



HAL
open science

Nanocristaux à luminescence persistante : nouveaux concepts pour l'imagerie in vivo

Thomas Maldiney

► **To cite this version:**

Thomas Maldiney. Nanocristaux à luminescence persistante : nouveaux concepts pour l'imagerie in vivo. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT: . pastel-00831281

HAL Id: pastel-00831281

<https://pastel.hal.science/pastel-00831281>

Submitted on 6 Jun 2013

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

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

École Doctorale : iViv - ED 387

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie du solide

présentée par :

Thomas Maldiney

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

NANOCRISTAUX À LUMINESCENCE PERSISTANTE :
NOUVEAUX CONCEPTS POUR L'IMAGERIE IN VIVO

sous la direction scientifique du Dr. Cyrille Richard

soutenue le 20 septembre 2012

devant le jury composé de :

<i>Rapporteurs :</i>	Pr. Olivier TILLEMENT Pr. Bertrand TAVITIAN
<i>Président :</i>	Pr. Germain TRUGNAN
<i>Examineurs :</i>	Pr. Olivier CLÉMENT Pr. Didier GOURIER
<i>Directeur de thèse :</i>	Dr. Michel BESSODES
<i>Co-directeur de thèse :</i>	Dr. Cyrille RICHARD

Préface

Depuis la découverte des rayons X en 1895 par Röntgen, l'imagerie a su se rendre indispensable dans de nombreux domaines de la médecine, notamment pour les essais cliniques et le diagnostic. Les différents systèmes d'imagerie peuvent être regroupés selon le type de rayonnement à l'origine de l'information (rayons X, positons, photons, ondes acoustiques...) ou la qualité de la mesure, i.e. sa précision (anatomique, physiologique, cellulaire ou moléculaire). La plupart des appareils utilisés en clinique sont des systèmes d'imagerie macroscopique. Ils fournissent une information anatomique (rayons X, scanner) et physiologique/fonctionnelle (IRM, échographie, TEP)¹.

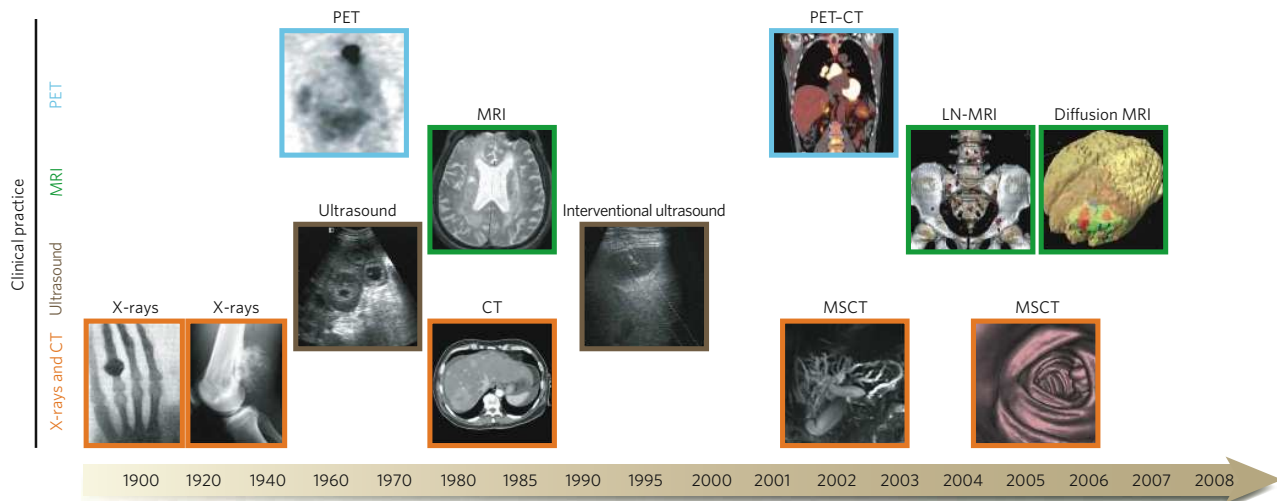


FIGURE 1 – Principales techniques d'imagerie macroscopiques utilisées en clinique¹

Pour le moment un peu en marge des techniques macroscopiques de routine, l'imagerie optique moléculaire est souvent considérée comme le futur de l'imagerie médicale. Elle est définie comme la caractérisation et la mesure optique de processus biologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire. De manière encore plus large, on la définit comme une technique permettant de suivre et d'enregistrer, de manière directe ou indirecte, la distribution spatio-temporelle de processus cellulaires ou moléculaires pour des applications en biochimie, biologie, thérapeutique ou diagnostic, cela en utilisant les photons comme principale source d'information.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit porte sur l'optimisation et le développement d'une nouvelle sonde d'imagerie optique exploitant le phénomène de luminescence persistante pour le diagnostic optique *in vivo* chez le petit animal. Il s'organisera autour de trois axes principaux :

1. *Introduction - Partie I* : Le premier chapitre de cette partie introductive assez générale sur l'imagerie optique nous permettra tout d'abord de revenir sur la physique des principaux phénomènes luminescents, mais aussi de mieux comprendre les singularités qui définissent l'identité de chaque outil et chaque technique. Le second chapitre de cette introduction sera consacré à la présentation des principales sondes photoniques utilisées aux fins de diagnostic optique et d'imagerie chez le petit animal. Nous remarquerons ici qu'une liste exhaustive de ce type d'outils demanderait très certainement un effort bibliographique bien plus conséquent que celui auquel nous nous attacherons dans cette partie. Nous traiterons plus particulièrement des sondes d'imagerie dont les développements nous ont paru prometteurs pour de futures applications au domaine biomédical.
2. *Résultats expérimentaux - Parties II à V* : Les résultats obtenus au cours de cette thèse seront ensuite exposés sous la forme d'une succession d'articles scientifiques publiés, soumis, ou en attente de soumission.
3. *Conclusion - Partie VI* : Une conclusion générale présentera enfin un bilan d'ensemble de cette période, les faits et résultats marquants obtenus au cours de ce doctorat, ainsi que quelques pistes de réflexions destinées à mes successeurs sur le projet, et à tous ceux qui les jugeront utiles ou dignes d'intérêt.

1. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. Nature. 2008 ;452(7187) :580-9

Table des matières

I	Introduction générale sur l'imagerie optique	5
1	Les émissions de lumière	7
1.1	Les photoluminescences	8
1.1.1	Fluorescence avec absorption monophonotique	8
1.1.2	Fluorescence avec absorption biphotonique	9
1.1.3	Fluorescence retardée et phosphorescence	11
1.1.4	Les centres colorés NV du diamant	12
1.1.5	Effets de confinement et boîtes quantiques	13
1.1.6	Upconversion de photons	14
1.2	Les autres luminescences	15
1.2.1	Chimiluminescence et bioluminescence	15
1.2.2	Electroluminescence	16
1.2.3	Triboluminescence	16
1.2.4	Thermoluminescence	17
1.3	La luminescence persistante	17
1.3.1	Bref historique	17
1.3.2	Le mécanisme	18
2	Les sondes d'imagerie optique	21
2.1	Les milieux biologiques imposent des contraintes	22
2.1.1	Autofluorescence	22
2.1.2	Absorption	23
2.1.3	Diffusion	24
2.2	Les sondes moléculaires	24
2.2.1	Fluorophores organiques	25
2.2.2	Les rapporteurs photoluminescents	28
2.2.3	Complexes phosphorescents	30
2.2.4	Chélates de lanthanides Ln^{3+}	31
2.3	Les nanoparticules	33
2.3.1	Des fluorophores dans une nanoparticule	33
2.3.2	Les nanoparticules de carbone	36
2.3.3	Les boîtes quantiques ou <i>quantum dots</i>	39
2.3.4	Les nanoparticules à upconversion	42
2.3.5	Les nanoparticules à luminescence persistante	45
II	Un premier nano-outil prometteur : $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+}, Mn^{2+}, Dy^{3+})	49
3	Premières preuves de ciblage <i>in vitro</i>	51
3.1	Réaliser un ciblage <i>in vitro</i>	51
3.2	Deux stratégies efficaces pour le ciblage de cellules cancéreuses	65
4	Contrôler la biodistribution de nanoparticules <i>in vivo</i>	67
4.1	Deux paramètres essentiels à la circulation des nanocristaux	67
4.2	Des propriétés optiques qui limitent les futures utilisations <i>in vivo</i>	77

III	Amélioration des propriétés optiques de matériaux à luminescence persistante	79
5	Le cas isolé du nitridosilicate : $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ (Eu^{2+}, Tm^{3+})	81
5.1	Pourquoi le nitridosilicate plutôt que le silicate	81
5.2	Une transposition difficile aux applications <i>in vivo</i>	90
6	Vers une persistance plus longue du silicate <i>in vivo</i>	91
6.1	Le modèle de la diopside : $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$	91
6.2	Une nouvelle composition pour l'imagerie optique du petit animal	98
IV	Le pas en avant pour l'imagerie optique <i>in vivo</i> : ZnGa_2O_4 (Cr^{3+})	99
7	L'excitation visible de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+})	101
7.1	L'efficacité du gallate massif	101
7.2	De nouvelles perspectives pour l'imagerie optique <i>in vivo</i>	124
8	Un paramètre de plus pour contrôler la biodistribution <i>in vivo</i>	125
8.1	Comment éviter le système monocyte-macrophage	125
8.2	Une circulation nettement améliorée	147
V	Nouveaux concepts à luminescence persistante pour l'imagerie <i>in vivo</i>	149
9	L'imagerie bimodale optique-IRM	151
9.1	L'idée de plateforme multimodale	151
9.2	La luminescence persistante pour l'imagerie bimodale	160
10	Un outil hybride pour la théranostique	161
10.1	L'intérêt du système cœur-coquille	161
10.2	La luminescence persistante en théranostique	183
VI	Conclusion	185
11	Bilan général et perspectives	187
12	Publications	191

Première partie

Introduction générale sur l'imagerie
optique

Chapitre 1

Les émissions de lumière

Sommaire

1.1	Les photoluminescences	8
1.2	Les autres luminescences	15
1.3	La luminescence persistante	17

Il pourrait paraître assez curieux d'employer un pluriel pour décrire le simple phénomène d'émission lumineuse. Notre œil, pourtant complexe d'un point de vue biologique ou physiologique, n'est sensible qu'à la dernière étape, résultante des phénomènes optiques par lesquels une substance émet une onde électromagnétique à laquelle notre système cônes/bâtonnets peut réagir : voilà ce que nous appelons lumière ! Il nous est ainsi possible d'accéder à certaines données physiques caractéristiques de cette onde. Sa fréquence et son amplitude sont respectivement liées à la couleur et à l'intensité du signal perçu par notre sens. Pourtant, une analyse physique de ces phénomènes permet de distinguer de nombreuses émissions lumineuses à l'origine d'une même couleur. A titre d'exemple, la luminescence de la pierre de Bologne, découverte par un chasseur italien nommé Casciarolo de Bologne en 1602², et celle de la partie inférieure de l'abdomen des lucioles ne sont absolument pas de même nature (Fig. 1.1).



FIGURE 1.1 – Tsuneaki Hiramatsu a parcouru les villes d'Okayama et Maniwa au Japon pendant la saison des pluies. C'est à cette période que les minuscules Lampyridae s'accouplent après les orages. En ressort une série de forêts féériques.

On distingue généralement les phénomènes d'incandescence, ou émissions "chaudes", par lesquels un corps porté à haute température émet naturellement de la lumière, des émissions "froides" dont l'origine n'est associée à aucune augmentation de température. Ces dernières, couramment regroupées sous le terme général de luminescence, sont associées à l'émission spontanée de photons après absorption d'une quantité d'énergie donnée. Selon la nature de l'excitation et de la relaxation, on parle de fluorescence, de phosphorescence, de fluorescence retardée, de bioluminescence, ou de chimiluminescence. Cette première partie sera l'occasion de détailler les phénomènes physiques associés aux différentes émissions lumineuses,

2. Y. Murayama, in Phosphor Handbook, S. Shionoya and W. M. Yen, Editors, p. 651, CRC Press, Boca Raton (1999)

mais aussi de comprendre les éléments qui font leur singularité. Le diagramme de Jablonski donnera une idée générale des transitions impliquées dans ces nombreux processus photoluminescents (Fig. 1.2).

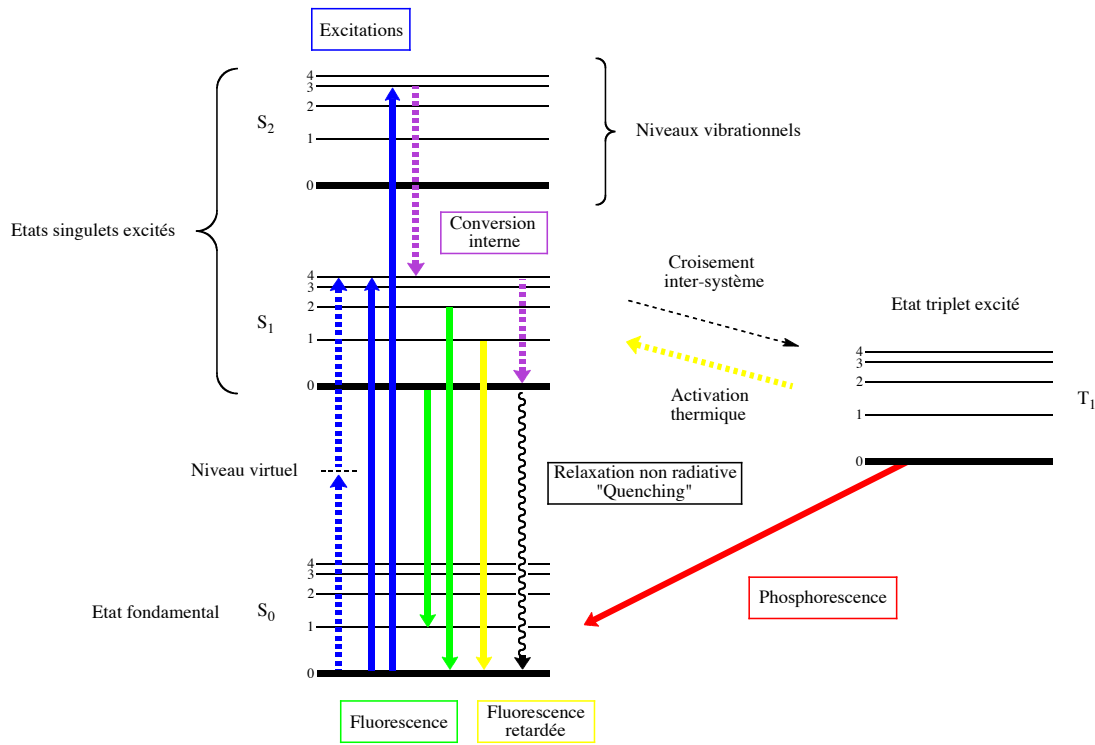


FIGURE 1.2 – Diagramme de Jablonski

Plutôt dédiée aux aspects théoriques des processus luminescents, le lecteur ne doit pas s'étonner de la faible quantité d'exemples de sondes présentés dans cette partie. Elles seront abordées avec leurs applications biomédicales dans le chapitre suivant sur les sondes d'imagerie optique.

1.1 Les photoluminescences

On utilise le terme de photoluminescence pour décrire un processus par lequel une substance absorbe un ou plusieurs photons, pour à son tour émettre un ou plusieurs photons. Nous détaillerons dans cette section les quelques photoluminescences essentielles au développement des techniques et outils d'imagerie optique, commençant par la fluorescence.

1.1.1 Fluorescence avec absorption monophotonique

Le terme de fluorescence est utilisé pour décrire le phénomène par lequel un photon est absorbé par un chromophore qui passe d'un état singulet fondamental S₀ à un état singulet excité S₁. Dans le cas d'une excitation monophotonique, abrégée OPA pour *one photon absorption*, cette absorption d'énergie est un processus quasi-instantané et se produit sur une durée proche de la femtoseconde (10⁻¹⁵ seconde). Une fois le chromophore dans son état excité, la relaxation peut se faire de façon non radiative, i.e. sans émission de lumière : il y a extinction de fluorescence, ou *quenching*. On parle de relaxation radiative, ou fluorescence, lorsque le phénomène de relaxation est accompagné d'une émission de lumière dont la fréquence ν_{em} est directement liée à la différence d'énergie entre les deux états singulets, selon :

$$\Delta E = E(S_1) - E(S_0) = \hbar\omega_{em} = h\nu_{em} = \frac{h \cdot c}{\lambda_{em}} \quad (1.1)$$

Dans cette équation, h est la constante de Planck (\hbar sa forme réduite), ω_{em} la pulsation de l'onde émise, ν_{em} sa fréquence, λ_{em} sa longueur d'onde, enfin c est la vitesse de la lumière. Ce phénomène radiatif se produit sur une durée proche de la nanoseconde.

La différence entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission est alors appelée déplacement de Stokes. On peut remarquer que dans les milieux liquides, la conversion interne conduit à une relaxation à partir du niveau de vibration la plus bas de l'état excité en 10^{-11} seconde, c'est la règle de Kasha. La figure 1.3 résume le mécanisme de fluorescence par OPA.

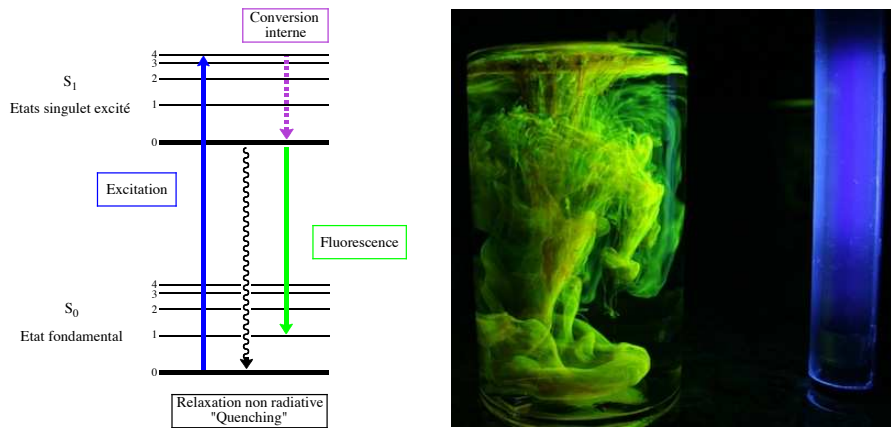


FIGURE 1.3 – *A gauche*, mécanisme simplifié de fluorescence par absorption monophotonique. *A droite*, solution de fluorescéine dont l'émission verte est visible sous une lampe bleue.

