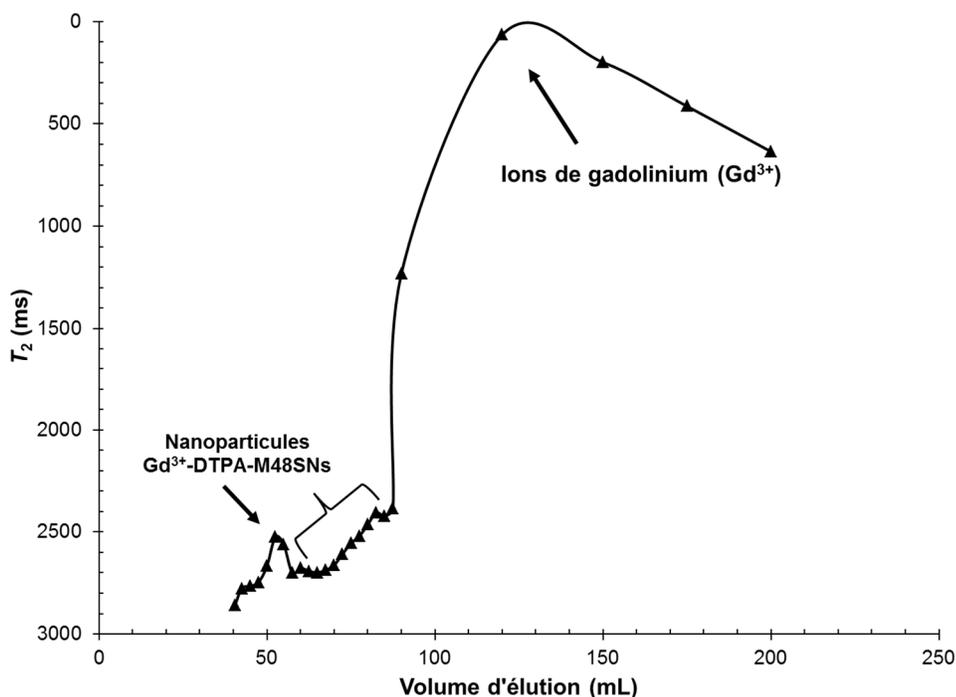


Figure 4.4. Profil d'éluant correspondant à une purification non réussie et nécessitant l'optimisation de certains paramètres (concentration et volume de la suspension).

Le profil d'élution de cette expérience (Figure 4.4) met en évidence l'importance d'optimiser les paramètres directement liés à la suspension de nanoparticules, c'est-à-dire la concentration en particules et le volume de l'échantillon. On observe sur la Figure 4.4 un très faible pic au tout début du profil d'élution (~ 50 mL), puis un deuxième pic très important à la fin (ions de gadolinium résiduels). On remarque que le temps de relaxation pour le sommet du premier pic est en dessous de 2500 ms, ce qui pourrait laisser croire qu'il n'y a pas de nanoparticules qui sont éluées de la colonne. Cependant, une analyse DLS de cette fraction a permis de confirmer la présence de nanoparticules (~300 nm). De plus, la sortie de celles-ci tout de suite après le volume mort de la colonne (48 mL) est en conformité avec la théorie de la chromatographie d'exclusion stérique. En effet, puisque les particules ne pénètrent pas à l'intérieur des sphères poreuses du gel, elles sont éluées directement. Ainsi, la raison pour laquelle les temps de relaxation (T_2) sont très longs est que la concentration en nanoparticules de la suspension est trop faible. À cela s'ajoute l'effet de dilution produit par la dispersion des particules dans la colonne. La combinaison de ces deux facteurs fait en sorte que le signal produit par les nanoparticules est trop faible pour obtenir un pic majeur sur le profil d'élution. Il est donc nécessaire d'augmenter la concentration en nanoparticules de la suspension afin d'obtenir un profil démontrant hors de tout doute la sortie des nanoparticules.

Le deuxième aspect important démontré par ce profil est l'influence du volume de l'échantillon sur la séparation entre les nanoparticules et les ions résiduels. Il est difficile de conclure avec cette expérience s'il y a réellement séparation entre les particules et les ions. En effet, en analysant au DLS les fractions comprises entre 60 mL et 90 mL, on note la présence de nanoparticules dans celles-ci (~300 nm). Ceci laisse supposer que les nanoparticules sortent sur un plus grand volume d'élution (largeur du pic) que ce qui est démontré sur le profil (premier pic). Étant donné les problèmes liés à la concentration il est difficile de le voir clairement. Dans ce cas-ci, la principale raison expliquant ce phénomène est le volume d'échantillon (2.5mL) introduit dans la colonne. Comme il a été mentionné dans la section 2.2.5.3, un volume d'échantillon élevé réduit la résolution entre les espèces puisque la dispersion dans la colonne est plus importante. Ainsi, pour éviter un élargissement du pic des nanoparticules il est préférable de réduire légèrement le volume de l'échantillon.

La Figure 4.5 présente le profil d'élution d'une purification réussie. Ce résultat a été obtenu suite à l'optimisation des paramètres mentionnés précédemment (hauteur de gel : 28 cm, concentration de la suspension : ~3 M de Si, volume de l'échantillon : 1 mL, vitesse d'élution : 5 mL/min, nature de l'éluant : 154 mM NaCl, concentration de Gd : 100 mM). La concentration de

nanoparticules est quant à elle près de 5 fois plus importante que dans l'essai précédent. La concentration de l'éluant est augmentée afin de correspondre à celle du milieu physiologique.

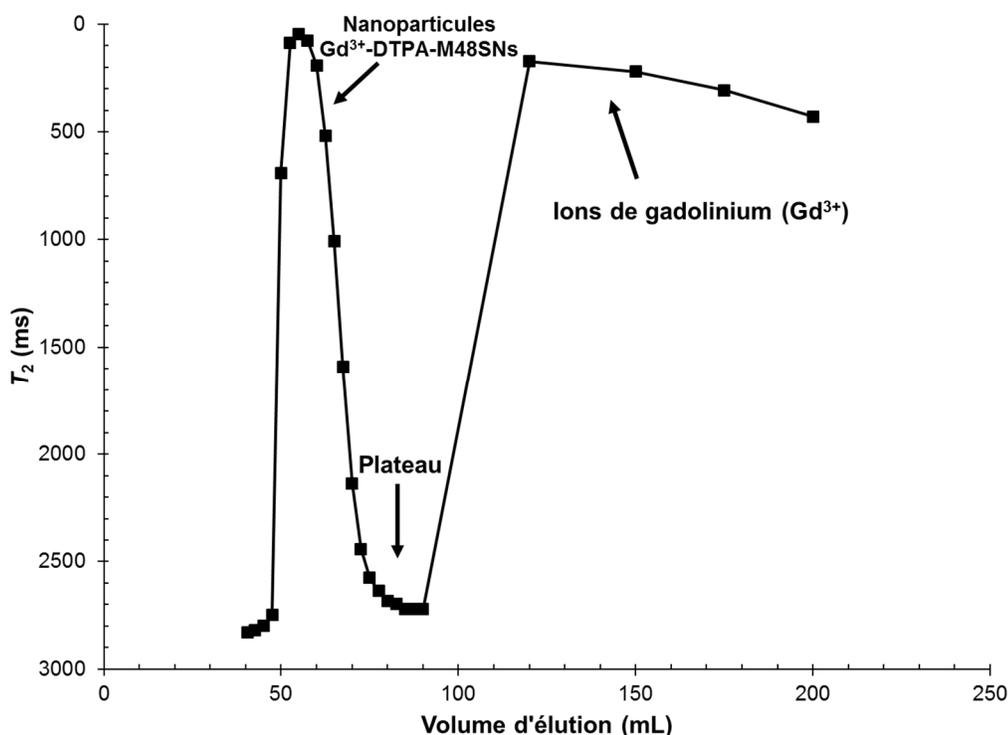


Figure 4.5. Profil d'éluant correspondant à une purification réussie.

Le profil présente un premier pic apparaissant après 48 mL et se poursuit jusqu'à 72 mL. Celui-ci correspond au volume d'éluant des nanoparticules. Trois choses permettent de le confirmer; la couleur blanche caractéristique des nanoparticules de silice mésoporeuses à la sortie de la colonne, les temps de relaxation très courts (signe qu'il y a beaucoup de matériel paramagnétique) et une analyse DLS des fractions qui démontre une taille moyenne de ~ 243 nm. Ensuite, un plateau d'au moins 15 mL est formé, les temps de relaxation étant très longs ($T_2 > 2500$ ms), cela signifie qu'il n'y a pas de matériel paramagnétique dans ces fractions. L'éluant des ions de gadolinium est finalement observée à partir d'un volume de plus de 120 mL. Ainsi, la purification est confirmée par la séparation nette entre la sortie des nanoparticules et celle des ions. Pour les études qui ont suivi ce résultat, le même profil a été observé, c'est-à-dire que les nanoparticules ont toujours été éluées entre 48 mL et 75 mL et les ions à partir de 120 mL, ce qui confirme la reproductibilité de la procédure.

À partir de ces données expérimentales, il est intéressant d'évaluer les différents paramètres qui caractérisent théoriquement la purification (le facteur de résolution, la dispersion, la symétrie et le

nombre de plateaux théoriques). Il s'agit d'une façon rigoureuse de caractériser la colonne et de comprendre le comportement des nanoparticules lors de la purification.

La résolution est calculée à partir de l'équation 4.1. Bien que la largeur du pic finale ne soit pas complète, on peut estimer que 250 mL est le volume d'élution final du gadolinium ionique, c'est-à-dire le volume correspondant à la fin de l'élution des ions. Comme il a été mentionné précédemment, le facteur de résolution pour une bonne séparation de deux pics se situe entre 1 et 1.5. Dans ce cas-ci, la valeur expérimentale calculée correspond à 1.3.

$$R_s = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})} = \frac{2(175 - 55)}{(160 + 32.5)} = 1.3 \quad (4.1)$$

V_R : Volume de rétention (mL)

w_b : Largeur des pics à la base (mL)

Ceci démontre que la séparation entre les deux espèces est suffisante pour confirmer l'élimination des ions de la suspension de nanoparticules.

La dispersion des nanoparticules lors de leur passage dans la colonne est responsable de leur volume total d'élution. En effet, 1 mL de suspension injectée dans la colonne implique que les nanoparticules vont être éluées sur un volume total de ~27 mL. Il est toutefois possible d'estimer la dispersion induite par une colonne. Selon l'équation 4.2, on calcule que la dispersion théorique (largeur de la base du pic d'élution = volume total d'élution) pour une colonne de 2.6 cm de diamètre et de 28 cm de hauteur de gel est de 28.5 mL.

$$w_b = 4(V_t) \left(\frac{2d_p}{L} \right)^{\frac{1}{2}} = 4(149) \left(\frac{2(320 \times 10^{-6})}{0.28} \right)^{\frac{1}{2}} = 28.5 \text{ mL} \quad (4.2)$$

w_b : Largeur du pic à la base(mL)

V_t : Volume total de liquide de la colonne (mL)

L : Longueur de la colonne (m)

d_p : Taille des sphères de la matrice(m)

En comparant cette valeur avec la valeur expérimentale du volume total d'élution des nanoparticules qui est d'environ ~27 mL, on remarque que les deux valeurs sont très proches. Cela signifie que les nanoparticules se dispersent dans le gel exactement comme le prévoit la théorie.

L'efficacité de la colonne est évaluée selon deux paramètres; le nombre de plateaux théoriques et la symétrie du pic. Le calcul du nombre de plateaux théoriques pour le pic des nanoparticules est donné par l'équation 4.3.

$$N = 5.54 \left(\frac{V_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{55}{18.75} \right)^2 \cong 48 \text{ plateaux} \quad (4.3)$$

V_R : Volume de rétention (mL)

$w_{1/2}$: Largeur des pics à mi-hauteur (mL)

Ensuite pour avoir le nombre de plateaux théoriques par mètre :

$$\frac{N}{L} = \frac{48 \text{ plateaux}}{0.28 \text{ m}} \cong 171 \text{ plateaux/m}$$

Suite à ce calcul, on évalue à 171 plateaux par mètre le nombre de plateaux théoriques de la colonne. Ce nombre est très inférieur à la valeur théorique idéale de 30 000 plateaux par mètre. On peut seulement conclure qu'en termes de plateaux théoriques la colonne n'est pas très efficace pour produire un pic étroit.

Le facteur de symétrie (A_s) du pic de nanoparticules est quant à lui calculé au moyen de l'équation 4.4 et correspond à une valeur de 2.5.

$$A_s = b/a = 17.5/7 = 2.5 \quad (4.4)$$

a: Première moitié de la largeur du pic à 10% de hauteur

b: Deuxième moitié de la largeur du pic à 10 % de hauteur

Il s'agit d'une valeur un peu éloignée de la valeur théorique idéale : $A_s = 1$. Elle est toutefois satisfaisante puisque le pic est bien défini.

4.2. Comparaison entre l'efficacité de la purification par chromatographie d'exclusion stérique et celle par centrifugation

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la comparaison de l'efficacité de la purification de la chromatographie d'exclusion stérique et celle de la centrifugation. L'évaluation de celle-ci est basée sur les temps de relaxation atteints après les purifications. Pour les deux suspensions purifiées, la même procédure de préparation et de marquage avec le gadolinium a été utilisée. La comparaison des deux méthodes nécessite également que la concentration finale de nanoparticules soit la même pour les deux suspensions purifiées. Pour ce faire, les nanoparticules purifiées par chromatographie d'exclusion stérique ont été concentrées jusqu'à un volume de 3 mL par concentration tangentielle alors que les nanoparticules purifiées par centrifugation (3000 g, 15 minutes) ont été mises en suspension dans 3 mL d'eau nanopure après les rinçages (7). Les concentrations de nanoparticules sont alors respectées et les temps de relaxation peuvent être comparés. Le tableau 4.1 résume les résultats obtenus pour les suspensions après purification.

Tableau 4.1. Mesures des temps de relaxation T_1 et T_2 après purification par chromatographie d'exclusion stérique/concentration tangentielle et par centrifugation

	Durée (h)	Temps de relaxation longitudinal (T_1) (ms)	Temps de relaxation transverse (T_2) (ms)
Chromatographie d'exclusion stérique/concentration tangentielle	1	61.5±0.2	33.32±0.02
Centrifugation	2	60.4±0.2	32.41±0.02

On remarque que les temps de relaxation sont pratiquement les mêmes. Ces données démontrent que les deux techniques de purification sont équivalentes en termes d'efficacité à éliminer les ions, mais la chromatographie à l'avantage d'être beaucoup plus rapide.

En conclusion, il a été démontré dans ce chapitre que malgré le fait que le principe de chromatographie d'exclusion stérique soit simple, la réussite d'une purification est dépendante de plusieurs paramètres. Ces derniers doivent être parfaitement optimisés les uns avec les autres, sans quoi la purification est vouée à l'échec. Par ailleurs, les résultats présentés ici confirment que la chromatographie d'exclusion stérique était le bon choix pour arriver à purifier rapidement et efficacement les nanoparticules de silice mésoporeuses marquées avec les ions Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$.

Chapitre 5 – Article 1

Manganese-impregnated mesoporous silica nanoparticles for signal enhancement in MRI cell labelling studies

Rémy Guillet-Nicolas ^{abcd}, Myriam Laprise-Pelletier ^{bcd}, Mahesh M. Nair ^{ab}, Pascale Chevallier ^d, Jean Lagueux ^d, Yves Gossuin ^e, Sophie Laurent ^f, Freddy Kleitz ^{*ab} and Marc-André Fortin ^{*bcd}

^aDépartement de chimie, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

Phone: +1 418-656-7812

Fax: +1 418-656-7916

E-mail: freddy.kleitz@chm.ulaval.ca

^bCentre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

^cDépartement de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

^dAxe Médecine Régénératrice, Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Québec (AMSVR-CRCHUQ), 10 rue de l'Espinay, Québec, QC G1L 3L5, Canada.

Phone: +1 418-656-8682

Fax: +1 418-656-5343

E-mail: marc-andre.fortin@gmn.ulaval.ca

^eService de physique expérimentale et biologique, Université de Mons, 20, Place du Parc, Mons, Belgium

^fService de chimie générale, organique et biomédicale, Université de Mons, Mons, B7000, Belgium

* Corresponding authors

Ce manuscrit a été soumis (8 juin 2013) et accepté (3 octobre 2013) dans le journal *Nanoscale*. Les informations supplémentaires de cet article sont présentées à la fin de ce chapitre.

5.1. Résumé

Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSNs) sont utilisées pour des applications de livraison de médicaments et de marquage cellulaire. Le Mn^{2+} étant déjà implanté comme un agent de contraste positif cellulaire dans les procédures d'imagerie préclinique (sous la forme de $MnCl_2$ pour des études neurologiques), l'introduction de Mn dans le réseau poreux des MSNs permettrait de marquer des cellules et de les suivre en utilisant l'IRM. Ces particules sont en général internalisées dans les endosomes, un environnement acide avec une très forte concentration saline. De plus, la porosité disponible des MSNs pourrait aussi servir de véhicule pour livrer des substances médicales/thérapeutiques par les cellules marquées. Dans cette étude, de l'oxyde de manganèse a été introduit dans le réseau poreux de nanoparticules de silice MCM-48 (Mn-M48SNs). Les particules possèdent une distribution de taille étroite (~140 nm de diam.) et une grande porosité (~60% vol.), et ce, après l'insertion du Mn. Les particules Mn-M48SNs ont été caractérisées par MET, physisorption d'azote (N_2) et DRX. Les caractérisations par H_2 -TPR et XPS ont démontré que le Mn(II) est le principal état d'oxydation des espèces paramagnétiques après suspension dans l'eau, fort probablement sous la forme de Mn-OOH. La stabilité colloïdale en fonction du temps a été confirmée par DLS dans l'eau, un tampon acétate et du milieu de culture cellulaire. Les données RMN n'ont montré aucune évidence de lixiviation de Mn^{2+} pour les Mn-M48SNs dans l'eau acide (pH 6), jusqu'à 96 heures après la suspension. Des valeurs de relaxivités longitudinales élevées de $r_1 = 8.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ont été mesurées à 60 MHz et 37 °C, avec le plus faible ratio relaxométrique ($r_2/r_1 = 2$) rapporté à l'heure actuelle pour un système de Mn-MSN. Des cellules leucémiques (P388) ont été marquées avec les Mn-M48SNs et l'internalisation des particules dans les cellules a été confirmée par MET. Finalement, le rehaussement du contraste en IRM produit par les cellules marquées avec différentes concentrations de Mn-M48SNs a été quantifié à 1 T. Cette étude a confirmé la possibilité d'introduire efficacement du Mn à l'intérieur des M48SNs en utilisant l'imprégnation, et ce, en maintenant la porosité ouverte et un volume poreux relativement élevé. Étant donné que les M48SNs marquées avec du Mn démontrent de fortes propriétés de contraste positif à faible concentration, elles sont potentiellement appropriées pour des procédures de marquage cellulaire et de livraison de médicaments.

5.2. Abstract

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) are used in drug delivery and cell tracking applications. As Mn^{2+} is already implemented as a “positive” cell contrast agent in preclinical imaging procedures (in the form of MnCl_2 for neurological studies), the introduction of Mn in the porous network of MSNs would allow labelling cells and tracking them using MRI. These particles are in general internalized in endosomes, an acidic environment with high saline concentration. In addition, the available MSN porosity could also serve as a carrier to deliver medical/therapeutic substances through the labelled cells. In the present study, manganese oxide was introduced in the porous network of MCM-48 silica nanoparticles (Mn–M48SNs). The particles exhibit a narrow size distribution (~140 nm diam.) and high porosity (~60% vol.), which was validated after insertion of Mn. The resulting Mn–M48SNs were characterized by TEM, N_2 physisorption, and XRD. Evidence was found with H_2 -TPR, and XPS characterization, that Mn(II) is the main oxidation state of the paramagnetic species after suspension in water, most probably in the form of Mn–OOH. The colloidal stability as a function of time was confirmed by DLS in water, acetate buffer and cell culture medium. In NMR data, no significant evidence of Mn^{2+} leaching was found in Mn–M48SNs in acidic water (pH 6), up to 96 hours after suspension. High longitudinal relaxivity values of $r_1 = 8.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ were measured at 60 MHz and 37 °C, with the lowest relaxometric ratios ($r_2/r_1 = 2$) reported to date for a Mn–MSN system. Leukaemia cells (P388) were labelled with Mn–M48SNs and nanoparticle cell internalization was confirmed by TEM. Finally, MRI contrast enhancement provided by cell labelling with escalated incubation concentrations of Mn–M48SNs was quantified at 1 T. This study confirmed the possibility of efficiently confining Mn into M48SNs using incipient wetness, while maintaining an open porosity and relatively high pore volume. Because these Mn-labelled M48SNs express strong “positive” contrast media properties at low concentrations, they are potentially applicable for cell tracking and drug delivery methodologies.

5.3. Introduction

In recent years, magnetic resonance imaging (MRI) has emerged as one of the most promising modalities enabling cell tracking *in vivo*.⁹⁹ Images of high anatomical resolution and excellent contrast in soft tissues are possible with MRI, without using ionizing radiation. As such, MRI is an optimal choice for preclinical and clinical studies where the precise detection and biodistribution of injected cells over time are mandatory.⁹⁹ For this, the cells must be labelled with contrast agents (CAs) prior to injection, in order to allow their visualization.

One of the most common CAs is iron-containing particles (SPIOs and USPIOs for example). They have been used for cell tracking in MRI since the beginning of the 1990s.^{70,100,101} Because these superparamagnetic particles produce hypointense regions in MR images, i.e. strong signal attenuation due to T_2 shortening and T_2^* effects, they are designated as “negative” CAs. Despite their indisputable advantages, T_2/T_2^* CAs suffer from limitations that prevent their use in many cell tracking applications.^{71,102-104} Indeed, it is sometimes difficult to accurately distinguish iron oxide-labelled cells from other sources of hypointense regions such as blood clots, tissue–air interfaces or calcification areas.⁷¹ Additionally, they usually induce magnetic susceptibility artefacts, which extend far beyond the volume of the labelled cells,¹⁰²⁻¹⁰⁴ ultimately complicating cell tracking and quantification based on contrast differences. On the other hand, “positive” CAs (T_1 -weighted), in spite of their lower intrinsic detection sensitivity limits, are less prone to image artefacts.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Such systems now represent a promising alternative to iron oxide particles for the MRI detection of thousands of cells injected, or accumulated, in a focal point *in vivo*.

A vast majority of positive MRI CAs are based on Gd^{3+} .^{14,96} This paramagnetic rare-earth metal efficiently generates hyperintense regions in MR images by dramatically shortening the longitudinal relaxation time (T_1) of neighbouring protons. Most of the Gd-based contrast agents are based on small Gd chelates which are not efficiently internalised or retained by cells.^{13,108,109} Therefore, alternatives to Gd chelates have been developed in the form of Gd-containing nanocrystals (Gd_2O_3 , GdF_3 , $(Na/K)GdF_4$, $GdPO_4$, etc.).¹¹⁰⁻¹¹⁶ Cells labelled with Gd-based nanocrystals can be implanted and efficiently detected by MRI. Image artefacts were not reported with such nanoparticles used for “positive contrast” in T_1 -weighted cell tracking procedures. In fact, contrast differences based on signal enhancement could be more quantitative than the susceptibility-induced negative contrast generated by SPIOs and USPIOs.

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) have been extensively used in nanomedicine and are emerging as promising drug delivery vectors.^{59,117-119} Adequately labelled with paramagnetic ions,

they can be exploited in theranostic applications.^{59,117-121} They exhibit high porosity, high specific surface area, and tailored pore morphologies. They also express versatile inner and outer surface characteristics enabling different grafting procedures. MSNs are also very well tolerated by cells.^{59,67,117,121} Mesoporous silica layers have been successfully used to coat magnetic nanoparticles, while preserving a certain interaction of hydrogen protons with the paramagnetic ions.¹²²⁻¹²⁵ Gd ions were also grafted in MSNs, and the relaxometric properties of such constructs were characterized.^{85,92,126-129} Gd-MSNs have thus been proposed for cell tracking applications using MRI.⁷²⁻⁷⁴ However, the ion Gd³⁺ is associated with the occurrence of nephrogenic systemic fibrosis (NSF),¹³⁰ and concerns related to this disease have led to a resurgence of interest in Mn²⁺-based contrast agents.

Mn²⁺ has been used since the inception of MRI.^{131,132} The magnetic moment of Mn²⁺ (5 unpaired electrons on the 3d orbital) is lower than that of Gd³⁺ (7 unpaired electrons on the 4f orbital). However, Mn²⁺ is less toxic than the lanthanide, and the presence of Mn²⁺ in tissues is acceptable below certain toxicity thresholds, i.e. a serum concentration of 0.5–1.2 μg L⁻¹ is essential for normal development and body function.¹³³ In fact, the ion Mn²⁺ is currently used as a contrast agent for neurological applications,¹³⁴ and for cell labelling studies.¹³⁵ In this latter application, both the nature and the concentration of the Mn-based CAs internalized by the cells are of prime importance as they are susceptible to affect cellular proliferation and viability. Noticeably, MnO nanocrystals were shown to be safer than MnCl₂ salts at cellular concentrations required to reach T₁-weighted MRI detection thresholds.¹³⁵ Nevertheless, very few studies have so far been reported on the integration of Mn²⁺ ions in MSNs, for the purpose of enhancing the contrast of silica colloids for MRI. The first attempt to graft Mn²⁺ ions in silica mesopores was performed using an in situ chemical oxidation–reduction process.⁶⁵ After calcination and H₂ reduction, the Mn-MSNs were suspended in water. The longitudinal and transversal relaxivities at 3.0 T (r₁ = 2.28 and r₂ = 15.9 mM⁻¹ s⁻¹, respectively), were much lower compared to Gd-labelled MSNs.^{85,92,126-129} By using a similar synthesis approach for confining Mn species into the mesopores of hollow mesoporous silica nanoparticles (HMSNs), Shi and co-workers reported a rather low chemical stability for these systems.⁷⁶ The release of free Mn²⁺ ions was quickly observed under weak acidic conditions, as typically found in endosomes or in the microenvironment of tumours. Such leaching was found responsible for significantly enhancing the performance of Mn-HMSNs as positive MRI CAs. Relaxometric properties of the system in slightly acidic pH (r₁ = 8.81 mM⁻¹ s⁻¹ and r₂ = 51.9 mM⁻¹ s⁻¹) increased noticeably compared to those in a physiological pH (r₁ = 0.79 mM⁻¹ s⁻¹ and r₂ = 27.7 mM⁻¹ s⁻¹, r₂/r₁ = 35).

The performance of MRI CAs is also characterized by the r_2/r_1 ratio, which must be as close as possible to 1 for positive contrast (in T_1 -w. imaging). Until now, in the best cases, r_2/r_1 close to ~ 6 was measured for Mn-MSNs.^{65,76} Therefore, the relaxometric properties of Mn-grafted MSNs must still be improved substantially, to allow efficient tracking of MSNs by MRI in cellular labelling, drug delivery, and other theranostic applications. Also, more insights into the chemical and colloidal stability of paramagnetic oxides/silicates-MSNs are required before considering a safe use as MRI positive CAs. With the entry of MSNs in the pre-clinical development stage for biomedical applications, addressing safety issues associated with their use is urgently needed.¹³⁶ A few previous studies have described Mn-impregnated mesoporous silica materials.^{65,76,137-141} However, the stability of Mn grafted in the porous network of MSNs, and suspended in water, has never been comprehensively characterized. Aqueous stability is a critical aspect of this technology. Moreover, advanced relaxometric study of Mn-labelled MSNs is still needed, to evaluate the true potential of such products for “positive” contrast in T_1 -weighted MRI applications.

In order to address the above issues, we here report on the synthesis, characterization and stability assessment of highly porous Mn-MSNs with a 3-D mesostructure (MnSi_xO_y-MSNs). The resulting Mn-M48SN particles were characterized in terms of porosity, structure and composition by nitrogen physisorption at 77 K, transmission electron microscopy (TEM), powder X-ray diffraction (XRD), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and temperature-programmed reduction (H₂-TPR). In addition, a comprehensive investigation of the colloidal stability of the system was performed in ultrapure water (pH 6) and acid buffers (pH 5), up to 96 hours. The relaxometric performance of the particle suspensions, as well as potential leaching of Mn²⁺ ions, were measured and studied. Most importantly, NMRD profiles were obtained at varying magnetic field strengths and as a function of the soaking time in different buffers. P388 leukaemia cells were labelled with Mn-MSNs, their viability was assessed, and the MRI contrast enhancement obtained in T_1 -w. MRI was evaluated. Finally, labelled cells were imaged by MRI. Contrast enhancement over time was used to demonstrate the potential of Mn-M48SNs for cell tracking in T_1 -w. MRI.

5.4. Experimental section

5.4.1. Materials

n-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, 99%), Pluronic F127 (EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆, BioReagent) and tetraethylorthosilicate (TEOS, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich, Canada. Manganese nitrate hydrate, Mn(NO₃)₂·xH₂O (99.9%, x = 4–6), was purchased from Alfa Aesar,

Canada. All other chemicals and solvents were of analytical grade and were used without further purification unless otherwise specified.

5.4.2. Synthesis of MCM-48 nanoparticles

MCM-48 mesoporous silica nanoparticles (M48SNs) with a 3-D cubic network of pores were synthesized according to a published protocol.¹⁴² In a typical synthesis, 1.0 g of CTAB and 4.0 g of Pluronic F127 were dissolved in 298 mL of H₂O/NH₃/EtOH (NH₄OH(aq.) (2.9 wt %)/EtOH = 2.5/1 (v/v)). A clear homogeneous solution was obtained and then 3.6 g of TEOS was added at once to the mixture, which was stirred at high speed for 1 min. The reaction mixture was further kept for 24 h under static conditions in a capped polypropylene bottle at room temperature. The resulting white, solid material was isolated by centrifugation at 15 300 g for 25 min, re-dispersed twice in 200 mL of deionized water, isolated again by centrifugation and dried overnight in air at 70 °C. Finally, M48SNs were calcined at 550 °C (heating ramp was 1 °C min⁻¹) for 5 hours under air atmosphere.

5.4.3. Modification of M48SNs with Mn

Manganese ions were inserted in the porous network of M48SNs using the incipient wetness technique. In brief, 2.0 g of M48SNs, previously degassed overnight at 150 °C, were impregnated with anhydrous EtOH containing 4 mmol (1148 mg) of manganese nitrate hydrate. The impregnation required 1280 µL of EtOH, corresponding to 80% of the pore volume (based on N₂ physisorption measurements of the pristine M48SNs). Then, the materials were dried overnight under air at 40 °C and calcined at 500 °C with a 1 °C min⁻¹ ramp also under air atmosphere. Materials were further left for 5 hours at 500 °C. In a subsequent step, Mn–M48SNs were reduced at 500 °C using a 1 °C min⁻¹ ramp under H₂ (5%)/N₂ (95%) atmosphere during 5 hours. Materials loaded with manganese are referred to as Mn–M48SNs in the following.