Il est ici important de comprendre que le processus d'absorption monophotonique est linéaire, i.e. que la quantité de lumière absorbée par le chromophore est une fonction linéaire de la quantité de lumière qui arrive sur l'échantillon. La formalisation mathématique d'un modèle d'absorption à une dimension nous permet d'écrire la loi de Beer-Lambert^{3, 4} :

$$-\frac{dI(z)}{dz} = \alpha I \quad (1.2)$$

Dans cette équation, z est la direction de propagation du faisceau incident, I l'intensité du faisceau et α le coefficient d'absorption monophotonique.

1.1.2 Fluorescence avec absorption biphotonique

Dans certains cas particuliers, il est possible de faire passer le chromophore de son état fondamental S_0 à son état excité S_1 par absorption simultanée de deux photons d'énergie $\Delta E/2$. Il se crée alors un état virtuel entre les deux niveaux du système. Si la relaxation se produit par émission d'un photon d'énergie ΔE , on parle de fluorescence avec absorption biphotonique, abrégée TPA pour *two photon absorption*. Contrairement au premier type de fluorescence décrit plus haut, il s'agit d'un phénomène d'optique non linéaire, proposé pour la première fois par M. Göpper-Mayer en 1931⁵, dans lequel l'absorption biphotonique du chromophore est décrite par la forme mathématique suivante :

$$-\frac{dI(z)}{dz} = \beta I^2 \quad \text{avec} \quad \beta = 2C \frac{\sum}{\hbar \cdot \omega} \quad (1.3)$$

Le coefficient d'absorption monophotonique α est ici remplacé par un coefficient d'absorption biphotonique β . La concentration C apparaît dans la définition de ce nouveau coefficient d'absorption, tout comme une "largeur apparente" \sum sur laquelle se produit l'absorption. L'unité informelle pour ce dernier facteur est le Göppert-Mayer (GM) avec $1\text{GM} = 10^{-50} \text{cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$.

D'un point de vue pratique, il est assez difficile d'obtenir une telle excitation de la fluorescence. La probabilité d'absorption simultanée de deux photons est environ trente fois plus faible que celle du

3. J.H. Lambert, *Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*, Sumptibus Vidae Eberhardi Klett, 1760

4. A. Beer, « Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten », dans *Annalen der Physik und Chemie*, vol. 86, 1852

5. M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*. 1931 ;401(3) :273-294

processus monophotonique. Un choix judicieux de la source d'excitation permet cependant d'augmenter la probabilité de voir un tel évènement se produire. Notamment, lorsque l'énergie d'un faisceau laser se concentre en de brèves impulsions femtosecondes suffisamment focalisées sur l'échantillon, les photons se retrouvent dans un état de confinement spatio-temporel qui favorise l'absorption biphotonique. Le mécanisme est présenté en figure 1.4.

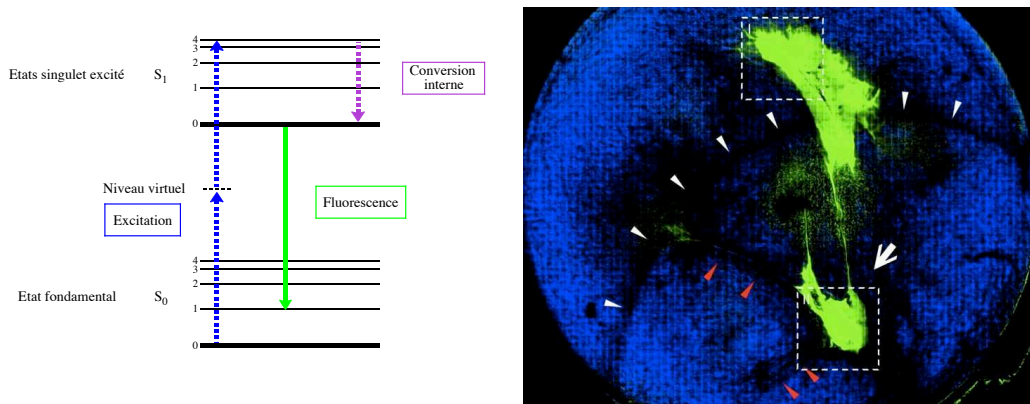


FIGURE 1.4 – *A gauche*, mécanisme simplifié de fluorescence par absorption biphotonique. *A droite*, image de fluorescence biphotonique d'une coupe de cornée. La flèche blanche indique la fluorescence de l'apex.

Ce phénomène de fluorescence a donné lieu à l'apparition d'une nouvelle technique d'imagerie optique, proposée par W. Denk dans les années 90 : la microscopie à deux photons⁶. Le principe repose sur la focalisation d'un faisceau laser à impulsions ultra brèves - on parle de laser femtoseconde - dans un volume de l'ordre du femtolitre. Une simple modification de l'optique de focalisation par rapport à l'échantillon permet d'obtenir une série de plans de coupe sur un axe z . Le balayage laser de l'échantillon dans un plan xy produit une image bidimensionnelle. Il suffit alors de coller les images obtenues en xy à différentes valeurs de z pour finalement obtenir une reconstruction en trois dimensions (Fig. 1.5, droite).

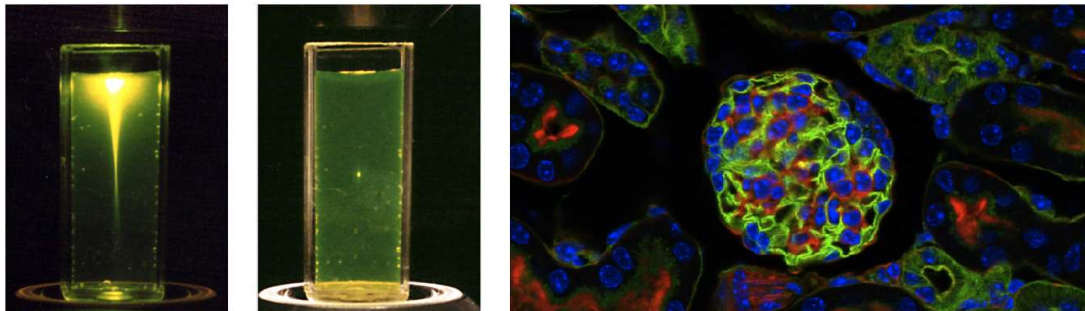


FIGURE 1.5 – La microscopie à deux photons. *A gauche*, cône d'excitation monophotonique dans une solution de fluorescéine. *Au milieu*, point de focalisation biphotonique dans une solution de fluorescéine. *A droite*, image d'un glomérule rénal de souris obtenue après excitation à deux photons d'une coupe de rein épaisse de 16 microns. Le réseau de tubule est marqué à l'agglutinine de germe de blé (vert), les filaments d'actine sont marqués à la phalloïdine (rouge), enfin les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (bleu). Le diamètre du glomérule central est d'environ $40 \mu\text{m}$.

Un avantage de cette technique par rapport aux microscopies conventionnelles réside dans l'utilisation de sources laser d'excitation situées dans la fenêtre de faible absorption des tissus, souvent dans le proche infrarouge. Nous verrons plus loin que les tissus biologiques sont responsables d'une forte absorption/diffusion des courtes longueurs d'onde qui peut nettement limiter la résolution spatiale des techniques de microscopie. L'excitation biphotonique permet l'acquisition d'images sur de plus grandes profondeurs et garantit une résolution radiale/axiale élevée, tout en minimisant la taille de la région excitée, mais

6. Denk and Svoboda, Photon Upmanship : why multiphoton imaging is more than a gimmick, Neuron (1997)

aussi le stress imposé au tissu ⁷.

1.1.3 Fluorescence retardée et phosphorescence

Pour le moment, nous n'avons évoqué que les processus d'excitation/relaxation entre deux états singlets. Dans certains cas, un croisement inter-système peut permettre au chromophore de passer d'un état singlet excité à un état triplet excité (Fig. 1.6). Les règles de sélection interdisent les émissions avec changement de multiplicité de spin, c'est la raison pour laquelle le système reste bloqué dans cet état triplet excité. Des modifications de l'environnement électronique permettent parfois une relaxation radiative directe de l'état triplet excité vers le niveau fondamental, c'est la phosphorescence. Le chromophore peut cependant retourner à l'état singlet excité en recevant une certaine quantité d'énergie, c'est le point de départ de la fluorescence retardée. On distingue alors deux cas de figure majoritaires :

- Une activation thermique peut permettre au système de retourner à l'état singlet excité pour finalement se relaxer dans l'état fondamental par fluorescence. Il s'agit du phénomène de fluorescence retardée de type E.
- La collision de deux chromophores bloqués dans le même état triplet excité peut générer un état fondamental et un état singlet excité qui revient à son niveau fondamental par fluorescence. Il s'agit du phénomène de fluorescence retardée de type P.

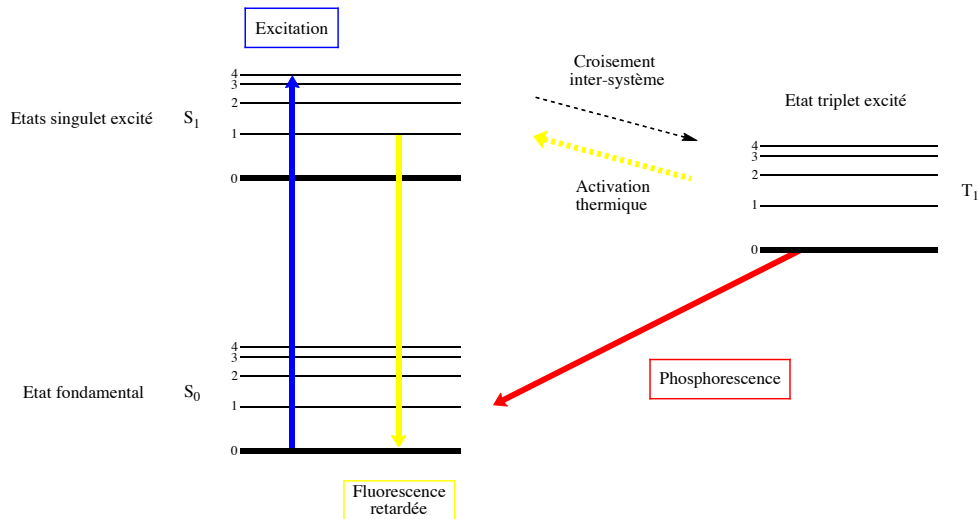


FIGURE 1.6 – Mécanismes simplifiés de la phosphorescence et de la fluorescence retardée de type E

Bien que le processus de fluorescence retardée dure plus longtemps qu'une fluorescence classique (de l'ordre de la milliseconde), la relaxation radiative se produit entre les mêmes états que dans le cas de la fluorescence classique. Le passage du système par l'état triplet excité n'est que momentané. Le photon émis par fluorescence retardée possède donc la même énergie que celui émis lors d'une fluorescence sans croisement inter-système. Pour cette raison, les spectres d'émission résultant des deux phénomènes seront identiques. Notons que ce mécanisme de fluorescence retardée explique les propriétés optiques des structures qui emploient les chélates de lanthanides et autres oxydes dopés avec des ions terres-rares.

Dans le cas de la phosphorescence, l'état triplet excité est de plus basse énergie que l'état singlet dont il provient. La relaxation de l'état triplet excité à l'état fondamental produit un photon de plus faible énergie que celui émis au cours de la fluorescence retardée. D'un point de vue énergétique, il est possible d'écrire :

$$E(S_1) - E(S_0) > E(T_1) - E(S_0) \Rightarrow \lambda_{em}^{phos} > \lambda_{em}^{fluo} \quad (1.4)$$

Le spectre d'émission de phosphorescence sera donc décalé vers les grandes longueurs d'onde.

7. Schilders SP, Gu M. Limiting factors on image quality in imaging through turbid media under single-photon and two-photon excitation. *Microsc Microannal.* 2000;6 :156-60

1.1.4 Les centres colorés NV du diamant

Certaines impuretés présentes dans le diamant sont à l'origine d'un signal de photoluminescence. Parmi plus de 500 défauts optiquement actifs dans la structure du diamant, l'azote représente l'impureté la plus abondante^{8,9}. Il existe sous la forme d'atome unique en substitution mais également sous la forme d'agrégats dans la matrice de carbone. Le centre coloré azote-lacune, abrégé NV pour *nitrogen-vacancy*, est créé lorsqu'une lacune de carbone est positionnée à côté d'un atome d'azote en substitution (Fig. 1.7).

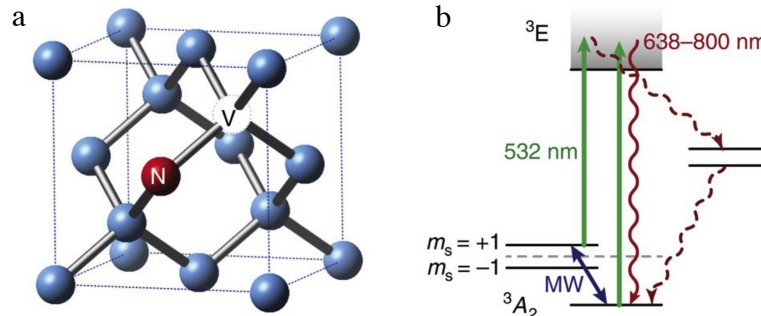


FIGURE 1.7 – *A gauche*, centre coloré azote-lacune dans une matrice de diamant. *A droite*, mécanisme simplifié de l'émission du centre NV^- .

Les centres colorés azote-lacune peuvent exister sous deux états de charge différents : un état neutre NV° et un état de charge négative NV^- ^{10,11}. Ils sont naturellement présents dans le cristal, comme impuretés répertoriées, mais peuvent également y être introduits par irradiation sous un faisceau d'électrons (2 à 10 MeV) ou de protons (2 à 3 MeV). Un traitement thermique du diamant à 800°C pendant quelques heures permet alors aux lacunes formées de migrer à proximité des atomes d'azote en substitution.

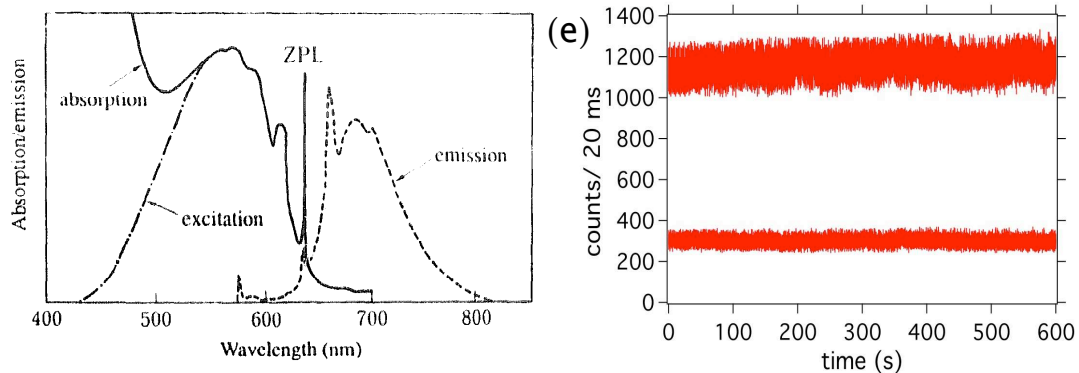


FIGURE 1.8 – Propriétés optiques des centres colorés NV^- . *A gauche*, Spectre d'excitation, spectre d'émission et ligne zéro phonon associés au centre NV^- . *A droite*, photostabilité de l'émission d'un centre NV^- (300 coups/20 ms) ou de quatre centres NV^- (1200 coups/20 ms).

Les propriétés optiques des centres NV^- sont présentées en figure 1.8. Ils se distinguent d'autres systèmes optiques, notamment des boîtes quantiques et autres sondes moléculaires organiques, par une photostabilité remarquable à température ambiante et une large émission entre 650 et 750 nm¹².

8. G. Davies. Properties and growth of diamond. INSPEC, The Institution of Electrical Engineers, EMIS Data Review Series, London, 1994

9. A.M. Zaitsev. Optical Properties of Diamond. A Data Handbook. Springer-Verlag, Berlin, 2001

10. Davies, G.; Hamer, M. F. (1976). "Optical Studies of the 1.945 eV Vibronic Band in Diamond". Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences (1934-1990) 348 (1653) : 285

11. Mita, Yoshimi. Change of absorption spectra in type-Ib diamond with heavy neutron irradiation. Physical Review B. 1996 ;53(17) :11360

12. Gruber A, Dräbenstedt A, Tietz C, Fleury L, Wrachtrup J and Von Borczyskowsky C. Scanning confocal optical microscopy and magnetic resonance on single defect centers. Science. 1997 ;276 :2012

1.1.5 Effets de confinement et boîtes quantiques

Retour sur la théorie des bandes Dans le modèle quantique simplifié, une molécule se forme par combinaison linéaire d'orbitales atomiques (CLOA). L'association de n orbitales atomiques donne naissance à n orbitales moléculaires : $n/2$ orbitales liantes occupées de basse énergie, $n/2$ orbitales antiliantes vides de plus haute énergie. Si l'édifice moléculaire comprend une association de $2n$ orbitales atomiques conjuguées identiques, il y a création de deux continums de n orbitales moléculaires (Fig. 1.9).