5.4.4. Transmission electron microscopy (TEM)

M48SNs and Mn–M48SNs were left in ultrapure water for 0, 24, 48 or 96 hours at room temperature, and then dried. Samples of dried nanoparticles were quickly dispersed in methanol under ultra-sound, and deposited dropwise on a carbon-coated copper grid for TEM analysis using a Jeol JEM-1230 operated at 80 keV. Samples of nanoparticles dispersed in a cell culture medium were also embedded in resin (see Section 5.4.14), and then sliced into 60 nm layers, prior to observation at 200 keV (Jeol JEM-2100F).

5.4.5. X-ray diffraction (XRD)

Low- and wide-angle powder XRD measurements of M48SNs and Mn-M48SNs were performed with a Siemens D5000 (reflection, θ - θ configuration; CuK α : $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$; 40 kV; 30 mA; 1–55° 2 θ , step size: 0.02 2 θ ; 0.02 s per step). The Jade (v 2.1) software coupled with JCPDS and ICDD (2001 version) databases was used to analyse the XRD data.

5.4.6. Porosity measurements

Nitrogen adsorption–desorption isotherms were measured at liquid nitrogen temperature (77.3 K) using a Micromeritics ASAP 2010 volumetric adsorption analyser (Norcross, GA, USA). Prior to analysis, samples were degassed at 200 °C under a turbo molecular vacuum for at least 12 h. The Brunauer–Emmett–Teller (BET) equation was used to calculate the apparent surface area from adsorption data obtained at P/P₀ between 0.05 and 0.2. Total pore volume was estimated using the Gurvitch rule from the amount of nitrogen adsorbed at P/P₀ = 0.95, assuming that adsorption on the external surface was negligible compared to adsorption in pores. Pore size distributions were determined by using non-local density functional theory (NLDFT) methods considering sorption of nitrogen at 77.3 K in cylindrical silica pores.^{143,144} The implemented NLDFT models were supplied by the Quantachrome Autosorb 1.55 software (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, USA).

5.4.7. Physicochemical surface analysis

To assess the binding state of O, Si, C and Mn, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was performed with a PHI 5600-ci spectrometer (Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA). The main XPS chamber was maintained at a base pressure of $<8 \times 10^{-9}$ Torr. A monochromatic aluminium X-ray source (Al K $\alpha = 1486.6 \text{ eV}$) at 200 W was used to record survey spectra (1400–0 eV) with charge neutralization, and the high-resolution spectra were obtained using a standard magnesium X-ray source (1253.6 eV) at 150 W with no charge neutralization. The detection angle was set at 45° with respect to the normal of the surface and the analysed area was 0.016 cm². High-resolution analyses were performed on the O (1s), Si (2p) and Mn (2p) peaks and the binding energy scale of the spectra was aligned on the C (1s) peak at 285 eV. Curve fittings for the high-resolution peaks were determined using the PHI software.

5.4.8. Temperature-programmed reduction by hydrogen (H₂-TPR)

The Mn oxidation state was probed by H₂-TPR using an RXM-100 multi-catalyst testing and characterization system from Advanced Scientific Design Inc. In a typical experiment, 50 mg of Mn–M48SNs were placed in a quartz reactor and pre-treated at 500 °C for 1 h with a ramp of 5 °C min⁻¹ under a helium flow of 20 mL min⁻¹. The sample was then allowed to cool down to room temperature under the same gas flow. Finally, TPR was carried out under a 10 mL min⁻¹ flow rate of 5% H₂ in Ar. The temperature was increased from 25 to 700 °C with a ramp of 5 °C min⁻¹. The consumption of hydrogen was monitored by TCD.

5.4.9. Colloidal suspensions of Mn–M48SNs

Aqueous colloidal suspensions of Mn–M48SNs were prepared by dispersing 200 mg of Mn–M48SNs in 10 mL of ultrapure water (vortex shaking for 2 min followed by 30 min treatment in an ultrasonic bath at room temperature (RT), repeated twice). The opaque suspension was then centrifuged at 500 g for 10 min. Only the supernatant was collected (8 mL) and used for further characterization. A fraction of the nanoparticles agglomerates in the calcination step (Section 5.4.3), and cannot be suspended in water. We estimated the weight fraction of suspended particles to be 20–30% of the initial 200 mg of Mn–M48SNs. However, from the collected supernatant, the particles formed a very stable colloidal suspension (Figure 5.14), without evidence of sedimentation.

The hydrodynamic diameters and the colloidal stability of the suspended Mn–M48SNs were assessed by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Malvern DTS Nano zetasizer 173° (equilibration time set to 3 min; 3 measurements taken on each sample; only quality criteria data accepted as valid results). Mn–M48SNs were also suspended and characterized in an acetate buffer (20 mM, pH 5) following the same procedure described above. Finally, static DLS measurements (described above) were compared with “dynamic” DLS measurements. For this, suspensions prepared as previously described were kept for $t = 3$ h, 24 h, and 48 h, then centrifuged (400 g, 10 min), and re-suspended in fresh ultrapure water or in an acetate buffer (pH 5), prior to DLS measurements.

5.4.10. Relaxometric analyses

¹H relaxometry. Dilutions of Mn–M48SN aqueous suspensions were prepared with ultrapure water (100, 50 (1:2), 25 (1:4), and 10% (1:10) (v/v)) and distributed in 10.0 mm NMR tubes. Longitudinal and transversal relaxation times (T_1 and T_2) were measured with a dedicated TD-NMR

relaxometer (Bruker Minispec 60 mq, 60 MHz (1.41 T), 37 °C). To calculate the relaxivities, the amount of Mn in the aqueous suspensions was precisely measured by graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GF-AAS; Perkin-Elmer Analyst 800). Prior to elemental analysis, dried samples of each suspension were digested overnight at 80 °C in HNO₃ (trace metal, Fisher Scientific A509–500). Solutions were then centrifuged, and the supernatant was diluted several times with Nanopure water. Relaxation rates ($1/T_1$ and $1/T_2$) were plotted against Mn concentration values and relaxivities (r_1 and r_2) were obtained by applying a linear regression of this plot. T_1 and T_2 of 100% (v/v) Mn–M48SNs suspended in acid buffers were also measured to evaluate the extent of leaching of Mn ions at pH = 5. For this, the suspensions were treated as described in Section 5.4.9 (“dynamic” measurements), prior to T_1 and T_2 measurements.

NMRD profiles. Longitudinal relaxivities (r_1) were measured on 100% (v/v) Mn–M48SN suspensions from 0.015 to 40 MHz with a Stelar fast field cycling relaxometer (Mede, Italy) set at 37 °C.

5.4.11. Cell labelling studies

For cell labelling studies, the suspensions of Mn–M48SNs were prepared by dispersing 75 mg of Mn–M48SNs in 3.75 mL of ultrapure water (vortex shaking for 2 min followed by 30 min treatment in an ultrasonic bath at RT, repeated twice). The suspension was then centrifuged at 1000 g for 10 min. The supernatant was collected (3 mL) and centrifuged at 4300 g for 10 min. The supernatant was discarded, and the particles were suspended in 3 mL of ultrapure water.

P388 leukaemia mouse cancer cells were maintained in a Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), in T-75 flasks, until they reached ~80% confluence. Before incubation with the nanoparticles, the cell concentration was adjusted to 2×10^6 cells per mL in complete Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with D-glucose (4.5 g L^{-1}), L-glutamine, sodium pyruvate (110 mg L^{-1}), 10% inactive fetal bovine solution (FBS), and 1% streptomycin–penicillin (all products from GIBCO were used). For MRI studies, cells were maintained in Falcon tubes at 2×10^6 cells per tube. For the cell proliferation assays and experiments requiring prolonged incubation times (up to 24 h), concentrations of 6×10^5 cells per tube were used. Solutions were prepared by diluting 100% (v/v) Mn–M48SN stock colloidal suspensions with complete DMEM (1:14.3, 1:20, and 1:50 (v/v)). The cells were incubated at 37 °C in humidified 95% air/5% CO₂ with these solutions (2 mL per tube). For MRI studies and proliferation assays, cells were incubated for 4 hours with Mn–M48SNs. To avoid sedimentation of the cells, tubes were gently stirred every 20 minutes. To assess the viability of cells submitted to prolonged incubation with Mn–M48SNs,

incubation times of 12 h and 24 h were used. Each cell culture condition was performed at least in quadruplicate. Incubation with complete DMEM was used as a control. After incubation, the cells were stained with Trypan blue and counted (number and viability) with an automated cell counter (Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) within the first 20 minutes after harvest. The cells were centrifuged (400 g, 5 min), and suspended in 2 mL of complete DMEM. This procedure was repeated three times. Labelled cell suspensions were also sampled for TEM cell analysis. The remaining cells were suspended in 2% (w/v) gelatine (150 μ L, bovine skin type B gelatine/serum-free DMEM) and distributed into 96-well plates prior to MR imaging.

5.4.12. Magnetic resonance imaging (MRI)

Plates containing contrast media and labelled cells suspended in gelatine were imaged with a 1.0 T preclinical MRI scanner (ASPECT Imaging, Netanya, Israel), using a custom-built microplate coil. A T_1 -weighted 2D-spin echo sequence was used, with the following parameters: TE/TR = 11.2/400 ms; $f\alpha = 90^\circ$; FOV = 70 mm; 1.0 mm slices, 200×200 ; 3 excitations; 4 min acquisition time.

5.4.13. Contrast quantification

The contrast in MR images was quantified using the following equation:

$$\text{Contrast} = \frac{2(S_2 - S_1)}{S_2 + S_1} \quad (5.1)$$

where S_1 is the signal from a region of interest (ROI) drawn over the cell culture well containing non-labelled cells embedded in gelatine, and S_2 is the signal from the ROI of cells labelled with Mn-M48SNs, embedded in gelatine and imaged as described in Section 5.4.12.

5.4.14. TEM cell study

To visualize cell internalization of Mn-M48SN particles, 100 μ L of the cell suspension was fixed for 24 h at 4 $^\circ$ C with 2.5% glutaraldehyde after treatment with a 0.001 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3). The samples were dehydrated in a graded series of ethanol solutions, and embedded in Poly/Bed 812 epoxy resin (Polysciences Inc., Warrington, PA). Thin sections were processed and visualised using a JEOL JEM-2100F TEM system operated at 200 keV.

5.5. Results and discussion

5.5.1. Synthesis and porosity characterization of Mn-M48SNs

M48SN nanoparticles were synthesized according to a previously reported protocol.¹⁴² The mesoporous particles were then impregnated with manganese nitrate dispersed in ethanol, followed by calcination and reduction at 500 °C allowing the synthesis of a Mn-containing phase inside the interwoven mesoporous channels of the M48SNs (Figure 5.1). The resulting particles were deposited on TEM grids and imaged at 80 keV (Figure 5.9 a and Figure 5.10). TEM images of dried Mn–M48SNs revealed non-aggregated, well-defined and uniform spherical particles, with an average particle size of ~140 nm (Figure 5.9 d and Figure 5.10). Furthermore, samples of Mn–M48SN particles embedded in polymer resin, sliced at 60 nm and imaged (Figure 5.1 c), showed indications that electron beam-attenuating elements (i.e., Mn) are located inside the silica particles and not only at their surface. The particles have also been visualised following different water soaking periods (Figure 5.1 a and Figure 5.9 b and c). Both as-synthesized and water-dispersed Mn–M48SN particles revealed individualised nanoparticles of similar diameters and morphology. The outer surface of Mn-M48SNs was apparently not significantly affected by the impregnation step nor by the repeated thermal treatments. Moreover, no bulk manganese oxide particles were observed outside of the pores indicating the successful sequestration of Mn species inside the M48SNs. Low-angle X-ray diffraction (XRD) patterns of the Mn–M48SNs were characteristic of materials with mesoscopic order. The diffraction pattern of the M48SNs is commensurate with the body-centered cubic *Ia3d* symmetry (Figure 5.11). A noticeable loss in intensity and a slight shift of the main peak to higher 2θ values were noted in the low-angle X-ray diffraction patterns for the Mn-loaded materials compared to the pristine host. After thermal reduction, no evidence was found of wide-angle XRD peaks corresponding to crystalline MnO or Mn silicates. This might be due to the amorphous nature of the Mn species or very fine crystallite sizes, which could be too small to be discriminated by this technique.

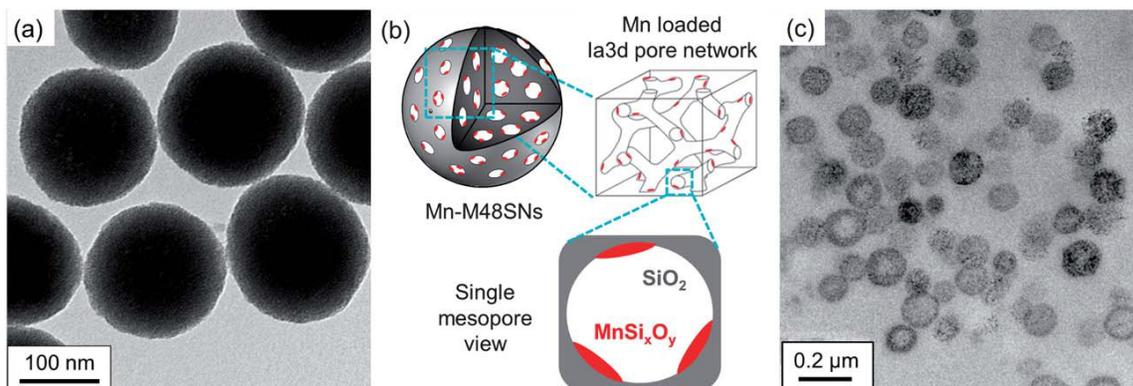


Figure 5.1. (a) TEM images (80 keV) of Mn–M48SNs after thermal reduction treatment, and suspension in water for 3 h; (b) schematic representation of Mn–M48SNs; the 3-D mesopore network shows accessible porosity after impregnation with Mn and thermal treatments; and (c) TEM image of Mn–M48SNs embedded in a polymer resin, sliced at 60 nm and imaged at 200 keV.

After thermal reduction, Mn–M48SNs showed a typical type IV isotherm with a steep capillary condensation step, characteristic of an excellent quality mesoporous material with uniform mesopore size (Figure 5.2 a). Although the treatment with manganese did not cause obstruction of the pores, a marked decrease in all porosity features was observed for Mn–M48SNs compared to the pristine M48SNs (Table 5.1, Figure 5.2). Indeed, the BET apparent specific surface area decreased from 1841 to 1365 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, the total pore volume decreased from 0.84 to 0.67 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ and a slight decrease of the pore size was also observed, i.e. from 3.0 nm for M48SNs to 2.9 nm for Mn–M48SNs (Figure 5.2 b and Table 5.1), possibly caused by very thin layers of Mn species inside the pores. Similar observations were previously made in the case of Gd–M48SN analogues.⁹²

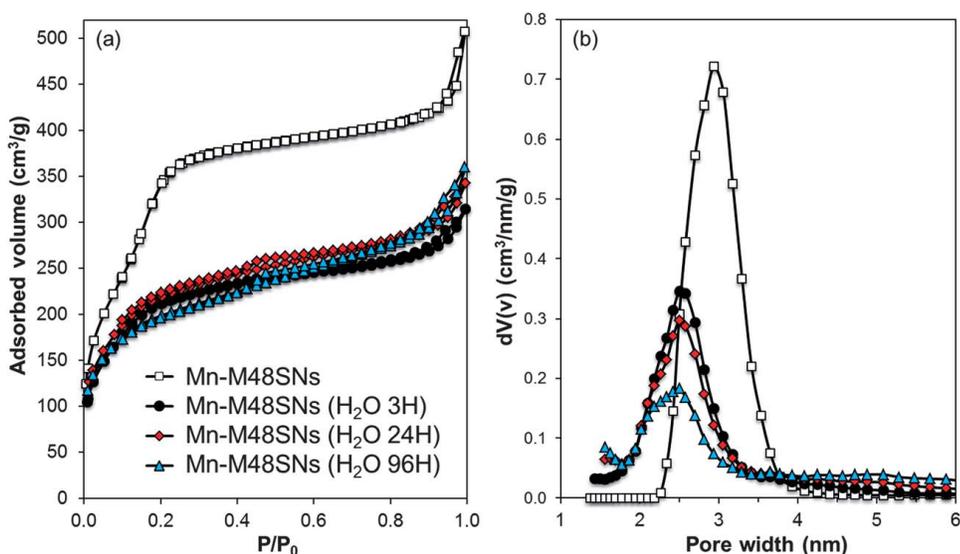


Figure 5.2. (a) N_2 at 77 K adsorption/desorption isotherms and (b) corresponding NLDFT pore size distributions (from the adsorption branch) obtained for Mn–M48SNs after thermal reduction treatment and suspension in H_2O for various times.

Table 5.1. Textural properties of M48SNs and Mn–M48SNs suspended in nanopure water for various times

Sample	BET specific surface area ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Pore volume ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	NLDFT ads. pore size (nm)
M48SNs	1841	0.84	3.0
Mn–M48SNs	1365	0.67	2.9
Mn–M48SNs (H ₂ O 3H)	805	0.44	2.6
Mn–M48SNs (H ₂ O 24H)	814	0.47	2.6
Mn–M48SNs (H ₂ O 96H)	723	0.48	2.5

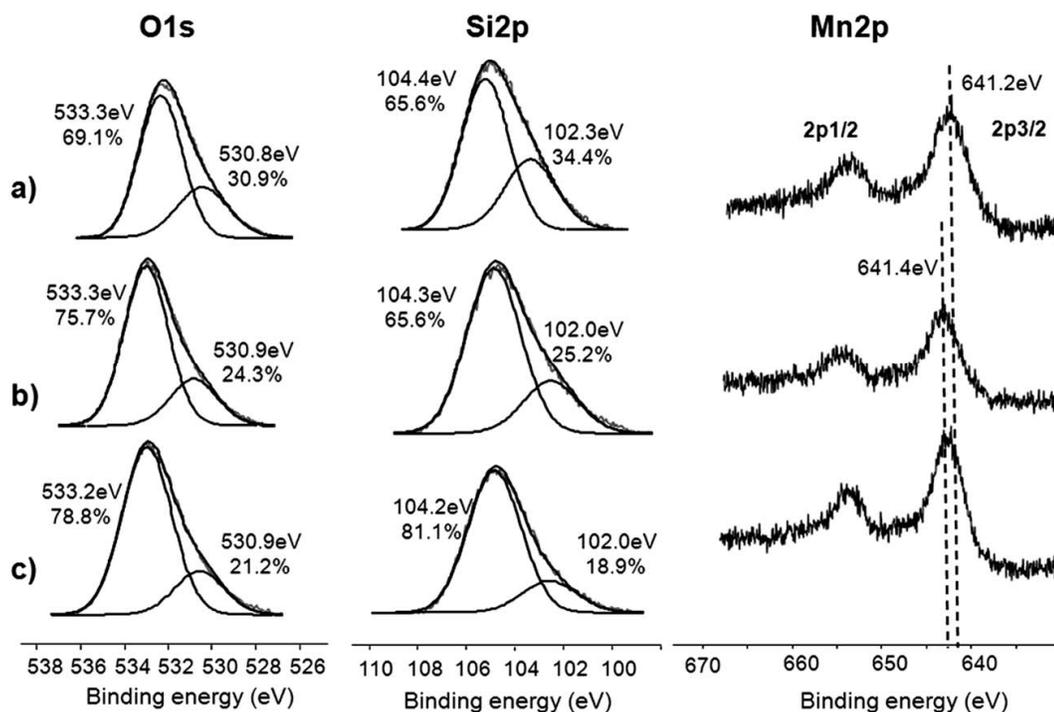
The size of Mn–M48SN particles was not significantly affected after soaking in water for prolonged times (up to 96 h). In particular, the particle size distributions extracted from the TEM results (Figure 5.9 d) after 24 h and 96 h of soaking were almost identical. However, the low-angle XRD patterns obtained for the Mn–M48SN particles soaked for 96 hours and dried did not show the peaks characteristic of the *Ia3d* symmetry. Also, a significant and progressive decrease in the signal-to-noise ratio was noted, indicating deterioration of the pore structure in aqueous media, which is in line with previous studies.^{59,145,146} Based on the textural properties of the particles (Table 5.1) and the N₂ adsorption/desorption measurements (Figure 5.2), it is clear that soaking in water has an immediate impact on the pore volume and the specific surface area. The pore volume of the particles decreased from 0.67 cm³ g⁻¹ to ~0.45 cm³ g⁻¹ after suspension in water. Between 3 h and 96 h however, no significant change in pore volume was noted. The only two indications of a structural change after prolonged soaking in water was noted by low-angle XRD (Figure 5.11), as well as TEM in Figure 5.9 c (after 96 h), in which the particles have a more “sponge-like” appearance. The possible degradation of mesoporous silica nanoparticles in aqueous media has previously been documented.^{59,145,146} Overall, in the present case, TEM and porosity measurements tend to confirm the adequate hydrolytic stability of the Mn–M48SN particles in aqueous suspensions.

5.5.2. Surface characterization and state of Mn in Mn–M48SNs

XPS. The elemental compositions of Mn–M48SNs were analysed by XPS (Table 5.2 and Figure 5.3). The composition of Mn–M48SNs in water remained unchanged up to 24 h. After 96 h however, a slight decrease in Si was noted, as well as an increase in Mn. This observation, coupled with the evidence of MSN surface degradation shown by TEM visualisation, suggests that Mn is not located at the outer surface of as-synthesized Mn–M48SNs, but rather distributed inside the mesopore network. The increase of Mn after 96 h could also indicate the re-deposition of Mn–OOH species on the outer surface of particles, upon prolonged incubation in aqueous media. In fact, Mn (II, III, IV) oxides occur in numerous phases of variable structures that are enabled by the ability of their building unit, Mn(O,OH)₆ octahedra, to form infinite layers and three-dimensional structures. Several of these structures contain freely accessible interlayer spaces of various sizes, which could promote interactions with H₂O molecules.¹⁴⁷ As for any MSN system in aqueous media, a large content of Si–OH groups is also expected. Hydroxylation of MSN surfaces could explain the difference in O/Si ratios from a theoretical ratio of 2, to the slightly higher values observed with the materials investigated in the present study.

Table 5.2. Elemental contents of the particles (XPS)

Sample	% C	% O [O1 – 533.3 eV] (O2 – 530.8 eV)	% Si [Si1 – 104.4 eV] (Si2 – 102.0 eV)	O/Si [O1/Si1] (O2/Si2)	% Mn
Mn–M48SNs (H ₂ O 3H)	11.3	62.3 [43] (19.3)	24.7 [16.2] (8.5)	2.52 [2.65] (2.27)	1.6
Mn–M48SNs (H ₂ O 24H)	11.8	62.0 [46.9] (15.1)	24.8 [18.5] (6.3)	2.50 [3.10] (2.40)	1.4
Mn–M48SNs (H ₂ O 96H)	12.3	61.5 [48.5] (13.0)	23.6 [19.1] (4.5)	2.61 [2.54] (2.89)	2.6

**Figure 5.3.** O, Mn and Si high-resolution XPS spectra of (a) Mn–M48SNs after thermal reduction treatment and suspension in H₂O for (b) 3 h, (c) 24 h and (d) 96 h.

To further investigate the chemical environment of each species, high-resolution spectroscopy on O (1s), Si (2p) and Mn (2p), was performed. First, both O (1s) and Si (2p) were deconvoluted in 2 bands: one due to silica structure (533.3 eV and 104.4 eV respectively) and the other one from Mn–O–Si (530.9 eV and 102.0 eV).¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ This observation is consistent with previous results from our group, reported for a Si–O–Gd system,⁹² and points to the presence of thin manganese silicate domains inside the pores (as schematically represented in Figure 5.1 b). However, it should be noted that the silicon peak characteristic of mesoporous silica was slightly shifted to higher energies compared to literature data (from ~103.8 to 104.4 eV in this study). We attribute this observation to the treatment performed in an aqueous environment, which could lead to a certain charge effect.

The Mn (2p_{3/2}) feature centered at 641.2 eV matched with the typical binding energy of the metal-silicate (Mn–O–Si).¹⁵¹ This peak was slightly shifted to higher energy, 641.4 eV, upon aging in water. Liu et al. have associated the Mn (2p_{3/2}) centered at 641.6 eV with Mn–OOH species.¹⁵²

Therefore, it could be hypothesized that the initial Mn–O–Si at 641.2 eV was gradually transformed in Mn–OOH leading to a chemical shift towards high energy. Mn (2p_{3/2}) peaks higher than 642 eV would have indicated the presence of higher oxidation states (e.g. Mn_(III), Mn_(IV)). The presence of a satellite peak at ~646–647 eV in the background also reflects the occurrence of Mn_(II).¹⁵³⁻¹⁵⁵ Finally, the separation of peak energies (ΔE_b) of the Mn (3s) components (data not shown) were found to be 6.1–6.2 eV before and after soaking in water, which also indicates Mn_(II).¹³⁹ The presence of Mn_(III) or Mn_(IV) would imply $\Delta E_b < 5.0$. The Mn–OOH formation could also be corroborated by the increase of the ratio of the O band at 530.8 eV (Mn–O–Si, Mn–OOH) on that of Si at 102.0 eV (Si–O–Mn, Si–OH) from 2.27 to 2.89 after 96 hours (Table 5.2). Besides, the ratio of oxygen and silicon bands associated with the silica structure decreased from 2.65 to 2.54, reflecting the modification of the M48SN structure during aqueous treatment.

TPR. Temperature-programmed reduction (H₂-TPR) profiles of Mn–M48SNs before and after soaking in ultrapure water, up to 96 h, are shown in Figure 5.12. These profiles were also used to probe the oxidation states of Mn. For Mn–M48SNs, subjected to H₂-TPR immediately after the thermal reduction (Figure 5.12 a), no noticeable peaks were obtained, indicating that this material only contains Mn species in the +2 oxidation state. Such a result is of importance to achieve a significant MR-contrast effect, as the paramagnetic moment of the Mn²⁺ ion allows for efficient interactions with hydrogen spins in biological tissues and aqueous media, resulting ultimately in dramatic reduction of longitudinal and transversal relaxation times. For the Mn–M48SNs suspended in water for 3 h and 24 h (Figure 5.12 b and c), a broad hydrogen consumption peak centered slightly above 500 °C was observed along with a small shoulder appearing approximately at 360 °C. Interestingly, after 96 h in water, instead of a shoulder, a clearly distinguishable peak centered at about 320 °C was recorded. In all materials that were in contact with ultrapure water, the high temperature peak above 500 °C suggests the potential presence of Mn species in a higher oxidation state, which may result from the alteration/degradation of the Mn–M48SN framework during prolonged soaking in water. However, it should be noted that both XPS results and relaxometric studies tend to indicate that Mn species in higher oxidation states correspond only to a rather small fraction of the total Mn content in Mn–M48SNs. It is of particular importance that the shoulder observed at 360 °C for the Mn–M48SNs suspended in water for 3 h and 24 h indicates the presence of hydroxides or hydrated Mn species which is further confirmed by the apparition of a separate peak for the Mn–M48SNs suspended in water for 96 h. The first reduction process occurred at the lowest temperature for materials suspended in water for 96 h, indicating that prolonged exposure to aqueous media ultimately modified the local chemical environment of the metallic species. Even

though a similar effect is observed for the second reduction step, the variation in temperature is negligible considering the fact that the peaks are much broader. Such results are also consistent with the proposed gradual formation of Mn–OOH surface layers.

Magnetometry. The paramagnetic nature of Mn–M48SN powders was confirmed by magnetometric measurements conducted at 10, 100, 200 and 298 K. As shown in Figure 5.13 the magnetic moment of the sample is proportional to the magnetic field at high temperatures. The typical curvature of the Langevin field dependence of the magnetization is only noticed at 10 K. The slope at low field of these curves is proportional to the zero field susceptibility, which obeys the Curie–Weiss law for paramagnetic systems. When plotted against temperature (inset of Figure 5.13), the slopes obtained for the Mn–M48SN powder are perfectly fitted by a $1/(T + T_0)$ function, which confirms the paramagnetic nature of the sample.

5.5.3. *Colloidal stability of Mn–M48SNs*

The particles were suspended in water by sonication and their colloidal stability, assessed by DLS for up to 48 h in water, acetate buffer and cell culture medium (DMEM). Although certain sedimentation was noted, the hydrodynamic diameter of the particles remained stable over time (Figure 5.4 a–c). A 24 h colloidal stability assay was performed in complete DMEM. Results from this study are shown in Figure 5.14. The mean particle size remained remarkably stable during this period (from 208 to 195 nm diam. in number-weighted data, for samples at $t = 0$ and $t = 24$ h, respectively). There was no evidence of sedimentation in DLS cells, and no fluctuation was noted in the attenuator aperture, which would have directly indicated the decrease of colloid concentration. Higher hydrodynamic diameters were measured in Mn–M48SNs in acetate and DMEM, which reflects the strong ionic corona (in acetate and DMEM) and protein adsorption (in DMEM).

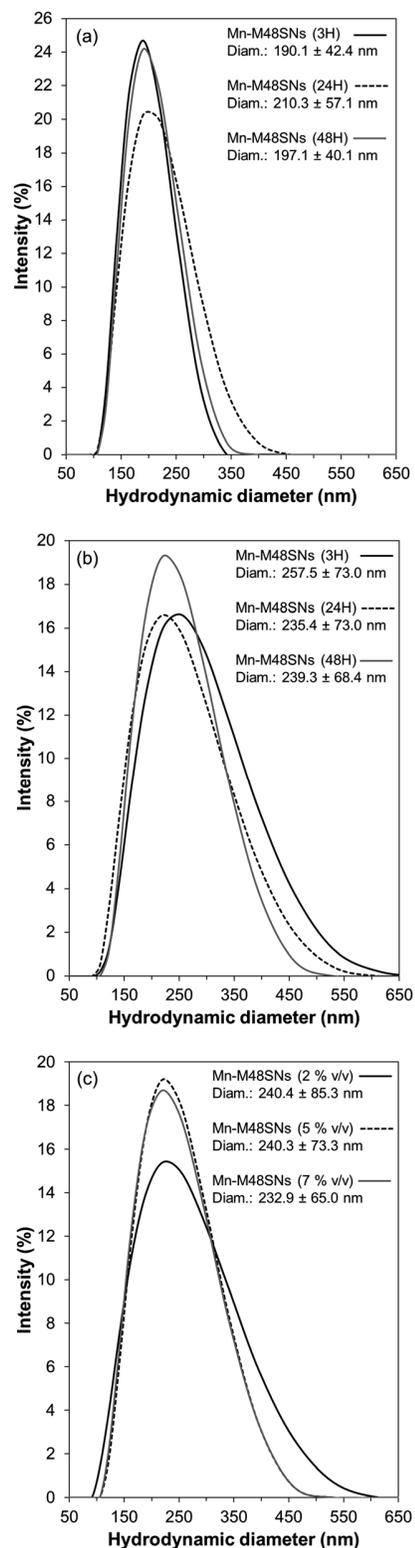


Figure 5.4. Hydrodynamic diameter distributions of Mn-M48SNs after suspension in (a) H₂O or (b) acetate buffer (20 mM, pH = 5) for 3, 24 and 48 hours; (c) hydrodynamic diameter distributions of Mn-M48SNs after suspension in complete DMEM for two hours at various concentrations.

5.5.4. Relaxivity and Mn chemical stability measurements

The performance of MRI CAs is always quantified on the basis of their longitudinal and transversal relaxivities ($1/T_1$ and $1/T_2$, normalised to the concentration of Mn). In this study, r_1 and r_2 relaxivities were first measured at 60 MHz (1.41 T), and showed values of 8.4 and 16.8 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$, respectively (Figure 5.5). These results appear much higher than relaxivity values typically measured for MnCl_2 (Mn^{2+} ions), in the order of 6.1 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ for r_1 and $r_2/r_1 \sim 10$.^{135,156} The relaxometric ratios ($r_2/r_1 = 2$) were remarkably small, and allowed much stronger “positive” contrast enhancement in MRI, than the vast majority of all Mn-containing CAs.¹⁵⁶ These relaxometric properties indicate that Mn in M48SNs is accessible to water molecules. Because the r_2/r_1 ratio of Mn-M48SN suspensions is so low, manganese is not in the form of free Mn^{2+} ions and this also corroborates the presence of MnO, Mn–O–Si and/or Mn–OOH structures in the mesopores. By comparison, for Mn–MCM-41 mesoporous silica nanoparticles impregnated with KMnO_4 and reduced in hydrogen, Shi et al. reported relaxivity values of $r_1 = 2.28$ and $r_2 = 15.9$ $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ ($r_2/r_1 = 6.97$) at 3.0 T.⁶⁵ Therefore, our study evidences that the procedure used to introduce and reduce manganese in the mesopore network has a very strong incidence on the induction of high relaxivities (with low r_2/r_1 ratios), which are adequate for “positive” contrast enhancement in T_1 -w. MRI.

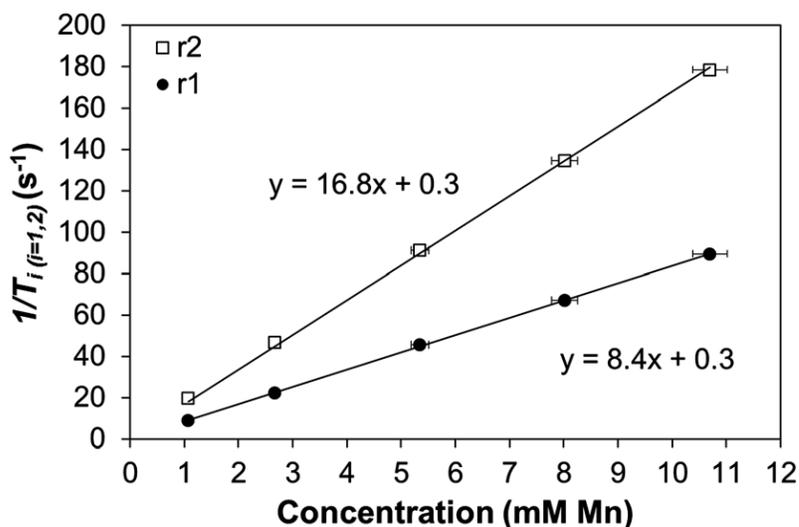


Figure 5.5. Longitudinal (r_1 , solid symbols) and transversal (r_2 , open symbols) relaxivities of Mn–M48SNs in H_2O at 60 MHz and 37 °C.

In order to demonstrate the applicability of new CAs for cell tracking, it is necessary to quantify the chemical stability of the paramagnetic species submitted to an aqueous environment showing characteristics similar to those encountered in the cell vesicles. Lysosomes, endosomes, and

phagosomes present an environment with pH as low as 4.5–5.¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ Depending on their resistance to acidic environments and to the reactive nature of their chemical form, silica and metal oxide nanoparticles taken up by cells and sequestered in these vesicles, are susceptible to dissolution.

Until now, stability tests of nanoparticulate MRI CAs have most often been conducted in an acetate buffer (e.g. pH 5, 20 mM).¹⁶¹ However, such conditions are not representative of the endosome's content. In fact, the acidity of transition metal oxides is dependent on both the type and the oxidation state of the metal. Also, weak acids, such as acetic acid, act as proton donors and complexing agents that might accelerate the dissolution of certain oxides. Therefore, in the absence of a model solution that could reproduce the exact vesicular contents in a variety of cells, we decided to test Mn–M48SN particles in water, as well as in both acetate and borate buffers (pH 5, 20 mM). This approach revealed clear differences in the chemical stabilities of Mn–MSNs, depending on the selected buffer. The particles suspended in water, borate and acetate buffers were collected at different time points by centrifugation, and re-suspended in fresh ultrapure water, followed by T_1 and T_2 measurements at 60 MHz over time. The longitudinal and transversal relaxation times were used as a confirmation of Mn(II) retention. As expected, no significant evolution was found in T_1 and T_2 for particles suspended in water (Figure 5.15 a), confirming the stability of Mn in the nanoparticle structure even after 96 hours of incubation.

In the acetate buffer however, Mn^{2+} ions rapidly leached and, as a result, much longer T_1 and T_2 were rapidly observed in the colloidal suspensions made with refreshed ultrapure water (Figure 5.15 b). As previously mentioned in the TEM and porosity analysis section, the silica particles were not severely degraded after 96 h of soaking in water (Figure 5.9 c and d and Table 5.1). However, a re-arrangement of the porous network was clearly noted, as well as the formation of Mn–OOH layers at the surface of pores (XPS and TPR results). Results of Figure 5.15 b demonstrate that acetate does certainly interfere with the re-arrangement of Mn into Mn–OOH layers in the first minutes following dispersion in the buffer. Although acetate is frequently used to challenge the chemical and colloidal stability of colloidal nanoparticle systems, it is an aggressive buffer that unfortunately does not represent the exact same conditions as in the cell vesicles. Other buffers more closely mimicking the endosomal conditions should be selected for such studies.

To confirm the impact of an incubation buffer on the leaching of Mn^{2+} ions, nuclear magnetic resonance dispersion (NMRD) profiles ($1/T_1$) were recorded with a fast field relaxometer at variable magnetic field strength (Figure 5.6 and 5.16), with particles incubated in water, acetate, and borate buffers. NMRD profiles in water and in borate buffers showed a progressive decrease in the range

0.1–3 MHz, which is consistent with the mechanisms of proton relaxation by dipolar interactions between the coordinated water protons and the paramagnetic ions. This inflection is widely observed in paramagnetic complexes, such as EDTA or DTPA, as well as in suspensions of ultra-small MnO nanoparticles.^{135,162} It is to be noted that the progressive decrease in $1/T_1$ relaxation rates observed in these measurements, mainly reflects the fact that particles had the tendency to sediment and adhere to the walls of NMRD tubes over time. Sonication was used between each NMRD measurement to suspend as much particles as possible and DLS analysis was performed each time to demonstrate that particles did not form aggregates upon sedimentation.

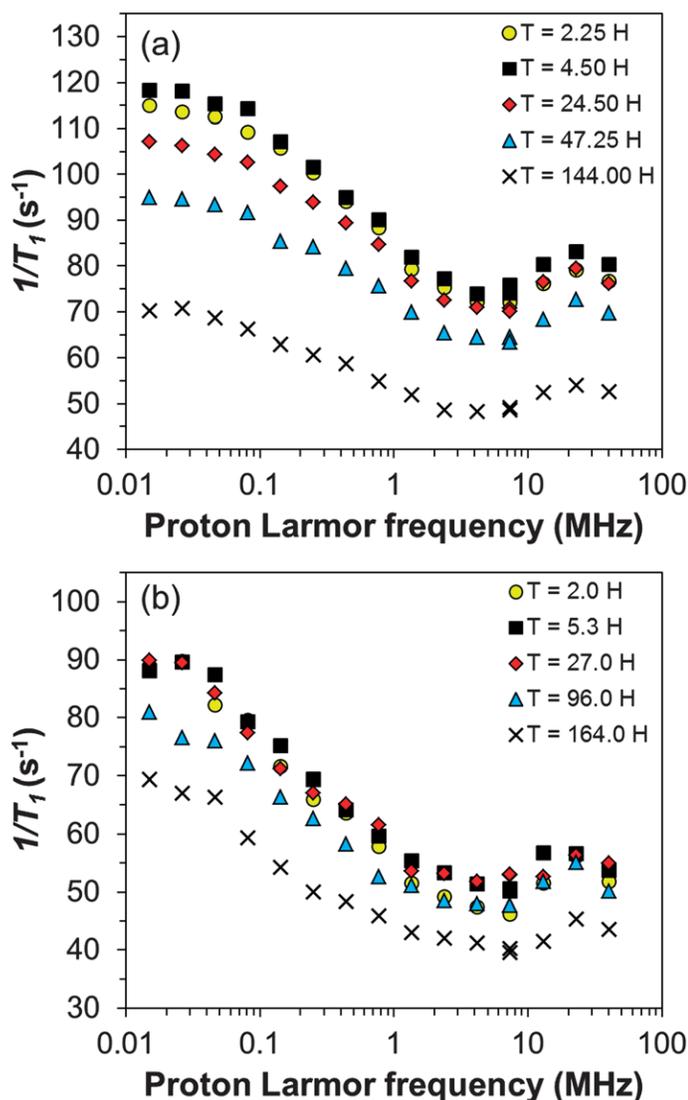


Figure 5.6. NMRD profiles of Mn-M48SNs in (a) H₂O and (b) in a borate buffer (20 mM, pH = 5), both performed at 37 °C.

In Mn–M48SNs suspended in water and in borate buffer, there was no evidence of a second inflexion in the low magnetic field strength range (<0.5 MHz), typical of the isotropic “contact” interaction between the electron spin of Mn^{2+} and protons in the first hydration shell.^{163,164} This low magnetic field inflexion, observed for free Mn^{2+} ions, is due to the delocalization of the electronic wave function of hydrated Mn^{2+} ions, to such an extent that a significant amount of its spin extends to the water protons of the first hydration shell.¹⁶⁵ Only Mn–M48SN nanoparticles incubated in an acetate buffer clearly showed the low-magnetic field strength inflexion (Figure 5.16), revealing thereby some leaching of Mn^{2+} ions from the M48SN structures. Higher T_1/T_2 (~4 at 40 MHz) ratios were also noted in acetate-incubated Mn–M48SNs (T_2 data not shown), which also points to the fact that the contact interaction of Mn^{2+} ions affects the transversal relaxivity of the suspensions, as expected for Mn^{2+} -containing suspensions. Very high r_2/r_1 ratios (~10) are indeed measured for aqueous solutions containing free Mn^{2+} ions, which is clearly not the case for Mn–MSN suspensions incubated in water and in borate buffers.^{135,156} Hence, the use of an acetate buffer as an incubation medium to reproduce the endosomal conditions (in particular the pH) appears questionable since its reactivity with the manganese oxide, hydroxide or silicate structures leads to Mn^{2+} leaching. Thus, the results of this study point to the necessity of using aqueous media with properties as close as possible to those in the cell vesicles, and therefore not necessarily based on acetate. The slight upward turn in the high-field region (20–30 MHz), typical of paramagnetic nanoparticles, such as ultra-small MnO , was also observed with Mn–M48SNs in water and borate buffers.¹³⁵ This signature indicates that electronic relaxation time, increasing with the magnetic field strength, could be an important limiting factor in that range. Finally, the decrease of relaxivity above 30 MHz is attributed to dipolar dispersion.

5.5.5. Cell labelling and MRI studies

Drug delivery to brain tumours is a medical challenge for which mesoporous silica particles could provide promising solutions. For example, it is well known that brain tumours represent a chemoattractive environment, which is colonized by microglia and by monocyte-derived macrophages.⁶⁰ As a result, macrophages may represent a potential vector to bring anti-tumoral therapy into the tumour. The cell line P388 (phagocytic leukaemia line) has been extensively used in experiments aiming at visualising the delivery of monocytes/macrophages to brain tumour areas, following intravenous injections of these cells.⁷⁸ Therefore, P388 cells represent an interesting cell line in the perspective of evaluating the potential of Mn–M48SNs for *in vivo* cell tracking and for macrophage-mediated drug delivery applications.

The tolerance of P388 cells to Mn–M48SNs was assessed using escalating concentrations of nanoparticles (0, 0.12, 0.29, 0.41, corresponding to 0, 2, 5, and 7% (v/v), respectively) and an incubation time of 4 hours. At all concentrations, the viability of cells was 95% and higher (Table 5.3). A series of cell samples incubated for 4 hours with high concentrations of particles (7% (v/v)) were incubated further in a fresh complete medium for up to 24 h (after the end of incubation with Mn–M48SNs). Results from this experiment are displayed in Figure 5.17. Compared with control cells, incubation with Mn–M48SNs delayed the proliferation in the first hours after the end of incubation. However, after 24 hours, the difference in cell number between both cell culture groups was not statistically different. At every time point, cell viability was systematically measured: for incubated cells, the viability was always higher than 97.1%. Finally, in order to measure the impact of prolonged incubation with high concentrations of Mn–M48SNs, cells were incubated for 12 h and 24 h, harvested, counted and their viability was measured (Table 5.4). No significant difference in cell numbers was noted, and the viability of cells was higher than 96.6% at all time points (0, 12 h and 24 h). Therefore, we concluded that incubation with high concentrations of Mn–M48SNs (7% (v/v)) neither affects cell proliferation nor cell viability.

Table 5.3. Cell viability of P388 cells incubated for 4 h with Mn–M48SNs (2, 5, 7% (v/v))

% Mn–M48SNs (v/v)	Incubation time (h)	Mean number of		Mean viability ^a (%)	Relative mean viability ^b (%)
		cells × 10 ⁶	Standard dev. × 10 ⁶		
0	4	1.70 (n = 5)	0.32	98.2	100
2	4	1.97 (n = 5)	0.42	97.3	99.1
5	4	1.54 (n = 5)	0.15	95.3	97.0
7	4	1.35 (n = 5)	0.34	95.8	97.6

^a Trypan blue assay. ^b Reported for 0% (v/v).

Table 5.4. Cell viability of P388 cells incubated for prolonged times with 7% (v/v) Mn–M48SNs

% Mn–M48SNs (v/v)	Incubation time (h)	Mean number of		Mean viability ^a (%)	Relative mean viability ^b (%)
		cells × 10 ⁶	Standard dev. × 10 ⁶		
7	0	8.25 (n = 8)	0.98	98.2	100
7	12	8.68 (n = 4)	1.47	99.0	100
7	24	9.21 (n = 4)	0.68	96.6	98.4

^a Trypan blue assay. ^b Reported for 7% (v/v) Mn–M48SNs at 0 h.

The presence of nanoparticles inside cells was confirmed by TEM investigations. As shown in Figure 5.7, the mesoporous silica particles were clearly visible in the cells, mainly as small clusters of nanoparticles (<10 particles). The particles appeared more contrasted than the rest of the cells, both due to the silica, and more importantly to the presence of electron-dense manganese. Overall,

the apparent concentration of nanoparticles internalised in cells was not very high, and points to the necessity of providing a surface treatment to the nanoparticles to enhance cell uptake in the perspective of establishing efficient cell labelling procedures. In the present study, only passive nanoparticle internalisation was studied. TEM visualisation also confirmed the separation of labelled cells from non-internalised nanoparticles present in the cell culture medium. Indeed, there was no evidence of nanoparticles outside the cells, or attached at the surface of the cells. This assessment was important to validate that MRI contrast enhancement results were not contaminated with non-internalised nanoparticles.

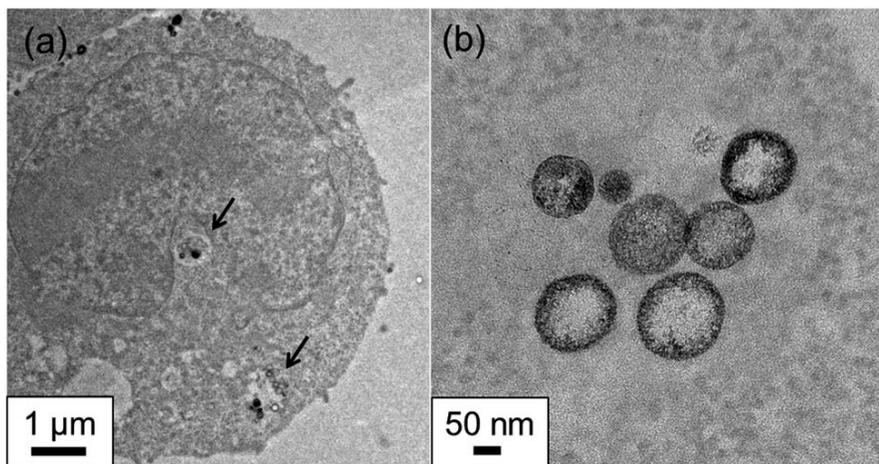


Figure 5.7. TEM images (200 keV) of (a) P388 cells labelled with Mn-M48SNs; (b) nanoparticles taken up in vesicles, showing indications of a Mn radial concentration profile in the porous particles.

Mn-M48SN-labelled cells were then suspended in gelatine, distributed in cell culture wells, and visualised by T_1 -weighted MRI (Figure 5.8 a) at minimum echo time (TE) and at three different repetition times (TR). The concentration of cells per μL of 0, 2, 5 and 7% (v/v) correspond to 1.07×10^4 cells per μL , 1.13×10^4 cells per μL , 0.89×10^4 cells per μL and 0.68×10^4 cells per μL respectively. The highest concentration of CA (7% (v/v)) provides the most significant MRI contrast effect despite the lowest concentration of cells suggesting a higher internalisation rate. The cells were kept under incubation for up to 24 h, and imaged at different time points. In spite of the rather low uptake of Mn-M48SNs in cells, the contrast between labelled cells and unlabelled cells was clearly visible. For 7% and 5% (v/v) incubation samples, 10–50% contrast enhancements were noted. A control experiment was performed with 7% (v/v) M48SNs (without Mn) that did not reveal any contrast enhancement (Figure 5.18). The quantified contrast (Figure 5.8 b) revealed that all samples labelled with 5% and 7% (v/v) Mn-M48SN suspensions, as well as those labelled with 2% (v/v) after 24 h, showed significantly higher “positive” contrast compared to unlabelled cell

samples. In fact, a general trend toward slightly higher contrast enhancement was noted over time (up to 24 h), most probably reflecting the modifications of the nanoparticles, as evidenced *in vitro*, e.g., hydroxylation of Mn-lined nanopores. A massive leakage of Mn^{2+} ions from the nanoparticles would have resulted in lower r_1 , and much higher r_2/r_1 ratios, and therefore to a pronounced decrease of the “positive” contrast enhancement in T_1 -w. MRI.

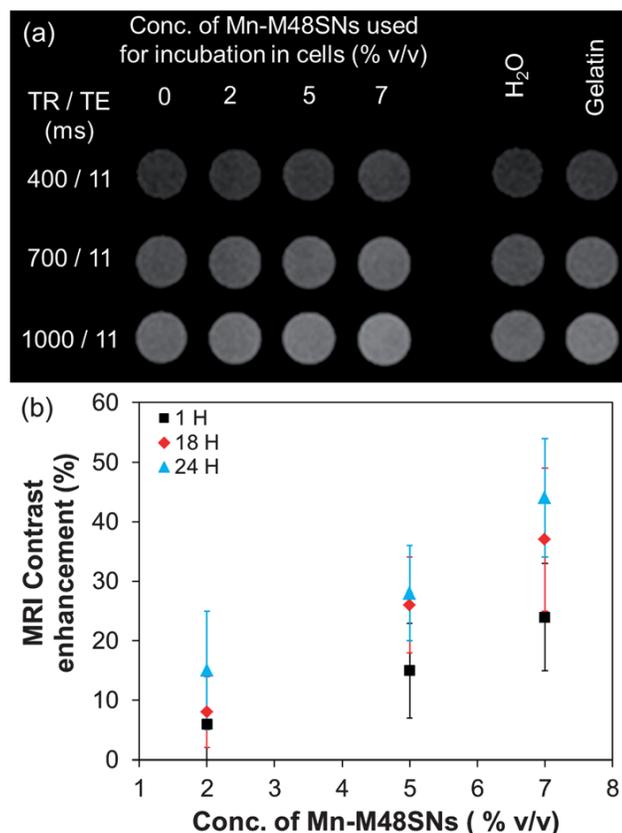


Figure 5.8. P388 cells labelled with Mn–M48SNs: (a) T_1 -w. MR images of cells incubated for 4 h with 0, 2, 5 and 7% (v/v) stock solutions of Mn–M48SNs obtained with different echo delay times and repetition times; (b) contrast-enhancement in P388 labelled cells suspended in gelatine was monitored by MRI for up to 24 h.

5.6. Conclusions

Mesoporous silica nanoparticles of narrow size distribution and exhibiting a 3-D pore network were synthesized, and impregnated with Mn in the perspective of being used as “positive” MRI contrast agents for cell labelling studies. Open porosity and optimal distribution of Mn in M48SNs allowed high relaxivities ($r_1 = 8.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and low r_2/r_1 ratios *in vitro*, as well as an efficient contrast enhancement in cells (*in vivo*). After suspension in water, evidence was found that Mn did not leach as free Mn^{2+} , even under acidic conditions, but rather rearranged into Mn–OOH structures with Mn(II) as the main oxidation state. Mn–M48SN suspensions have a relaxivity at least 4–5 times

higher than those of common Mn chelates, with very low r_2/r_1 ratios (~ 2), which is exceptional for a Mn-based MR contrast agent. These relaxometric properties provide remarkably good “positive” contrast enhancement properties to the MSN-labelled nanostructures that can thus be used to label cells without significantly affecting their viability. A clear positive contrast was evidenced in MRI with labelled cells, even for low numbers of particles internalized per cell. Because Mn^{2+} ions are increasingly used in neurological studies (MEMRI), Mn-M48SN particles could therefore be employed as an interesting system to label neurological and immune cells, and to progressively deliver Mn^{2+} ions at low doses and under controlled biological environments. The porosity could also be used to deliver complementary biological factors or drugs. Future studies will aim at investigating the thresholds of Mn^{2+} leaching necessary to maximize MRI contrast enhancement, while minimizing the impact on cell viability.

5.7. Acknowledgements

This study was supported by the Centre Québécois des Matériaux Fonctionnels (CQMF), the Fonds de la recherche sur la nature et les technologies du Québec (FQRNT), and NSERC Discovery grants (M.A.F. and F.K.). Dr Luce vander Elst (U. Mons), Dr Robert Muller (U. Mons), Marie-France Côté, Jacques Lacroix and Andrée-Anne Guay-Bégin (CHUQ) and Vicky Dodier (U. Laval) are gratefully acknowledged for their valuable contribution to this work.

5.8. Supporting information

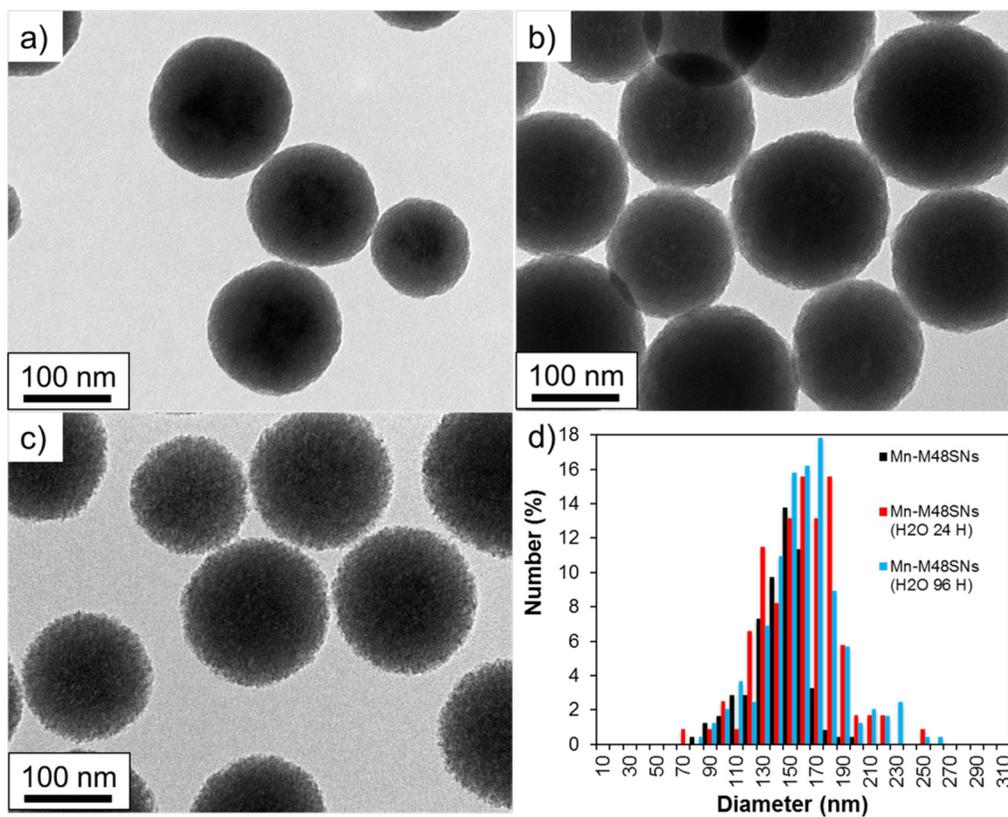


Figure 5.9. TEM images of Mn-M48SNs after (a) thermal reduction treatment and after suspension in H₂O for (b) 24 h or (c) 96 h and (d) corresponding particle size distributions.

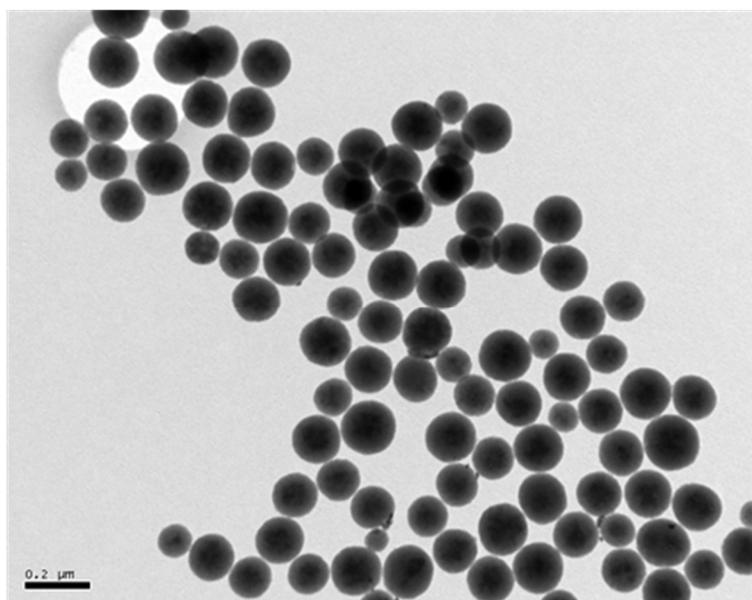


Figure 5.10. TEM image of Mn-M48SNs after thermal reduction treatment (corresponding to the product in Figure 5.9 a).

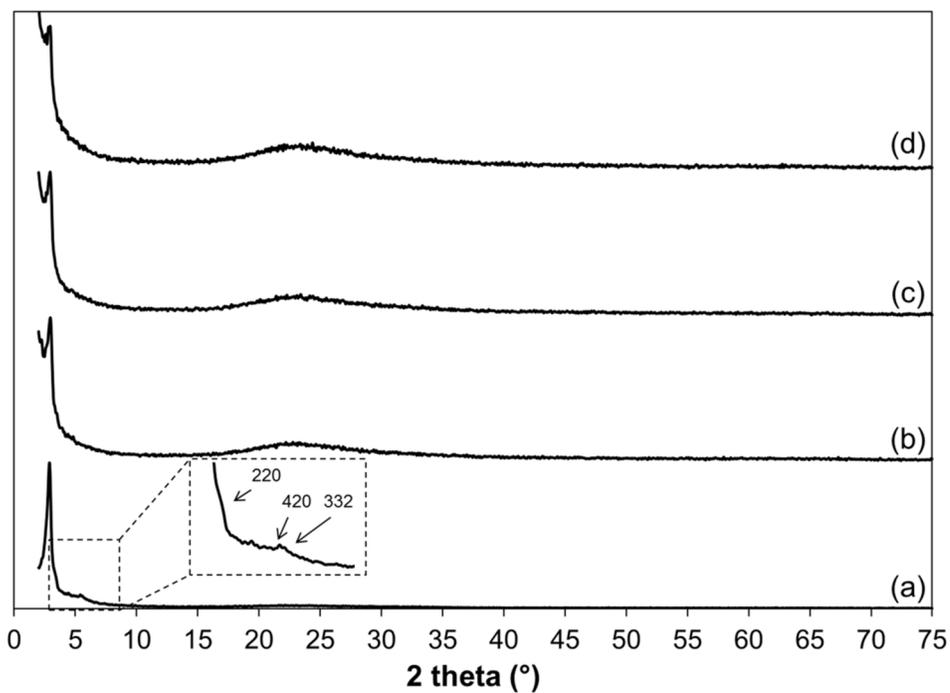


Figure 5.11. XRD patterns of Mn-M48SNs after (a) thermal reduction treatment and after suspension in H₂O for (b) 3 h, (c) 24 h, or (d) 96 h.

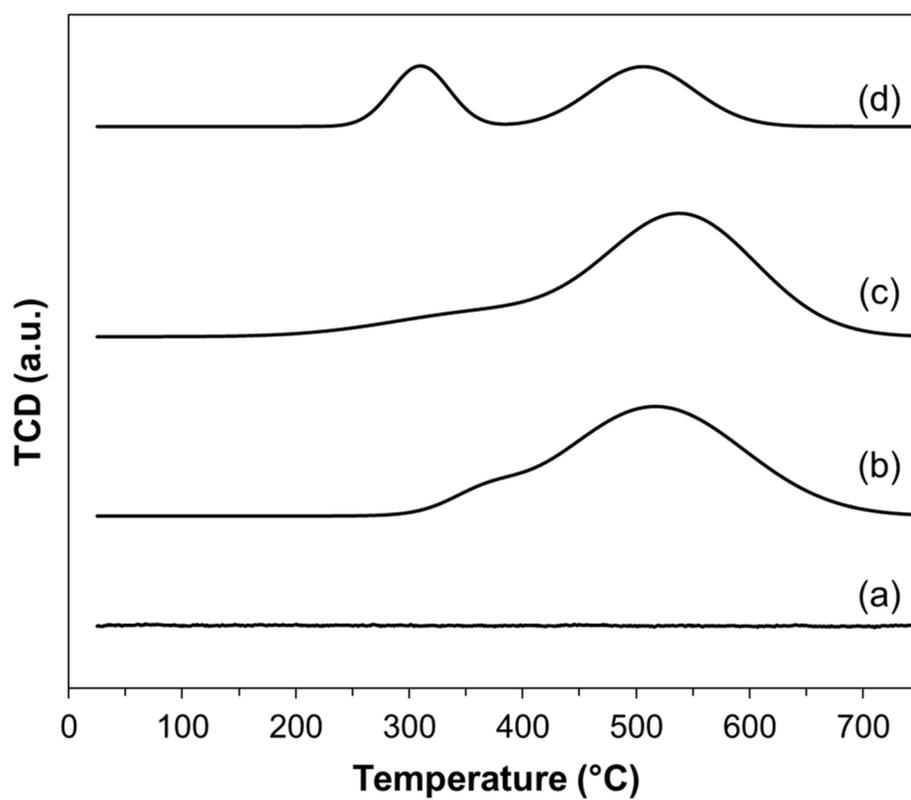


Figure 5.12. H₂-TPR profiles of Mn-M48SNs after (a) thermal reduction treatment and after suspension in H₂O for (b) 3 h, (c) 24 h, or (d) 96 h.