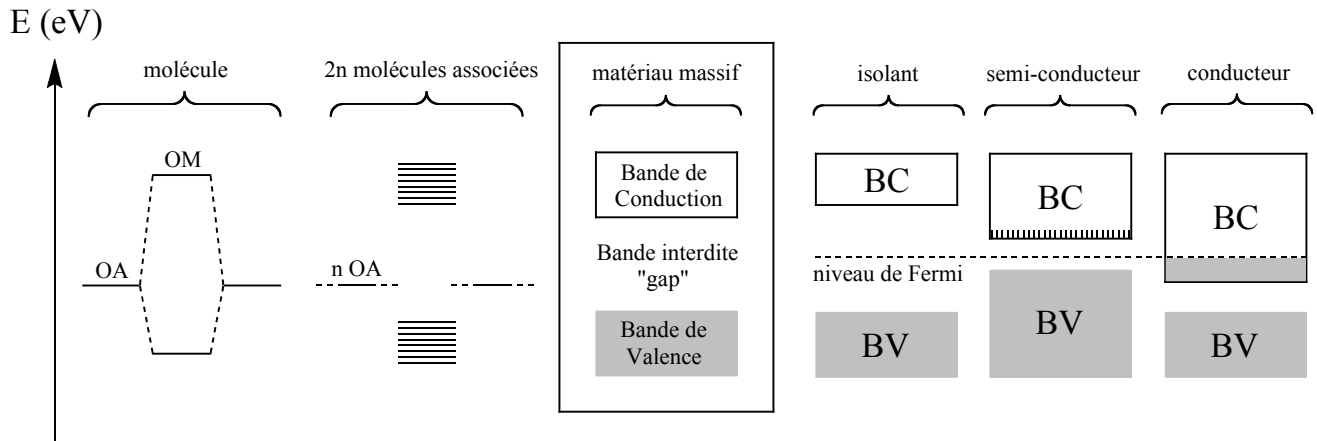


FIGURE 1.9 – Structure de bandes et grandes classes de matériaux

Etant donné le nombre important d'atomes associés les uns aux autres dans un solide, mais aussi la proximité de leurs niveaux d'énergie, il apparaît une structure de bandes qui définit trois zones distinctes dans le matériau : une bande de valence (BV) que l'on présente usuellement comme le continuum liant du solide, une bande interdite - ou *gap* - ne recevant aucun niveau d'énergie, enfin une bande de conduction (BC) associée au continuum antiliant du système.

Le positionnement de la bande de conduction par rapport à la bande de valence fixe la largeur de la bande interdite et permet de définir trois grandes classes de matériaux (Fig. 1.9) :

1. Les conducteurs : la bande de conduction est partiellement occupée et les électrons sont libres de se déplacer dans toute la structure du matériau. Le niveau de Fermi se situe dans la bande de conduction et permet une bonne conductivité électrique.
2. Les isolants : la bande de valence est pleine d'électrons alors que la bande de conduction ne contient aucun électron. Dans ce cas précis, la bande interdite est assez large pour empêcher tout passage de charge de la bande de valence vers la bande de conduction. La conductivité électrique de tels matériaux est nulle.
3. Les semi-conducteurs : cette situation est assez proche de celle de matériaux isolants pour lesquels la largeur de la bande interdite est diminuée et permet une excitation des électrons de la bande de valence vers la bande de conduction, moyennant une certaine quantité d'énergie.

Le confinement des boîtes quantiques Le cas des boîtes quantiques présente un intérêt singulier en ce que leurs propriétés optiques dépendent directement des dimensions du cristal qui les compose. Ces matériaux sont le plus souvent constitués de semi-conducteurs inorganiques de composition variable : CdS, CdSe, ZnO, InP, ... L'excitation d'électrons de la bande de valence dans la bande de conduction permet la création d'excitons. Un exciton est une quasi-particule que l'on peut voir comme une paire électron-trou liée par des forces de Coulomb et à laquelle est associée un rayon de Bohr, défini comme la demi distance entre les deux charges créées. Lorsque les dimensions du matériau sont réduites, notamment dans le cas de nanoparticules dont le diamètre est du même ordre de grandeur que le rayon de Bohr des excitons, il se produit un effet de confinement associé à une baisse significative de la densité d'états, abrégée DOS pour *density of states*¹³. Cette diminution du nombre d'états, liée à l'effet de confinement quantique, est

13. Ekimov, A.I. and Onushchenko, A.A. Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals. JETP Lett. 1981 ;34 :345-349

à l'origine d'une disparition de la structure de bandes - les niveaux se discrétisent à nouveau - et d'une nette augmentation de la largeur de la bande interdite (Fig. 1.10).

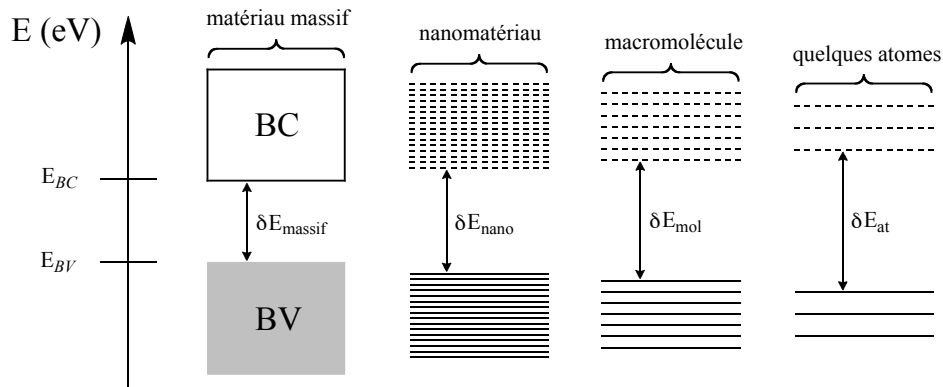


FIGURE 1.10 – Effet de confinement associé à la diminution du diamètre de la particule

Plus l'effet de confinement est important, i.e. plus les particules sont de faible diamètre, plus la bande interdite est élargie¹⁴. Au moment de la recombinaison de l'exciton, la longueur d'onde du photon émis sera directement dépendante de la largeur de la bande interdite, donc de la taille du semi-conducteur^{15, 16}. Les boîtes quantiques de grands diamètres seront ainsi caractérisées par un faible effet de confinement et une émission décalée vers le rouge. À l'inverse, les plus petits diamètres seront le siège d'un fort effet de confinement et d'une émission décalée vers le bleu (Fig. 1.11).

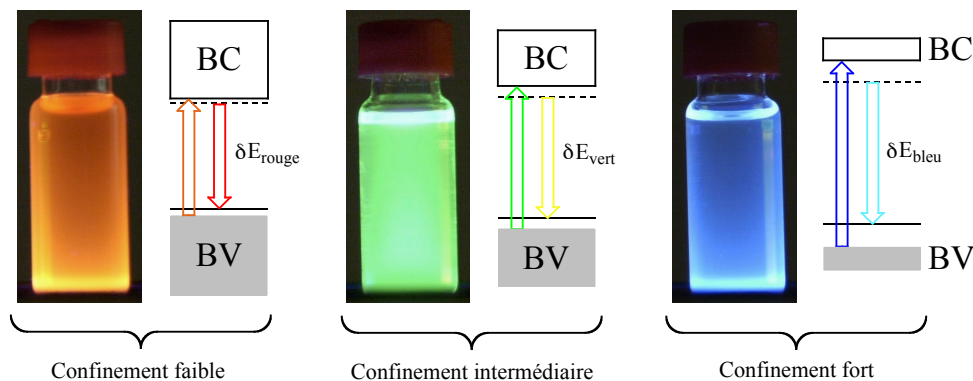


FIGURE 1.11 – Influence de l'effet de confinement sur les propriétés optiques des boîtes quantiques

Dans le cas de ces petits semi-conducteurs, la recombinaison de l'exciton n'est pas aussi rapide que le phénomène de fluorescence classique. La durée de vie du signal de photoluminescence des boîtes quantiques est de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes, contre quelques nanosecondes pour la fluorescence des sondes moléculaires organiques.

1.1.6 Upconversion de photons

Ce phénomène appartient au domaine de l'optique non linéaire. Il se caractérise par la conversion de photons de longueurs d'onde élevées, souvent dans l'infrarouge, en radiations de longueurs d'onde plus faibles, généralement dans le visible. Ce type de conversion peut se produire suivant trois mécanismes,

14. Reed MA, Randall JN, Aggarwal RJ, Matyi RJ, Moore TM, Wetsel AE. Observation of discrete electronic states in a zero-dimensional semiconductor nanostructure. *Phys Rev Lett.* 1988;60(6) :535-537

15. Han M, Gao X, Su JZ, Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol.* 2001;19(7) :631-5

16. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science.* 2005;307(5709) :538-544

tous basés sur l'absorption séquentielle de photons par des états énergétiques métastables de longue durée de vie¹⁷ (Fig. 1.12) :

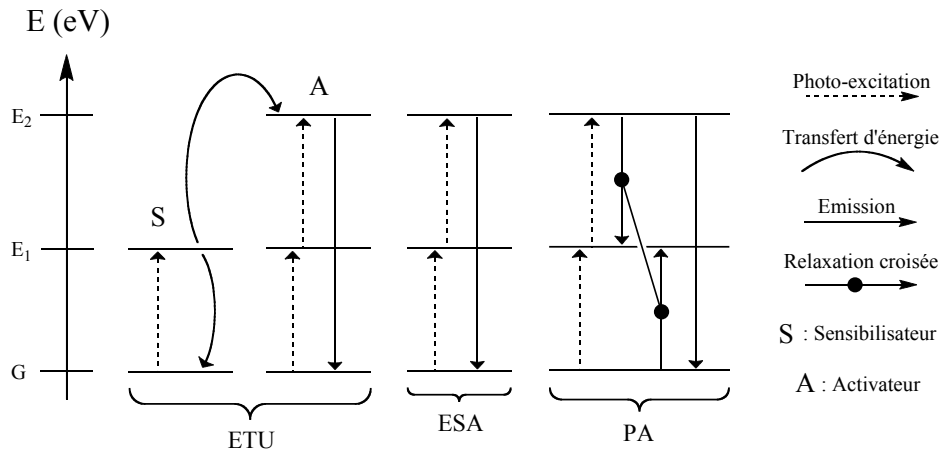


FIGURE 1.12 – Processus d'upconversion pour un cristal dopé avec des lanthanides

1. Addition de photons par transferts d'énergie APTE, ou ETU pour *energy transfer upconversion* : un photon est d'abord absorbé par l'ion sensibilisateur qui transfère son énergie vers l'ion activateur et peuple un état hautement excité à partir duquel se produira l'émission finale.
2. *Excited-state absorption* ESA : l'ion qui émet absorbe de manière séquentielle au moins deux photons d'énergie convenable pour parvenir au niveau émetteur.
3. *Photon avalanche* PA : ce mécanisme d'upconversion est le plus récent mais aussi le plus complexe. Le photon d'énergie plus élevée, émis par relaxation du niveau E_2 au niveau fondamental E_G , peut dans le même temps provoquer un processus d'upconversion¹⁸. Cet effet est attribué à une augmentation de la population du niveau excité E_1 résultant d'un phénomène de relaxation croisée. Plus la quantité d'énergie absorbée ($E_2 - E_1$) est importante, plus le phénomène de relaxation croisée peuple le niveau E_1 . Il s'ensuit un processus cyclique et une "avalanche de photons".

L'apparition de ces phénomènes d'upconversion nécessite la réalisation d'un certain nombre de conditions parmi lesquelles nous pouvons citer l'existence d'états excités de longue durée de vie ou encore un arrangement en échelle des niveaux d'énergie, avec un écart similaire entre plusieurs niveaux consécutifs. Ces prérequis se retrouvent pour certains ions des blocs d et f. De grandes efficacités d'upconversion ont notamment été obtenues dans les solides dopés avec des lanthanides. Pour le moment, l'un des matériaux les plus efficaces reste $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$, développé par Menyuk et al. en 1972¹⁹.

1.2 Les autres luminescences

Une substance peut également émettre de la lumière en réponse à une excitation qui n'appartient pas au domaine de l'optique. Cette section est consacrée aux autres phénomènes de luminescence, i.e. ceux pour lesquels l'émission de photons n'est pas provoquée par une absorption de photons.

1.2.1 Chimiluminescence et bioluminescence

Le phénomène de chimiluminescence, respectivement bioluminescence, se produit lorsqu'une réaction chimique, respectivement enzymatique, est à l'origine d'une émission de photon. Si nous considérons les réactifs A et B, ainsi que l'intermédiaire excité Δ^* formé par réaction de ces deux espèces, on peut décrire la réaction de chimiluminescence par l'équation suivante :



17. Auzel F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. Chem Rev. 2004;104(1) :139-73

18. Chivian JS, Case WE and Eden DD. The photon avalanche : A new phenomenon in Pr^{3+} -based infrared quantum counters. Appl. Phys. Lett. 1979;35 :124

19. Menyuk N, Dwight K and Pinaud F. $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}, \text{Er}$ - an efficient upconversion phosphor. Appl Phys Lett. 1972;21 :159-161

L'émission de photon est directement reliée à la relaxation radiative de l'espèce intermédiaire excitée (Fig. 1.13). En théorie, un photon devrait être rendu pour une molécule de réactif, i.e. nous devrions recevoir un nombre de photons égal au nombre d'Avogadro par mole de réactif. Bien entendu, ce n'est pas le cas dans la pratique et les rendements quantiques de telles réactions ne dépassent guère le pourcent.

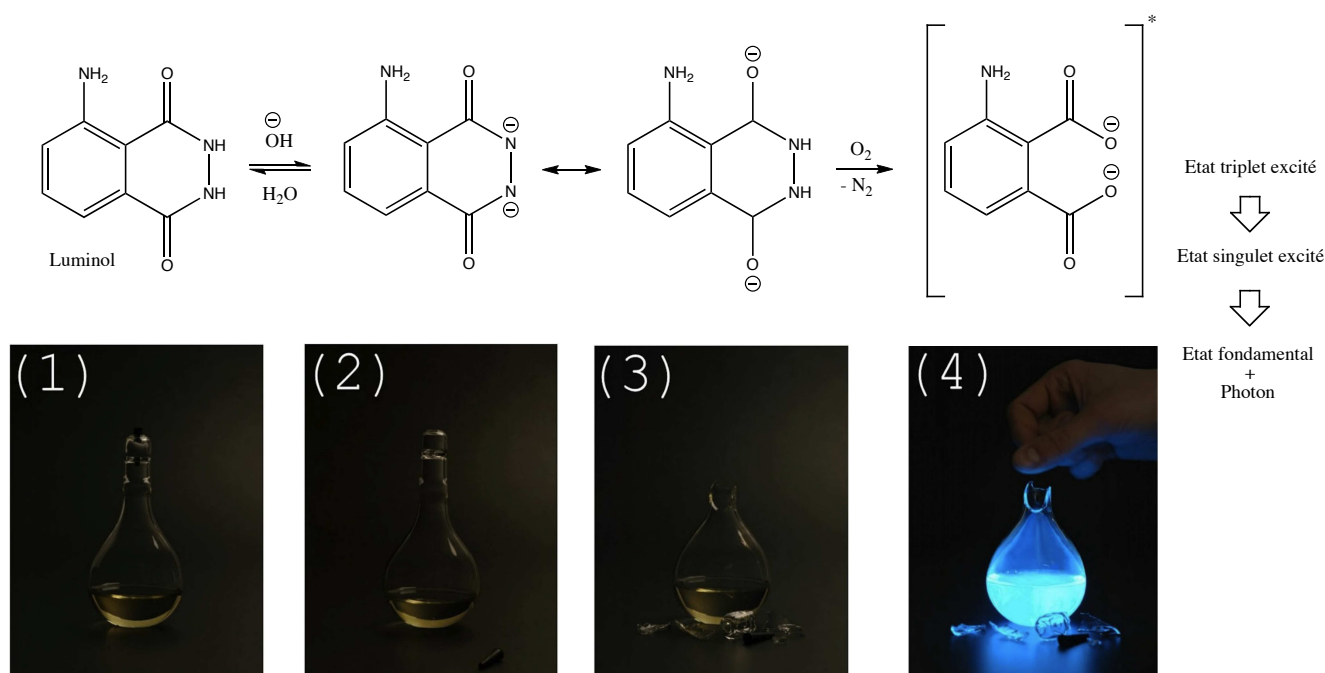


FIGURE 1.13 – Equation associée à la réaction de chimiluminescence du luminol. Les images présentées sous le chemin réactionnel donnent une idée du type de signal obtenu au moment de la relaxation radiative.

1.2.2 Electroluminescence

L'électroluminescence est le phénomène opto-électrique par lequel un matériau émet de la lumière en réponse à un courant ou à un champ électrique qui le traverse. Dans la première étape du processus électroluminescent, l'application d'un fort courant électrique au travers d'un semi-conducteur permet de séparer les charges, ou défauts, au sein de la matrice. Le matériau est alors divisé en trois zones schématiques :

1. Semi-conducteur de type-n : accumulation de charges/défauts positifs
2. Jonction p-n : zone de déplétion dans laquelle la concentration en porteurs libres est quasi-nulle
3. Semi-conducteur de type-p : accumulation de charges/défauts positifs

Les charges séparées au cours de la première étape du processus se recombinent de manière radiative au niveau de la jonction p-n du matériau pour donner naissance au phénomène d'électroluminescence. Ces propriétés opto-électriques sont de plus en plus utilisées dans l'industrie pour la production de biens de consommations destinés au grand public comme les téléviseurs, les systèmes d'éclairage à base de diodes électroluminescentes (DEL), ou encore d'autres accessoires lumineux.

1.2.3 Triboluminescence

Peu connu du grand public, le terme triboluminescence fait référence au phénomène optique par lequel se produit une émission de lumière lorsqu'un matériau est cassé, fendu, rompu, ou encore frotté. Les spécialistes de la science des matériaux ne comprennent pas encore clairement les mécanismes à l'origine d'un tel processus. Pour le moment, la théorie associée au phénomène de triboluminescence, qui repose essentiellement sur des données cristallographiques et spectroscopiques, prévoit que l'émission de photons serait la conséquence d'une séparation de charges, apparue du fait de la rupture d'un matériau asymétrique. Lorsque les charges se recombinent, la décharge électrique provoque l'ionisation de l'air

environnant, et un flash de lumière. Les propriétés de triboluminescence semblent se manifester pour des cristaux manquant de symétrie et mauvais conducteurs. Dans certains cas, on parle également de fractoluminescence pour désigner le même phénomène.