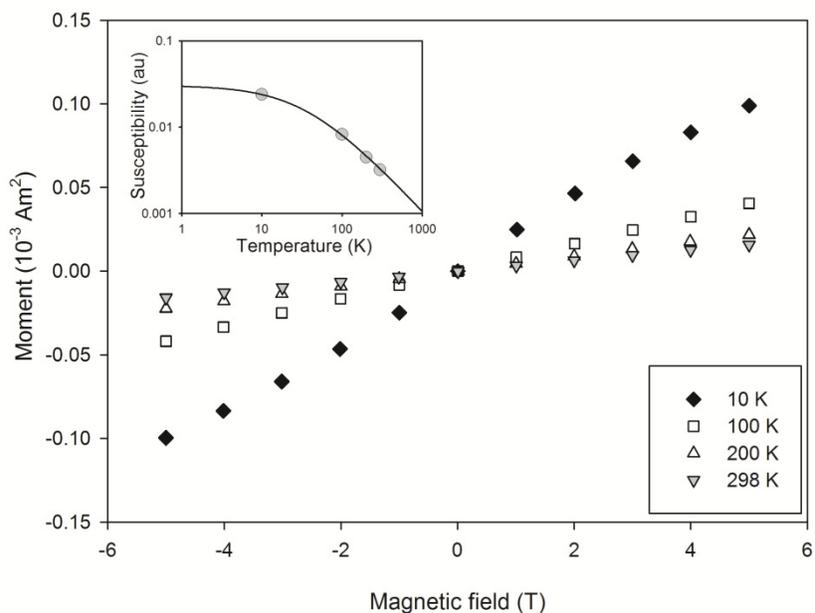


Figure 5.13. Magnetometric profiles of Mn-M48SNs at different temperatures.

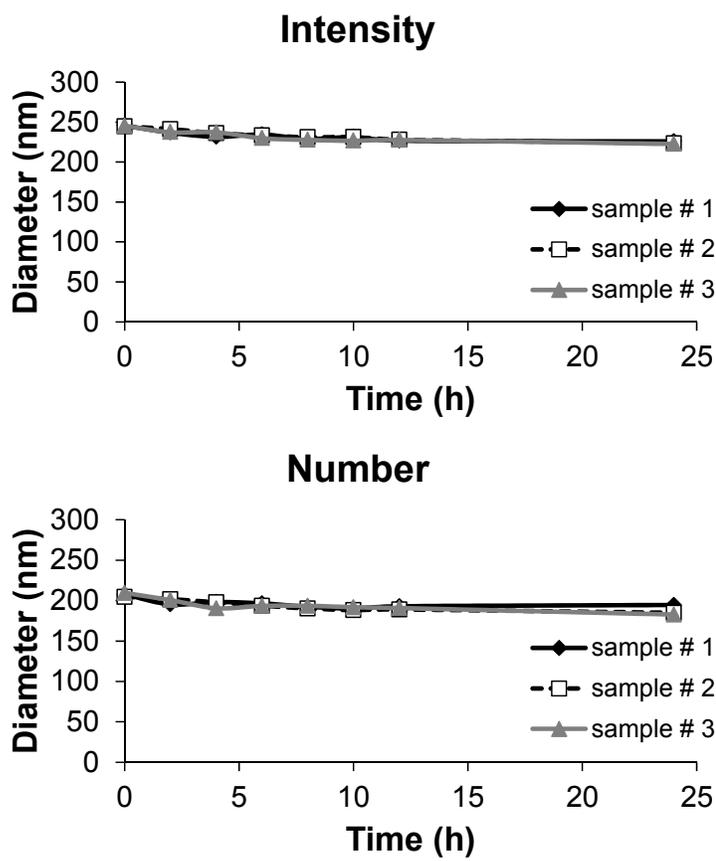


Figure 5.14. Colloidal stability assay for Mn-M48SN particles suspended in DMEM.

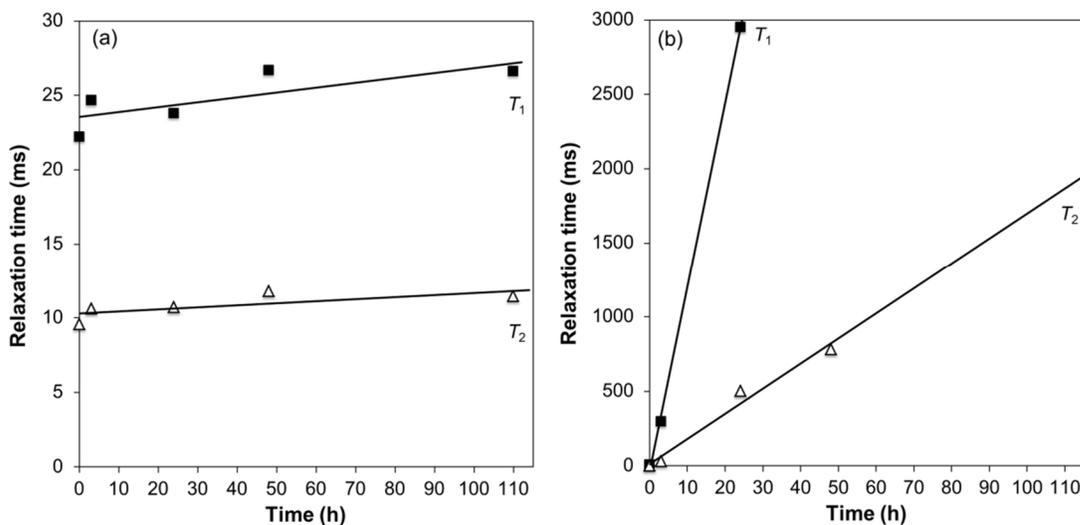


Figure 5.15. T_1 and T_2 relaxation times (60MHz, 37 °C) of Mn-M48SNs suspended for prolonged times in (a) H₂O and (b) acetate buffer (20 mM, pH 5). Before each measurement, suspensions were centrifuged at 5000 g and materials were suspended in fresh media.

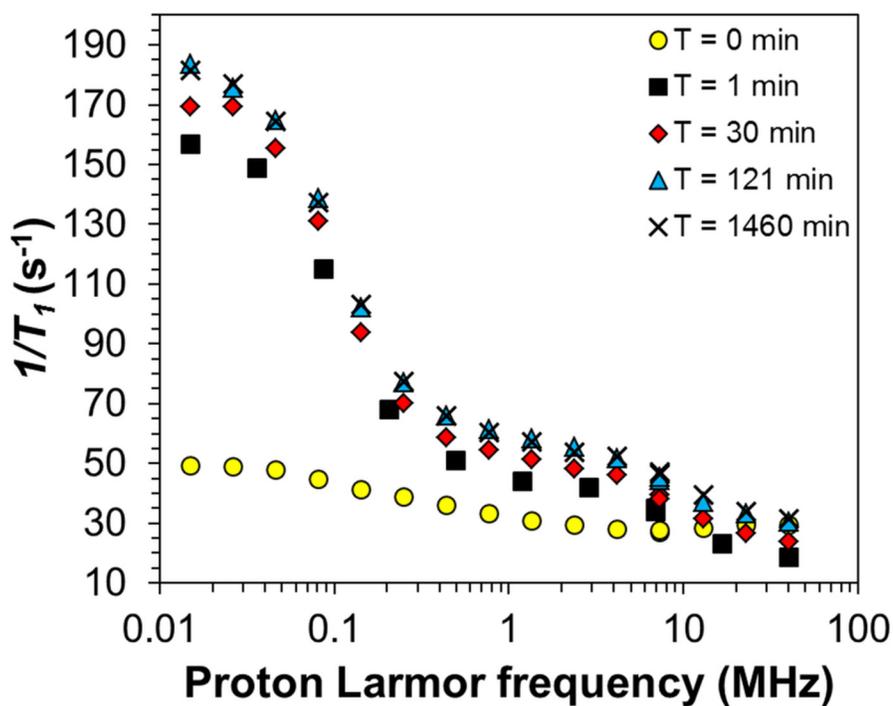


Figure 5.16. NMRD profiles of Mn-M48SNs suspended in acetate buffer (20 mM, pH 5) performed at 37°C.

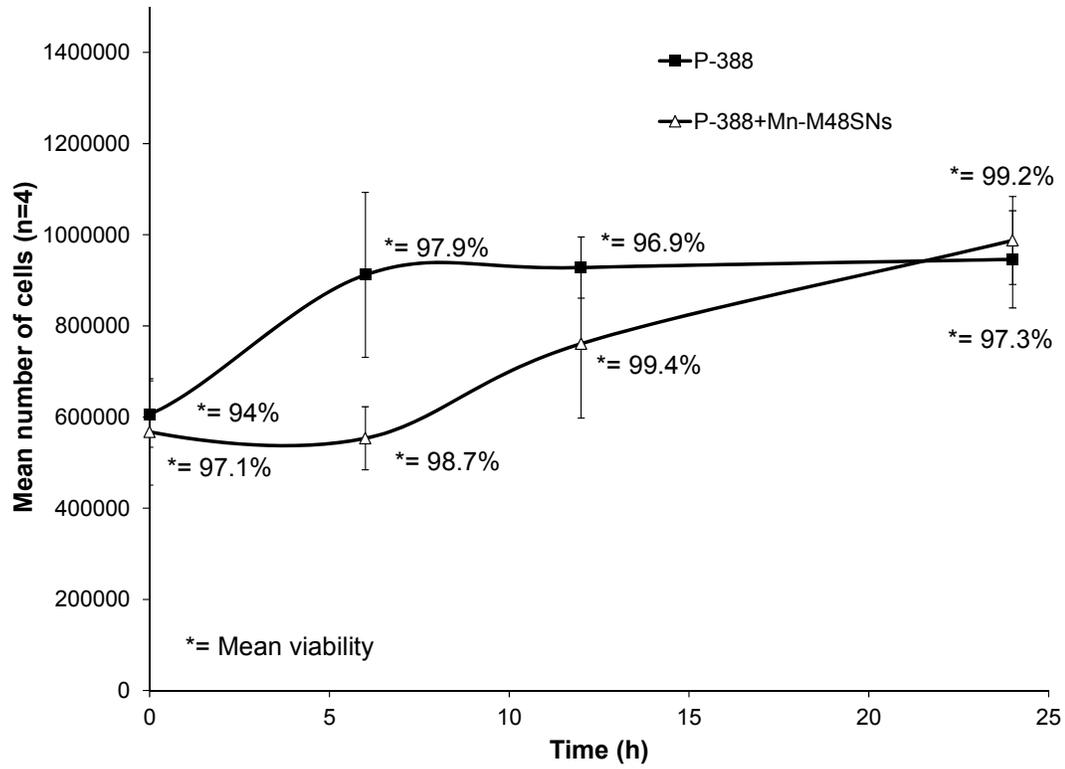


Figure 5.17. P388 cell proliferation assay, after 4 hours of incubation with 7 % (v/v) Mn-M48SNs.

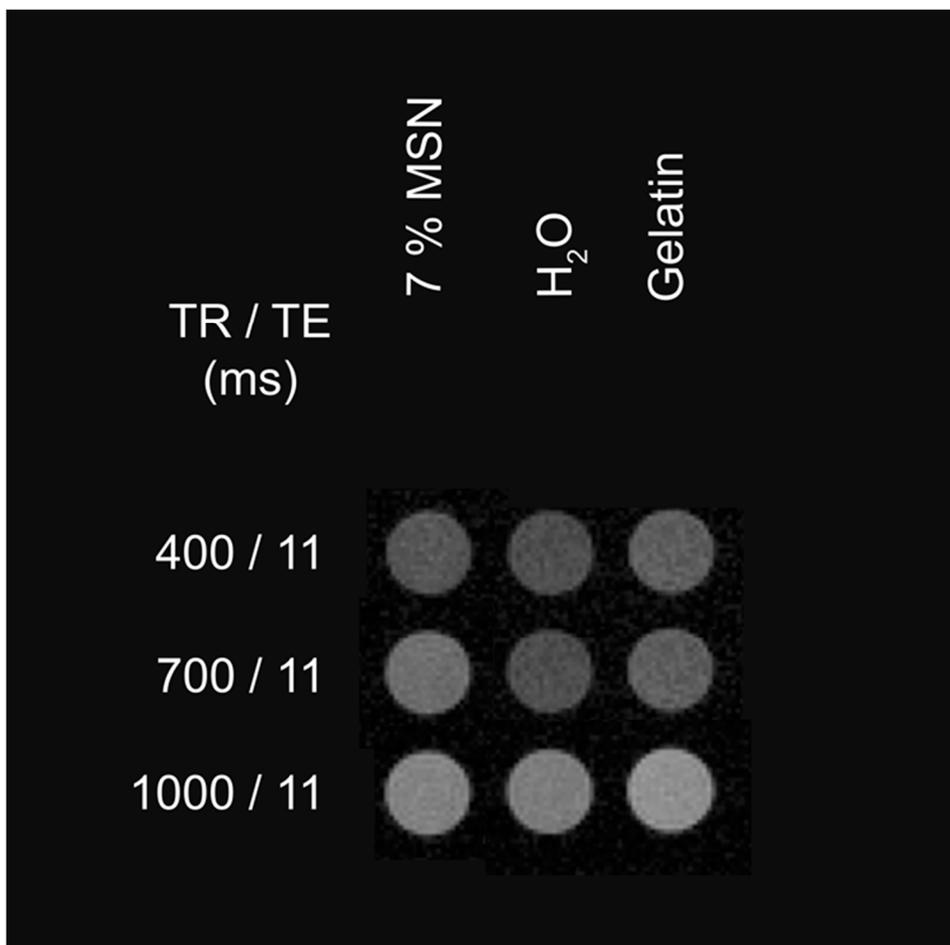


Figure 5.18. T_1 -w. MR images of P388 cells incubated 4h with a 7 % (v/v) stock solution of M48SNs obtained with different echo delay times and repetition times. No difference of signal was found between cells incubated with 7% (v/v) MSN, water and gelatin.

Chapitre 6 – Article 2

Metal chelate grafting at the surface of mesoporous silica nanoparticles (MSNs): physico-chemical and biomedical imaging assessment

Myriam Laprise-Pelletier ^{a,b,d}, Meryem Bouchoucha ^{a,c,d}, Jean Lagueux ^a, Pascale Chevallier ^{a,d}, Roger Lecomte ^e, Yves Gossuin ^f, Freddy Kleitz ^{c,d,*}, Marc-André Fortin ^{a,b,d,*}

^aCentre de recherche du Centre hospitalier universitaire de Québec (CR-CHUQ), axe Médecine Régénératrice, Québec, G1L 3L5, QC, Canada

Phone: 1-418-525-4444 ext: 52366

Fax: 1-418-525-4372

E-mail: marc-andre.fortin@gmn.ulaval.ca

^bDepartment of Mining, Metallurgy and Materials Engineering, Université Laval, Québec, G1V 0A6, QC, Canada

^cDepartment of Chemistry, Université Laval, Québec, G1V 0A6, QC, Canada

Phone: 1-418-656-7812

Fax: 1-418-656-7916

E-mail: freddy.kleitz@chm.ulaval.ca

^dCentre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Université Laval, Québec, G1V 0A6, QC, Canada

^eSherbrooke Molecular Imaging Center, CRCHUS, and Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, J1H 5N4, QC, Canada

^fService de physique biomédicale, Université de Mons, Mons, B7000, Belgium

* Corresponding authors

Ce manuscrit a été soumis (28 août 2014) et accepté (9 octobre 2014) dans le *Journal of Materials Chemistry B*. Les informations supplémentaires de cet article sont présentées à la fin de ce chapitre.

6.1. Résumé

Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSNs) sont développées comme vecteurs pour la livraison de médicaments. L'imagerie biomédicale (IRM et TEP) permet de faire leur suivi *in vivo*, pourvu que leur surface soit adéquatement fonctionnalisée avec des sondes pour l'imagerie (chélates). Les MSNs sont caractérisées par de grandes surfaces spécifiques et des procédures permettant un ancrage solide des chélates doivent être développées et validées. Ceci sert à démontrer que la détection *in vivo* est associée à la présence des nanoparticules, et non à celle de chélates qui se seraient détachés. Les nanosphères MCM-48 (M48SNs, 150 nm diam., structure mésoporeuse 3D) ont été synthétisées et fonctionnalisées avec de l'acide diéthylène-triaminopentaacétique (DTPA). Le greffage du DTPA a été confirmé par RMN (^{29}Si), XPS, FTIR et TGA. Les particules ont ensuite été marquées avec des ions paramagnétiques de Gd^{3+} (pour l'IRM) et des ions radioactifs de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ (pour la TEP ; demi-vie : 12.7 h). Les particules Gd^{3+} -DTPA-M48SNs forment un colloïde stable en solution saline pour au moins 6 mois (sans aucun signe d'agrégation visible). Les propriétés relaxométriques ont été mesurées à différents champs magnétiques. La force de la liaison du DTPA à la surface des MSNs a aussi été évaluée *in vivo*, et ce, par l'injection (i.v.) des particules $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs chez la souris. La rétention vasculaire et l'élimination par l'urine ont été contrôlées par IRM, alors que la TEP a fourni une évaluation dynamique et quantitative complète de la biodistribution et de la clairance sanguine et des organes. Aucune activité (^{64}Cu) significative n'a été détectée dans la vessie. L'étude a confirmé qu'il se produit un léger détachement des molécules de DTPA des particules M48SNs une fois injectées dans l'animal. Il a été observé que le transit des MSNs se fait par le foie et la voie intestinale, alors qu'aucune évidence concernant la présence de $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA dans l'urine n'a été démontrée. Les études physico-chimiques et de biodistribution ont ainsi permis de confirmer la qualité du greffage du DTPA à la surface des particules, celui-ci étant nécessaire au développement des futures procédures de livraison de médicaments à base de MSNs fonctionnalisées pour l'imagerie IRM et TEP.

6.2. Abstract

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs) are being developed as drug delivery vectors. Biomedical imaging (MRI and PET) enables their tracking *in vivo*, provided their surface is adequately grafted with imaging probes (metal chelates). However, MSNs are characterized by huge specific surfaces, and high-quality metal chelate anchoring procedures must be developed and validated, to demonstrate that their detection *in vivo*, is associated to the presence of nanoparticles and not to detached metal chelates. MCM-48 nanospheres (M48SNs, 150 nm diam., 3-D pore geometry) were synthesized and functionalized with diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). The strong grafting of DTPA was confirmed by ^{29}Si NMR, XPS, FTIR and TGA. The particles were labeled with paramagnetic ions Gd^{3+} (for MRI) as well as radioactive ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ (for PET; half-life: 12.7 h). Gd^{3+} -DTPA-M48SNs formed a stable colloid in saline media for at least 6 months, without any sign of aggregation. The relaxometric properties were measured at various magnetic fields. The strength of DTPA binding at the surface of MSNs was also assessed *in vivo*, by injecting mice (i.v.) with $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs. Vascular retention and urinary clearance were monitored by MRI, whereas the PET modality provided dynamic and quantitative assessment of biodistribution and blood/organ clearance. No significant ^{64}Cu activity was detectable in the bladder. The study confirmed the very limited detachment of DTPA from M48SNs cores once injected *in vivo*. The transit of MSN through the liver and intestinal tract, does not lead to evidences of $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA in the urine. This physico-chemical and biodistribution study confirms the quality of DTPA attachment at the surface of the particles, necessary to allow further development of PET/MRI-assisted MSN-vectorized drug delivery procedures.

6.3. Introduction

Mesoporous silica nanoparticles (MSNs), a new class of nanostructured materials, have considerable potential as drug delivery vectors and for other theranostic biomedical applications.^{57-69,136,166} Their size (20 - 200 nm mean diam.), high pore volume (0.6 – 1 cm³/g), surface chemistry and functional coatings can be precisely tuned and adapted to different applications. In general, drug loadings higher than 30% wt can be achieved in these nanoconstructs and MSNs can serve as delivery carriers for controlled drug and gene release.^{117,119,167-173} The first silica-based diagnostic nanoparticles are now entering the clinical stage.^{136,174} Compared to their organic or polymer counterparts, drug delivery vectors based on inorganic porous materials could provide extended mechanical strength, chemical stability, biocompatibility and resistance to microbial attack.⁵⁹ The versatility of MSNs physico-chemical surface functionalization could provide a second life to a number of drugs that have not made it to the clinic due either to poor solubility, poor targeted delivery to organs, or to the occurrence of extensive side effects.⁶⁰ Indeed, the long-term goal of MSN-based formulations is the development of vehicles that could more efficiently deliver drugs to specific organs or cells, while decreasing the side effects of medication.

In order to do so, it is necessary to label MSNs with imaging probes, enabling their detection *in vivo* using either magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), or a combination of both modalities (PET/MRI).⁷⁴ Metal chelates (e.g. Gd³⁺ for MRI, and ⁶⁴Cu²⁺ for PET) grafted at the surface of MSNs, allow the monitoring of MSN-vectorized drug delivery to organs. In particular, several studies have reported on the development of MSNs labeled with paramagnetic Gd-based chelates, which appear bright in *T*₁-weighted MR imaging. Such products are mostly based on the grafting of Gd(III) chelates (e.g., DTPA, diethylenetriaminopentaacetic acid) at the surface of MSNs.^{85,87,175,176} However, MSNs are characterized by huge specific surfaces (500 – 1500 m²/g). Therefore, the quality and strength of metal chelate grafting at the surface of the particles must be demonstrated to unambiguously validate that signal enhancement (in MRI) or activity counting (in PET) comes from the nanoparticles and not from metal chelates detaching from the main MSN cores. At this stage of their development, many unknowns remain on the chemical stability of metal chelate grafting at MSNs, once injected *in vivo*, and such procedures must be validated with both *in vitro* physico-chemical techniques, as well as *in vivo* through adequate imaging procedures.

In vivo magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) enable the visualization of nanoparticle biodistribution in real-time and on the same animal over long periods.

Whereas MRI, as high-resolution, whole-body anatomical imaging technique, is suitable to monitor the blood retention and urine excretion of MSN labeled with paramagnetic elements⁸⁷, it does not always provide very clear evidence of moderate MSN uptake and retention in critical organs such as liver, spleen, and kidneys. To perform quantitative, whole-body, and dynamic pharmacokinetic profiles of MSN injected *in vivo*, PET is much more appropriate as it allows the detection of imaging tracers in the nanomolar range. Until now, no quantitative biodistribution study has been reported using the unique combination of PET/MRI imaging modalities, enabling the dynamic acquisition of MSN uptake to key organs. More specifically, dynamic PET biodistribution studies would reveal the biodistribution of MSN in the first minutes following intravenous (i.v.) injections (kinetics of liver and spleen uptake; blood clearance; evidences of kidney excretion). Finally, evidences of free DTPA in the blood, would be efficiently revealed thereby (e.g. through evidences of rapid kidney and bladder clearance). Indeed, nanoparticles of the size of MSNs (> 25 nm diam.) are not expected to follow the urinary clearance route.

Until now, most experiments reporting on the development of MSN for biomedical applications have been performed *in vitro*, with very few results available of systematic biodistribution studies *in vivo*. None of these studies have reported blood clearance and organ uptake profiles quantitatively, and at high temporal resolution, and none have shown a clear demonstration of the fraction of metal chelates eventually detaching from the MSN cores. In addition to this, the variety of study designs and lack of standardization makes the comparison between MSNs from different research groups a difficult task.

A comprehensive description of MSN synthesis procedures can be found in previous literature.⁵⁹ In general, TEOS-CTAB-amphiphilic block copolymer-based MSN synthesis lead to materials with mesopore diameters in the range 3-4 nm, ordered in either 2-D or 3-D arrangements, and with porosity higher than 50% v/v. In this study, MCM-48 nanospheres (150 nm diam., 3-D) were synthesized and functionalized with diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) through intermediate reaction with aminopropyltriethoxysilane (APTES). Silane coupling efficiency was measured by ²⁹Si NMR. The strong grafting of DTPA chelates was confirmed by XPS, FTIR and TGA, before and after chelation with Gd³⁺. Gd³⁺-DTPA-M48SNs formed a stable colloid in saline media for at least 6 months, without any sign of aggregation. The relaxometric properties were measured at various magnetic field strengths, to reveal a profile that correspond closely to that of other paramagnetic nanoparticles or macromolecules (and not of free Gd³⁺-DTPA). Finally, DTPA binding at the surface of the particles was assessed *in vivo*. For this, mice were injected (i.v.) with Gd³⁺/Cu²⁺-DTPA-M48SNs. The vascular retention and urine clearance were both monitored by

MRI, whereas the PET modality provided a comprehensive, dynamic and quantitative assessment of biodistribution and blood/organ clearance.

6.4. Experimental

6.4.1. Material and methods

6.4.1.1. Synthesis of DTPA-grafted mesoporous silica nanoparticles (M48SNs)

Unless specified, all chemical products used in this study were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada) without any further purification. MCM-48 nanospheres (M48SNs) with a 3-D $Ia\bar{3}d$ cubic network of pores were synthesized by adapting a previously reported procedure.¹⁴² In brief, 1.0 g of n-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, 99%) and 4.0 g of Pluronic F127 (EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆, BioReagent) were dissolved in 298 mL of H₂O/NH₃/EtOH (NH₄OH(aq) (2.8 wt %)/EtOH = 2.5/1 (v/v)) under vigorous stirring. Then, 3.6 g of tetraethylorthosilicate (TEOS, 98%) was added to the solution and vigorously stirred for 1 minute at room temperature (RT). The reaction mixture was kept 24 h in static conditions (air, RT) and the resulting white solid product was isolated by centrifugation at 15 300 g for 25 min, rinsed once with water (250 mL) and twice with ethanol (250 mL), then dried overnight (air, 70 °C). Then, M48SNs (1 g) were refluxed in toluene (100 mL) for 24 h with 1.9 mL of aminopropyltriethoxysilane (APTES). The particles were recovered by centrifugation and washed three times with ethanol (50 mL). Because the particles are synthesized by using n-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and Pluronic F127 (EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆, BioReagent) to form the template, a solvent extraction step was performed by refluxing the particles for 24 h in ethanol (1 g M48SNs/100 mL ethanol 95%) supplemented with 1% v/v HCl (37%). The particles were collected by centrifugation, washed twice in 20 mL of ethanol (95%), and undispersed particles, eliminated by centrifugation (500 g, 10 min). These aminated particles were dried overnight (air, 70 °C), and are referred to as “APTES-M48SNs”.

6.4.1.2. DTPA grafting on M48SNs

APTES-M48SNs nanoparticles (100 mg) were dispersed in dry DMSO, followed by addition of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) bis-anhydride (> 98.5%) in a APTES-M48SNs:DTPA massic ratio of 2:1. This solution was stirred overnight. The particles (“DTPA-M48SNs”) were isolated by centrifugation (7500 g, 10 min), washed three times with DMSO, resuspended in 10 mL of DMSO and stored until labeling with Gd³⁺ and ⁶⁴Cu²⁺ (referred to as “Gd³⁺/⁶⁴Cu²⁺-DTPA-M48SNs”). The metal chelate grafting procedure is comprehensively described in the schematic representation of Figure 6.1.

6.4.1.3. M48SNs and DTPA-M48SNs textural properties

The porosity features and textural properties of M48SNs and DTPA-M48SNs were measured by X-ray diffraction at low angles as well as by nitrogen physisorption. The massic fraction of DTPA grafted on M48SNs, was measured by thermogravimetric analysis (TGA) (detailed in the ESI, Figure 6.6-6.9)

6.4.1.4. Nanoparticle size analysis with TEM

The mean particle size diameter of DTPA-M48SNs was measured using particles deposited on a carbon-coated copper grid, and imaged in TEM (Jeol JEM-1230, 80 keV, Tokyo, Japan), followed by calculations through a ImageJ protocol (sample of 1495 particles, from 5 images taken over 5 different quartiles). The results are shown in Figure 6.1 A. High-resolution images were acquired on a Jeol JEM-2100F, 200 keV (Figure 6.1 B).

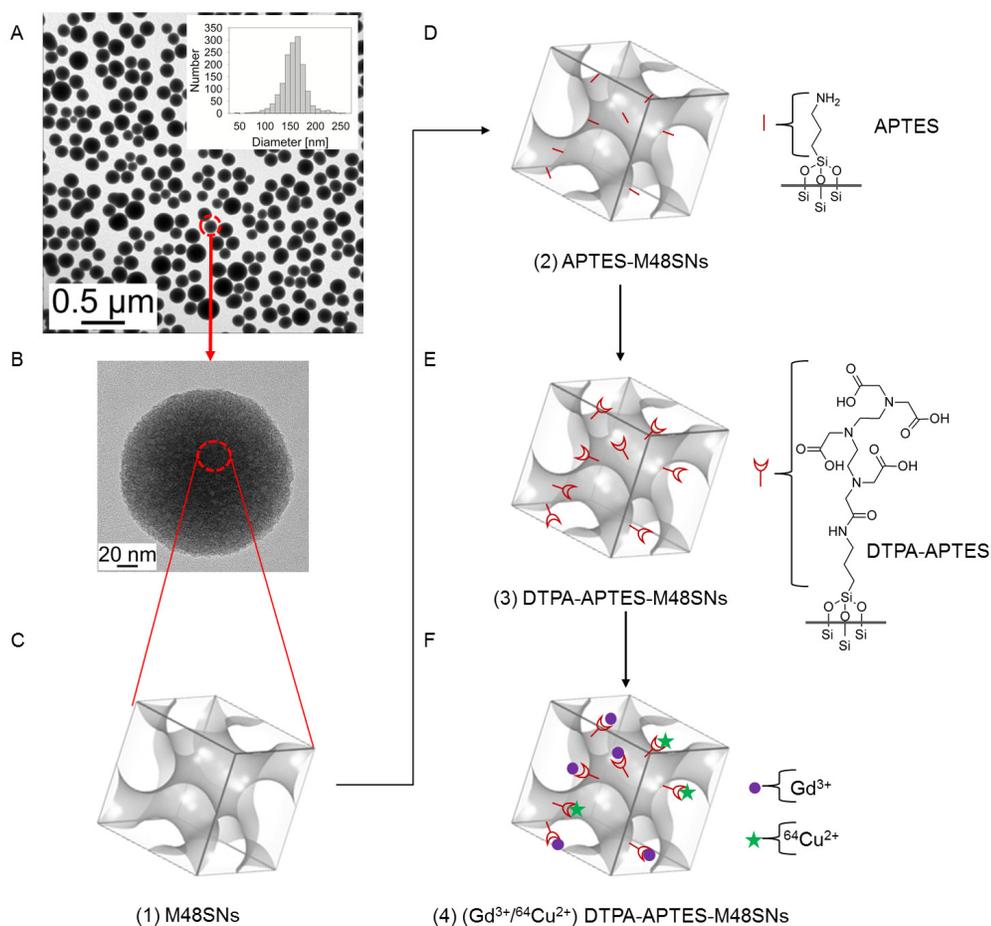


Figure 6.1. M48SN synthesized as drug carriers were visualised by TEM (A-B). In (C), schematic representation of the $Ia\bar{3}d$ pore network, followed by grafting of APTES (D), DTPA (E), and labelling with $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ (F).

6.4.1.5. Labeling and purification of M48SNs with Gd^{3+}

1.5 mL of DTPA-M48SNs (in DMSO, 3.6 M Si) was washed three times with nanopure water, using centrifugation cycles (1.5:4.5 v/v, 4300 g, 15 min). The supernatant was discarded, and one (1) mL of a 100 mM-solution of $Gd(CH_3CO_2)_3 \cdot xH_2O$ was added dropwise to DTPA-M48SNs particles. The solution was left for chelation (30 min, RT, moderate agitation). Then, the particles were eluted on a chromatography column (model XK 26/40, Pharmacia, Uppsala, Sweden) filled with Sephadex G-25 (coarse, 28 cm, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Since the radioisotope $^{64}Cu^{2+}$ has a half-life of 12.7 hours, matching the requirements for biodistribution kinetics of MSNs *in vivo*, it is necessary to minimize the complexation time, as well as to develop fast and reliable purification procedures to remove all free metal ions from the nanoparticle suspension, before injection. The particles were eluted with 154 mM NaCl (0.22 μ m-filtered), as the buffer for equilibration and elution at a constant flow rate (5 mL/min; peristaltic pump). The void (first 48 mL) was discarded, and the labeled M48SNs were collected in the next 25 mL fraction. Tangential filtration (10 kD, 11 cm², polysulfone, MicroKros, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) was used to concentrate the nanoparticles suspension up to ¹H longitudinal relaxation times (T_1) values < 30 ms. Altogether, the purification steps (chromatography and concentration) were performed in not more than 60 min. This nanoparticle suspension was referred to as Gd^{3+} -DTPA-M48SNs.

6.4.2. M48SNs, APTES-M48SNs, DTPA-M48SNs, and Gd^{3+} -DTPA-M48SNs physico-chemical characterization

6.4.2.1. NMR

Solid-state magic-angle spinning (MAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained on a Bruker DRX300 MHz NMR spectrometer. The 59.60 MHz ²⁹Si MAS NMR and the 75.4 MHz ¹³C CP-MAS NMR spectra were measured using 4 mm rotors spinning at 8 kHz. The chemical shifts are reported in ppm relative to tetramethylsilane (TMS) for ²⁹Si and relative to adamantane for ¹³C. The results are shown in Figure 6.2 A, B.

6.4.2.2. EDX

The Gd/Si ratio in Gd^{3+} -DTPA-M48SNs suspension, was measured with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analyses, performed with a high resolution TEM (Jeol JEM-2100F, 200 keV).

6.4.2.3. XPS

The chemical composition of nanoparticles and complexation of Gd^{3+} in DTPA was investigated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). For XPS analyses, drops (20 μ L) of aqueous suspensions of nanoparticles were deposited on gold-coated silicon substrates cleaned with TL1 solution, which is a mixture of ultrapure water, 30% H_2O_2 and 25% ammonia (Fisher, IL, USA; 5:1:1), at 80 °C for 10 min. The drops were dried in a vacuum oven (at 40 °C). The samples were then analyzed by using a PHI 5600-ci spectrometer (Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA). An achromatic aluminum X-ray source (1486.6 eV, 200 W) was used to record the survey spectra (1400-0 eV) with charge neutralization while high resolution spectra (HRXPS) were obtained using an achromatic magnesium X-ray source (1253.6 eV, 150 W) with no charge compensation. The detection angle was set at 45° with respect to the surface and the analyzed area was 0.005 cm². The curve fitting procedure of the components underlying the C1s peaks was performed by means of a least-square minimization procedure employing Gaussian–Lorentzian functions and a Shirley-type background.

6.4.2.4. FTIR

Further investigations on chemical structure of the nanoparticles suspension were done with attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). These analyses were performed using a Nicolet Magna 550 Fourier transform infrared spectrometer (Thermo Nicolet, Madison, WI, USA) equipped with a germanium-coated KBr beamsplitter and a DTGS/KBr detector. Samples (20 μ L) of the aqueous suspensions of nanoparticles were directly deposited on the Si crystal and then dried under vacuum at 40 °C. Spectra were recorded in absorbance mode and 100 scans were recorded with a spectral resolution of 4 cm⁻¹. A Gd-DTPA solution was prepared as reference to compare with the Gd^{3+} -DTPA-M48SNs spectra. For this, 5 mM of $Gd(CH_3CO_2)_3 \cdot xH_2O$ was complexed with 5 mM of DTPA in aqueous solution.

6.4.2.5. Hydrodynamic diameter and zeta potential of Gd^{3+} -DTPA-M48SNs

The hydrodynamic diameter of particles in saline, was measured by dynamic light scattering (DLS; He-Ne laser (633 nm); scattering angle = 173 °; T = 25 °C; Nano zetasizer, Malvern Instruments Ltd., UK). The viscosity of water was fixed at 0.8872 cP and refractive index of water and silica were fixed at 1.33 and 1.45, respectively. The results were calculated from the average of three measurements. For colloidal stability assessment, a sample was left at room temperature for 6 months, and measured. Zeta potential of Gd^{3+} -DTPA-M48SNs was measured by electrophoretic

light scattering (ELS; He-Ne laser (633 nm); scattering angle = 173 °; T = 25 °C; at pH = 7.5. The result was calculated from the average of three measurements.

6.4.2.6. Relaxometric studies of Gd^{3+} -DTPA-M48SNs

Aliquots of diluted Gd^{3+} -DTPA-M48SNs suspension (300 μ L; 100, 75, 50, 25% v/v) were distributed in 7 mm o.d. NMR tubes. The relaxation times (T_1 and T_2) were measured with a TD-NMR relaxometer (Minispec 60 mq, 60 MHz (1.41 T), 37°C, Bruker, Billerica, MA, USA). Then, longitudinal and transverse relaxation rates ($1/T_1$, $1/T_2$) were plotted against Gd concentrations, and relaxivities (r_1 and r_2) were calculated from the slope of the graphs. For this, Gd concentration values were obtained by ICP-MS (PerkinElmer Elan 6000, Waltham, MA, USA), after digestion of samples in nitric acid (trace metal grade, Fisher) and 30 % H_2O_2 at high temperature (115 °C). Nuclear magnetic relaxation dispersion (NMRD) profiles (T_1) of aqueous suspensions were measured from 0.015 to 40 MHz with a Spinmaster fast field cycling relaxometer (STELAR, Mede, Italy) at 37 °C, using 600 μ L of the 100% v/v nanoparticles suspension. Then, longitudinal and transverse relaxation times (T_1 and T_2) were measured at 20, 60, 300 and 500 MHz (corresponding to 0.47, 1.41, 7.0 and 11.7 T; 1 T = 42.6 MHz) by using Bruker MiniSpec relaxometers (20 and 60 mq; 20 and 60 MHz), and Bruker AMX300 (300 MHz) and AVANCEII-500 spectrometers (500 MHz). The temperature was set to 37 °C for all measurements, as well as a standard echo time of 1 ms. Finally, the relaxation rates ($1/T_1$ and $1/T_2$) were normalized to the Gd^{3+} concentration values in order to calculate the relaxivities (r_1 and r_2).

6.4.3. *In vivo* MR imaging and signal enhancement studies (Gd^{3+} -DTPA-M48SNs)

All animal experiments were conducted under the guidelines of Université Laval, Université de Sherbrooke and Centre hospitalier universitaire de Québec (CHU de Quebec, Canada) animal ethical committee. Six week-old balb/c female mice (Charles River, Montreal, Canada), were anaesthetised with isoflurane using a nose cone integrated to the MRI mouse bed. Animals were cannulated in the caudal tail vein (30 G, winged needle), and connected to a catheter prewashed with heparin and connected to the contrast media syringe (280 μ m ID Intramedic™ Polyethylene Tubing PE-10, 60 cm, total volume: 60 μ L). Then, the animals were inserted in a 3.5 cm diameter RF coil, and scanned twice using a T_1 -weighted 2D spin echo sequence (FOV: 90 mm, 24 slices, 0.7 mm, 0.1 slice gap, dwell time 25 μ s, 400x320, α 90°, TE/TR: 18/800 ms, duration: 4:16 min). Respiratory triggering was used. At time $t = 0$, the animals (3) were injected with 100 μ L of nanoparticle suspension (Gd^{3+} -DTPA-M48SNs in 154 mM NaCl, $T_1 = 19.4$ ms, ~ 2 mM Gd), and the same MR sequence was repeated for at least 90 minutes. For signal analysis, raw signal data

were extracted, and regions of interest (ROIs) drawn over sections of the abdominal aorta, liver and bladder. The mean signal intensity was calculated using ImageJ software (version 1.44m; Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Signal enhancement ratios were calculated as follows:

$$Ratio_{t=x} = \frac{Signal_{t=x}}{Signal_{t=0}} \quad (6.1)$$

6.4.4. PET and biodistribution studies

The radioisotope $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ($t_{1/2} = 12.7$ h) was purchased from the Sherbrooke Molecular Imaging Center of CRCHUS (Quebec, Canada), in the form of copper acetate ($^{64}\text{Cu}^{2+}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$). The preparation of copper acetate is described in the Supporting information section.

6.4.4.1. Labeling with $^{64}\text{Cu}^{2+}$ and Gd^{3+} ($\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs)

A fraction (500 μL) of the $^{64}\text{Cu}^{2+}$ solution (8.36 mCi) was added to the stock DTPA-M48SNs suspension (1.5 mL of 3.6 M Si) and left for chelation under moderate stirring (90 min, RT). After complexation with $^{64}\text{Cu}^{2+}$, 500 μL of a solution of $\text{Gd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (100 mM) was added, and the nanoparticle suspension was left in incubation for 30 min (RT). The suspension was purified by SEC (in 154 mM NaCl) and concentrated by tangential filtration down to 1.5 mL (see aforementioned procedure) in less than 60 minutes. From the SEC results, the radioactive labeling yield was evaluated to (54%). Similar T_1 and T_2 results were obtained with $^{64}\text{Cu}^{2+}$ and Gd^{3+} , compared to Gd^{3+} only.

6.4.4.2. Biodistribution studies

PET imaging was performed using a LabPET8 scanner (Gamma Medica, Northridge, CA, USA) with an 8-cm axial field, achieving a high spatial resolution (<1.5 mm FWHM within the central 12-mm diameter field of view) and absolute sensitivity (2.6% at an energy threshold of 250 keV).¹⁷⁷ Four week-old balb/c female mice ($n = 4$, Charles River, Montreal, Canada), were anaesthetized with isoflurane using a nose cone integrated to the PET mouse bed. Animals were cannulated in the caudal tail vein (30 G, winged needle), and connected to a catheter prewashed with heparin and connected to the syringe (280 μm ID IntramedicTM Polyethylene Tubing PE-10, 60 cm, total volume: 6 μL). The first animal was injected 17 h after beginning of chelation with $^{64}\text{Cu}^{2+}$ (~100 μCi at $t = 0$) and the others subsequently for the scans. Each animal was injected with 100-150 μL of $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs. The total activity injected per animal amounted 170 (100 μL), 213, 210 and 180 (150 μL) μCi for each mouse, respectively. Dynamic scans were acquired for

60 min, followed by static whole-body scans at $t = 6, 12, 24$ and 48 h. A 30-min acquisition scan was performed at $t = 6$ h, then 60-min scans at $t = 12$ h, 24 h and 48 h. At the end of each acquisition, data were reconstructed and corrected for radioactivity decay. In the following analysis, doses were corrected for radioactive decay referred to the time of the first PET acquisition, for each animal. The PET image reconstruction and analysis procedure is detailed in the Supporting Information section. ROIs were drawn over the abdominal aorta and the cava vein (for blood retention analysis), over the liver, spleen and kidneys. Organ and blood retention was calculated in units of %ID/g (see Supporting Information). The blood clearance half-lives were extracted by fitting the clearance curve with a sum of two exponentials, as follows:

$$y = A_0 + A \exp(-b * t) + C * \exp(-d * t) \quad (6.2)$$

The area under the curve was measured to calculate the nanoparticle retention rate, expressed in units of (MBq/cc) \times hour. To calibrate PET measurements, blood samples were extracted from the caudal vein at $t = 60$ minutes after the first injection, for each animal, and measured in a gamma counter (Auto-Gamma, Cobra II, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) to determine the blood radioactivity concentration. Finally, 48 h after the injection of $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs, mice were euthanatized by intracardiac exsanguination. Organs of interest were extracted, weighed, and their activity was measured by gamma counter. Values were corrected for the radioactive decay, as well as for the gamma counter efficiency, and expressed in units of %ID and %ID/g of tissue.

6.5. Results and discussion

The MCM-48-type MSNs (with a 3D pore structure) were synthesized in basic media, followed by template extraction in ethanol.⁹² As shown in Figure 6.1 A-C, the particles are non-aggregated, well-defined and uniformly spherical (mean diameter by TEM: 150 nm). The reaction sequence that was used to graft DTPA, followed by chelation with Gd^{3+} and $^{64}Cu^{2+}$ ions, is schematically presented in Figure 6.1 D-F. APTES was reacted with the silanol groups at the MSN surface (in toluene), to form “APTES-M48SNs”, followed by grafting with DTPA (“DTPA-M48SN”). Finally, the particles are labeled with Gd^{3+} or $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ ions in nanopure water (Figure 6.1 F).

6.5.1. Textural properties and TGA analysis

Porosity data, reported in Table 6.1. The final product (DTPA-M48SNs) had a surface area, pore volume and mesopore size of $847 \text{ m}^2/\text{g}$, $0.42 \text{ cm}^3/\text{g}$ and 2.4 nm , respectively. Thermogravimetric analysis (TGA, Figure 6.9) performed on APTES-M48SN and DTPA-M48SN,

revealed a weight loss of 18.5% and 33.5%, respectively (15 % w/w attributed to DTPA in DTPA-M48SN), indicating the strong presence of DTPA in M48SNs.

Table 6.1. Textural properties of M48SNs and DTPA-functionalized M48SNs

Sample	Surface area [m ² /g]	Pore volume [cm ³ /g]	NLDFT ads. Pore size [nm]
M48SNs	1633	1.34	3.6
DTPA-M48SNs	847	0.42	2.4

6.5.2. Physico-chemical characterization (NMR, XPS, FTIR, EDX)

The successful grafting of APTES and DTPA on M48SNs was further confirmed by NMR, XPS and FTIR spectroscopic characterization. First, NMR spectra of ¹³C and ²⁹Si (Figure 6.2 A and B) confirmed the presence of APTES and the covalent reaction (on the ²⁹Si spectrum) of APTES with the silanol groups present at the surface of M48SNs. Indeed, the ¹³C CP-MAS NMR spectrum of DTPA-M48SNs showed all the typical characteristic peaks of DTPA-APTES (ascribed in Figure 6.2 A). The ¹³C peaks characteristics of DTPA were grouped into two major contributions: one group at – (160 – 180) ppm, corresponding to the five carbon atoms present in positions 1 - 4; one group at – (40 – 65) ppm, corresponding to the eight atoms present in positions 5 - 9. In addition, the ²⁹Si NMR spectrum (Figure 6.2 B) depicted a multicomponent peak in the -88 to -120 ppm range, which is associated with the Q_n groups of the silica framework (Q_n schematically represented in Figure 6.2 C). Furthermore, T_n groups from the silicon atoms contained by covalently-grafted silane molecules, were also evidenced (Fig. 6.2 C) and confirmed the reaction of APTES on MSNs.¹⁷⁸

FTIR spectra of Gd-DTPA, DTPA-M48SNs and Gd³⁺-DTPA-M48SNs are presented in Figure 6.2 D. FTIR spectra confirmed the grafting of DTPA on M48SNs and the chelation of Gd³⁺. First, the stretching bands of Gd³⁺-DTPA-M48SNs matched the ones of Gd-DTPA and of DTPA-M48SNs. The observation of carboxylate bands in the FTIR spectra (Figure 6.2 D) confirmed the efficient chelation of Gd³⁺ by DTPA. Gd³⁺-DTPA-M48SNs stretching bands are similar to the DTPA-M48SNs, except for the absorption band at 1722 cm⁻¹ which disappeared after the chelation of the Gd³⁺. This indicates that all the carboxylic acids (COOH) in DTPA are deprotonated and used for the grafting on APTES-M48SNs or for the chelation of Gd³⁺. The separation (Δ) between the symmetric and asymmetric bands of the carboxylate group indicates the coordination type. For the Gd³⁺-DTPA-M48SNs, a wavenumber separation of 180 cm⁻¹ was calculated, which corresponds to a bridging ligand.¹⁷⁹ As shown in Figure 6.2 D, the carboxylate separation is similar for Gd-DTPA

and Gd^{3+} -DTPA-M48SNs, indicating that there is no modification of the chelation type between both products. The DTPA-M48SNs spectrum showed the DTPA stretches and also revealed the characteristic mesoporous silica nanoparticles bands.

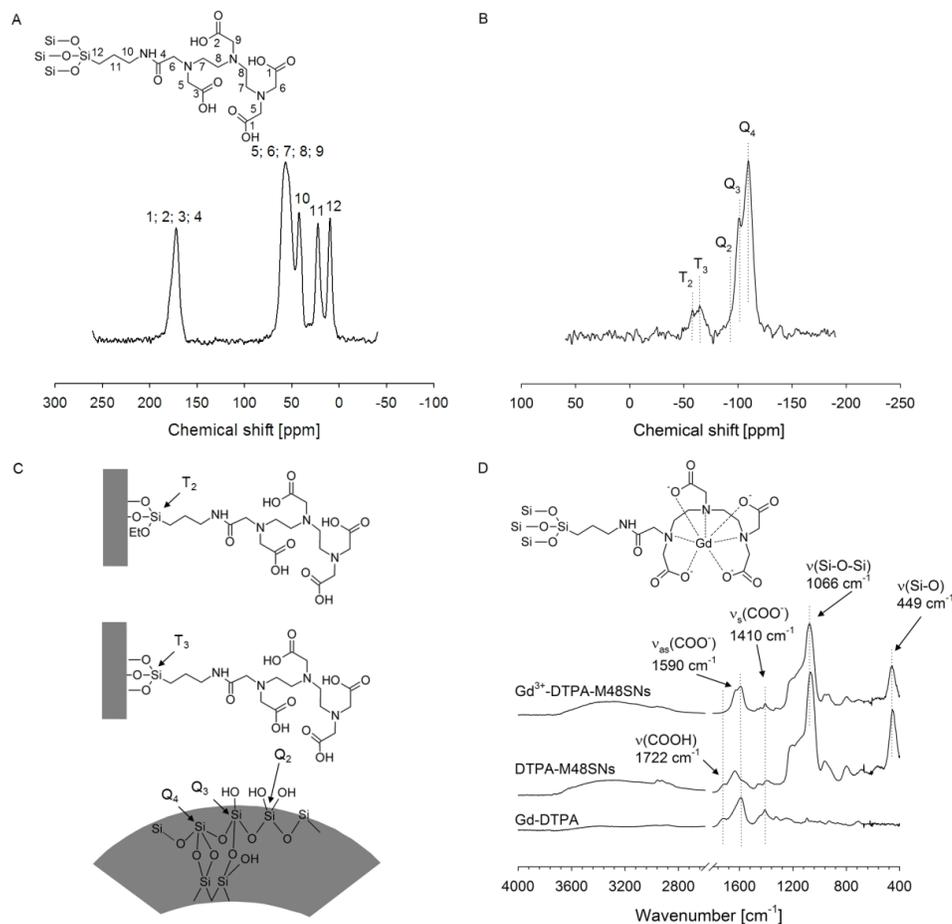


Figure 6.2. Physico-chemical characterization of M48SNs: (A) grafting of DTPA demonstrated by ^{13}C CP/NMR profile; (B) grafting of APTES on the silica network demonstrated by the ^{29}Si MAS NMR profile; (C) schematic representation of the Si-O bonds at the surface of M48SNs, as revealed by NMR; (D) FTIR profile of Gd-DTPA, DTPA-M48SNs and Gd^{3+} -DTPA-M48SNs.

The XPS results clearly exhibited the presence of silicon, carbon, oxygen, nitrogen and gadolinium (Table 6.2). As expected, the characteristic silicon peak of mesoporous silica at 103.7 eV was observed for each nanoparticle system.⁹² The grafting efficiency of APTES and DTPA was evidenced by the strong presence of C, N and O. For C the band at 285.0 eV (Table 6.2) is attributed to C-C and C-H; that at 286.5 eV to C-O and C-N; the one at 288.8 eV to C=O amide/acid. For N, the presence of two components at binding energies of 399.8 eV and 402.0 eV were observed. The peak at 399.8 eV was attributed to amine (NH_2) groups and the contribution at 402.0 eV, to residual ammonium (NH_3^+) content from chemical extraction procedure. The presence

of this contamination was observed for APTES-M48SNs (1.4%) and DTPA-M48SNs (0.8%) systems. The contributions of Si significantly decreased after the grafting procedures (Table 6.2). Consequently, an increase in the C/Si ratios were observed, which confirmed that APTES and DTPA were efficiently grafted on M48SNs.

Table 6.2. Surface composition of nanoparticles (from XPS survey spectra)

Sample	% C [285.0 eV:C-C/C-H] (286.5 eV:C-O/C-N) {288.8 eV:C=O amide/acid}	% O [532.8 eV:Si-O/COOH] (531.5 eV:Gd-OCO)	% N [399.8 eV:NH ₂] (402.0 eV:NH ₃ ⁺)	% Si 103.7 eV:SiO	% Gd	C/Si
M48SNs	9.7	63.7 [63.7] (-)	-	26.6	-	0.37
APTES-M48SNs	25.8 [12.7] (13.1) {-}	47.0 [47.0] (-)	4.0 [2.6] (1.4)	21.6	-	1.19
DTPA-M48SNs	31.8 [13.5] (16.1) {2.2}	42.7 [42.7] (-)	6.9 [6.1] (0.8)	18.1	-	1.76
Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs	30.3 [14.2] (12.9) {3.2}	43.8 [36.2] (7.6)	6.5 [6.5] (-)	17.6	0.8	1.72

*The missing contribution to reach 100% of surface composition is corresponding to Cl contribution

XPS further confirmed the chelation of Gd³⁺ by DTPA-M48SNs (0.8% of Gd), for a Gd/Si ratio of 0.045. This result indicates an efficient complexation of Gd³⁺ to DTPA-M48SNs, meaning suitable chelation conditions. Oxygen contribution revealed two peaks at binding energies of 532.8 eV and 531.5 eV. Peaks were assigned as follows: 532.8 eV to Si-O/COOH and 531.5 eV to Gd-OCO. The absence of a second silica peak at 102.1 eV indicates that there are no gadolinium silicate domains (Si-O-Gd).⁹² Finally, because XPS is a surface technique, the Gd/Si ratio was also measured by EDX (on a HRTEM system). Gd/Si ratios of 0.064 at the outer surface of particles, and 0.058 at their core, confirmed that Gd was distributed not only at the outer surface of particles, but uniformly inside the mesopore structure. The chemical concentration of ⁶⁴Cu²⁺ was too low in ⁶⁴Cu²⁺-DTPA-MSNs to reach detectability levels in XPS.

6.5.3. Colloidal stability and relaxometric properties

DLS revealed a hydrodynamic diameter size of 250 ± 76 nm, and a strong colloidal stability (Figure 6.3 A), confirmed by zeta potential (-20.6 mV at pH 7.5). Only a slight increase of hydrodynamic diameter was found after 6 months in 154 mM NaCl. The relaxometric potential of Gd³⁺-DTPA-M48SNs was measured at clinical magnetic field strength (1.41 T, 60 MHz, 37 °C,

Figure 6.3 B). The longitudinal relaxivity of Gd^{3+} -DTPA-M48SNs was $r_1=17.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (r_2/r_1 ratio of 2.0), which is 5.3 times higher than for Gd-DTPA (see Table 6.4), and in the same order as for previous studies reported for Gd-MSNs ($19.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r_2/r_1 = 2.5$; measured at 3T and room temperature).⁸⁷ The previous few relaxometric studies on Gd-labeled MSN were performed mainly with 2-D mesoporous networks, and they used different magnetic field strengths and temperature conditions. For some of them, precise relaxivity values were not reported.⁷⁴ For Gd^{3+} -DTPA-M48SNs, we measured r_1 and r_2 on a large range of magnetic field strengths (from 0.01 to 500 MHz for r_1 and 20 to 500 MHz for r_2 , Figure 6.3 C).

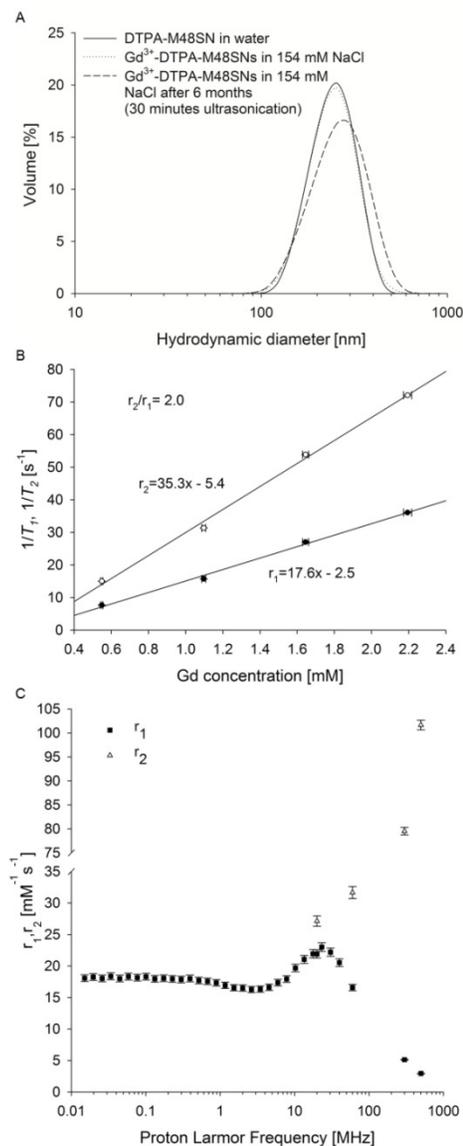


Figure 6.3. DLS hydrodynamic diameter profiles and colloidal stability (A). Contrast-enhancement potential of Gd^{3+} -DTPA-M48SNs, relaxivities (r_1 , r_2) measured at clinical magnetic field strength (1.41 T)(B), and (C) NMRD profiles of Gd^{3+} -DTPA-M48SNs (r_1 , r_2) at variable magnetic field strengths.

NMRD profiles revealed a relaxometric peak at 10 – 60 MHz, followed by a sharp decrease at fields >100 MHz, which is typical of NMRD profiles of nanoparticles and macromolecules labeled with paramagnetic chelates. For instance, Gd³⁺ chelates bound to human serum albumin, show a maximum peak at similar field strengths (~20 MHz).¹⁸⁰ This peak has been attributed to the fact that for nanoparticles and macromolecules, the rotational time of the compound is intrinsically higher than for free Gd³⁺ chelates. Finally, the presence of free Gd-DTPA would have been evidenced by strong dipolar dispersion at about 5 MHz.¹⁴ Hence, the labeling of M48SNs with Gd³⁺ provides an efficient positive contrast enhancement effect at clinical magnetic field strengths (1 - 1.5 T; 40 - 60 MHz), which is moderate at higher fields (higher r₂/r₁ ratios). No evidence of sedimentation or aggregation was found either by DLS or in T₁-w. *in vitro* MRI images (Figure 6.10).

6.5.4. *In vivo stability assessment*

Gd³⁺-DTPA-M48SNs were injected in mice (0.31 μmol Gd), and scanned in MRI for at least 1 hour (Figure 6.4 A). The injected dose was deliberately kept at a low level (12.4 μmol/kg or 0.31 μmol Gd/mouse for a 25-g animal), well below the potential cytotoxic thresholds of Gd-DTPA (typical clinical injections at 0.1 mmol/kg). A strong vascular signal enhancement was evidenced and quantified in the first minutes following the injection, corroborating the high relaxivities measured for Gd³⁺-DTPA-M48SNs, stronger than for free Gd³⁺-DTPA. The signal enhancement was monitored on the abdominal aorta (empty arrow in Figure 6.4 A), confirming the significant concentration of Gd in the blood (Figure 6.11 A), as well as the retention of a signal enhancement effect up to 90 minutes after the injection. The signal in the liver remained relatively stable over time (Figure 6.11 B), whereas a moderate and progressive signal enhancement was noted in the bladder (Figure 6.11 C), indicating the leaching of a very limited fraction of Gd³⁺-DTPA from the M48SNs. No evidence of signal enhancement was noted in the kidneys. This is a significant finding because, on such high specific surface systems, the presence of DTPA chelators only adsorbed (and not covalently bound) to the main nanoparticle framework, could lead to excessive leaching of Gd³⁺-DTPA in the blood, in the first seconds following injection of the compound. The absence of signal enhancement in the kidneys confirms that Gd³⁺-DTPA attached using the chemical procedure described in the experimental section, does not leach from the nanoparticles upon injection.

After MRI studies, the distribution of Gd³⁺/⁶⁴Cu²⁺-DTPA-M48SNs was monitored by PET (Figure 6.4 B). The activity of the suspension was 4.49 mCi after the purification, with a ⁶⁴Cu²⁺ chelation yield of 54%. Dynamic and static PET scans performed over 48 hours, revealed a strong

accumulation of particles in the liver and in the spleen and, more importantly, in the gastrointestinal system (Figure 6.4 B). Gastrointestinal excretion was evidenced at 24 h and 48 h, and confirmed by biodistribution data at 48 h (Table 6.3). In spite of a very careful examination of the PET images in the first seconds following injections, then at every acquisition time, no evidence of signal accumulation was found in the kidney area. A moderate to high kidney activity would have indicated the presence of detached ^{64}Cu -DTPA from the MSN structures. In fact, i.v.-injected ^{64}Cu is expected to be eliminated through the kidneys within 2 h post injection.¹⁸¹ The presence of free ^{64}Cu would also have been clearly indicated by activities in the bladder and the kidneys, in the first hour following the injection.

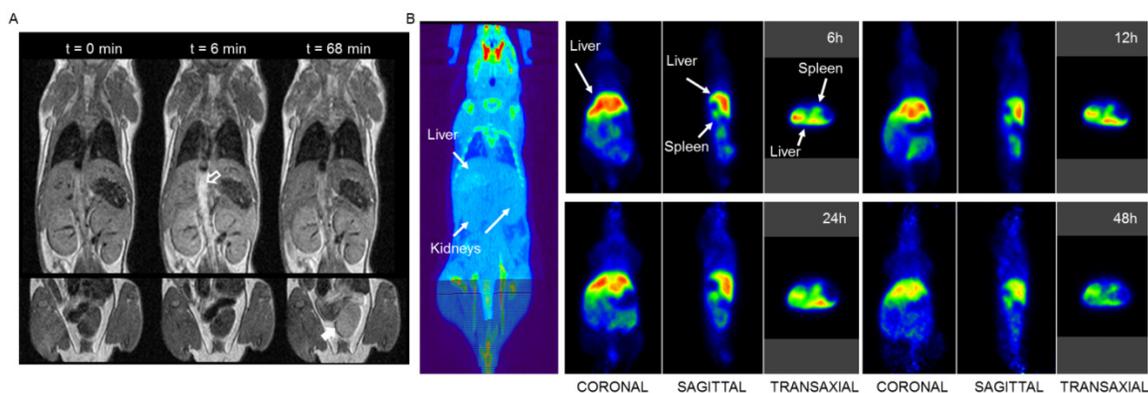


Figure 6.4. MRI images of mice injected i.v. with Gd^{3+} -DTPA-M48SNs (A). Empty arrow: vascular signal-enhancement effect after injection of the particles. PET images of mice injected with $\text{Gd}^{3+}/^{64}\text{Cu}^{2+}$ -DTPA-M48SNs (B). Left: coronal “scout” CT map to localize liver and kidneys. Right: series of coronal, sagittal and axial PET images acquired at time points. No evidence of radioactive uptake or clearance was found in the kidneys.