1.2.4 Thermoluminescence

Le phénomène de thermoluminescence se produit lorsqu'une substance émet de la lumière des suites d'une activation thermique. Comme nous l'avons déjà évoqué plus haut à propos des matériaux semi-conducteurs, lorsque la bande interdite n'est pas trop large, il est possible de faire passer des électrons de la bande de valence dans la bande de conduction. Cette excitation peut se faire en utilisant des rayonnements de haute énergie, notamment des rayons X dont l'énergie est comprise entre 100 et 1000 eV. Une fois excités, ces électrons peuvent se déplacer au sein de la bande de conduction. De la même manière, les trous créés peuvent également se déplacer dans la bande de valence. Ce transport de porteurs de charge peut être empêché ou retardé par l'introduction de défauts ponctuels dans le matériau qui jouent le rôle de piège. Une stimulation thermique peut alors libérer ces charges, qui vont migrer jusqu'à rencontrer un centre luminescent, se recombiner et émettre de la lumière (Fig. 1.14). Le processus de thermoluminescence constitue une étape essentielle du phénomène de luminescence persistante.

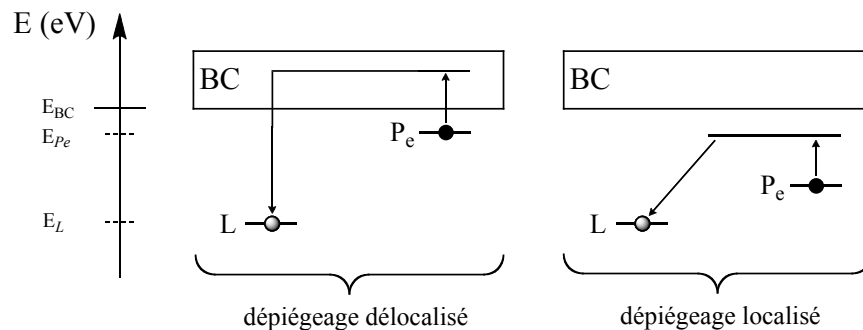


FIGURE 1.14 – Dépiégeage thermostimulé d'un électron piégé sous la bande de conduction. *A gauche*, mécanisme de dépiégeage délocalisé, i.e. avec passage par la bande de conduction. *A droite*, mécanisme de dépiégeage localisé, i.e. sans passage par la bande de conduction, avec effet tunnel.

1.3 La luminescence persistante

La luminescence persistante est la propriété optique par laquelle certains minéraux émettent des photons de manière prolongée sans excitation continue. Comparables à des condensateurs optiques, ces matériaux ont la capacité de capter une certaine quantité d'énergie, dont ils se chargent, et de la restituer sous forme de lumière sur des durées pouvant atteindre plusieurs jours.

1.3.1 Bref historique

Les premiers rapports de l'existence de tels phénomènes optiques datent du début du XVII^e siècle. En 1602, un chasseur italien du nom de Casciarolo de Bologne découvre une pierre de baryte, le sulfure de baryum calciné. Cette roche avait le "pouvoir" d'émettre de la lumière dans le noir, après une exposition à la lumière du jour. Les savants de l'époque, dont Galilée (1564-1642), s'intéressèrent à cet étrange phénomène et baptisèrent la fameuse pierre de Bologne : "éponge à lumière".

Malgré les nombreuses tentatives de scientifiques et d'alchimistes européens désireux d'expliquer le phénomène, la pierre de Bologne ne refit son apparition qu'au début du XX^e siècle avec le scandale des "radium girls". La communauté scientifique avait découvert que les sels de radium permettaient l'excitation continue de la luminescence persistante d'un mélange de sulfure de zinc et de vernis. Cette association mortelle fut utilisée pour la fabrication des aiguilles de montres jusqu'au décès d'ouvrières des suites d'une trop forte exposition aux rayonnements ionisants.

La première alternative à la radioactivité fut proposée au début du XX^e siècle, avec le sulfure de zinc dopé au cuivre, mais il était encore difficile de voir ces composés plus d'une heure après excitation. La recherche scientifique fut relancée en 1996 par la découverte de l'aluminate de strontium codopé avec de l'euporium et du dysprosium²⁰. Ce composé pouvait émettre une lumière verte, visible pendant plus de 12 heures après excitation UV. Depuis, de nombreux matériaux commerciaux ont été développés et couvrent différentes couleurs du spectre visible, du bleu au rouge. La plupart des poudres accessibles sur le marché ont une taille qui varie de 10 à 60 μm . Leurs applications principales rassemblent les panneaux de signalisation, les jouets, et la peinture (Fig. 1.15).



FIGURE 1.15 – Quelques applications des matériaux à luminescence persistante

1.3.2 Le mécanisme

Bien que le mécanisme de luminescence persistante puisse sensiblement varier d'une composition à l'autre, il se dégage de l'ensemble des théories un dénominateur commun qui rassemble la plupart des scientifiques du domaine sur la question. Tout d'abord, la phénomène de luminescence persistante est le résultat d'une série de piégeage et de dépiégeage de charges²¹. Ces processus sont rendus possibles par l'introduction de défauts-pièges dans la matrice. La plupart des discussions au sein de la communauté portent sur la nature des défauts ou encore la manière de les introduire dans le cristal.

Introduction de défauts-pièges Les défauts présents dans la matrice peuvent être de deux natures. Il peut s'agir d'imperfections du matériau, défauts intrinsèques, ou d'impuretés/dopants que l'on qualifie de défauts extrinsèques. Dans tous les cas, leur fonction est de stocker une charge nette dans la structure du cristal, négative pour les électrons e^- , positive pour les trous t . On distingue généralement deux types de pièges :

1. Les pièges à électrons P_e : ils sont le plus souvent des défauts ponctuels (lacune d'oxygène, lanthanide trivalent en substitution) placés sous la bande de conduction.
2. Les pièges à trous P_t : de la même manière, les trous peuvent être piégés à proximité de la bande de valence (lacune anionique, cation, ou lacune cationique).

Les ions terres-rares ont été désignés comme pièges à électrons efficaces dans de nombreuses compositions donnant lieu à un phénomène de luminescence persistante. L'ionisation de ces atomes conduit à des ions trivalents Ln^{3+} , de configuration électronique : $[\text{Xe}]4f^{m-1}5s^25p^6$, capables de piéger les électrons suivant le mécanisme : $\text{Ln}^{3+} + e^- \rightarrow \text{Ln}^{2+}$. Les travaux de P. Dorenbos et de son équipe ont largement contribué à une meilleure compréhension du rôle des lanthanides dans ces mécanismes²². Bien entendu, la seule présence de pièges dans le cristal ne suffit pas à obtenir le phénomène de luminescence persistante. Pour se produire, l'émission de lumière nécessite l'introduction d'un centre luminescent L, et parfois d'un activateur A.

Chargement optique Comme nous l'avons évoqué plus haut, un matériau à luminescence persistante peut être considéré comme un condensateur optique. La première étape du mécanisme de luminescence persistante consiste à charger le matériau avec une certaine quantité d'énergie. Cette étape de chargement

20. Matsuzawa T, Aoki Y, Takeuchi N and Murayama Y. A new long phosphorescence phosphor with high brightness, $\text{SrAl}_2\text{O}_4 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$. J. Electrochem. Soc. 1996;143(8) :2670-2673

21. Leverenz HW. Luminescent solids (phosphors). Science. 1949;109 :183-189

22. Dorenbos P. Mechanism of persistent luminescence in $\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7 : \text{Eu}^{2+}; \text{Dy}^{3+}$. Phys. Stat. Sol. 2005;242(1) :R7-R9

correspond au piégeage de charges. Nous détaillerons ici le cas d'un piégeage de charges négatives.

Habituellement, il est possible de faire passer des électrons de la bande de valence vers la bande de conduction en utilisant un rayonnement de haute énergie comme les rayons X. Il est cependant peu aisé de manipuler ce genre de sources, et leur utilisation nécessite un certain nombre de précautions pendant la manipulation, notamment l'installation d'une enceinte plombée pour éviter toute fuite de rayons X vers le manipulateur. Pour des raisons pratiques, il est préférable de travailler avec des rayonnements moins énergétiques, et un activateur A qui va permettre de séparer les charges dans le matériau sans passer par la bande de valence (Fig. 1.16).

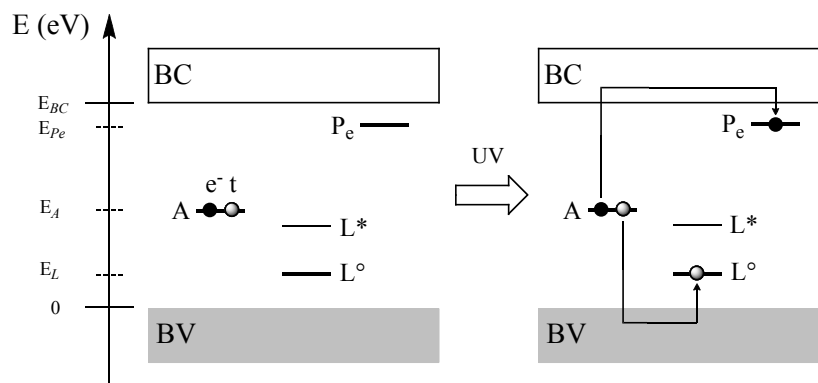


FIGURE 1.16 – Chargement optique d'un matériau à luminescence persistante

Dans le schéma ci-dessus, le cristal est dopé avec trois espèces différentes : A, L, et P_e . Tout d'abord, l'activateur A permet de placer un niveau entre la bande de valence et la bande de conduction. Il rend possible une excitation du matériau dans la bande interdite par des rayonnements UV beaucoup moins énergétiques que les rayons X²³. L'excitation UV permet de faire passer un électron de A vers P_e en passant par la bande de conduction. A la fin du processus de piégeage optique, l'électron est piégé sur P_e alors que le trou a migré jusqu'au niveau L° du centre luminescent sur lequel il se retrouve piégé, à son tour.

Dépiégeage thermique La deuxième étape du mécanisme de luminescence persistante fait appel à une notion que nous avons déjà abordée plus tôt : la thermoluminescence. Une fois le chargement terminé, le matériau a emmagasiné une certaine quantité d'énergie. Pour la restituer, il lui est nécessaire de provoquer la libération des charges qui vont pouvoir se recombiner et donner lieu à une émission lumineuse. Cette dernière étape est contrôlée par la température (Fig. 1.17).

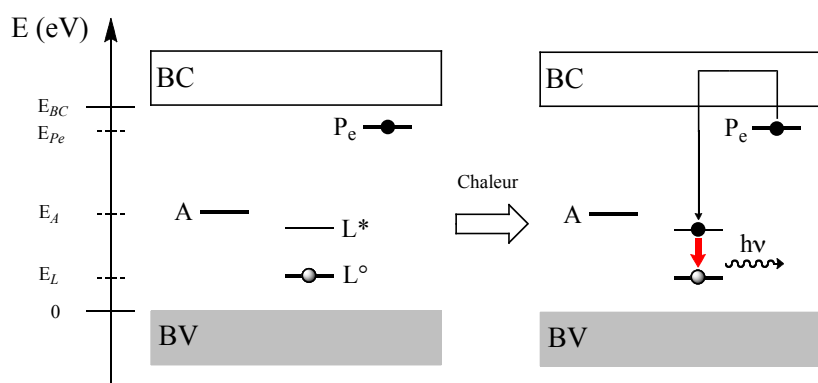


FIGURE 1.17 – Dépiégeage thermique et luminescence persistante

23. Lecointre A, Viana B, LeMasne Q, Bessière A, Chanéac C, Gourier D. Red long-lasting luminescence in clinoenstatite. Journal of Luminescence 2009 ;129 :1527-1530

La chaleur ambiante apporte l'énergie nécessaire au dépiégeage de l'électron qui se relaxe de manière non radiative sur le niveau excité L^* du centre luminescent L . Enfin, la recombinaison de la paire électron-trou va donner lieu à une émission caractéristique du centre L . Les propriétés optiques et la durée de l'émission sont dépendantes de chaque ensemble {matrice-dopants}.

Chapitre 2

Les sondes d'imagerie optique

Sommaire

2.1	Les milieux biologiques imposent des contraintes	22
2.2	Les sondes moléculaires	24
2.3	Les nanoparticules	33

Nous avons vu dans le premier chapitre de cette introduction qu'il existait un très grand nombre de mécanismes physiques associés à l'émission de lumière. Le domaine de l'imagerie optique exploite l'ensemble de ces phénomènes dans le but de visualiser et quantifier tout type de processus cellulaire ou moléculaire¹ en utilisant les photons comme principale source d'information. L'apparition de techniques photoniques innovantes a notamment permis de constituer une boîte à outils moléculaire et nanoparticulaire pour mieux comprendre l'évolution de certaines pathologies chez le petit animal (Fig. 2.1).

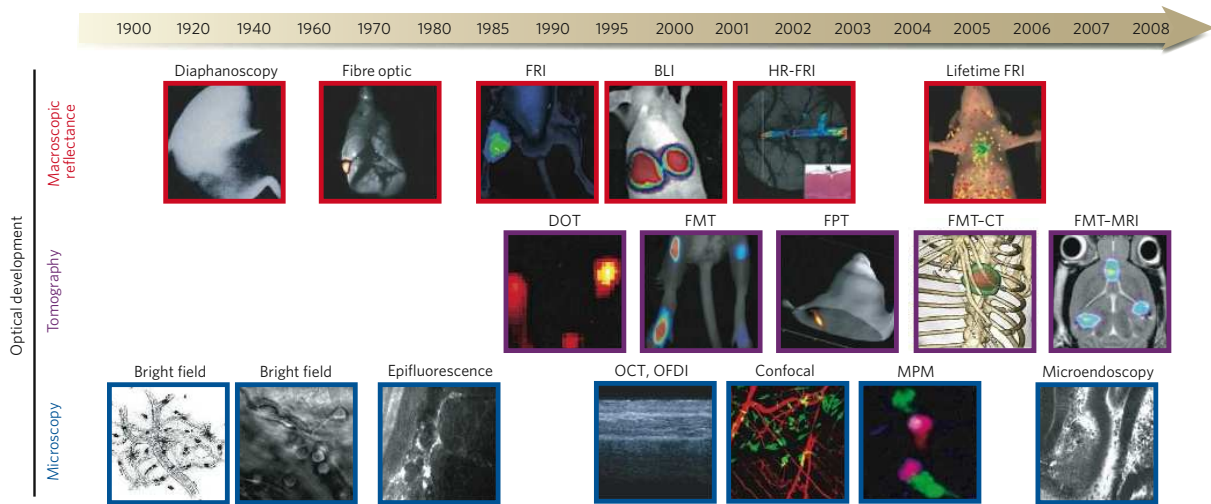


FIGURE 2.1 – Principales techniques d'imagerie optique utilisées en cancérologie¹

Ce chapitre a pour objet de présenter les grands acteurs du développement de l'imagerie optique et leurs applications biomédicales allant de la cellule à l'animal corps entier. Nous ne présenterons ici que les sondes et marqueurs d'imagerie optique. Les techniques d'imagerie ne reposant pas sur l'utilisation de sondes, comme la tomographie moléculaire de fluorescence (FMT pour *fluorescence-mediated tomography*) ou la tomographie de cohérence optique (OCT pour *optical coherence tomography*), ne seront pas abordées au cours de cette thèse. Avant de commencer la description des différents types de sondes, nous remarquerons que plusieurs contraintes critiques apparaissent du fait de l'utilisation de la lumière comme unique source d'information pour l'observation d'évènements biologiques *in vivo*. La conception de tout outil destiné à de telles applications présuppose une parfaite compréhension des difficultés associées à l'excitation et à la détection d'un signal lumineux à travers les tissus biologiques.

2.1 Les milieux biologiques imposent des contraintes

Trois contraintes fondamentales limitent considérablement le développement des sondes d'imagerie optique pour l'observation dans des milieux biologiques et l'espoir de voir un jour ces techniques percer en clinique pour des applications directes chez l'homme : l'autofluorescence, l'absorption et la diffusion des tissus. Cette section sera l'occasion de détailler chaque contrainte, ses conséquences sur l'observation/détection, mais aussi des manières de les éviter et minimiser.

2.1.1 Autofluorescence

L'autofluorescence est le phénomène par lequel les tissus biologiques absorbent la lumière pour émettre un signal de fluorescence. Cette émission provient de fluorophores endogènes et diminue considérablement la sensibilité de détection des sondes d'imagerie photonique, injectées à des fins de diagnostic et/ou de recherche. Le signal d'autofluorescence n'est pas le même sur tout le spectre visible/infrarouge. Il dépend sensiblement de la longueur d'onde d'excitation (Fig. 2.2) : les longueurs d'onde rouge et infrarouge produisent une autofluorescence bien plus faible que les courtes longueurs d'onde (bleu, vert)²⁴.



FIGURE 2.2 – Influence de la longueur d'onde d'excitation sur le signal d'autofluorescence²⁴. *De gauche à droite* : image de la souris en lumière blanche, immédiatement après sacrifice et exposition de ses viscères ; filtre d'excitation/émission bleu/vert (460-500 nm/505-560 nm) ; filtre d'excitation/émission vert/rouge (525-555 nm/590-650 nm) ; filtre infrarouge (725-775 nm/790-830 nm).

Certaines substances de l'organisme sont connues pour leur forte participation au signal d'autofluorescence. C'est le cas des flavines, de l'élastine, du collagène, de la protoporphyrine IX ou encore de la chlorophylle. Les spectres d'excitation/émission de la chlorophylle et de la riboflavine sont présentés en figure 2.3. Si l'on prend l'exemple de la cellule, la grande majorité du signal d'autofluorescence provient de la mitochondrie et des lysosomes. Il est alors possible d'utiliser ce signal, souvent qualifié de parasite, pour obtenir une double information morphologique et physiologique sur l'état des cellules²⁵.