The dynamic PET and MRI scans were then used to plot the blood clearance (Figure 6.5 A and 6.11 A). In the dynamic PET acquisitions, regions of interest (ROI) of the abdominal aorta and the cava vein were plotted and converted in %ID/g of blood. Blood clearance half-lives were calculated on the results of four (4) animals, and fitted according to a model of two (2) exponential curves (fast-decaying component: mean $t_{1/2 \text{ blood}} = 4.5 \text{ min} \pm 2.4$; slow-decaying component: $t_{1/2 \text{ blood}} = 137 \text{ min} \pm 11$, respectively). Finally, Figure 6.5 B depicts the evolution of % ID/g of tissue as a function of time for ROIs integrated on the liver and spleen areas. The results were corrected for ^{64}Cu physical decay. The left part of the graph corresponds to the 60-min dynamic acquisition data, whereas the right part corresponds to the static acquisitions at 6, 12, 24 and 48 h post-injection. In the liver, a maximum peak ($\sim 88\%$ ID/g) was reached in the first minute after injection, followed by a rapid decrease to $\sim 42\%$ ID/g. This initial peak corresponds to the nanoparticles present in the vascular system just after injection. After this first initial peak, the liver signal progressively

increased, then plateaued (~65% ID/g). A strong activity decrease was noted within the first 48 hour after injection. Similar profiles were revealed for the spleen, with activity concentrations about half of those calculated in the liver (~27% ID/g) few minutes after the injection. The biological half-lives of the nanoparticles in the liver and in the spleen were measured in the 6 – 48 h period, and correspond to 14.8 h and 12.9 h, respectively (Figure 6.5 B). Finally, the comprehensive *ex vivo* biodistribution study performed at 48 h (Table 6.3), revealed that Gd³⁺/⁶⁴Cu²⁺-DTPA-M48SNs were mainly found in the liver (~30.1% ID), which is consistent with PET results. A high level of activity was found in the intestine (~18.1% ID). A moderate activity level was found in the blood (4.94% ID), as well as in the heart (~1.09% ID) and in the lungs (~1.65% ID).

Understanding the retention to organs, elimination, and early signs of degradation of the particles *in vivo*, is a priority in the perspective of transferring MSN-based technologies into approved clinical procedures. One of the most fundamental steps, is to demonstrate that metal chelates attached on nanoparticles that have such high specific surface values as MSNs, remain strongly attached once submitted to *in vivo* conditions. The absence of signal in the kidneys and in the bladder, confirms the strong attachment of metal chelates at the surface of the particles. Then, the blood clearance of MSNs as well as uptake in organs such as liver, spleen and kidneys are expected to occur within minutes following i.v. injection. Therefore, efficient, quantitative and time-resolved imaging modalities must be used to reveal the dynamics of such processes. Dual MRI/PET acquisition protocols provide a straightforward and systematic methodology allowing the precise *in vivo* quantification of nanoparticle blood retention (by MRI), excretion by the kidneys through the urine (by MRI), as well as dynamic measurement of liver, spleen, lung, and kidney uptake and clearance (by PET).

In the present study, the uptake to critical organs such as liver (30.1%), spleen (0.72%) and lungs (1.65%) at 48 h, was similar to data previously found for MSN showing zeta potential -20.5 mV, and measured at 72 h after injection (MSNP-PEG).⁸³ Gd³⁺/⁶⁴Cu²⁺-labeled MSNs were found mainly in the liver and in the spleen within a few minutes after injection (Figure 6.5 C). After the high-intensity peak initially detected in the liver, and corresponding to the initial vascular influx of radioactive MSNs, a progressive uptake of MSNs occurs at the same rate in the liver and in the spleen. After 7 minutes, the uptake of the particles in the liver and in the spleen reaches a plateau, followed by progressive elimination. This is the first time a quantitative and dynamic measurement of liver and spleen MSN uptake, retention, and elimination, is performed in real time. MSNs appear to be strongly eliminated from the liver and from the spleen. Interactions with proteins, serum components and immune cells in the blood may affect the behavior of template-extracted MSNs and

initiate their degradation.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Calcined nanoparticles, on the other hand, are more resistant to degradation when submitted to physiological media.¹⁸⁵ It is generally assumed that biocompatible nanoparticles which remain in the body for a few hours, delivering a treatment, followed by a strong elimination through the urinary or gastrointestinal tracts, would attenuate the toxicity risks and moderate their potential long-term retention in organs.

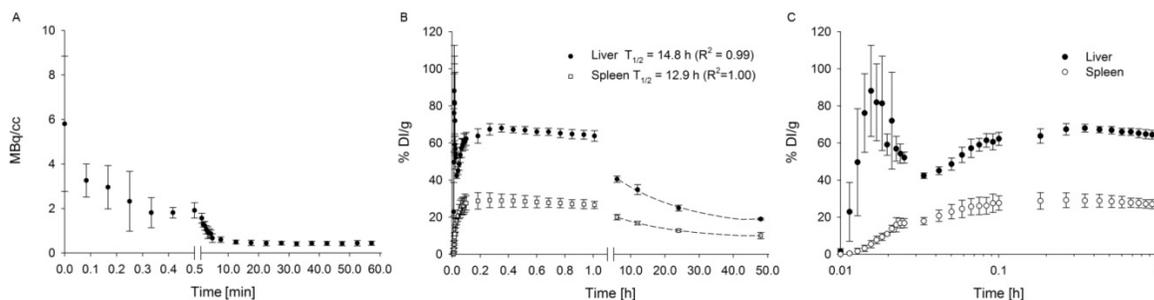


Figure 6.5. Dynamic blood clearance profiles measured by PET (A); uptake and retention of M48SNs in the liver and in the spleen (B-C).

The precision of dynamic PET studies performed here provided new valuable insights into blood clearance data (Figure 6.5 A). Two (2) different regimes were identified: first, a more rapid mechanism of elimination seems to occur ($\text{mean } t_{1/2 \text{ blood}} = 4.5 \text{ min} \pm 2.4$), then, as second, slower contribution, is noticed ($t_{1/2 \text{ blood}} = 137 \text{ min} \pm 11$). The first contribution is most probably due to the larger fraction of particles that are rapidly sequestered by the macrophages, followed by their entrapment in the liver and spleen. The slower contribution is attributed to larger particles (>200 nm) possibly delayed in the fine vasculature of several organs such as in the liver, and in the lungs. Overall, the presence of two clear components in the blood clearance profiles of MSNs is a significant observation that would deserve further investigation

Finally, the *ex vivo* biodistribution study performed at 48h, revealed a strong presence of particles in the intestine (18.1% ID at 48 h; Figure 6.4 B), confirming that the major route for the degradation of DTPA-labeled MSNs is through the gastrointestinal tract. Significant contributions were also found in the kidneys (2.27%) but relatively weak ones in the bladder (0.06%). The retention of vascular radioactivity at 48h (4.94% ID), suggests the occurrence of a vascular uptake of small fragments of MSNs, possibly at the intestinal level. The exact mechanism of this phenomenon should be studied in detail in order to comprehensively understand the pharmacokinetics and clearance mechanisms of silica nanoparticles.

Table 6.3. Biodistribution of Gd³⁺/⁶⁴Cu²⁺-DTPA-M48SNs after 48 hours (n = 4). Total injected activity (ID) is based on the average of 3 standards

Organ	48 hours			
	% ID	±	% ID/g of organ	±
Blood	4.94	0.76	4.66	0.72
Liver	30.1	1.8	30.3	2.0
Spleen	0.72	0.13	9.3	1.3
Kidney	2.27	0.03	17.08	0.85
Lungs	1.65	0.10	12.9	1.3
Pancreas	1.14	0.16	4.86	0.36
Heart	1.09	0.07	11.96	0.44
Intestine	18.1	1.0	12.27	0.47
Stomach	1.53	0.17	8.80	0.71
Bladder	0.06	0.00	3.31	0.48

6.6. Conclusion

The strong attachment of metal chelates at the surface of 3-D nanostructured mesoporous silica nanoparticles, was characterised by FTIR, XPS, and NMR. The particles demonstrated a very strong colloidal stability *in vitro*. The relaxometric study performed with Gd³⁺-DTPA-M48SNs revealed a high contrast enhancement potential in MRI, as well as a signature typical of paramagnetic nanoparticles. Gd³⁺/⁶⁴Cu²⁺-DTPA-M48SNs were injected in mice, and visualized in MRI and in PET. No significant activity was detectable in the bladder with PET, whereas a slight signal increase was measured with MRI, but only at 90 min. post-injection. This confirms the very limited detachment of DTPA from the M48SN cores with the chelat grafting methodology used in this study. PET and biodistribution data confirmed that MSN excretion occurs massively by the gastrointestinal route following their uptake by the hepatic system. No evidence was found that the transit of MSN *in vivo*, leads to DTPA detachment and elimination in the urine. This demonstrates the quality and strength of DTPA anchoring at the silica surfaces, and validates this approach for further development in the field of PET/MRI-assisted drug delivery procedures using MSNs.

6.7. Acknowledgements

This study was supported by the Centre Québécois des Matériaux Fonctionnels (CQMF). M.-A.F. and F. Kleitz are grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and to Fonds de recherche du Québec Nature et technologies (FRQNT) for financial support. M.-A.F. and Y.G. are grateful to Ministère des relations internationales du Québec-Wallonnie-Brussel for a joint mobility grant. The authors acknowledge the valuable contribution of Dr Jean-Luc Bridot and Dr Rémy Guillet-Nicolas (contribution to MSN synthesis), Dr Sophie

Laurent and Dr Aline Hocq (NMRD profiles) as well as Ms Melissa Guignard (CR-CHU) for technical assistance in animal handling), Dr Jacques Rousseau and Mr Jean-François Beaudoin (CHUS, PET procedures).

6.8. Supporting information

6.8.1. M48SNs and DTPA-M48SNs textural properties

Low-angle powder XRD measurements were carried out on a Siemens D5000 system (Munich, Germany) using Cu K α radiation (1.541 Å) and operated at 40 kV with a variable slit width. The scanning rate was set over 2 θ from 1° to 8°. The Jade (v 2.1) software coupled with JCPDS and ICDD (2001 version) databases was used to analyze the XRD data. The low-angle XRD profile of DTPA-M48SNs showed a broad and weak peak at 2.7° 2 θ assigned to the (211) plane of the 3-D cubic $Ia\bar{3}d$ mesostructure (Figure 6.6).¹⁸⁶

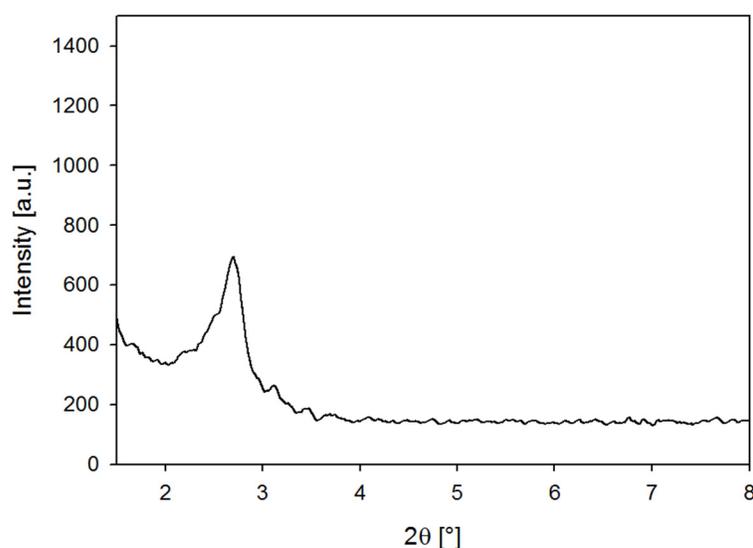


Figure 6.6. Low-angle XRD profile of DTPA-M48SNs.

The textural properties and the porosity features were also investigated by N₂ physisorption measurements and porosimetry calculations (Figure 6.7-6.8 and Table 6.1). Nitrogen physisorption measurements were performed at -196 °C with an ASAP 2010, Micromeritics (Norcross, GA, USA). Before the sorption measurements, the samples were out-gassed under vacuum for at least 6 hours at >80 °C. The specific surface area (S_{BET}) was determined using the BET equation in the range $0.05 \leq P/P_0 \leq 0.20$ and the total pore volume was obtained at $P/P_0 = 0.95$.

Pure M48SNs showed a type-IV isotherm (IUPAC classification), characteristic of highly ordered M48SN with cylindrical-like pores (Figure 6.7). However, the isotherms of DTPA-M48SNs showed type I-like behavior, which is similar to what is typically found for microporous materials. This behavior can be attributed mainly to the presence of DTPA, not only at the outer surface but also at the entrance of pore channels.

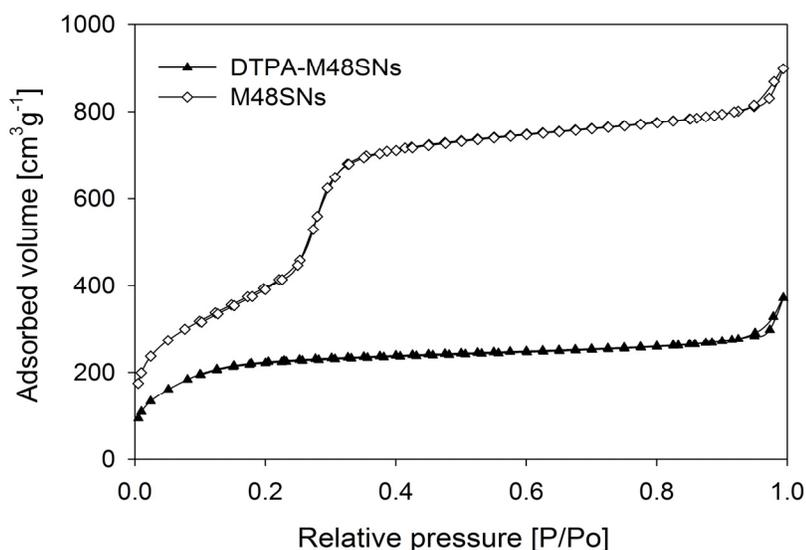


Figure 6.7. N₂ physisorption isotherms of DTPA-M48SNs and M48SNs.

The pore size distributions were calculated using non-local density functional theory (NLDFT) methods applying the adsorption branch model (from N₂ physisorption isotherms data and considering N₂ sorption at -196 °C in silica with cylindrical pore geometry). This calculation was performed with Autosorb 1.55 software (Quantachrome Instrument, Boynton Beach, FL, USA). The calculated pore width showed a pronounced decrease after DTPA grafting, from 3.6 to 2.4 nm (Figure 6.8).

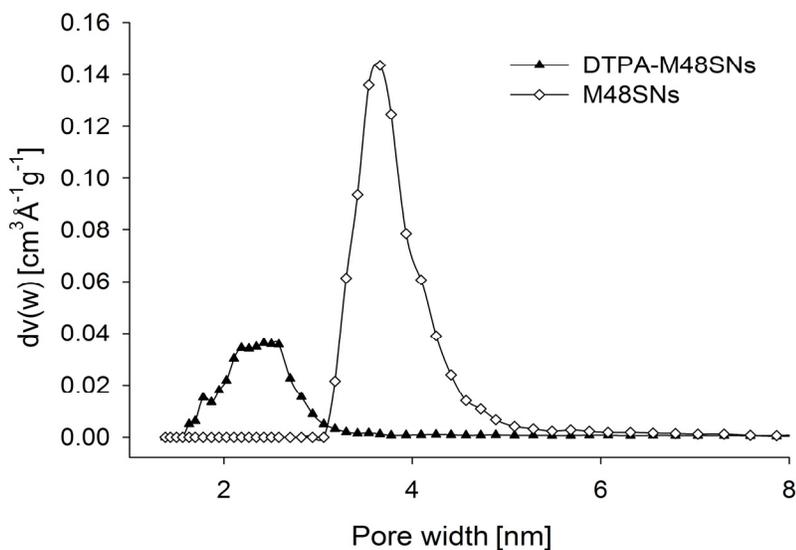


Figure 6.8. NLDFT pore size distributions (N₂, 77 K).

6.8.2. DTPA grafting quantification

The amount of attached DTPA molecules was quantitatively determined by thermogravimetric analysis (TGA, Figure 6.9). Thermogravimetric analyses were carried out on DTPA-M48SNs using a Netzsch STA 449C thermogravimetric analyzer (Selb, Germany), under air flow of 20 mL/min with a heating rate of 5 °C min⁻¹, between 35 °C and 700 °C. The percentage of grafted molecules (DTPA-APTES) was calculated based on the mass loss between 160 °C and 650°C. This temperature range excludes solvent (e.g., physisorbed water) and supplementary silica condensation from the calculation (Figure 6.9). The unfunctionalized sample, M48SNs, exhibits a loss of 7% w/w attributed to the residual ethoxy groups formed during the surfactant extraction process. After amine and DTPA functionalization, the weight loss was 18.5% and 33.5% (from 160 °C to 650 °C, respectively). Therefore, the amount of organic loss attributed to DTPA, is estimated to about 15% (w/w), confirming thereby the efficiency of DTPA grafting.

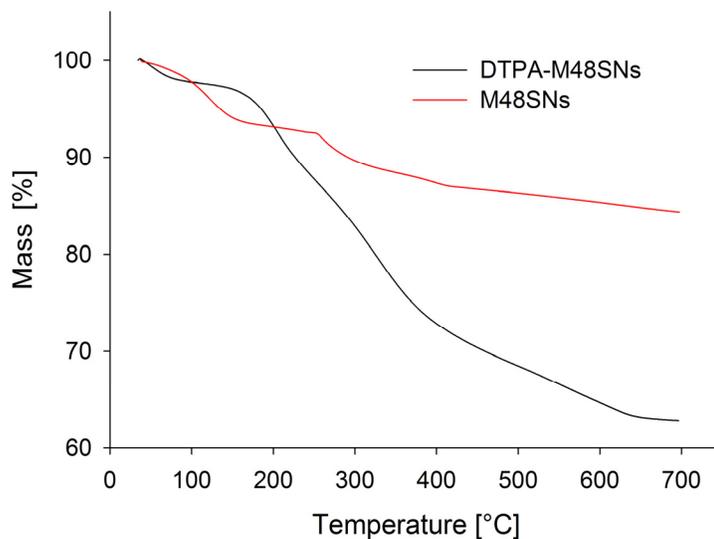


Figure 6.9. Thermogravimetric profiles of M48SNs and DTPA-M48SNs.

6.8.3. Relaxometric studies of Gd³⁺-DTPA-M48SNs

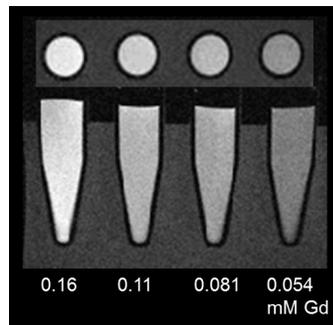
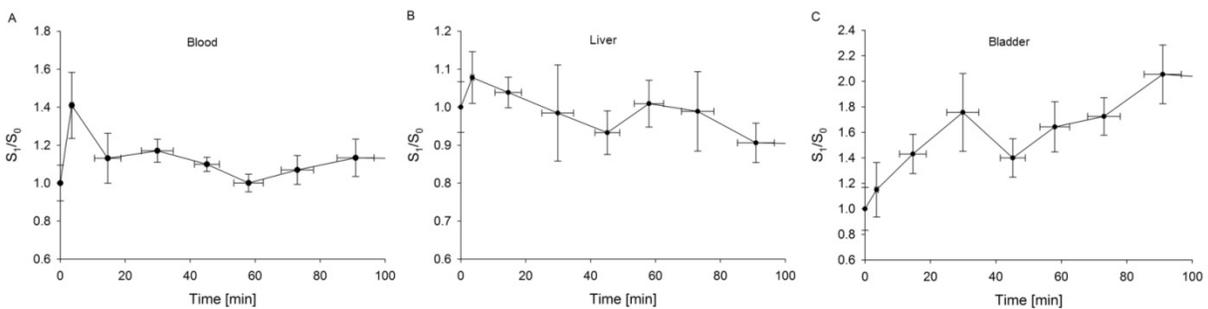
The relaxometric performance of Gd³⁺-DTPA-M48SNs is shown in Table 6.4, and compared with the few other Gd-labeled MSNs systems (based on 2D-porosity materials), reported thus far in the literature.

Table 6.4. Relaxivities of Gd-chelated MSN materials

Sample	Pore network geometry	Temperature [°C]	Magnetic field T, [MHz],	r_1 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	r_2 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	r_2/r_1	Ref.
Gd ³⁺ -DTPA-M48SNs	3D	37	1.41 [60]	17.6	35.3	2.0	This work
Dye@MSN@Gd@ ⁶⁴ Cu	2D	-	7 [297.9]	-	-	-	74
Gd-MSNs	2D	-	3 [127.7]	19.0	46.8	2.5	87
GdL/MCM-41	2D	37	0.47 [20]	27	-	-	176
Gd-Dye@MSN	2D	-	0.47 [20]	23	34	1.5	72
Gd-DTPA (Magnevist®)	-	37	1.5 [63.8]	3.3	3.9	1.2	187

6.8.4. *In vitro* assessment of contrast media with MRI

Aliquots of diluted Gd³⁺-DTPA-M48SNs (500 μ L) were pipetted in 500 μ L-polyethylene centrifugation tubes. The tubes were immersed in water, inserted in a 60-mm RF coil and imaged at 25 °C with a 1 T small-animal MRI system (M2M, Aspect Imaging, Netanya, Israel). T_1 -weighted 2D spin-echo sequences were used, as follows: TE/TR = 14/700 ms; $f_\alpha=90^\circ$; FOV: 80 mm; 1.4 mm slices with 0.1 mm gap; dwell time 16 μ s, matrix: 400 X 400; 3 NEX.

**Figure 6.10.** T_1 - weighted MR images of aqueous dilutions of Gd³⁺-DTPA-M48SNs.**Figure 6.11.** Dynamic blood clearance profile measured by MRI (A), the signal enhancement ratio (S_1/S_0) was calculated for liver and bladder, and plotted in (B) and (C).

6.8.5. Preparation of $^{64}\text{Cu}^{2+}$ radioisotope solution

The radioisotope $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ($t_{1/2} = 12.7$ h) was purchased from the Sherbrooke Molecular Imaging Center of CRCHUS (Quebec, Canada), in the form of copper acetate ($^{64}\text{Cu}^{2+}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$). It was prepared on a TR-19 cyclotron (Advanced Cyclotron Systems, Richmond, BC, Canada) by the reaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ using an enriched ^{64}Ni target electroplated on a solid rhodium disc (22 mm diameter, 1 mm thickness). ^{64}Ni was purchased from Isoflex (San Francisco, CA, USA). $^{64}\text{Cu}^{2+}$ was recovered from the target material following the procedure of McCarthy et al.¹⁸⁸ and dispersed in 0.5 mL of 0.1 M HCl. Then, the sample was evaporated and reconstituted in 0.1 M acetate buffer (0.5 mL, pH 5.5). All solutions were prepared with ultrapure water (>18.0 M Ω -cm resistivity).

6.8.6. PET images reconstruction and analysis

Images were reconstructed by MLEM 3D (15 iterations, no attenuation correction) and analyzed with the software LabTEP (Université de Sherbrooke). ROIs were drawn on 3 adjacent transaxial planes, selected on areas covering the liver, the spleen and the kidneys. On each ROI, the average count per second per pixel (Cts/sec/Pix) and the maximum 4 pixel count (MAX4Pix, average of the 4 most intense pixels in ROI) were noted. These values were then corrected for ^{64}Cu decay (12.7 h) referred to the time of injection ($t = 0$). Then, values in (Cts/sec/Pix) were converted in (Cts/sec/cc) by dividing by the corresponding pixel volume (1.475×10^{-3} cc). The values in (Cts/sec/cc) were then converted in MBq/cc using a calibration factor of (1 Cts/sec/cc = 640.9 Bq/cc), determined by scanning a standard phantom containing a known solution of ^{64}Cu obtained from the cyclotron facility, and measured on the same day. Values in MBq/g were obtained assuming a tissue density of 1g/cc. The percentage of injected dose per g of tissue (%ID/g) was calculated by dividing the values in MBq/g, by the total activity per mouse measured in a well counter (Capintec, Inc., Ramsey, NJ, USA). The dose values were all corrected for decay using the reference time corresponding to the first dynamic scan, for each mouse.

Discussion

La première étude présentée dans ce mémoire repose sur un modèle de particules MSNs fonctionnalisées par l'imprégnation de manganèse à l'intérieur du réseau poreux. La synthèse et la caractérisation des nanoparticules ayant été réalisées par l'étudiant Rémy Guillet-Nicolas (candidat au doctorat), seules les propriétés directement en lien avec les études cellulaires sont discutées ici.

Il est important de souligner que notre étude a démontré pour la première fois les effets de contraste produits par des particules Mn-M48SNs internalisées à l'intérieur de cellules. Il est maintenant établi que malgré une faible concentration de nanoparticules internalisées, le signal produit reste suffisant pour être détecté par effet de contraste. Une étude sur le contraste des cellules après un certain nombre de divisions cellulaires sera nécessaire afin d'établir les limites de l'utilisation de l'IRM. Néanmoins, l'excellent seuil de détection démontré dans notre étude laisse présager la possibilité de suivre, dans des modèles animaux, des cellules marquées avec les Mn-M48SNs.

L'intérêt de notre étude par rapport aux autres travaux sur l'internalisation de MSNs dopées avec du Mn réside dans le fait que plusieurs expériences ont été élaborées afin d'étudier en profondeur la cytotoxicité des particules Mn-M48SNs. En effet, celle-ci a non seulement été évaluée en fonction de la concentration de nanoparticules, mais aussi en fonction de la durée de l'incubation et des effets sur la prolifération. D'ailleurs, nos résultats ont permis de conclure qu'une forte concentration de Mn-M48SNs et une incubation prolongée n'affectent pas la prolifération ou la viabilité des cellules. À titre comparatif, seule la viabilité en fonction de différentes concentrations avait été évaluée par Shi et al. sur des cellules du cancer du sein.⁶⁵ Ces derniers ont développé un modèle de Mn-MSNs basé sur une réaction d'oxydation et de réduction dans le but d'obtenir de l'oxyde de manganèse dans les pores de particules MSNs de structure poreuse 2D (~100 nm de diamètre). Pour des concentrations d'incubation beaucoup plus élevées (~10 x) et une durée d'incubation de 24 h, les taux de viabilité cellulaire que nous avons obtenus sont supérieurs à ceux publiés par Shi et al.⁶⁵ En présence de particules MSNs dopées avec du Mn pendant 36 h, leur pourcentage de viabilité n'atteint que 70 à 80 %. Ces différences peuvent s'expliquer par la durée de l'incubation, mais aussi par un taux d'internalisation plus important ou un problème de stabilité lié à la voie de synthèse.

En effet, un aspect important à considérer est l'effet de lixiviation des ions de Mn^{2+} dû à l'environnement acide des cellules. Ce phénomène a déjà été observé par Shi et al. dans un modèle

animal.⁷⁶ Ces derniers ont noté une augmentation du contraste à l'intérieur d'une tumeur suite à l'injection de particules MSNs dopées avec du Mn. Aucune quantification du rehaussement du signal n'avait toutefois été réalisée. Ainsi, avant notre étude *in vitro*, aucune donnée quantitative de ce phénomène n'avait été mesurée. Il s'agit pourtant d'un aspect très important puisqu'il est directement lié à la dégradation et à la toxicité des nanoparticules. Dans le cadre de notre étude, la démarche utilisée constitue une approche originale puisqu'elle met à profit les méthodes de caractérisation relaxométriques (NMRD, T_1 et T_2). À partir des temps de relaxation T_1 et T_2 , il est possible d'observer le phénomène de lixiviation sans passer par l'analyse élémentaire. Évidemment, pour la quantification exacte de Mn^{2+} relargué des études ICP-MS ou GF-AAS sont nécessaires. Les résultats obtenus dans les conditions *in vitro* ont permis de démontrer qu'il y a bel et bien lixiviation du Mn^{2+} dans un milieu acide comme un tampon acétate (pH 5), alors que pour des milieux comme l'eau ou un tampon borate (pH 5) aucune évidence de lixiviation n'a été mesurée. Ces résultats suggèrent que le milieu dans lequel est effectuée l'analyse doit être le plus similaire possible à celui des cellules afin de réellement prédire le comportement des Mn-M48SNs *in vivo*. Dans notre cas, l'étude d'IRM a mis en évidence un rehaussement de l'effet de contraste au cours du temps, mais les résultats ne correspondent pas à la lixiviation massive d'ions Mn^{2+} , ce qui expliquerait que la viabilité et la prolifération n'ont pas été affectées par la présence des Mn-M48SNs. Des études plus approfondies sur le taux d'internalisation des nanoparticules, ainsi que sur la quantité et la toxicité des ions Mn^{2+} relargués devront maintenant être effectuées.

Parmi les autres résultats de notre étude, les images TEM de l'internalisation des Mn-M48SNs sont particulièrement intéressantes. La localisation des particules à l'intérieur des cellules constitue une information importante afin d'étudier le mécanisme d'internalisation. Dans le cadre de nos travaux, quelques particules Mn-M48SNs ont été observées à l'intérieur de vésicules. Ce résultat est en conformité avec ce qui avait déjà été observé par Shi et al.⁶⁵ On peut supposer qu'il s'est produit une invagination de la membrane plasmique autour des particules, ce qui a mené à la création de la vésicule et au transport des particules vers l'intérieur de la cellule. Afin de bien étudier ce processus, il sera toutefois nécessaire de prélever des échantillons de cellules au cours du temps et de les analyser par TEM. Ceci permettra d'observer plus spécifiquement les différentes étapes de la prise en charge des particules par la cellule.

Dans le cadre de la deuxième étude présentée dans ce mémoire, la fonctionnalisation des MSNs repose sur le greffage de molécules de DTPA et la chélation des ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$. Cette stratégie de fonctionnalisation est plus sécuritaire que l'approche par imprégnation, où les risques de relargage d'ions sont beaucoup plus grands au moment de la dégradation.

À l'heure actuelle, peu d'études dans la littérature ont caractérisé de façon exhaustive le greffage du DTPA à la surface de particules MSNs. Les études précédentes se sont généralement limitées aux propriétés structurales des MSNs (XRD, TEM, physisorption, porosimétrie), à la stabilité colloïdale (DLS, potentiel zêta) et aux propriétés relaxométriques (relaxométrie, NMRD, IRM).^{86,87,189} Un des intérêts de notre étude est justement d'avoir employé toutes ces analyses pour caractériser les nanoparticules $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs, mais aussi d'avoir utilisé plusieurs techniques d'analyse physico-chimique (XPS, RMN, FTIR, EDX, TGA) pour confirmer et quantifier le greffage et la chélation des ions métalliques. De cette façon, les propriétés des particules dans les conditions *in vitro* étaient connues, et ont permis de s'assurer que la suspension de particules $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs était adéquate avant de passer dans le modèle animal.

Il est important de souligner que les caractérisations physico-chimiques ne peuvent prédire le réel comportement des chélates dans les conditions biologiques, et c'est pourquoi les études *in vivo* étaient le seul moyen de connaître les limites des particules $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs comme sondes d'imagerie. Les résultats *in vivo* de l'imagerie IRM de notre étude se démarquent puisque contrairement à l'étude de Vivero-Excoto et al., où un détachement massif des chélates de gadolinium était visible après seulement 15 minutes (vessie très blanche)⁸⁷, ici l'accumulation est restée limitée et s'est échelonnée sur plus d'une heure. On peut donc conclure que le greffage des Gd^{3+} -DTPA a bien résisté aux conditions *in vivo*. De plus, ces résultats mettent en évidence l'intérêt d'utiliser l'IRM pour faire le suivi *in vivo* de la dégradation des particules. En effet, les petits fragments de particules résultants de la dégradation risquent d'être éliminés par les reins et de s'accumuler dans la vessie. Les résultats TEP ont quant à eux clairement démontré que les $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs se retrouvent principalement dans le foie et dans la rate seulement quelques minutes après l'injection. Bien que ces résultats soient conformes aux études déjà publiées dans la littérature, il s'agit des premières mesures quantitatives et en temps réel de la prise en charge par ces organes des nanoparticules MSNs. La qualité et la précision des résultats obtenus sont bien supérieures à ceux des études par quantification élémentaire et fluorescence.^{66,68,69,81-84} La combinaison des procédures d'imagerie IRM et TEP est beaucoup plus adaptée, plus précise et plus systématique pour étudier la distribution, la rétention, la dégradation et l'élimination des nanoparticules. Il s'agit d'une méthode non invasive qui offre des résultats *in vivo* quantitatifs et permet de diminuer significativement le nombre d'animaux utilisés lors des essais précliniques.

Dans le même ordre d'idées, l'importance de la purification de la suspension de nanoparticules a été soulignée à plusieurs reprises au cours de ce mémoire. Évidemment, la purification est essentielle à la caractérisation physico-chimique des nanoparticules (relaxométrie, NMRD, etc.),

mais il est primordial de faire le lien entre une purification efficace et l'impact de celle-ci sur les résultats *in vivo*. En effet, si des ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ s'étaient retrouvés dans la suspension après la purification, les résultats des études d'imagerie *in vivo* en auraient été grandement affectés. Les ions résiduels auraient rapidement été éliminés par le système rénal et se seraient retrouvés massivement dans la vessie.¹⁸¹ Il aurait alors été très difficile de faire la distinction entre les ions provenant d'une mauvaise purification et les chélates s'étant détachés de la surface des particules. La stabilité et la force du greffage du DTPA dans les conditions *in vivo* aurait alors été remise en question et cela aurait mené à une fausse interprétation des résultats. Ceci démontre comment l'étape de purification n'est pas négligeable dans le contexte d'études *in vivo*. Ces résultats confirment également que la chromatographie d'exclusion stérique était tout à fait adéquate pour purifier efficacement et rapidement les nanoparticules de silice mésoporeuses.

Conclusion

Ce projet de maîtrise a permis de démontrer le comportement des nanoparticules de silice mésoporeuses dans deux modèles *in vivo*. Il s'agit évidemment d'une étape cruciale dans le développement d'un nouveau matériau pour applications biomédicales. Dans un premier temps, un protocole de marquage cellulaire a été développé afin de vérifier la cytotoxicité et l'effet sur la prolifération cellulaire de nanoparticules MSNs chargées de l'élément paramagnétique manganèse. Une étude en IRM du contraste produit par les particules internalisée à l'intérieur des cellules a ensuite permis de confirmer le grand potentiel des MSNs comme marqueur cellulaire préclinique.

Le deuxième système de nanoparticules évalué de manière *in vivo* a permis d'étudier la biodistribution des nanoparticules MSNs dans le modèle de la souris par IRM et par TEP. Pour y arriver, la surface des MSNs a d'abord été fonctionnalisée avec un agent chélateur (DTPA), puis un protocole de marquage au cuivre-64 et au gadolinium a été élaboré. Les différentes contraintes liées à l'utilisation de ces deux isotopes ont mené au développement d'une procédure rapide de purification par chromatographie d'exclusion stérique. Ensuite, le greffage du DTPA et la chélation des ions métalliques ont été caractérisés par plusieurs techniques d'analyse physico-chimiques. Il a aussi été démontré que la combinaison de l'imagerie IRM et de la TEP est un outil puissant pour faire le suivi de particules en temps réel. La réalisation des études de biodistribution avec ces deux modalités d'imagerie a permis de comprendre et de quantifier la prise en charge des nanoparticules MSNs par les organes, de même que leur route d'excrétion. Dans l'optique de développer des vecteurs pour la livraison de médicaments, la connaissance de la cinétique des particules devient indispensable.

En conclusion, il faudra attendre encore quelques années avant que les nanoparticules de silice mésoporeuses soient approuvées pour des applications cliniques. D'ici là, de nombreux modèles de ces nanoparticules devront être évalués de manière *in vivo*. Ainsi, les travaux réalisés au cours de cette maîtrise auront permis de mettre en place des protocoles rigoureux (marquage cellulaire, chélation du Gd et du ⁶⁴Cu, purification) pouvant servir systématiquement à l'évaluation par imagerie IRM et/ou TEP du comportement *in vivo* de ces nouveaux modèles de nanoparticules.

Perspectives

Les applications biomédicales envisagées pour les nanoparticules de silice mésoporeuses leur assurent un avenir prometteur. Parmi les études complémentaires pour les particules Mn-M48SNs, une plus grande plage de concentrations de nanoparticules pourrait être testée en fonction de différents temps d'incubation. Ainsi, les paramètres optimaux de marquage cellulaire pourraient être établis. Des tests de viabilité cellulaire à la résazurine pourraient également être réalisés afin de mesurer de façon plus quantitative la cytotoxicité. Ensuite, pour mesurer la quantité de Mn ionique relarguée, il serait intéressant d'étudier la stabilité des particules dans un milieu davantage similaire à celui des vésicules et d'effectuer une analyse élémentaire quantitative de la teneur en Mn relarguée. Finalement, une étude IRM permettant de faire le suivi de cellules implantées dans une souris (par ex. : dans le cerveau) permettrait de confirmer l'intérêt d'utiliser les Mn-MSNs comme marqueur cellulaire pour des applications précliniques.

Le mode opératoire de purification par chromatographie d'exclusion stérique pourrait quant à lui être appliqué à d'autres types de nanoparticules (par ex. : particules d'or ou d'oxyde de fer). Que les particules soient ou non radioactives, l'utilisation de cette technique permet de gagner un maximum de temps.

En ce qui concerne les particules $Gd^{3+}/^{64}Cu^{2+}$ -DTPA-M48SNs, les résultats de la biodistribution ont démontré l'intérêt de réduire leur taille (<50 nm) afin d'éviter la séquestration rapide par le foie et la rate. L'ajout de molécules de PEG à la surface des particules pourrait également favoriser la rétention sanguine. De nouvelles études de biodistribution devront être effectuées à titre comparatif. Les questions concernant la dégradation des particules devront aussi être investiguées de façon plus exhaustive. L'utilisation de cages métaboliques permettrait, par exemple, de faire un bilan complet de la route d'excrétion.

Pour conclure, on peut imaginer que les prochaines générations de nanoparticules de silice mésoporeuses pourront être détectables par plusieurs modalités d'imagerie et contenir de grandes quantités d'agents médicamenteux. Des molécules spécifiques permettant de cibler certaines cellules ou certaines pathologies pourraient aussi être greffées à la surface des particules. Ainsi, un suivi complet de la livraison des médicaments à un organe précis ou à une tumeur pourrait être réalisé.

Bibliographie

1. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* 2005;5(3):161-171.
2. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*;8(2):147-166.
3. Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(9):771-782.
4. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin Pharmacol Ther* 2007;83(5):761-769.
5. Lee N, Hyeon T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews*;41(7):2575-2589.
6. Hashemi RH, Bradley WG, Lisanti CJ. MRI the basics. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
7. Bushberg JT. The Essential Physics of Medical Imaging: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
8. Merbach AE, Helm L, Tóth É. The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, 2013.
9. Lin S-P, Brown JJ. MR contrast agents: Physical and pharmacologic basics. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2007;25(5):884-899.
10. Runge VM. Clinical MRI: Saunders, 2002.
11. Gaynor D, Griffith DM. The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: beyond platinum. *Dalton Transactions* 2012;41(43):13239-13257.
12. Caravan P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chemical Society Reviews* 2006;35(6):512-523.
13. Cabella C, Crich SG, Corpillo D, Barge A, Ghirelli C, Bruno E, Lorusso V, Uggeri F, Aime S. Cellular labeling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as 'sponges' of Gd³⁺ ions. *Contrast Media & Molecular Imaging* 2006;1(1):23-29.
14. Toth É, Helm L, Merbach AE. Relaxivity of MRI Contrast Agents. *Contrast Agents I: Topics in Current Chemistry*, 2002. p. 61-101.
15. de Dreuille O, Maszelin P, Foehrenbach H, Bonardel G, Gaillard JF. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *EMC - Radiologie* 2004;1(1):2-35.
16. Wagner HN, Wahl RL. Principles and practice of PET and PET/CT. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
17. Saha GB, SpringerLink. Physics and radiobiology of nuclear medicine. New York: Springer, 2006.
18. Mettler FA, Guiberteau MJ. Essentials of nuclear medicine imaging. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2012.
19. McQuade P, Rowland DJ, Lewis JS, Welch MJ. Positron-emitting isotopes produced on biomedical cyclotrons. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12(7):807-818.
20. Jødal L, Le Loirec C, Champion C. Positron range in PET imaging: non-conventional isotopes. *Physics in medicine and biology* 2014;59(23):7419.
21. Martell AE, Smith RM. Critical stability constants. New York: Plenum Press, 1974.
22. Delacroix D, P. Guerre J, Leblanc P, Hickman C. Radionuclide and radiation protection data handbook 2002. *Radiation Protection Dosimetry* 2002 January 1, 2002;98(1):1-168.
23. Wei GT, Liu FK. Separation of nanometer gold particles by size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999 Mar 26;836(2):253-260.

24. Wei GT, Liu FK, Wang CRC. Shape separation of nanometer gold particles by size-exclusion chromatography. *Analytical Chemistry* 1999 Jun 1;71(11):2085-2091.
25. Al-Somali AM, Krueger KM, Falkner JC, Colvin VL. Recycling size exclusion chromatography for the analysis and separation of nanocrystalline gold. *Analytical Chemistry* 2004 Oct 1;76(19):5903-5910.
26. Siebrands T, Giersig M, Mulvaney P, Fischer CH. Steric Exclusion Chromatography of Nanometer-Sized Gold Particles. *Langmuir* 1993 Sep;9(9):2297-2300.
27. Krueger KM, Al-Somali AM, Falkner JC, Colvin VL. Characterization of nanocrystalline CdSe by size exclusion chromatography. *Analytical Chemistry* 2005 Jun 1;77(11):3511-3515.
28. Shen Y, Gee MY, Tan R, Pellechia PJ, Greytak AB. Purification of Quantum Dots by Gel Permeation Chromatography and the Effect of Excess Ligands on Shell Growth and Ligand Exchange. *Chemistry of Materials* 2013 Jul;25(14):2838-2848.
29. Wang JJ, Huang XY, Ruan LG, Lan T, Ren JC. Size exclusion chromatography as a universal method for the purification of quantum dots bioconjugates. *Electrophoresis* 2013 Jun;34(12):1764-1771.
30. Wang MF, Bardajee GR, Kumar S, Nitz M, Scholes GD, Winnik MA. Preparative size-exclusion chromatography for purification and characterization of colloidal quantum dots bound by chromophore-labeled polymers and low-molecular-weight chromophores. *Journal of Chromatography A* 2009 Jun;1216(25):5011-5019.
31. Alamo-Nole L, Bailon-Ruiz S, Perales-Perez O, Roman FR. Preparative size-exclusion chromatography for separation and purification of water-stable Cd-based quantum dots. *Analytical Methods* 2012 Oct;4(10):3127-3132.
32. Yang XQ, Hong H, Grailler JJ, Rowland IJ, Javadi A, Hurley SA, Xiao YL, Yang YA, Zhang Y, Nickles R, Cai WB, Steeber DA, Gong SQ. cRGD-functionalized, DOX-conjugated, and (64)Cu-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted anticancer drug delivery and PET/MR imaging. *Biomaterials* 2011 Jun;32(17):4151-4160.
33. Jarrett BR, Gustafsson B, Kukis DL, Louie AY. Synthesis of Cu-64-labeled magnetic nanoparticles for multimodal imaging. *Bioconjugate Chemistry* 2008 Jul;19(7):1496-1504.
34. Lee HY, Li Z, Chen K, Hsu AR, Xu CJ, Xie J, Sun SH, Chen XY. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD) - Conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. *Journal of Nuclear Medicine* 2008 Aug;49(8):1371-1379.
35. Xie J, Chen K, Huang J, Lee S, Wang JH, Gao J, Li XG, Chen XY. PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2010 Apr;31(11):3016-3022.
36. Glaus C, Rossin R, Welch MJ, Bao G. In Vivo Evaluation of Cu-64-Labeled Magnetic Nanoparticles as a Dual-Modality PET/MR Imaging Agent. *Bioconjugate Chemistry* 2010 Apr;21(4):715-722.
37. Hagel L. Gel-filtration chromatography. *Curr Protoc Protein Sci* 2001 May;Chapter 8:Unit8 3.
38. Gel filtration Principles and Methods. GE Healthcare, 2010. Available from:http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1336168762999/litdoc28983331_20140622214354.pdf.
39. Alberts B. *L'essentiel de la biologie cellulaire*. Paris: Médecine-sciences Flammarion, 2005.
40. Gel filtration columns and media. GE Healthcare Life Sciences, 2011. Available from:http://www.xingyibio.com/pdf/products/GDE_Gel%20Filtration%20columns%20and%20media.pdf.
41. Hagel L. Gel Filtration: Size Exclusion Chromatography. *Protein Purification: John Wiley & Sons, Inc.*, 2011. p. 51-91.
42. Mori S, Dubin PL. Chapter 7 Column Efficiency. *Journal of Chromatography Library: Elsevier*, 1988. p. 171-190.
43. Strategies for Protein Purification Handbook. Ge Healthcare, 2010. Available from:http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1336168762999/litdoc28983331_20140622214354.pdf.

44. Hagel L, Haneskog L. Size-exclusion Chromatography. eLS: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
45. Desalting and buffer exchange with Sephadex-G25. Amersham Biosciences, 1998. Available from:http://staff.ustc.edu.cn/~liuyz/methods/Desalting_sephadexG25.pdf.
46. Janson JC. On the history of the development of Sephadex. *Chromatographia* 1987 May;23(5):361-369.
47. Flodin P. Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. *Journal of Chromatography* 1961;5(2):103-115.
48. Knox JH. Band dispersion in chromatography a new view of A-term dispersion. *Journal of Chromatography A* 1999;831(1):3-15.
49. Mohammad AW, Stevenson DG, Wankat PC. Pressure-drop correlations and scale-up of size exclusion chromatography with compressible packings. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 1992 Feb;31(2):549-561.
50. Davis ME. Ordered porous materials for emerging applications. *Nature* 2002;417(6891):813-821.
51. Beck JS, Vartuli JC, Roth WJ, Leonowicz ME, Kresge CT, Schmitt KD, Chu CTW, Olson DH, Sheppard EW. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society* 1992 2014/06/16;114(27):10834-10843.
52. Zhao DY, Feng JL, Huo QS, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 1998 Jan;279(5350):548-552.
53. Wu S-H, Mou C-Y, Lin H-P. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Society Reviews* 2013;42(9):3862-3875.
54. Kleitz F. Ordered Microporous and Mesoporous Materials. *Nanoscale Materials in Chemistry: John Wiley & Sons, Inc.*, 2009. p. 243-329.
55. Corma A. From Microporous to Mesoporous Molecular Sieve Materials and Their Use in Catalysis. *Chemical Reviews* 1997 2014/05/19;97(6):2373-2420.
56. Hoffmann F, Cornelius M, Morell J, Fröba M. Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie International Edition* 2006;45(20):3216-3251.
57. He QJ, Shi JL. Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility. *Journal of Materials Chemistry* 2011;21(16):5845-5855.
58. Wittig R, Rosenholm JM, von Haartman E, Hemming J, Genze F, Bergman L, Simmet T, Linden M, Sahlgren C. Active targeting of mesoporous silica drug carriers enhances gamma-secretase inhibitor efficacy in an in vivo model for breast cancer. *Nanomedicine (Lond)* 2013 Jul 30.
59. Rosenholm JM, Sahlgren C, Linden M. Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles--opportunities & challenges. *Nanoscale* 2010 Oct;2(10):1870-1883.
60. Mamaeva V, Sahlgren C, Linden M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013 May;65(5):689-702.
61. Lee JE, Lee DJ, Lee N, Kim BH, Choi SH, Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for pH controlled drug release and dual modal imaging. *Journal of Materials Chemistry* 2011;21(42):16869-16872.
62. Vivero-Escoto JL, Huxford-Phillips RC, Lin W. Silica-based nanoprobe for biomedical imaging and theranostic applications. *Chem Soc Rev* 2012 Apr 7;41(7):2673-2685.
63. Lu J, Li ZX, Zink JJ, Tamanoi F. In vivo tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: enhanced efficacy by folate modification. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 2012 Feb;8(2):212-220.
64. Gu JL, Su SS, Zhu MJ, Li YS, Zhao WR, Duan YR, Shi JL. Targeted doxorubicin delivery to liver cancer cells by PEGylated mesoporous silica nanoparticles with a pH-dependent release profile. *Microporous and Mesoporous Materials* 2012 Oct 1;161:160-167.

65. Chen Y, Chen H, Zhang S, Chen F, Sun S, He Q, Ma M, Wang X, Wu H, Zhang L, Shi J. Structure-property relationships in manganese oxide--mesoporous silica nanoparticles used for T1-weighted MRI and simultaneous anti-cancer drug delivery. *Biomaterials* 2012 Mar;33(7):2388-2398.
66. Lu J, Liong M, Li ZX, Zink JJ, Tamanoi F. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. *Small* 2010 Aug 16;6(16):1794-1805.
67. Asefa T, Tao ZM. Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology* 2012 Nov;25(11):2265-2284.
68. Huang XL, Li LL, Liu TL, Hao NJ, Liu HY, Chen D, Tang FQ. The Shape Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles on Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility in Vivo. *Acs Nano* 2011 Jul;5(7):5390-5399.
69. Liu T, Li L, Teng X, Huang X, Liu H, Chen D, Ren J, He J, Tang F. Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials* 2011 Feb;32(6):1657-1668.
70. Corot C, Robert P, Idée J-M, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006;58(14):1471-1504.
71. Bulte JWM, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine* 2004;17(7):484-499.
72. Hsiao JK, Tsai CP, Chung TH, Hung Y, Yao M, Liu HM, Mou CY, Yang CS, Chen YC, Huang DM. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system of gadolinium for effective human stem cell tracking. *Small* 2008 Sep;4(9):1445-1452.
73. Shen Y, Shao Y, He H, Tan Y, Tian X, Xie F, Li L. Gadolinium(3+)-doped mesoporous silica nanoparticles as a potential magnetic resonance tracer for monitoring the migration of stem cells in vivo. *Int J Nanomedicine* 2013;8(119-27).
74. Huang XL, Zhang F, Lee S, Swierczewska M, Kiesewetter DO, Lang LX, Zhang GF, Zhu L, Gao HK, Choi HS, Niu G, Chen XY. Long-term multimodal imaging of tumor draining sentinel lymph nodes using mesoporous silica-based nanoprobe. *Biomaterials* 2012 Jun;33(17):4370-4378.
75. Huang X, Zhang F, Wang H, Niu G, Choi KY, Swierczewska M, Zhang G, Gao H, Wang Z, Zhu L, Choi HS, Lee S, Chen X. Mesenchymal stem cell-based cell engineering with multifunctional mesoporous silica nanoparticles for tumor delivery. *Biomaterials* 2013;34(7):1772-1780.
76. Chen Y, Yin Q, Ji XF, Zhang SJ, Chen HR, Zheng YY, Sun Y, Qu HY, Wang Z, Li YP, Wang X, Zhang K, Zhang LL, Shi JL. Manganese oxide-based multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive MRI, ultrasonography and circumvention of MDR in cancer cells. *Biomaterials* 2012 Oct;33(29):7126-7137.
77. Teicher BA, Waud W. Murine L1210 and P388 Leukemias. *Tumor Models in Cancer Research: Humana Press*, 2011. p. 23-41.
78. Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, Roussel S, Segebarth C, Petit E, Rémy C. In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *NeuroImage* 2008;40(2):973-983.
79. Moghimi SM, Farhangrazi ZS, Boraschi D, Duschl A. Chapter 6 - Nanoparticles in Medicine: Nanoparticle Engineering for Macrophage Targeting and Nanoparticles that Avoid Macrophage Recognition. *Nanoparticles and the Immune System*. San Diego: Academic Press, 2014. p. 77-89.
80. Svenson S, Prud'homme RK, Jain S, Amiji M. Macrophage-Targeted Nanoparticle Delivery Systems. *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Springer US*, 2012. p. 47-83.

81. Souris JS, Lee CH, Cheng SH, Chen CT, Yang CS, Ho JA, Mou CY, Lo LW. Surface charge-mediated rapid hepatobiliary excretion of mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials* 2010 Jul;31(21):5564-5574.
82. Lee CH, Cheng SH, Wang YJ, Chen YC, Chen NT, Souris J, Chen CT, Mou CY, Yang CS, Lo LW. Near-Infrared Mesoporous Silica Nanoparticles for Optical Imaging: Characterization and In Vivo Biodistribution. *Advanced Functional Materials* 2009 Jan 23;19(2):215-222.
83. Meng H, Xue M, Xia T, Ji Z, Tam DY, Zink JI, Nel AE. Use of Size and a Copolymer Design Feature To Improve the Biodistribution and the Enhanced Permeability and Retention Effect of Doxorubicin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles in a Murine Xenograft Tumor Model. *ACS Nano* 2011 2014/05/01;5(5):4131-4144.
84. He QJ, Zhang ZW, Gao F, Li YP, Shi JL. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small* 2011 Jan 17;7(2):271-280.
85. Taylor KML, Kim JS, Rieter WJ, An H, Lin WL, Lin WB. Mesoporous silica nanospheres as highly efficient MRI contrast agents. *Journal of the American Chemical Society* 2008 Feb 20;130(7):2154-2155.
86. Steinbacher JL, Lathrop SA, Cheng K, Hillegass JM, Butnor K, Kauppinen RA, Mossman BT, Landry CC. Gd-Labeled Microparticles in MRI: In vivo Imaging of Microparticles After Intraperitoneal Injection. *Small* 2010 Dec 6;6(23):2678-2682.
87. Vivero-Escoto JL, Taylor-Pashow KML, Huxford RC, Della Rocca J, Okoruwa C, An HY, Lin WL, Lin WB. Multifunctional Mesoporous Silica Nanospheres with Cleavable Gd(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Synthesis, Characterization, Target-Specificity, and Renal Clearance. *Small* 2011 Dec 16;7(24):3519-3528.
88. Chen F, Hong H, Zhang Y, Valdovinos H, Shi S, Kwon G, Theuer CP, Barnhart T, Cai W. In Vivo Tumor Targeting and Image-Guided Drug Delivery with Antibody-Conjugated, Radio labeled Mesoporous Silica Nanoparticles. *Acs Nano* 2013;7(10):9027-9039.
89. Miller L, Winter G, Baur B, Witulla B, Solbach C, Reske S, Linden M. Synthesis, characterization, and biodistribution of multiple ⁸⁹Zr-labeled pore-expanded mesoporous silica nanoparticles for PET. *Nanoscale* 2014;6(9):4928-4935.
90. Kim T-W, Chung P-W, Lin VSY. Facile Synthesis of Monodisperse Spherical MCM-48 Mesoporous Silica Nanoparticles with Controlled Particle Size. *Chemistry of Materials* 2010 2014/06/07;22(17):5093-5104.
91. Kueny-Stotz M, Garofalo A, Felder-Flesch D. Manganese-Enhanced MRI Contrast Agents: From Small Chelates to Nanosized Hybrids. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2012 Apr(12):1987-2005.
92. Guillet-Nicolas R, Bridot JL, Seo Y, Fortin MA, Kleitz F. Enhanced Relaxometric Properties of MRI "Positive" Contrast Agents Confined in Three-Dimensional Cubic Mesoporous Silica Nanoparticles. *Advanced Functional Materials* 2011 Dec 20;21(24):4653-4662.
93. Klabunde KJ, Richards R. *Nanoscale materials in chemistry*. Hoboken, N.J: Wiley, 2009.
94. Lowell S. *Characterization of porous solids and powders : surface area, pore size, and density*. Dordrecht: Springer, 2006.
95. Relaxation Time (T1 and T2) Measurements Bruker minispec Relaxation Time Manual. Bruker Relaxation Time Manual Available from:http://www.uni-ulm.de/physchem-praktikum/media/literatur/mq_Relaxation_Time_Manual.pdf.
96. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews* 1999;99(9):2293-2352.
97. Semmler W, Schwaiger M, Burtea C, Laurent S, Vander Elst L, Muller R. Contrast Agents: Magnetic Resonance. *Molecular Imaging I: Springer Berlin Heidelberg*, 2008. p. 135-165.
98. Lipani E, Laurent S, Surin M, Elst LV, Leclere P, Muller RN. High-Relaxivity and Luminescent Silica Nanoparticles As Multimodal Agents for Molecular Imaging. *Langmuir* 2013 Mar 12;29(10):3419-3427.

99. Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM. Technology Insight: in vivo cell tracking by use of MRI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3(10):554-562.
100. Josephson L, Tung C-H, Moore A, Weissleder R. High-Efficiency Intracellular Magnetic Labeling with Novel Superparamagnetic-Tat Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 1999;10(2):186-191.
101. Heyn C, Ronald JA, Mackenzie LT, MacDonald IC, Chambers AF, Rutt BK, Foster PJ. In vivo magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation. *Magnetic Resonance in Medicine* 2006;55(1):23-29.
102. Metz S, Bonaterra G, Rudelius M, Settles M, Rummeny E, Daldrup-Link H. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *European Radiology* 2004;14(10):1851-1858.
103. Muller RN, Vander Elst L, Roch A, Peters JA, Csajbok E, Gillis P, Gossuin Y. Relaxation by metal-containing nanosystems. *Advances in Inorganic Chemistry: Academic Press*, 2005. p. 239-292.
104. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RAJ, Jacobs VR, Simon GH, Gooding C, Rummeny EJ. Comparison of iron oxide labeling properties of hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood and from peripheral blood for subsequent in vivo tracking in a xenotransplant mouse model XXX¹. *Academic Radiology* 2005;12(4):502-510.
105. Bottrill M, Kwok L, Long NJ. Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chemical Society Reviews* 2006;35(6):557-571.
106. Na HB, Song IC, Hyeon T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. *Advanced Materials* 2009;21(21):2133-2148.
107. Na HB, Hyeon T. Nanostructured T1 MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry* 2009;19(35):6267-6273.
108. De Stasio G, Casalbore P, Pallini R, Gilbert B, Sanita F, Ciotti MT, Rosi G, Festinesi A, Larocca LM, Rinelli A, Perret D, Mogk DW, Perfetti P, Mehta MP, Mercanti D. Gadolinium in Human Glioblastoma Cells for Gadolinium Neutron Capture Therapy. *Cancer Research* 2001 May 15, 2001;61(10):4272-4277.
109. De Stasio G, Rajesh D, Casalbore P, Daniels MJ, Erhardt RJ, Frazer BH, Wiese LM, Richter KL, Sonderegger BR, Gilbert B, Schaub S, Cannara RJ, Crawford JF, Gilles MK, Tyliczszak T, Fowler JF, Larocca LM, Howard SP, Mercanti D, Mehta MP, Pallini R. Are gadolinium contrast agents suitable for gadolinium neutron capture therapy? *Neurological Research* 2005;27(4):387-398.
110. Bridot J-L, Faure A-C, Laurent S, Rivière C, Billotey C, Hiba B, Janier M, Jossierand Vr, Coll J-L, Vander Elst L, Muller R, Roux Sp, Perriat P, Tillement O. Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast Agents for in Vivo Imaging. *Journal of the American Chemical Society* 2007;129(16):5076-5084.
111. Faucher L, Tremblay M, Lagueux J, Gossuin Y, Fortin MA. Rapid Synthesis of PEGylated Ultrasmall Gadolinium Oxide Nanoparticles for Cell Labeling and Tracking with MRI. *Acs Applied Materials & Interfaces* 2012 Sep;4(9):4506-4515.
112. Evanics F, Diamante PR, van Veggel FCJM, Stanisz GJ, Prosser RS. Water-Soluble GdF₃ and GdF₃/LaF₃ Nanoparticles Physical Characterization and NMR Relaxation Properties. *Chemistry of Materials* 2006;18(10):2499-2505.
113. Ju Q, Tu D, Liu Y, Li R, Zhu H, Chen J, Chen Z, Huang M, Chen X. Amine-Functionalized Lanthanide-Doped KGdF₄ Nanocrystals as Potential Optical/Magnetic Multimodal Bioprobes. *Journal of the American Chemical Society* 2012;134(2):1323-1330.
114. Hifumi H, Yamaoka S, Tanimoto A, Citterio D, Suzuki K. Gadolinium-Based Hybrid Nanoparticles as a Positive MR Contrast Agent. *Journal of the American Chemical Society* 2006;128(47):15090-15091.