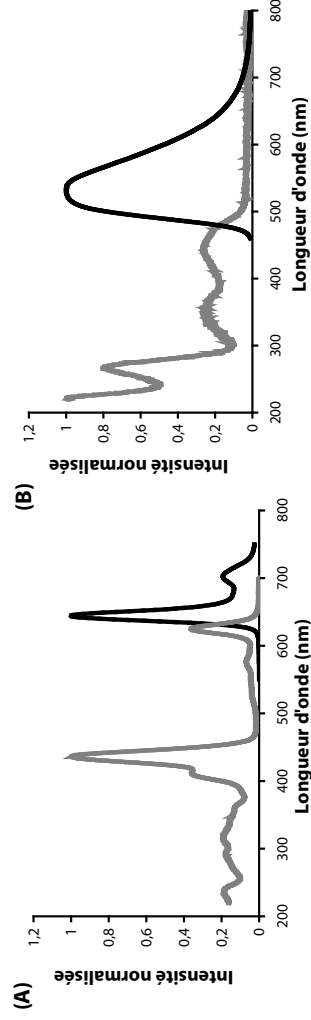


FIGURE 2.3 – Spectres d'excitation (gris)/émission (noir) de la chlorophylle b (A) et de la riboflavine (B)

Il est important de noter que les entreprises impliquées dans l'élaboration des systèmes de détection

24. Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7(5) :626-34

25. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev.* 2005 ;11 :227-56

optique se tournent de plus en plus vers l'utilisation d'algorithmes mathématiques permettant un traitement du signal par analyse spectrale. Il leur est ainsi possible de réaliser une analyse fréquentielle des signaux de fluorescence de manière à soustraire le signal global des fluorophores endogènes et faire ressortir le signal du fluorophore d'intérêt²⁶. Cette manipulation logicielle, de plus en plus répandue dans les systèmes "clé en mains" proposés par les industriels, repose sur de nombreuses hypothèses physiques concernant l'absorption et la diffusion d'ondes électromagnétiques dans les tissus biologiques. Lorsque ces hypothèses sont grossières ou imprécises, il apparaît sur les images des artefacts difficiles à exploiter d'un point de vue biologique.

2.1.2 Absorption

L'autofluorescence n'est pas le seul phénomène susceptible de gêner la détection d'une sonde d'imagerie optique. Au cours de l'excitation, comme au cours de l'émission, les photons doivent traverser une certaine épaisseur de tissus avant d'arriver sur la sonde ou au détecteur. Cette épaisseur mais aussi le type d'environnement à traverser varient sensiblement selon la localisation de la sonde dans l'organisme (sous cutané, cerveau, sang...) et déterminent la force de l'absorption.

Si nous laissons de côté les phénomènes de diffusion pour le moment (réflexion, réfraction, diffraction), la loi de Beer-Lambert pour un rayonnement d'intensité I_λ qui traverse normalement une couche de matière i et d'épaisseur z nous donne :

$$-\frac{dI_\lambda(z)}{dz} = \alpha_\lambda^i I_\lambda \Rightarrow -\frac{dI_\lambda(z)}{I_\lambda} = \alpha_\lambda^i dz \Rightarrow \ln\left(\frac{I_\lambda(z)}{I_\lambda(z_0)}\right) = -\alpha_\lambda^i z \quad (2.1)$$

Chaque tissu est caractérisé par un coefficient d'absorption α_λ^i dont la valeur dépend de la longueur d'onde du faisceau absorbé et du type de tissu (organe, état physiologique du tissu...). L'exemple le plus simple constitue l'absorption comparée de l'hémoglobine des globules rouges, de l'eau et des graisses de l'organisme (Fig. 2.4).

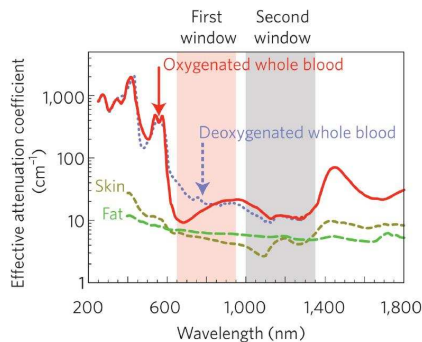


FIGURE 2.4 – Le phénomène d'absorption. *A gauche*, coefficient d'absorption d'un tissu biologique²⁷. *A droite*, expérience mettant en évidence la zone de faible absorption des tissus : seules les longueurs d'onde rouges/infrarouges traversent la main placée devant une source de lumière blanche.

Il ressort de ces données comparatives sur l'absorption des tissus la nécessité de travailler dans deux zones de longueurs d'onde appelées fenêtres optiques^{27, 28}, grossièrement définies entre 650 et 950 nm pour la première et entre 1000 et 1350 nm pour la seconde. Ces fenêtres assurent une meilleure transparence des tissus ainsi qu'une pénétration plus profonde de la lumière d'excitation et de la lumière d'émission de la sonde.

26. Mansfield JR, Gossage KW, Hoyt CC, Levenson RM. Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt.* 2005;10(4) :41207

27. Smith AM, Mancini MC and Nie S. Second window for in vivo imaging. *Nat Nanotechnol.* 2009;4(11) :710-711

28. Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L, Butler J. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia.* 2000;2(1-2) :26-40

2.1.3 Diffusion

On parle couramment de diffusion pour décrire le phénomène optique par lequel une onde électromagnétique voit sa direction de propagation changer de manière aléatoire du fait d'interactions physiques avec le milieu de propagation. La diffusion rassemble en réalité plusieurs processus d'interaction lumière-matière parmi lesquels on compte la réflexion, la réfraction et la diffraction.

Le cas des milieux biologiques présente un intérêt particulier pour les physiciens spécialisés dans l'étude du transport de photons dans la matière. Contrairement aux cas de la diffusion dans un milieu homogène infini, la diversité des organes et tissus biologiques nécessite d'introduire la notion de milieu multicouche. Ce changement d'hypothèse suppose une implémentation des modèles habituels dans le but de décrire au mieux le transport des photons dans un milieu diffusant. Sur cet aspect de modélisation, nous citerons les travaux de Wang et Jacques sur l'application de la méthode Monte-Carlo à la diffusion de photons dans un milieu diffusant multicouche^{29, 30}. Pour chaque étape de la diffusion du photon, Wang et Jacques utilisent la fonction de phase de Heneye-Greenstein³¹ qui permet de relier le coefficient d'anisotropie du milieu intermédiaire, noté g , à l'angle entre le photon incident et le photon diffusé, noté θ et défini par :

$$\cos \theta = \frac{1}{2g} \left[1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\xi} \right)^2 \right] \text{ si } g \neq 0 ; \cos \theta = 1 - 2\xi \text{ si } g = 0 \quad (2.2)$$

Notons que la méthode de Monte-Carlo est un processus statistique qui se base sur l'utilisation de nombres aléatoires. Dans l'équation ci-dessus, ξ représente la variable pseudo-aléatoire. De proche en proche, et couche après couche, cette méthode permet donc de reconstruire le parcours chronologique du photon à travers un tissu organisé en multicouche (Fig. 2.5).

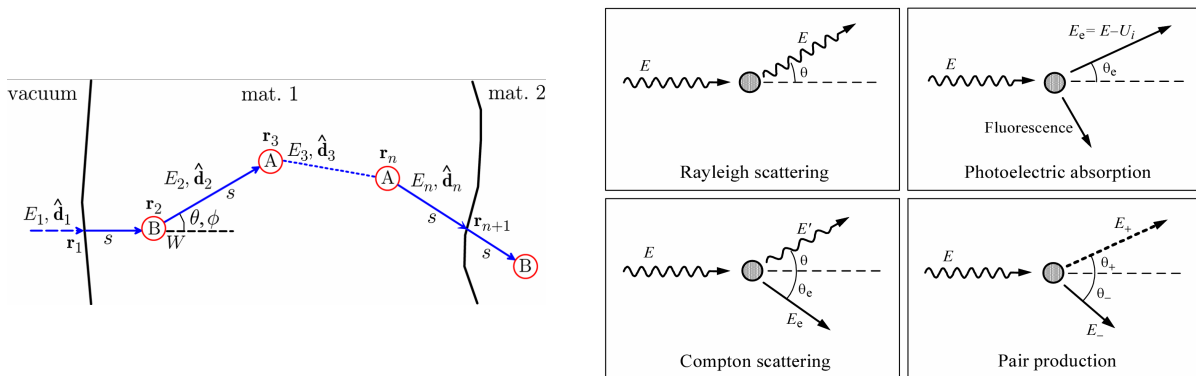


FIGURE 2.5 – Modèle de diffusion de photons dans les tissus. *A gauche*, schéma de propagation d'un photon dans un matériau multicouche : chronologie des évènements pour une simulation par la méthode Monte-Carlo. *A droite*, liste non exhaustive de diffusions possibles au cours de l'interaction lumière-matière.

L'application de ce modèle à la propagation d'un paquet de photons de longueur d'onde donnée conduit rapidement à l'observation d'une tache diffuse de propagation. Cette expérience prévoit de manière évidente la difficulté de toute localisation précise d'un objet lumineux au sein de tissus biologiques. Elle rappelle en cela le point faible de nombreuses techniques d'imagerie optique : la résolution spatiale³².

2.2 Les sondes moléculaires

Nous entendons par sonde d'imagerie optique moléculaire toute substance de diamètre inférieur au nanomètre utilisée dans le but de sonder le vivant par l'utilisation de photons comme principale source

29. Wang L, Jacques SL, Zheng L. MCML—Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Comput Methods Programs Biomed.* 1995;47(2) :131-46

30. Wang L, Jacques SL, Zheng L. CONV—convolution for responses to a finite diameter photon beam incident on multi-layered tissues. *Comput Methods Programs Biomed.* 1997;54(3) :141-50

31. Henyey L and Greenstein J. Diffuse radiation in the galaxy. *Astrophys. Journal*, 1941;93 :70-83

32. Vitkin E, Turzhitsky V, Qiu L, Guo L, Itzkan I, Hanlon EB, Perelman LT. Photon diffusion near the point-of-entry in anisotropically scattering turbid media. *Nat Commun.* 2011;2 :587

d'information. Le cas des protéines fluorescentes, dont le diamètre peut dépasser le nanomètre, sera également abordé dans cette section. Comme nous le verrons plus en détail par la suite, le centre actif responsable de l'émission de lumière au sein de ce type de protéines est seulement constitué de quelques acides aminés, ce qui justifie son appartenance à cette section.

2.2.1 Fluorophores organiques

L'histoire de l'imagerie optique clinique commence avec les sondes organiques fluorescentes. En 1966, trois fluorophores sont approuvés aux Etats-Unis par la FDA, *Food and Drug Administration*, pour une utilisation en clinique : la fluorescéine, le vert d'indocyanine et la rhodamine B³³. Des utilisations médicales de la fluorescéine sont autorisées chez l'homme depuis plus de trente ans, notamment en ophtalmologie. Le vert d'indocyanine est utilisé comme marqueur de la fonction hépatique depuis plus de cinquante ans.

Présentation générale et contraintes Plusieurs fluorophores sont maintenant commercialisés et utilisés en routine dans les laboratoires de recherche pour des applications en biologie cellulaire et moléculaire, aussi en génomique. Il existe de nombreuses familles de molécules permettant d'obtenir des chromophores couvrant une large gamme de longueurs d'onde, allant du spectre visible à l'infrarouge. Parmi ces grands groupes de molécules fluorescentes, nous pouvons citer les dérivés du xanthène, les BODIPYs, les cyanines, ou encore les squaraines qui sont des dérivés du squarate³⁴ (Fig. 2.6).

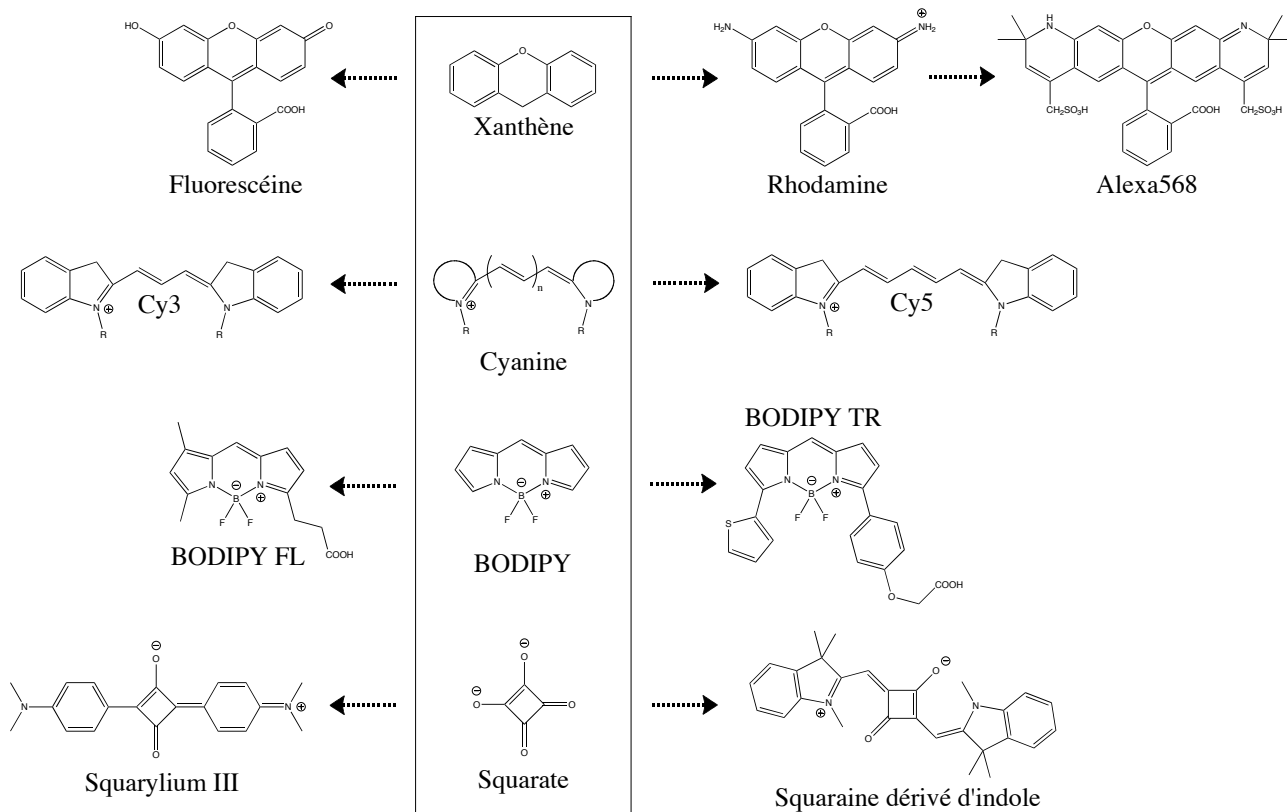


FIGURE 2.6 – Quelques grandes familles de molécules fluorescentes

Actuellement, les deux familles les plus utilisées pour l'imagerie optique sont très certainement les chromophores à base de xanthène et les dérivés de cyanines. Ces sondes moléculaires se distinguent les unes des autres par leurs signature optique, leur stabilité optique/chimique, ou encore leur susceptibilité à l'environnement. La structure chimique a tout d'abord une influence sur les longueurs d'onde d'absorption et d'émission de la molécule. Ainsi, la structure des cyanines 3 et 5 ne diffère que de deux carbones mais ces deux molécules possèdent, nous le verrons un peu plus tard, des propriétés optiques bien différentes.

33. Blumenthal D. FDA Consumer ; U.S. Government Printing Office : Washington, DC, 1990

34. Pansare VJ, Hejazi S, Faenza WJ and Prud'homme RK. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials : Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers. Chem. Mater. 2012 ;24 :812-827

Il peut s'agir des longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes, mais également de rendements quantiques η différents. Cette "efficacité lumineuse" est définie comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés :

$$\eta = \frac{I_e}{I_a} \quad (2.3)$$

Ces propriétés optiques de chromophores dépendent de nombreux paramètres et varient avec l'environnement et le milieu biologique de la sonde : le pH, la quantité d'oxygène, la concentration en agent fluorescent... Cette sensibilité des molécules fluorescentes vis-à-vis de l'environnement chimique nous permet de mettre en lumière deux contraintes majeures associées à ces sondes :

1. Le photoblanchiment : un fluorophore excité en continu émet un signal de fluorescence auquel est associé une certaine durée de vie, nombre de cycles excitation/émission, qui varie avec la structure de la molécule et son environnement. Il résulte de cette caractéristique une perte progressive du signal de fluorescence qui limite de manière considérable les temps d'observation. Pour répondre à une demande croissante de sondes à fluorescence stable, la société *Molecular Probes* a développé une série de molécules dotées d'une plus grande photostabilité mais également moins sensibles aux variations de pH : la famille des Alexa Fluor (Fig. 2.7).

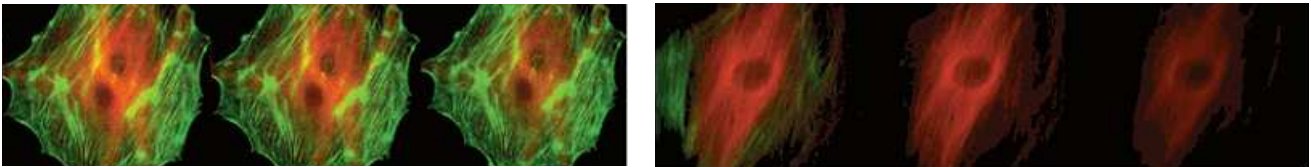


FIGURE 2.7 – Comparaison du photoblanchiment du couple Alexa488/Alexa546, à gauche, et du couple Fluorescéine/Cy3, à droite, pendant l'observation de cellules endothéliales d'artères pulmonaires. Les images sont enregistrées après 30, 90, et 210 secondes d'exposition.

2. Le *quenching* : comme nous l'avons expliqué dans le premier chapitre de cette introduction, le *quenching* correspond à une relaxation non radiative du fluorophore. Lorsque le nombre d'évènements non radiatifs augmente par rapport à la relaxation radiative classique, l'intensité du signal de fluorescence diminue. De nombreux cas de *quenching* sont décrits dans la littérature. Nous ne parlerons ici que du phénomène de *self quenching* statique par lequel deux molécules de fluorophore s'associent et forment un complexe responsable de l'inhibition de l'état excité et de la perte du signal de fluorescence. Il a notamment été rapporté que les dérivés de xanthène pouvaient former des homodimères à forte concentration^{35, 36}. Ces dimères induisent alors des changements dans le spectre d'absorption du mélange et une extinction complète du signal de fluorescence.