115. Ren W, Tian G, Zhou L, Yin W, Yan L, Jin S, Zu Y, Li S, Gu Z, Zhao Y. Lanthanide ion-doped GdPO₄ nanorods with dual-modal bio-optical and magnetic resonance imaging properties. *Nanoscale* 2012;4(12):3754-3760.
116. Liu YJ, Zhang N. Gadolinium loaded nanoparticles in theranostic magnetic resonance imaging. *Biomaterials* 2012 Jul;33(21):5363-5375.
117. Garcia-Bennett AE. Synthesis, toxicology and potential of ordered mesoporous materials in nanomedicine. *Nanomedicine* 2011 Jul;6(5):867-877.
118. Li Z, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JI. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chemical Society Reviews* 2012;41(7):2590-2605.
119. Yang PP, Gai SL, Lin J. Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chemical Society Reviews* 2012;41(9):3679-3698.
120. Peters JA, Djanashvili K. Lanthanide Loaded Zeolites, Clays, and Mesoporous Silica Materials as MRI Probes. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2012;2012(12):1961-1974.
121. Mai WX, Meng H. Mesoporous silica nanoparticles: A multifunctional nano therapeutic system. *Integrative Biology* 2013;5(1):19-28.
122. Kim T, Momin E, Choi J, Yuan K, Zaidi H, Kim J, Park M, Lee N, McMahon MT, Quinones-Hinojosa A, Bulte JWM, Hyeon T, Gilad AA. Mesoporous Silica-Coated Hollow Manganese Oxide Nanoparticles as Positive T-1 Contrast Agents for Labeling and MRI Tracking of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of the American Chemical Society* 2011 Mar 9;133(9):2955-2961.
123. Peng YK, Lai CW, Liu CL, Chen HC, Hsiao YH, Liu WL, Tang KC, Chi Y, Hsiao JK, Lim KE, Liao HE, Shyue JJ, Chou PT. A New and Facile Method To Prepare Uniform Hollow MnO/Functionalized mSiO₂ Core/Shell Nanocomposites. *Acs Nano* 2011 May;5(5):4177-4187.
124. Xu Z, Li C, Ma Pa, Hou Z, Yang D, Kang X, Lin J. Facile synthesis of an up-conversion luminescent and mesoporous Gd₂O₃ : Er³⁺@nSiO₂@mSiO₂ nanocomposite as a drug carrier. *Nanoscale* 2011;3(2):661-667.
125. Kang X, Cheng Z, Yang D, Ma Pa, Shang M, Peng C, Dai Y, Lin J. Design and Synthesis of Multifunctional Drug Carriers Based on Luminescent Rattle-Type Mesoporous Silica Microspheres with a Thermosensitive Hydrogel as a Controlled Switch. *Advanced Functional Materials* 2012;22(7):1470-1481.
126. Lin Y-S, Hung Y, Su J-K, Lee R, Chang C, Lin M-L, Mou C-Y. Gadolinium(III)-Incorporated Nanosized Mesoporous Silica as Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *The Journal of Physical Chemistry B* 2004;108(40):15608-15611.
127. Davis JJ, Huang W-Y, Davies G-L. Location-tuned relaxivity in Gd-doped mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 2012;22(43):22848-22850.
128. Lin W-I, Lin C-Y, Lin Y-S, Wu S-H, Huang Y-R, Hung Y, Chang C, Mou C-Y. High payload Gd(III) encapsulated in hollow silica nanospheres for high resolution magnetic resonance imaging. *Journal of Materials Chemistry B* 2013;1(5):639-645.
129. Carniato F, Tei L, Arrais A, Marchese L, Botta M. Selective Anchoring of Gd(III) Chelates on the External Surface of Organo-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles: A New Chemical Strategy To Enhance Relaxivity. *Chemistry – A European Journal* 2013;19(4):1421-1428.
130. Saxena S, Sharma M, Patel M, Oreopoulos D. Nephrogenic systemic fibrosis: an emerging entity. *International Urology and Nephrology* 2008;40(3):715-724.
131. Lauterbur PC. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* 1973;242(5394):190-191.
132. Koretsky AP, Silva AC. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR in Biomedicine* 2004;17(8):527-531.
133. Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine* 2004;17(8):544-553.

134. Boretius S, Frahm J. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol* 2011;771:531-568.
135. Létourneau M, Tremblay M, Faucher L, Rojas D, Chevallier P, Gossuin Y, Lagueux J, Fortin M-A. MnO-Labeled Cells: Positive Contrast Enhancement in MRI. *The Journal of Physical Chemistry B* 2012;116(44):13228-13238.
136. Rosenholm JM, Mamaeva V, Sahlgren C, Linden M. Nanoparticles in targeted cancer therapy: mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage. *Nanomedicine* 2012 Jan;7(1):111-120.
137. Zhang W, Wang J, Tanev PT, Pinnavaia TJ. Catalytic hydroxylation of benzene over transition-metal substituted hexagonal mesoporous silicas. *Chemical Communications* 1996(8):979-980.
138. Yonemitsu M, Tanaka Y, Iwamoto M. Metal Ion-Planted MCM-41. 1. Planting of Manganese(II) Ion into MCM-41 by a Newly Developed Template-Ion Exchange Method. *Chemistry of Materials* 1997;9(12):2679-2681.
139. Han Y-F, Chen F, Zhong Z, Ramesh K, Chen L, Widjaja E. Controlled Synthesis, Characterization, and Catalytic Properties of Mn₂O₃ and Mn₃O₄ Nanoparticles Supported on Mesoporous Silica SBA-15. *The Journal of Physical Chemistry B* 2006;110(48):24450-24456.
140. Gomez S, Giraldo O, Garces LJ, Villegas J, Suib SL. New Synthetic Route for the Incorporation of Manganese Species into the Pores of MCM-48. *Chemistry of Materials* 2004;16(12):2411-2417.
141. Dong X, Shen W, Zhu Y, Xiong L, Shi J. Facile Synthesis of Manganese-Loaded Mesoporous Silica Materials by Direct Reaction Between KMnO₄ and an In-Situ Surfactant Template. *Advanced Functional Materials* 2005;15(6):955-960.
142. Kim TW, Chung PW, Slowing, II, Tsunoda M, Yeung ES, Lin VS. Structurally ordered mesoporous carbon nanoparticles as transmembrane delivery vehicle in human cancer cells. *Nano Letters* 2008 Nov;8(11):3724-3727.
143. Ravikovitch PI, Neimark AV. Characterization of Micro- and Mesoporosity in SBA-15 Materials from Adsorption Data by the NLDFT Method. *The Journal of Physical Chemistry B* 2001;105(29):6817-6823.
144. Neimark AV, Ravikovitch PI. Capillary condensation in MMS and pore structure characterization. *Microporous and Mesoporous Materials* 2001;44-45(0):697-707.
145. Izquierdo-Barba I, Colilla M, Manzano M, Vallet-Regi M. In vitro stability of SBA-15 under physiological conditions. *Microporous and Mesoporous Materials* 2010;132(3):442-452.
146. Cauda V, Argyo C, Bein T. Impact of different PEGylation patterns on the long-term biostability of colloidal mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 2010;20(39):8693-8699.
147. Feng Q, Kanoh H, Ooi K. Manganese oxide porous crystals. *Journal of Materials Chemistry* 1999;9(2):319-333.
148. Sun H, Qin X, Zaera F. Chemical Nature of the Thin Films that Form on SiO₂/Si(100) Surfaces Upon Manganese Deposition. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2011;2(20):2525-2530.
149. Nesbitt HW, Banerjee D. Interpretation of XPS Mn(2p) spectra of Mn oxyhydroxides and constraints on the mechanism of MnO₂ precipitation. *American Mineralogist* 1998 April 1, 1998;83(3-4):305-315.
150. Chigane M, Ishikawa M. Manganese Oxide Thin Film Preparation by Potentiostatic Electrolyses and Electrochromism. *Journal of The Electrochemical Society* 2000 June 1, 2000;147(6):2246-2251.
151. Sun H, Zaera F. Chemical Vapor Deposition of Manganese Metallic Films on Silicon Oxide Substrates. *The Journal of Physical Chemistry C* 2012;116(44):23585-23595.
152. Liu Y, Shen J, Chen Z, Liu Y. Degradation of p-chloronitrobenzene in drinking water by manganese silicate catalyzed ozonation. *Desalination* 2011;279(1-3):219-224.

153. Oku M, Wagatsuma K, Konishi T. Relation between 2p X-ray photoelectron and $K\alpha$ X-ray emission spectra of manganese and iron oxides. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 1999;98-99(0):277-285.
154. Parmigiani F, Sangaletti L. Fine structures in the X-ray photoemission spectra of MnO, FeO, CoO, and NiO single crystals. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 1999 Jan;98:287-302.
155. Oku M, Suzuki S, Ohtsu N, Shishido T, Wagatsuma K. Comparison of intrinsic zero-energy loss and Shirley-type background corrected profiles of XPS spectra for quantitative surface analysis: Study of Cr, Mn and Fe oxides. *Applied Surface Science* 2008;254(16):5141-5148.
156. Schwert D, Davies J, Richardson N. Non-Gadolinium-Based MRI Contrast Agents. *Contrast Agents I: Topics in Current Chemistry*, 2002. p. 165-199.
157. Asokan A, Cho MJ. Exploitation of intracellular pH gradients in the cellular delivery of macromolecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002;91(4):903-913.
158. Reijngoud D-J. The pH and transport of protons in lysosomes. *Trends in Biochemical Sciences* 1978;3(3):178-180.
159. Helenius A, Mellman I, Wall D, Hubbard A. Endosomes. *Trends in Biochemical Sciences* 1983;8(7):245-250.
160. Schlesinger PH, David GR. Measuring the pH of Pathogen-Containing Phagosomes. *Methods in Cell Biology: Academic Press*, 1994. p. 289-311.
161. Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, Jordan EK, Lewis BK, Frank JA. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine* 2005;18(6):383-389.
162. Koenig SH, Baglin C, Brown RD, Fred Brewer C. Magnetic field dependence of solvent proton relaxation induced by Gd^{3+} and Mn^{2+} complexes. *Magnetic Resonance in Medicine* 1984;1(4):496-501.
163. Bernheim RA, Brown TH, Gutowsky HS, Woessner DE. Temperature Dependence of Proton Relaxation Times in Aqueous Solutions of Paramagnetic Ions. *The Journal of Chemical Physics* 1959;30(4):950-956.
164. King J, Davidson N. On the T_1/T_2 Ratio for Protons in Aqueous Mn^{++} Solutions. *The Journal of Chemical Physics* 1958;29(4):787-791.
165. Koenig SH, Brown RD. Relaxation of solvent protons by paramagnetic ions and its dependence on magnetic field and chemical environment: implications for NMR imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* 1984;1(4):478-495.
166. Wu KCW, Yamauchi Y. Controlling physical features of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) for emerging applications. *Journal of Materials Chemistry* 2012;22(4):1251-1256.
167. Rosenholm JM, Sahlgren C, Linden M. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for combined therapeutic, diagnostic and targeted action in cancer treatment. *Curr Drug Targets* 2011 Jul 1;12(8):1166-1186.
168. Slowing II, Trewyn BG, Giri S, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Advanced Functional Materials* 2007 May 21;17(8):1225-1236.
169. Trewyn BG, Slowing, II, Giri S, Chen HT, Lin VS. Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release. *Acc Chem Res* 2007 Sep;40(9):846-853.
170. Vivero-Escoto JL, Slowing, II, Trewyn BG, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery. *Small* 2010 Sep 20;6(18):1952-1967.
171. Liong M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, Tamanoi F, Zink JJ. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *Acs Nano* 2008 May;2(5):889-896.

172. He Q, Shi J, Chen F, Zhu M, Zhang L. An anticancer drug delivery system based on surfactant-templated mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials* 2010 Apr;31(12):3335-3346.
173. Slowing, II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 Aug 17;60(11):1278-1288.
174. Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, DeStanchina E, Longo V, Herz E, Iyer S, Wolchok J, Larson SM, Wiesner U, Bradbury MS. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *Journal of Clinical Investigation* 2011 Jul;121(7):2768-2780.
175. Carniato F, Tei L, Cossi M, Marchese L, Botta M. A Chemical Strategy for the Relaxivity Enhancement of Gd-III Chelates Anchored on Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemistry-a European Journal* 2010;16(35):10727-10734.
176. Carniato F, Tei L, Dastru W, Marchese L, Botta M. Relaxivity modulation in Gd-functionalised mesoporous silicas. *Chemical Communications* 2009(10):1246-1248.
177. Bergeron M, Cadorette J, Tétrault M-A, Beaudoin J-F, Leroux J-D, Fontaine R, Lecomte R. Imaging performance of LabPET APD-based digital PET scanners for pre-clinical research. *Physics in Medicine and Biology* 2014;59(3):661-678.
178. Kobler J, Moller K, Bein T. Colloidal Suspensions of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles. *Acs Nano* 2008 2014/10/02;2(4):791-799.
179. Soderlind F, Pedersen H, Petoral RM, Kall PO, Uvdal K. Synthesis and characterisation of Gd₂O₃ nanocrystals functionalised by organic acids. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005 Aug 1;288(1):140-148.
180. Elst LV, Maton F, Laurent S, Seghi F, Chappelle F, Muller RN. A multinuclear MR study of Gd-EOB-DTPA: Comprehensive preclinical characterization of an organ specific MRI contrast agent. *Magnetic Resonance in Medicine* 1997 Oct;38(4):604-614.
181. Schipper ML, Cheng Z, Lee SW, Bentolila LA, Iyer G, Rao JH, Chen XY, Wul AM, Weiss S, Gambhirl SS. MicroPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *Journal of Nuclear Medicine* 2007 Sep;48(9):1511-1518.
182. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, Dawson KA. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 2011 Mar 2;133(8):2525-2534.
183. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Feb 13;104(7):2050-2055.
184. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 23;105(38):14265-14270.
185. He Q, Shi J, Zhu M, Chen Y, Chen F. The three-stage in vitro degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid. *Microporous and Mesoporous Materials* 2010;131(1-3):314-320.
186. Alfredsson V, Anderson MW. Structure of MCM-48 Revealed by Transmission Electron Microscopy. *Chemistry of Materials* 1996 2014/10/02;8(5):1141-1146.
187. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Investigative Radiology* 2005 Nov;40(11):715-724.
188. McCarthy DW, Shefer RE, Klinkowstein RE, Bass LA, Margeneau WH, Cutler CS, Anderson CJ, Welch MJ. Efficient production of high specific activity Cu-64 using a biomedical cyclotron. *Nuclear Medicine and Biology* 1997 Jan;24(1):35-43.

189. Pinho SLC, Faneca H, Geraldés CFGC, Delville MH, Carlos LD, Rocha J. Lanthanide-DTPA grafted silica nanoparticles as bimodal-imaging contrast agents. *Biomaterials* 2012 Jan;33(3):925-935.
190. Instructions for Sephadex Media. GE Healthcare, 2011. Available from:https://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/17000001.pdf.

Annexe 1 : Gels de chromatographie d'exclusion stérique

La sélection du gel utilisé pour la chromatographie d'exclusion stérique se fait en fonction de l'objectif de la purification. La Figure i présente les limites d'exclusion et de fractionnement des différents gels disponibles commercialement.

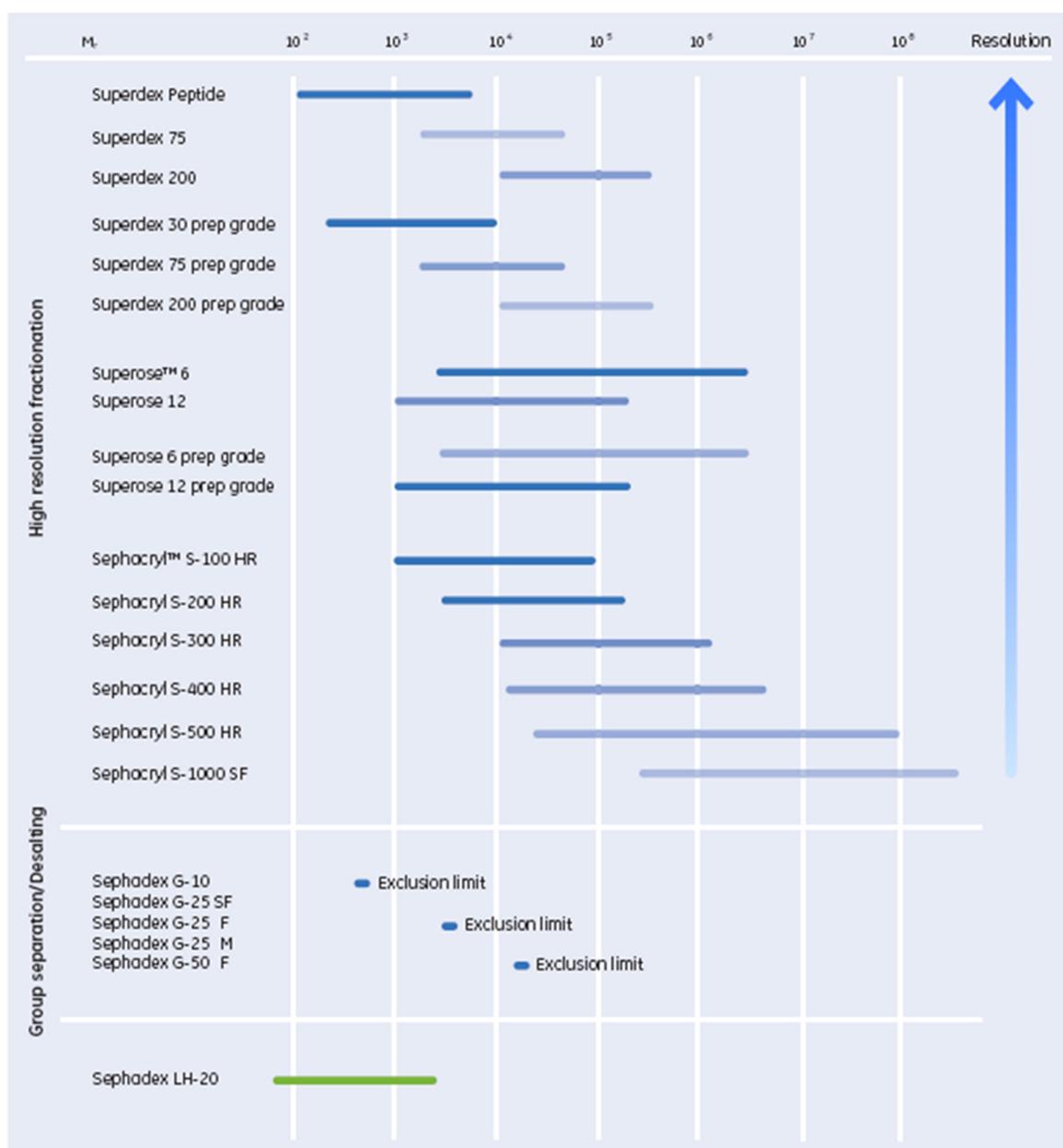


Fig 1.7. Gel filtration media fractionation range guide.

Figure i. Limites d'exclusion et de fractionnement des gels de chromatographie d'exclusion stérique commerciaux.

(Source :³⁸)

Annexe 2 : Protocole de digestion dans l'acide en préparation de l'analyse élémentaire (GF-AAS et ICP-MS)

Avant l'analyse en ICP-MS, il est nécessaire de procéder à une digestion des particules (Gd^{3+} -DTPA-M48SNs) afin de dégrader entièrement la matière organique (chélate) et permettre aux ions de Gd^{3+} et de $^{64}Cu^{2+}$ de passer en solution. La procédure de digestion est effectuée sur trois échantillons (triplicata), mais seulement deux sont analysés en ICP-MS. Le troisième sert d'échantillon de sauvegarde dans l'éventualité où les résultats des deux premiers ne concordent pas. Pour commencer, 20 μ L de la suspension de nanoparticules sont prélevés, puis transférés dans un vial en verre de 4 mL. Le volume de l'échantillon est ajusté à 1 mL en ajoutant 980 μ L d'eau nanopure dans chaque vial. Les vials sont déposés dans un support, puis immergés dans un cristalliseur rempli à moitié d'huile de silicone. Les échantillons sont chauffés jusqu'à ce que l'huile atteigne une température de 90 °C, puis 1 mL d'acide nitrique *trace metal grade* (HNO_3) est ajouté dans chaque flacon. La température est ensuite augmentée jusqu'à 115 °C. Lorsqu'il ne reste qu'environ 1 mL de liquide dans les vials, 1 mL de HNO_3 est ajouté dans chacun des flacons. Le volume de l'échantillon doit être d'environ 1 mL avant d'arrêter le chauffage et de laisser refroidir le bain jusqu'à la température de la pièce. Ensuite, 200 μ L d' H_2O et 300 μ L de H_2O_2 30 % sont ajoutés aux échantillons, puis la température est augmentée doucement (115 °C) jusqu'à ce que l'effervescence cesse. Le bain est ensuite refroidi à température pièce. Enfin, 1 mL de H_2O_2 30 % est ajouté dans chacun des vials, puis la température est augmentée à 115 °C jusqu'à ce qu'il ne reste qu'environ 1 mL de liquide dans les flacons. Une fois que le bain est revenu à la température de la pièce, le volume final des échantillons est ajusté à 2 mL. Les échantillons digérés sont ensuite transférés et analysés à l'institut national de santé publique du Québec (INSPQ).

Annexe 3 : Préparation du gel de Sephadex G-25 et mise en place de la colonne de chromatographie

Le gel de chromatographie Sephadex G-25 *coarse* se présente sous forme de poudre et doit être mélangé à une solution aqueuse pour obtenir un gel. La préparation du gel commence donc par la préparation d'une solution saline (154 mM de NaCl dissous dans de l'eau nanopure et filtrée avec un filtre de 0.2 µm). À partir des dimensions de la colonne et en sachant que la proportion de gel obtenu suite à l'hydratation de la poudre correspond à 4-6 mL de gel par g de poudre, il est possible d'évaluer la masse nécessaire.¹⁹⁰ Ainsi, 35 g de poudre de Sephadex G-25 sont mélangés à 175 mL de solution saline. Bien que la méthode la plus simple consiste à faire gonfler le gel à la température de la pièce pendant 3 h, un léger chauffage du mélange dans un bain à 90 °C pendant 1 h est utilisé pour accélérer le processus.¹⁹⁰ Par ailleurs, aucune agitation n'est employée, car cela risque d'endommager les billes de Sephadex G-25. Cette procédure permet d'obtenir un volume final de gel de 150 mL.

L'insertion du gel dans la colonne est réalisée en quelques étapes. D'abord, le premier quart de la colonne doit être rempli de solution saline (154 mM) filtrée à 0.2 µm. Ensuite, la pompe est actionnée pour que la compaction se fasse au débit de 5mL/min. Puisque le gel a tendance à sédimenter, il est nécessaire de l'agiter un peu pour obtenir une suspension homogène. Un entonnoir exclusivement conçu pour les colonnes de chromatographie est vissé au sommet de celle-ci et permet de verser en un seul mouvement le gel dans la colonne. Cette technique assure une compaction uniforme du gel et évite l'apparition de bulles d'air. Une période d'attente est nécessaire afin que le gel sédimente complètement et se compacte de façon uniforme dans la colonne. Si le gel n'est pas uniforme, la purification des nanoparticules sera influencée puisqu'il risque d'y avoir formation de trainées. D'autre part, il est important que la colonne soit toujours alimentée par de l'éluant (solution saline (154 mM) filtré à 0.2 µm) afin d'éviter que le gel ne sèche. Lorsqu'il reste environ 3 cm d'éluant au-dessus du gel, l'adaptateur supérieur de la colonne est positionné. La colonne est maintenant montée et prête à l'utilisation.

Annexe 4 : Protocoles cellulaires

Étude de la cytotoxicité des nanoparticules Mn-M48SNs

Afin de s'assurer que les nanoparticules ne sont pas toxiques pour les cellules P388, il est nécessaire d'effectuer une expérience de toxicité échelonnée sur une longue période de temps. Tout d'abord, la croissance des cellules est réalisée dans un flacon de culture de 75 cm² (T75) jusqu'à confluence de 80 %. Un compte cellulaire et un test de viabilité au Trypan bleu sont effectués afin de déterminer la concentration initiale de cellules vivantes. Lorsque les cellules sont marquées avec du Trypan bleu, le compteur de cellules automatisé (Nexcelom) permet d'obtenir les informations suivantes : le diamètre moyen des cellules, le nombre de cellules vivantes et mortes, le pourcentage de viabilité et la concentration de cellules vivantes par millilitre. La procédure consiste simplement à prélever 20 µL de la suspension cellulaire et de les mélanger avec 20 µL de Trypan bleu. Ensuite, 20 µL de ce mélange sont transférés sur une lame qui s'insère dans le compteur. Pour les besoins de l'expérience, 8 tubes contenant $\sim 6 \times 10^5$ cellules sont préparés. Un compte cellulaire et un test de viabilité sont effectués pour chaque tube (t=0h). Ces derniers sont ensuite incubés (37 °C et 5 % CO₂) avec 2 mL de suspension concentrée à 7 % v/v de particules Mn-M48SNs dans du DMEM complet, et ce, pendant 12 h et 24 h. L'expérience est réalisée en quadruplicate pour chaque point dans le temps (4 tubes pour le point à 12 h et 4 tubes pour le point à 24 h). Ensuite, pour t=12 h et 24 h, les comptes cellulaires et les tests de viabilité sont encore réalisés. C'est en comparant la viabilité moyenne des cellules au temps 0 h à celles de 12 h et 24 h qu'il est possible de vérifier la toxicité des nanoparticules Mn-M48SNs.

Étude de l'effet des nanoparticules Mn-M48SNs sur la prolifération cellulaire

Cette étude est réalisée afin de s'assurer que l'incubation des nanoparticules avec les particules de silice paramagnétiques n'influence pas la prolifération normale des cellules. Dans un premier temps, une première expérience est produite avec uniquement les cellules P388. Il s'agit d'étudier leur prolifération normale dans les conditions de marquage (courbe standard). La deuxième expérience implique de marquer d'abord les cellules avec les nanoparticules Mn-M48SNs pour ensuite étudier leur impact sur la prolifération. Pour les deux expériences, la croissance des cellules est réalisée dans un flacon T75 jusqu'à confluence de 80 %. 20 tubes contenant 6.0×10^5 cellules/tube dans du DMEM complet sont préparés pour la courbe de prolifération standard. Pour l'autre courbe, 20 autres tubes contenant la suspension cellulaire (6.0×10^5 cellules/tube) sont préparés, mais en plus, dans chaque tube est ajouté l'équivalent de 7 % v/v de suspension de

nanoparticules Mn-M48SNs. Seule la concentration la plus élevée (7 % v/v) est testée, car c'est elle qui risque d'influencer le plus la prolifération.

Pour comparer si les nanoparticules influencent la prolifération, il faut procéder exactement aux mêmes étapes pour les deux expériences. Dans le cas présent, le début de l'observation de la prolifération commence après les 4 h d'incubation avec les nanoparticules. Ainsi, le temps 0 h des courbes de prolifération correspond au temps après l'élimination des nanoparticules. Cela permet d'évaluer uniquement l'effet des particules internalisées dans les cellules. Pour chaque courbe de prolifération, il est nécessaire d'avoir 4 tubes de suspension cellulaire pour chacun des 5 points dans le temps (-4 h/0 h/6 h/12 h/24 h). La moyenne et l'écart-type des comptes cellulaires des 4 tubes sont calculés.

Pour vérifier que la concentration initiale de cellules dans chaque tube est relativement constante, un compte cellulaire et un test de viabilité sont effectués pour les 4 tubes de $t = -4$ h. À $t = -4$ h, toutes les suspensions cellulaires (0 h/6 h/12 h/24 h/16 tubes) sont mises dans l'incubateur pour une durée de 4 h (37 °C, 95 % d'humidité et 5 % CO₂). À $t = 0$ h, 20 µL de suspension cellulaire sont prélevés pour faire un compte cellulaire et un test de viabilité, et ce, pour les 4 tubes de $t = 0$ h. Ensuite, les suspensions cellulaires restantes (6 h/12 h/24 h/12 tubes) sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes. Le surnageant de chaque tube est prélevé pour éliminer les nanoparticules non internalisées. Les cellules sont ensuite rincées à trois reprises avec du DMEM complet. Elles sont ensuite remises en suspension dans 2 mL de DMEM complet. Les tubes (6 h/12 h/24 h/12 tubes) sont remis à l'incubateur pour 6 h. Par la suite, les comptes cellulaires et les tests de viabilité sont produits pour chacun des points dans le temps (6 h, 12 h et 24 h). Il est important de spécifier que cette même procédure est reprise pour l'expérience ne contenant que des cellules (standard). Par la suite, les courbes de prolifération sont obtenues en traçant le nombre moyen de cellules compté pour chaque point dans le temps. C'est en comparant les deux courbes qu'il est possible d'observer l'effet des nanoparticules Mn-M48SNs sur la prolifération cellulaire.

Étude d'imagerie IRM des cellules marquées avec les nanoparticules Mn-M48SNs

L'intérêt de cette étude est d'évaluer le contraste en IRM produit par les cellules P388 marquées avec différentes concentrations de nanoparticules Mn-M48SNs. La première étape consiste évidemment à faire croître les cellules dans un flacon T75 jusqu'à confluence de 80 %. Un premier compte cellulaire est fait pour déterminer la concentration initiale de cellules. Parallèlement, trois suspensions d'incubation sont préparées en diluant la suspension de nanoparticules Mn-M48SNs dans du DMEM complet. Les trois concentrations testées correspondent à 2 %, 5 % et 7 % v/v.

L'incubation est réalisée dans des tubes stériles (Falcon, 4 mL) dans lesquels est d'abord déposé 1 mL de suspension cellulaire (2×10^6 cellules/mL). Chaque condition de concentration est répétée en quintuplicata (5x). Au total, les cellules sont suspendues dans 2 mL de DMEM complet contenant l'équivalent de 2 %, 5 % ou 7 % v/v de suspension de nanoparticules Mn-M48SNs. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 h (37 °C, 95 % d'humidité et 5 % CO₂) pour favoriser l'internalisation des particules. Les tubes sont agités manuellement à toutes les 20 min pour s'assurer que les cellules ne sédimentent pas.

Deux contrôles sont préparés afin de comparer l'effet du manganèse sur le signal IRM. Le premier consiste à incuber les cellules avec les nanoparticules M48SNs. Ces dernières ne contenant pas de matériel paramagnétique, cela permet de démontrer que le rehaussement du signal des cellules marquées avec les particules Mn-M48SNs provient du manganèse uniquement. Dans le cas présent, seule la concentration la plus élevée (7 % v/v) de M48SNs est testée. Le second contrôle implique d'incuber les cellules sans ajouter de nanoparticules. Ceci sert à obtenir le contraste de base des cellules. Les contrôles sont évidemment traités dans les mêmes conditions et selon la même procédure que les cellules marquées avec les Mn-M48SNs (4 h d'incubation, 37 °C, 95 % d'humidité et 5 % CO₂). D'ailleurs, la suspension de nanoparticules de M48SNs est préparée selon la même procédure que celle des Mn-M48SNs (voir section 3.9.1).

Après les 4 heures d'incubation, un compte cellulaire et un test de viabilité sont effectués sur chaque échantillon. Il s'agit de comparer l'effet des différentes concentrations de nanoparticules sur la viabilité. L'étape suivante consiste à rincer les cellules à plusieurs reprises. Cette procédure est essentielle afin d'assurer que le signal en IRM est uniquement dû aux nanoparticules internalisées dans les cellules. La méthode consiste à centrifuger ces dernières à 400 g pendant 5 minutes puis à prélever le surnageant. Celui-ci contient alors les particules n'ayant pas été internalisées. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans du DMEM complet et de nouveau centrifugées. Cette procédure est répétée trois fois. Il est important de spécifier que les deux contrôles mentionnés plus haut sont également soumis aux trois lavages.