Les applications Malgré ces quelques désavantages, l'imagerie de fluorescence est reconnue à l'échelle mondiale pour sa sensibilité de détection - comparée dans certains cas à celle de l'imagerie isotopique - et sa versatilité³⁷. Ses applications sont nombreuses et couvrent des utilisations *in vitro* de surface, comme l'immunomarquage ou la visualisation de processus dynamique à l'échelle moléculaire³⁸, ainsi que des études *in vivo*. Ce dernier cas de figure est réservé aux sondes fluorescentes dont le couple $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ se situe dans la fenêtre de transparence des tissus biologiques.

Ces dernières années ont vu se développer de nouvelles molécules fluorescentes, moins sensibles au problème de photoblanchiment, émettant à des longueurs d'onde couvrant l'ensemble du spectre visible et infrarouge (Fig. 2.8). L'avènement de ces nouvelles générations de chromophores a permis de faire émerger une grande variété d'applications autrefois laissées de côté du fait de la faible efficacité des sondes

35. Lopez Arbeloa I, Ruiz Ojeda P. Dimeric States of Rhodamine B. Chem. Phys. Lett. 1982;87 :556-560

36. Kemnitz K and Yoshihara K. Entropy-driven dimerization of xanthene dyes in nonpolar solution and temperature-dependent fluorescence decay of dimers. J. Phys. Chem. 1991; 95 :6095-6104

37. Schaeffter, T. Imaging modalities : principles and information content. Prog. Drug Res. 2005, 62, 15

38. Zhang Z, Rajagopalan PT, Selzer T, Benkovic SJ, Hammes GG. Single-molecule and transient kinetics investigation of the interaction of dihydrofolate reductase with NADPH and dihydrofolate. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(9) :2764-9

organiques. C'est notamment le cas des cyanines, sur lesquelles les chimistes organiciens ont beaucoup travaillé à l'amélioration des propriétés optiques et de la photostabilité, dont les vertus optiques sont de plus en plus appliquées à l'imagerie du petit animal *in vivo*³⁹.

Fluorophores	λ_{ex}	λ_{em}
Allophycocyanin (APC)	650	660
Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)	490	520
Rhodamine B-Isothiocyanate (RITC)	570	595
Texas Red	596	620
Cy 3	552	565
Cy 5	650	667
Cy5.5	675	694
Cy7	743	767
AlexaFluor 488	495	519
AlexaFluor 546	556	573
AlexaFluor 647	650	668
AlexaFluor 750	749	775

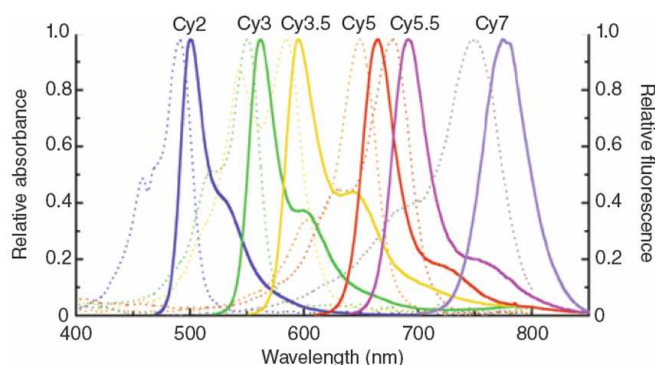


FIGURE 2.8 – Propriétés optiques de quelques molécules fluorescentes

De nombreux exemples rapportent notamment l'utilisation de cyanines pour le ciblage de modèles murins de cancer^{40, 41} (Fig. 2.9), l'observation de zones d'hypoxie⁴², ou encore l'imagerie d'articulations inflammées dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde⁴³.

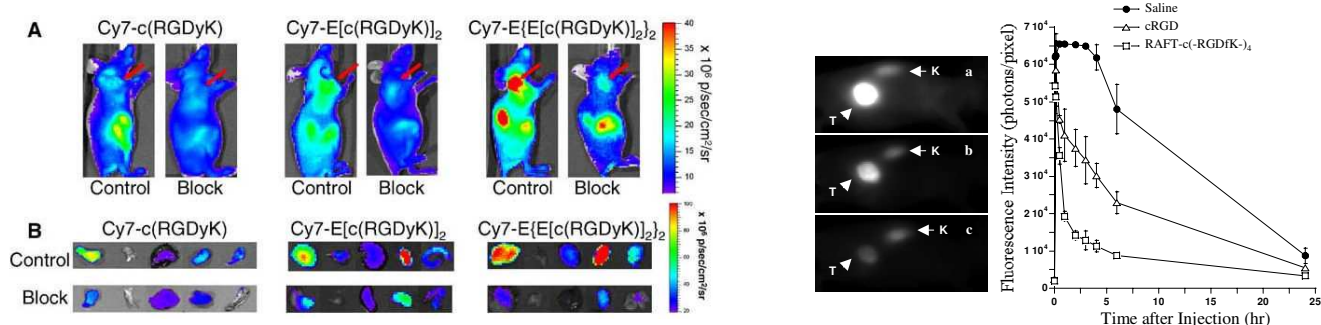


FIGURE 2.9 – Utilisations de cyanines pour l'observation de tumeurs solides *in vivo*. *A gauche*, imagerie de fluorescence d'une souris portant une tumeur U87MG injectée avec plusieurs assemblages ciblant Cy7-RGD⁴⁰ (la flèche rouge sur les images indique la tumeur). *A droite*, visualisation d'un ciblage spécifique de tumeur HEK293 au moyen d'une construction Cy5-RAFT-c(-RGDFK)-4⁴¹.

La qualité des images obtenues par ces techniques de fluorescence a poussé une équipe de Grenoble, en collaboration avec le CEA-LETI, à commercialiser un système double comprenant un système d'illumination/détection (Fluobeam) ainsi que les sondes d'imagerie adaptées au ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ (AngioStamp). La société *fluoptics* propose ainsi une solution portable d'aide chirurgicale pour la résection de tumeurs dont les premiers essais en peropératoire sur des modèles murins ont déjà démontré leur efficacité⁴⁴.

39. Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials*. 2011;32(29):7127-38

40. Wu Y, Cai W, Chen X. Near-infrared fluorescence imaging of tumor integrin alpha v beta 3 expression with Cy7-labeled RGD multimers. *Mol Imaging Biol*. 2006;8(4):226-36

41. Jin ZH, Jossierand V, Foillard S, Boturny D, Dumy P, Favrot MC, Coll JL. In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer*. 2007;6:41

42. Okuda K, Okabe Y, Kadonosono T, Ueno T, Youssif BG, Kizaka-Kondoh S, Nagasawa H. 2-Nitroimidazole-tricarboxyanine conjugate as a near-infrared fluorescent probe for in vivo imaging of tumor hypoxia. *Bioconjug Chem*. 2012;23(3):324-9

43. Chen WT, Mahmood U, Weissleder R and Tung CH. Arthritis imaging using a near-infrared fluorescence folate-targeted probe. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(2):R310-R317

44. Mery E, Jouve E, Guillermet S, Bourgoignon M, Castells M, Golzio M, Rizo P, Delord JP, Querleu D, Couderc B. Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol Oncol*. 2011;122(1):155-62

2.2.2 Les rapporteurs photoluminescents

La première protéine fluorescente utilisée en biologie cellulaire fut la phycobiliprotéine, pigment hydro-soluble de la photosynthèse chez les cyanobactéries⁴⁵. Elle possédait l'avantage de présenter de multiples chromophores de biline par protéine, lui permettant ainsi d'émettre un signal de fluorescence de deux ordres de grandeur plus élevé que celui d'un chromophore classique. Les applications de cette protéine furent malheureusement limitées du fait de sa taille (200 kDa) et des problèmes de diffusion qui s'ensuivaient. Le principe qui vise à exploiter une protéine lumineuse endogène pour sonder les processus cellulaires et moléculaires va cependant rester dans les esprits. Les protéines fluorescentes et bioluminescentes sont aujourd'hui à l'origine d'une véritable révolution dans des domaines aussi variés que la biologie moléculaire, la biologie cellulaire, mais aussi la cancérologie et la génomique.

Protéines fluorescentes La protéine fluorescente la plus utilisée est la GFP, pour *green fluorescent protein*. Elle est décrite pour la première fois en 1962 par Shimomura⁴⁶ qui sera récompensé du prix Nobel de chimie en 2008. La GFP non modifiée est constituée de 238 acides aminés pour une masse totale d'environ 27 kDa. Son centre actif, à l'origine d'une fluorescence verte dont le maximum est situé à 504 nm, est constitué des chaînes latérales d'une glycine, d'une tyrosine et d'une sérine (Fig. 52).

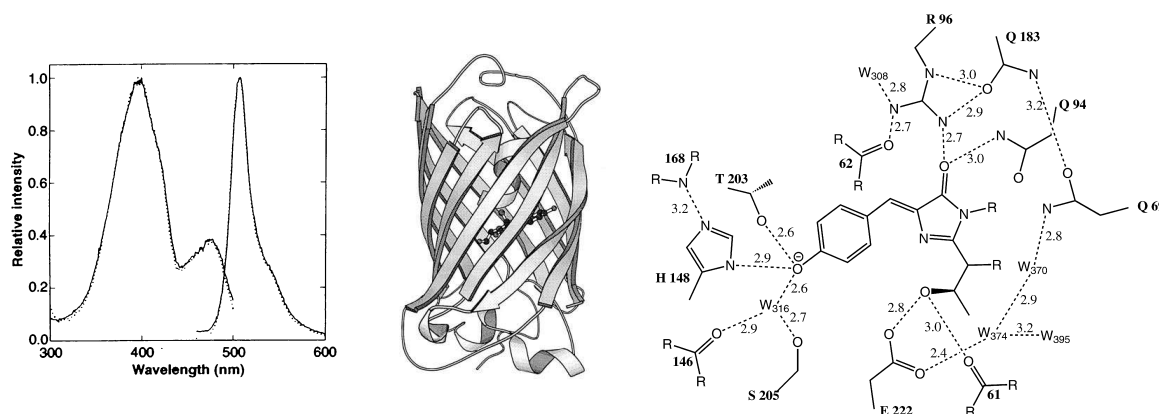


FIGURE 2.10 – *A gauche*, propriétés optiques de la GFP. *Au milieu*, structure de la GFP, *A droite*, structure de son centre actif luminescent.

Les travaux de Chalfie et Tsien, également lauréats du prix Nobel de chimie en 2008, ont ensuite prouvé qu'il était possible d'utiliser cette protéine fluorescente pour suivre l'expression d'un gène^{47, 48} et la localisation d'une protéine dans une cellule vivante.

De multiples applications ont suivi les premières preuves de concept introduites par les lauréats. Plusieurs équipes ont proposé l'utilisation de cellules cancéreuses exprimant la GFP pour mieux observer et comprendre le processus de dissémination métastatique *in vivo* sur des modèles murins⁴⁹. L'apparition de variants génétiques de la GFP⁵⁰ mais aussi la découverte de nouvelles protéines fluorescentes, avec des émissions situées dans la fenêtre de transparence des tissus⁵¹, ont permis d'améliorer la sensibilité de détection de protéines fluorescentes localisées en profondeur dans les tissus.

45. Glazer AN. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J Biol Chem.* 1989 ; 264(1) :1-4

46. Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y. Heimet. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J Cell Comp Physiol*, 1962 ;59 :223-239

47. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 1994 ;263(5148) :802-805

48. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 1998 ;67 :509-544

49. Hoffman RM. In vivo imaging of metastatic cancer with fluorescent proteins. *Cell Death and Differentiation.* 2002 ;9 :786-789

50. Heim R, Prasher DC and Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26) :12501-12504, 1994

51. Shu X, Royant A, Lin MZ, Aguilera TA, Lev-Ram V, Steinbach PA, Tsien RY. Mammalian Expression of Infrared Fluorescent Proteins Engineered from a Bacterial Phytochrome. *Science.* 2009 ;324(5928) : 804-807

Enfin nous rapporterons un dernier exemple d'utilisation de la GFP comme outil optique pour l'aide chirurgicale à la résection de tumeurs disséminées dans la cavité péritonéale (Fig. 2.11).

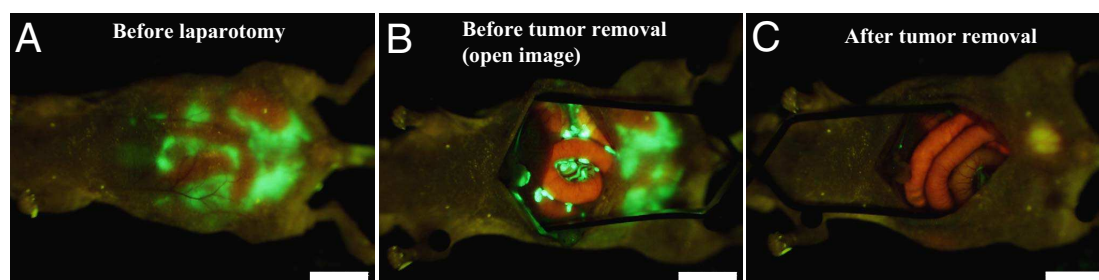


FIGURE 2.11 – Utilisation de la GFP comme outil optique pour l'aide chirurgicale à la résection de tumeurs⁵²

Dans cette étude, l'équipe de Kishimoto propose une méthode originale de réplication virale sélective au sein de cellules cancéreuses. Leur idée est d'utiliser un adénovirus télomérase-dépendant exprimant la GFP pour éclairer de manière sélective la tumeur et ses disséminations chez la souris *nude*⁵². Les résultats indiquent clairement la possibilité de marquer de manière sélective les nodules tumoraux disséminés dans la cavité péritonéale. La protéine fluorescente permet au chirurgien de retirer une majorité de tissus malades au cours de l'opération, limitant ainsi le risque de récurrence après traitement.

Nous avons vu que les protéines fluorescentes pouvaient servir de puissant outil pour le suivi de l'expression d'un gène ou le marquage sélectif de tumeurs *in vitro* et *in vivo*. Cette technique peut cependant présenter quelques problèmes de détection, notamment une sensibilité assez faible pour des observations *in vivo* dans les tissus profonds. Cette difficulté tient tout d'abord à la nécessité d'exciter la protéine fluorescente avec un rayonnement en majorité absorbé par les tissus biologiques, mais aussi et surtout au phénomène d'autofluorescence qui résulte de cette excitation. Le problème pourrait être contourné par le recours à une technique permettant de provoquer la luminescence sans excitation photonique : c'est le cas de la bioluminescence.

Protéines bioluminescentes Comme nous l'avons rapidement évoqué dans l'introduction sur la chimiluminescence, le phénomène de bioluminescence est le résultat d'une réaction enzymatique à la suite de laquelle se produit une émission de lumière. La protéine bioluminescente la plus connue et la plus utilisée est la luciférase de luciole, abrégée FLuc pour *firefly luciferase*. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la forme réduite de la luciférine en présence d'ATP-Mg²⁺ et d'oxygène pour générer du dioxyde de carbone, de l'AMP, du PP_i, de l'oxyluciférine (forme oxydée de la luciférine) et une émission de lumière jaune-verte centrée sur 562 nm (Fig. 2.12).

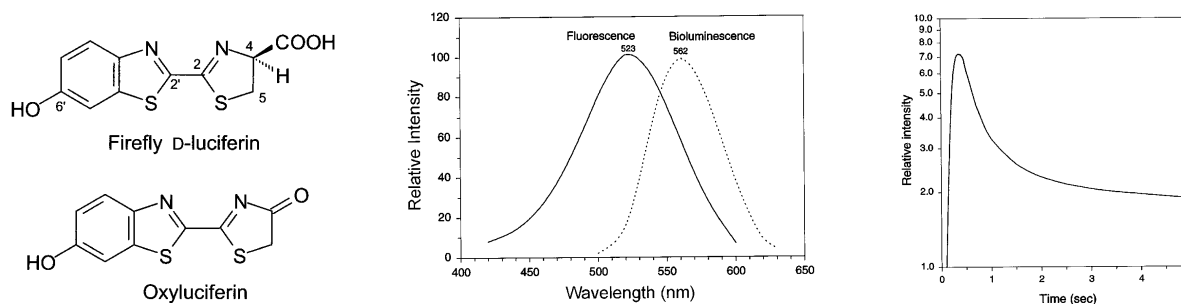


FIGURE 2.12 – *A gauche*, structure des deux formes de la luciférine. *Au milieu*, spectre d'émission de la bioluminescence de la luciférase. *A droite*, courbe de déclin du signal de bioluminescence.

52. Kishimoto H, Zhao M, Hayashi K, Urata Y, Tanaka N, Fujiwara T, Penman S, Hoffman RM. In vivo internal tumor illumination by telomerase-dependent adenoviral GFP for precise surgical navigation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(34) :14514-7

On compte de nombreuses utilisations de la luciférase en études pré-cliniques pour des applications diverses comme l'évaluation de l'efficacité du transfert de gènes par électrotransfert dans le muscle tibial cranial de souris⁵³, la mesure de signaux calciques *in vivo* chez la souris⁵⁴, ou encore la détection non invasive d'un petit nombre de cellules cancéreuses *in vivo*⁵⁵ (Fig. 2.13).

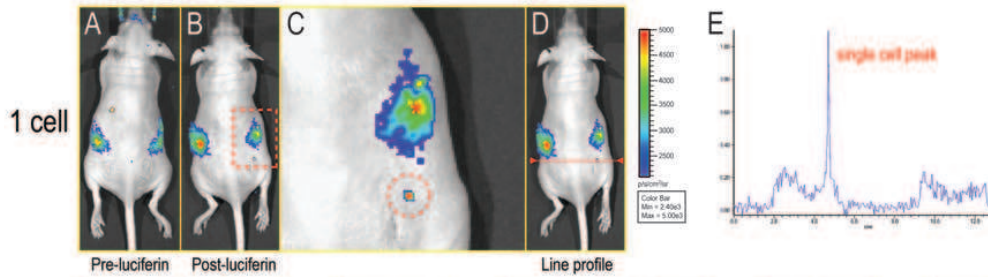


FIGURE 2.13 – Utilisation de la bioluminescence pour la détection de cellules uniques *in vivo*⁵⁵

Ce dernier exemple présente un cas particulièrement intéressant dans la mesure où les auteurs rapportent l'utilisation d'une luciférase améliorée par optimisation de codon, *luc2*, pour la détection d'une seule cellule cancéreuse *in vivo*. Le flux de photons annoncé par cellule cancéreuse transduite exprimant *luc2* est de l'ordre de 10 000 photons par seconde. Cette quantité de lumière leur permet de détecter l'apparition de micrométastases dans un modèle de tumeur orthotopique. Une trentaine de jours après l'injection de cellules cancéreuses-*luc2* dans les coussins adipeux mammaires, les micrométastases pulmonaires sont visibles en imagerie de bioluminescence (Fig. 2.14).

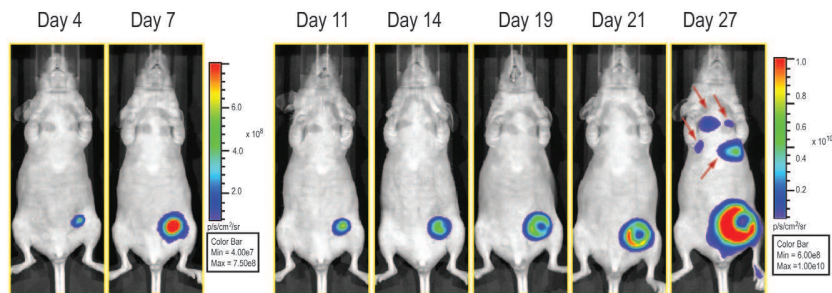


FIGURE 2.14 – Utilisation de la bioluminescence pour la détection de métastases *in vivo*⁵⁵

2.2.3 Complexes phosphorescents

En comparaison des autres phénomènes luminescents, la phosphorescence est très certainement la technique la moins représentée dans l'univers des sondes d'imagerie. Elle présente néanmoins l'avantage d'un temps de vie particulièrement long (ms) par rapport à la fluorescence (ns), ainsi qu'une large séparation spectrale entre l'absorption et le signal de phosphorescence. La plupart des applications rapportées exploitent les propriétés de complexes luminescents, formés par association d'un métal et d'un ligand, pour la détection de zones en hypoxie. Nous pouvons citer les travaux de Wilson et Vinogradov dont les techniques ont permis d'utiliser des complexes à base de palladium pour la détection de l'oxygène dans les tissus et l'imagerie du petit animal^{56, 57, 58}.

53. Bloquel C, Trollet C, Pradines E, Seguin J, Scherman D and Bureau MF. Optical imaging of luminescence for in vivo quantification of gene electrotransfer in mouse muscle and knee. BMC Biotechnology 2006; 6 :16

54. Rogers KL, Picaud S, Roncali E, Boisgard R, Colasante C, Stinnakre J, Tavitian B, Brûlet P. Non-invasive in vivo imaging of calcium signaling in mice. PLoS One. 2007;2(10) :e974.

55. Kim JB, Urban K, Cochran E, Lee S, Ang A, Rice B, Bata A, Campbell K, Coffee R, Gorodinsky A, Lu Z, Zhou H, Kishimoto TK, Lassota P. Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer cells in vivo. PLoS One. 2010;5(2) :e9364

56. Wilson DF, Vinogradov SA. Tissue oxygen measurements using phosphorescence quenching. In : Mycek M-A, Pogue BW, editors. Handbook of Biomedical Fluorescence. New York : Marcel Dekker, Inc. ; 2003. p. 637–62.

57. Vinogradov SA, Lo L-W, Jenkins WT, et al. Noninvasive imaging of the distribution in oxygen in tissue in vivo using near-infrared phosphors. Biophys J 1996;70 :1609–17

58. Dunphy I, Vinogradov SA, Wilson DF. Oxyphor R2 and G2 : phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence. Anal Biochem 2002;310 :191–8

Cette mesure de l'oxygénation des tissus par une telle méthode optique repose sur un *quenching* de phosphorescence par l'oxygène dissous en solution. Cette interaction entre le complexe phosphorescent et l'oxygène est décrite par l'équation de Stern-Volmer :

$$\frac{\Phi_p^0}{\Phi_p} = \frac{\tau_p^0}{\tau_p} = 1 + k_q \tau_p^0 pO_2 \quad (2.4)$$

Dans cette équation, Φ_p et τ_p sont respectivement le rendement quantique et la durée de vie de phosphorescence ; k_q est le taux de *quenching* bimoléculaire exprimé en $\text{mmHg}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cette technique a récemment été appliquée à l'utilisation d'un complexe phosphorescent à base d'iridium pour la détection de zones hypoxiques et l'imagerie de tumeurs *in vivo*⁵⁹.

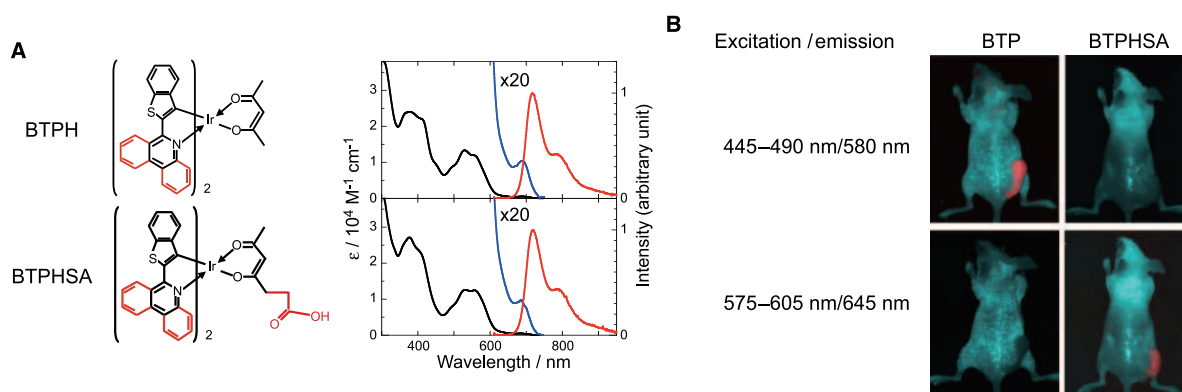


FIGURE 2.15 – Utilisation de complexes phosphorescents pour la détection de zones hypoxiques *in vivo*⁵⁹. A gauche, structure et propriétés optiques des complexes phosphorescents employés. A droite, observation des zones hypoxiques chez la souris par détection des complexes *in vivo*.

Dans cet article, l'équipe de Zhang et Takeuchi démontre *in vivo* l'efficacité de l'imagerie par "démixage spectral" couplée à une analyse des durées de vie de phosphorescence (Fig. 2.15). Cette association leur permet d'obtenir des images remarquables de tumeurs phosphorescentes chez le petit animal et de sonder dans le même temps la pression partielle d'oxygène au sein de l'environnement tumoral.

2.2.4 Chélates de lanthanides Ln³⁺

Les lanthanides trivalents, du fait de leur configuration électronique $[\text{Xe}]4f^{n-1}5s^25p^6$, présentent des propriétés optiques fascinantes. Ces configurations génèrent une grande variété de niveaux électroniques d'énergie bien définie - du fait de l'écrantage des orbitales 4f par les sous-couches remplies $5s^25p^6$ - et surtout peu sensibles à l'environnement chimique dans lequel est placé le lanthanide. Les transitions 4f-4f couvrent une large gamme spectrale du bleu à l'infrarouge et présentent des durées de vie particulièrement élevées, de l'ordre de la milliseconde, par rapport aux transitions impliquées dans le phénomène de fluorescence⁶⁰ (Fig. 2.16). Le principal désavantage de ces transitions f-f tient à leur faible force d'oscillateur - paramètre sans dimension associé à la probabilité de transition d'absorption par rapport à celle de transition d'émission - qui limite de manière significative le nombre de transitions d'absorption observées au sein des ions isolés. La réponse à ce problème fut apportée par Weissman en 1942 qui observa que l'excitation d'un complexe de lanthanide en passant par les états énergétiques du ligand conduisait à une luminescence centrée sur le lanthanide⁶¹. Ce transfert d'énergie du ligand vers l'état excité du lanthanide permet de fortement augmenter la luminescence des ions seuls et d'obtenir pour le complexe une signature caractéristique des lanthanides, remarquable par la finesse de ses bandes d'émission et l'intensité de son signal.

59. Zhang S, Hosaka M, Yoshihara T, Negishi K, Iida Y, Tobita S, Takeuchi T. Phosphorescent light-emitting iridium complexes serve as a hypoxia-sensing probe for tumor imaging in living animals. *Cancer Res.* 2010;70(11):4490-8

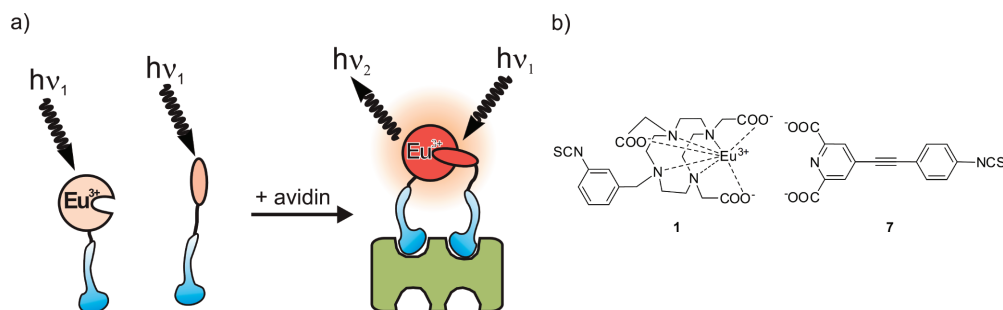
60. Bünzli JCG. Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chem. Rev.* 2010;110:2729-2755

61. Weissman SI. Intramolecular Energy Transfer The Fluorescence of Complexes of Europium. *J. Chem. Phys.* 1942;10:214

Ln	G	I	F	$\lambda/\mu\text{m or nm}^b$	gap/cm ^{-1b}	$\tau^{\text{rad}}/\text{ms}^b$
Ce	² F _{5/2}	5d	² F _{5/2}	tunable, 300–450		
Pr	³ H ₄	¹ D ₂	³ F ₄ , ¹ G ₄ , ³ H ₄ , ³ H ₅	1.0, 1.44, 600, 690	6940	(0.05 ^c –0.35)
		³ P ₀	³ H _J (J = 4–6)	490, 545, 615	3910	(0.003 ^c –0.02)
		³ P ₀	³ F _J (J = 2–4)	640, 700, 725		
Nd	⁴ I _{9/2}	⁴ F _{3/2}	⁴ I _J (J = 9/2–13/2)	900, 1.06, 1.35	5400	0.42 (0.2–0.5)
		⁴ G _{5/2}	⁶ H _J (J = 5/2–13/2)	560, 595, 640, 700, 775	7400	6.26
Sm	⁶ H _{5/2}	⁴ G _{5/2}	⁶ F _J (J = 1/2–9/2)	870, 887, 926, 1.01, 1.15		
		⁴ G _{5/2}	⁶ H _{13/2}	877		
Eu ^d	⁷ F ₀	⁵ D ₀	⁷ F _J (J = 0–6)	580, 590, 615, 650, 720, 750, 820	12300	9.7 (1–11)
		⁸ S _{7/2}	⁸ S _{7/2}	315	32100	10.9
Tb	⁷ F ₆	⁵ D ₄	⁷ F _J (J = 6–0)	490, 540, 580, 620	14800	9.0 (1–9)
				650, 660, 675		
Dy	⁶ H _{15/2}	⁴ F _{9/2}	⁶ H _J (J = 15/2–9/2)	475, 570, 660, 750	7850	1.85 (0.15–1.9)
		⁴ F _{15/2}	⁶ H _J (J = 15/2–9/2)	455, 540, 615, 695	1000	3.22 ^b
Ho	⁵ I ₈	⁵ S ₂	⁵ I _J (J = 8, 7)	545, 750	3000	0.37 (0.51 ^c)
		⁵ F ₅	⁵ I ₈	650	2200	0.8 ^c
		⁵ F ₅	⁵ I ₇	965		
Er ^e	⁴ I _{15/2}	⁴ S _{3/2}	⁴ I _J (J = 15/2, 13/2)	545, 850	3100	0.7 ^c
		⁴ F _{9/2}	⁴ I _{15/2}	660	2850	0.6 ^c
		⁴ I _{9/2}	⁴ I _{15/2}	810	2150	4.5 ^c
		⁴ I _{13/2}	⁴ I _{15/2}	1.54	6500	0.66 (0.7–12)
Tm	³ H ₆	¹ D ₂	³ F ₄ , ³ H ₄ , ³ F ₃ , ³ F ₂	450, 650, 740, 775	6650	0.09
		¹ G ₄	³ H ₆ , ³ F ₄ , ³ H ₅	470, 650, 770	6250	1.29
		³ H ₄	³ H ₆	800	4300	3.6 ^c
Yb	² F _{7/2}	² F _{5/2}	² F _{7/2}	980	10 250	2.0 (0.5–2.0) ^f

FIGURE 2.16 – Propriétés spectroscopiques des lanthanides Ln³⁺

La facilité d'accès à une grande variété de longueurs d'onde, par simple changement du lanthanide complexé, a permis de voir apparaître de nombreuses applications pour le marquage de cellules⁶², de brins d'ADN⁶³, ou encore l'évaluation d'activités enzymatiques⁶⁴. Bien que le premier marquage cellulaire par des lanthanides date de 1969⁶⁵, les techniques de détection basées sur l'utilisation de complexes moléculaires de lanthanide restent encore aujourd'hui destinées aux applications *in vitro*. En témoigne cette étude récente dans laquelle un complexe d'Eu³⁺ permet la détection d'avidine à faible concentration⁶⁶ (Fig. 2.17).

FIGURE 2.17 – Utilisation de complexes d'Eu³⁺ pour la détection de l'avidine⁶⁶

Une solution à envisager pour permettre le passage de ces marqueurs à des applications *in vivo* chez le petit animal serait d'augmenter le nombre de centres luminescents par sonde de manière à améliorer de manière significative la sensibilité de détection. Une telle transition a été rendue possible avec le développement des nanotechnologies.

62. Rajapakse HE, Reddy DR, Mohandessi S, Butlin NG, Miller LW. Luminescent terbium protein labels for time-resolved microscopy and screening. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(27) :4990-2

63. Ollikka P, Ylikoski A, Kaatrasalo A, Harvala H, Hakala H, Hovinen J. Minisequencing with acyclonucleoside triphosphates tethered to lanthanide(III) chelates. *Bioconjug Chem.* 2008;19(6) :1269-73

64. Mizukami S, Tonai K, Kaneko M, Kikuchi K. Lanthanide-based protease activity sensors for time-resolved fluorescence measurements. *J Am Chem Soc.* 2008;130(44) :14376-7

65. Scaff WL Jr, Dyer DL, Mori K. Fluorescent europium chelate sta. *J Bacteriol.* 1969;98(1) :246-8

66. Karhunen U, Rosenberg J, Lamminmäki U, Soukka T. Homogeneous detection of avidin based on switchable lanthanide luminescence. *Anal Chem.* 2011;83(23) :9011-6

2.3 Les nanoparticules

Le développement des sondes d'imagerie photonique repose habituellement sur plusieurs piliers optiques indispensables à leur transposition aux observations du vivant :

1. Sensibilité élevée de la technique pour permettre la détection de faibles quantités et/ou à travers les tissus de l'animal.
2. Emission dans la fenêtre de faible absorption des tissus, souvent entre 700 et 900 nm.
3. Stabilité de la sonde : chimique et photonique.

Par ailleurs, nous avons vu dans la section précédente que les sondes moléculaires présentent des contraintes qui limitent leur extension à certaines applications biologiques. Parmi ces contraintes, nous pouvons citer le fait qu'elles soient souvent peu hydrophiles et très sensibles à leur environnement chimique. D'un point de vue optique, il n'est pas non plus rare de les associer à de faibles rendements quantiques ainsi qu'une médiocre photostabilité.

Ces dernières années, le développement des nanoparticules a permis d'apporter un certain nombre de solutions à ces différents écueils en proposant un choix varié de sondes d'imagerie destinées à des applications biomédicales : boîtes quantiques, nanoparticules à upconversion... On emploie usuellement le terme de nanoparticule pour décrire un système dont les dimensions sont comprises entre un et plusieurs centaines de nanomètres. Dans la pratique, l'intervalle se restreint souvent à des particules dont le diamètre se situe sous la centaine de nanomètres. Cette section a pour objet la description des principales sondes photoniques nanoparticulaires utilisées dans le domaine de l'imagerie optique *in vitro* et *in vivo*.

2.3.1 Des fluorophores dans une nanoparticule

Le principe Partant des sondes moléculaires les plus utilisées, la solution la plus évidente pour augmenter de manière significative la sensibilité de détection consiste à exploiter le volume accessible dans une nanoparticule pour y emprisonner plusieurs fluorophores identiques. La plupart du temps, des chromophores émettant dans l'infrarouge sont encapsulés dans un objet nanométrique, de manière covalente ou non, pour former une plateforme fonctionnelle avec une structure cœur-coquille⁶⁷ (Fig. 2.18).

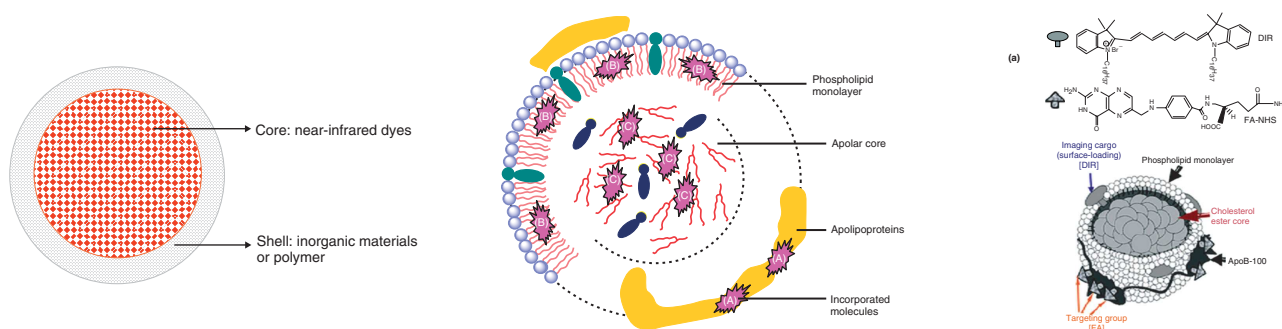


FIGURE 2.18 – Exemples de nanostructures pour l'emprisonnement de fluorophores dans une nanoparticule⁶⁷. *A gauche*, schéma d'une architecture type cœur-coquille. *Au milieu*, représentation schématique des voies d'encapsulation de fluorophores par des lipoprotéines. *A droite*, un exemple de nanoparticules conçues à partir de lipoprotéines de faible densité.

Ces nouvelles architectures sont particulièrement attractives en comparaison des sondes moléculaires. La présence d'une coquille améliore sensiblement la photostabilité des molécules fluorescentes emprisonnées en les protégeant de l'environnement extérieur, mais aussi de nombreux facteurs chimiques susceptibles d'altérer leur structure. L'enrobage dans une coque biocompatible permet également à ces molécules souvent peu hydrophiles d'être vectorisées dans les milieux physiologiques aqueux. Enfin, outre le gain évident obtenu par ces systèmes cœur-coquille vis-à-vis du signal de fluorescence, la présence de la

67. Xiaoxiao He, Kemin Wang and Zhen Cheng. In vivo near-infrared fluorescence imaging of cancer with nanoparticle-based probes. John Wiley & Sons, Inc. WIREs Nanomed Nanobiotechnol 2010 2 349-366

coquille rend accessible le greffage de ligands d'intérêt biologique et tout autre type de fonctionnalisation de surface pour le ciblage ou l'ajout de nouvelle modalité/fonctionnalité.

Il existe de nombreuses matrices servant d'amorce à l'organisation de ces nanoparticules fluorescentes. Nous ne présenterons dans cette section que trois des structures-bases les plus courantes : la silice, le phosphate de calcium, et les lipoprotéines.

Nanoparticules de silice fluorescentes Parmi les nombreux exemples de matrices inorganiques rapportées dans la littérature, la silice amorphe présente l'avantage d'être biocompatible et non toxique. Ces deux caractéristiques en font un candidat de choix pour le développement de nouvelles biotechnologies. Cette matrice de silice présente le second avantage de rendre toute fonctionnalisation de surface accessible par une chimie des silanes. De nombreux dérivés de silanes commerciaux et plutôt bon marché permettent l'introduction de divers groupements fonctionnels tels que des amines primaires, des thiols, des acides carboxyliques, via une chimie de surface relativement simple. Ces intermédiaires réactionnels sont alors essentiels à la fixation ultérieure de biomolécules pour le ciblage de certaines pathologies : cancer, arthrite, thrombose...

L'exemple ci dessous rapporte l'utilisation de nanoparticules de silice dopées avec le vert d'indocyanine pour l'imagerie optique *in vivo* chez le rat⁶⁸ (Fig. 2.19).

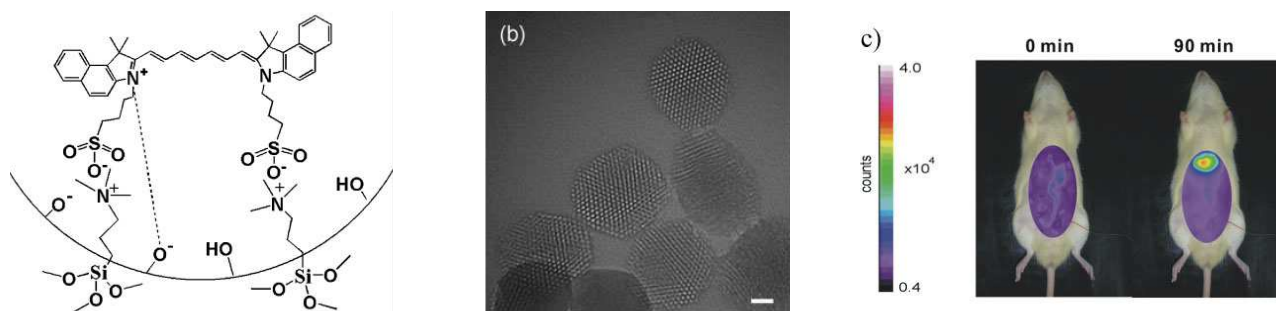


FIGURE 2.19 – Nanoparticules de silice mésoporeuse dopées avec du vert d'indocyanine pour des applications en imagerie optique *in vivo*. *A gauche*, schéma de l'arrangement du fluorophore dans la matrice de silice. *Au milieu*, cliché de microscopie électronique à transmission des nanoparticules de silice mésoporeuse. *A droite*, biodistribution des nanoparticules chez le rat, obtenue par détection de la fluorescence du vert d'indocyanine.

Nanoparticules fluorescentes de phosphate de calcium Du fait de sa présence abondante dans notre organisme, notamment dans la composition des os et des dents, le phosphate de calcium est reconnu et approuvé depuis longtemps comme matériau de choix pour des applications biomédicales. Les nanoparticules à base de phosphate de calcium sont de plus en plus utilisées en bioimagerie et thérapeutique. De récentes études rapportent notamment l'emploi de nanoparticules de phosphosilicate de calcium, d'hydroxyapatite, ou encore de composés hybrides de phosphate de calcium, associés à des lipides et des polymères, pour l'emprisonnement de molécules fluorescentes ou de lanthanides à des fins de diagnostic chez le petit animal (Fig. 2.20).

Kester et Adair ont ainsi rapporté l'encapsulation de fluorophores au sein de nanoparticules à base de phosphate⁶⁹ et phosphosilicate de calcium⁷⁰ pour l'imagerie optique du petit animal.

68. 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. *Adv Funct Mater.* 2009;19 :215-222.

69. Altinoglu EI, Russin TJ, Kaiser JM, Barth BM, Eklund PC, Kester M, Adair JH. Near-infrared emitting fluorophore-doped calcium phosphate nanoparticles for *in vivo* imaging of human breast cancer. *ACS Nano.* 2008;2(10) :2075-84

70. Barth BM, Sharma R, Altinoglu EI, Morgan TT, Shanmugavelandy SS, Kaiser JM, McGovern C, Matters GL, Smith JP, Kester M, Adair JH. Bioconjugation of calcium phosphosilicate composite nanoparticles for selective targeting of human breast and pancreatic cancers *in vivo*. *ACS Nano.* 2010;4(3) :1279-87

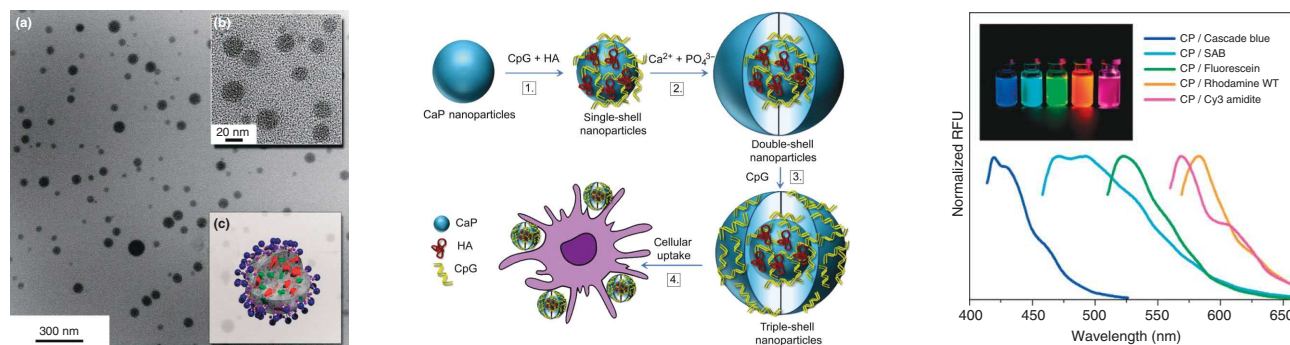


FIGURE 2.20 – Structure et propriétés de nanoparticules fluorescentes à base de phosphate de calcium⁷¹

Plusieurs de leurs travaux mettent en évidence la possibilité d'utiliser ces nanoplateformes biocompatibles à base de phosphate de calcium pour le ciblage et l'imagerie de certains modèles tumoraux chez la souris⁷¹. L'étude présentée ci-dessous introduit les nanoparticules de phosphate de calcium dopées au vert d'indocyanine pour la localisation de tumeurs solides du sein chez la souris *nude* (Fig. 2.21). On remarque sur les images l'apparition d'un net contraste au niveau de l'environnement tumoral, 96 heures après l'injection des nanoparticules.

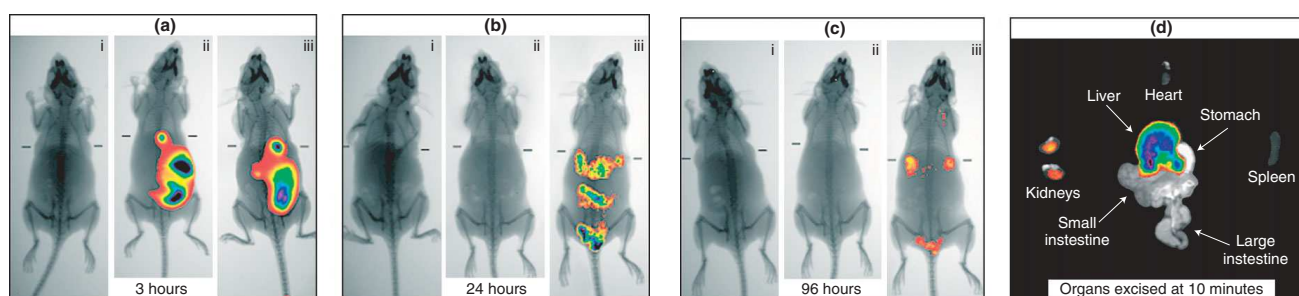


FIGURE 2.21 – Biodistribution *in vivo* puis *ex vivo* de nanoparticules fluorescentes de phosphate de calcium⁶⁹

Les lipoprotéines Le cas de cette classe de nanoparticules est un peu particulier et constitue une exception du fait de sa présence naturelle chez les métazoaires. Ces nanoparticules endogènes sont utilisées par notre organisme pour le transport des molécules hydrophobes (cholestérol, triglycérides) vers les cellules. La composition de ces assemblages est présentée en figure 2.22⁷².

	diameter (nm)	protein components	surface component (mol %)			core lipids (mol %)	
			protein	phospholipid	cholesterol	cholesterol ester	triglycerides
chylomicron	75–1200	ApoB-48	2	63	35	5	95
VLDL	30–80	ApoB-100	2	55	43	24	76
LDL	18–25	ApoB-100	2	58	42	19	81
HDL	5–12	ApoA-I, A-II, E, C	2	72	23	82	18

FIGURE 2.22 – Composition et caractéristiques de quelques classes de lipoprotéines

La nature amphiphile des phospholipides permet de maintenir l'émulsion de lipides dans la phase aqueuse, alors que les protéines stabilisent et soutiennent l'ensemble de la structure formée. De telles caractéristiques physico-chimiques suggèrent ces lipoprotéines comme candidats idéaux pour des applications en imagerie biomédicale *in vivo*. Tout d'abord, leur fonction naturelle dans l'organisme nous

71. Tabaković A, Kester M, Adair JH. Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2012;4(1):96-112

72. Ng KK, Lovell JF, Zheng G. Lipoprotein-inspired nanoparticles for cancer theranostics. Acc Chem Res. 2011;44(10):1105-13

permet d'assurer que ces structures peuvent circuler librement dans la circulation générale⁷³. Ensuite, le cœur hydrophobe permet d'encapsuler les molécules peu solubles en milieu aqueux, comme la plupart des sondes fluorescentes organiques ou des molécules actives utilisées en chimiothérapie. Enfin, dans le cas des lipoprotéines de haute et faible densité (HDL/LDL), les architectures obtenues par ces assemblages lipides-protéines ont des tailles inférieures à la cinquantaine de nanomètres, reconnues comme de bons compromis capacité de chargement/volume pour ce genre d'applications biologiques⁷².

La plupart des applications *in vivo* décrites avec les lipoprotéines se tournent vers le diagnostic de tumeurs solides⁷⁴. L'équipe de Chen, Corbin et Zheng rapporte l'utilisation de LDL modifiées pour le ciblage de modèles tumoraux *in vivo*^{75, 76} (Fig. 2.23) :

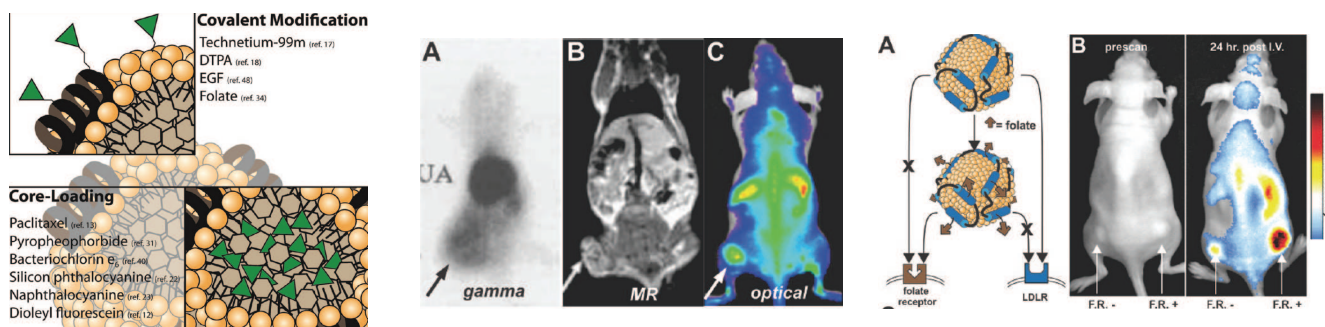


FIGURE 2.23 – Application des lipoprotéines à la construction de structures fluorescentes pour l'imagerie optique *in vivo* du petit animal et le ciblage de xénogreffes. *A gauche*, représentation schématique d'une structure type à base de lipoprotéines. *Au milieu*, comparaison des signaux obtenus en scintigraphie⁷⁴ puis IRM⁷⁵ à ceux obtenus en imagerie optique après injection de lipoprotéines fluorescentes. *A droite*, utilisation de lipoprotéines marquées au DiR (748/782) pour l'observation d'un ciblage de tumeur solide chez la souris⁷⁶.

Sur l'image du milieu, les lipoprotéines de faible densité sont marquées avec un fluorophore émettant dans le proche infrarouge ou du technétium. On remarque une nette correspondance entre le signal optique et les données de scintigraphie, témoignant d'une sensibilité remarquable de la sonde LDL en fluorescence. L'exemple de droite constitue une preuve de ciblage avec des LDL recouvertes de folate⁷⁶. Les images témoignent d'une accumulation préférentielle des lipoprotéines ciblantes au niveau de la tumeur présentant les récepteurs au folate (Fig. 2.23, droite).

Nous avons vu qu'il existait de nombreuses matrices, inorganiques ou non, permettant d'encapsuler des fluorophores organiques et d'obtenir une sensibilité remarquable pour la détection d'un signal de fluorescence *in vivo*. Ces nanoparticules donnent accès à des images de haute qualité ainsi qu'à de multiples applications orientées vers le diagnostic optique chez le petit animal. Elles sont cependant toujours sensibles à la lumière d'excitation et finissent irrémédiablement par perdre leurs propriétés optiques, après un certain nombre de cycles excitation/émission. Il devient alors nécessaire de passer sur des systèmes optiques plus stables, et moins susceptibles de se dégrader sous l'effet d'excitation répétées.

2.3.2 Les nanoparticules de carbone

Depuis la découverte des fullerènes en 1985 par Kroto, Curl et Smalley⁷⁷, dont les travaux seront récompensés du prix Nobel de chimie en 1996, de nombreuses nanostructures à base de carbone ont fait leur apparition dans des domaines aussi variés que la pharmaceutique, la cosmétique, l'électronique ou

73. Eisenberg S, Windmueller HG, Levy RI. Metabolic fate of rat and human lipoprotein apoproteins in the rat. *J Lipid Res.* 1973;14(4) :446-58

74. Ponty E, Favre G, Benaniba R, Boneu A, Lucot H, Carton M, Soula G. Biodistribution study of 99mTc-labeled LDL in B16-melanoma-bearing mice. Visualization of a preferential uptake by the tumor. *Int J Cancer.* 1993;54(3) :411-7

75. Corbin IR, Li H, Chen J, Lund-Katz S, Zhou R, Glickson JD, Zheng G. Low-density lipoprotein nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. *Neoplasia.* 2006;8(6) :488-98

76. Chen J, Corbin IR, Li H, Cao W, Glickson JD, Zheng G. Ligand conjugated low-density lipoprotein nanoparticles for enhanced optical cancer imaging *in vivo*. *J Am Chem Soc.* 2007;129(18) :5798-9

77. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF and Smalley RE. C60 : Buckminsterfullerene. *Nature.* 1985 ;318 :162-163

encore le photovoltaïque⁷⁸. Ces dernières années, les applications optiques/biologiques du carbone sont en majorité occupées par trois structures dominantes : les nanotubes de carbone, découverts par Iijima⁷⁹ en 1991, les boîtes de carbone, et les nanodiamants. Dans cette section, nous porterons notre attention sur ces trois architectures, remarquables par leurs propriétés optiques et les perspectives qu'elles ouvrent en recherche biomédicale.

Les nanotubes de carbone Ces structures carbonées appartiennent à la famille des fullerènes et constituent l'une des leurs formes allotropiques arrangée en simple ou multi-feuillets (Fig. 2.24, gauche). Du fait de leur appartenance au groupe des semi-conducteurs, les nanotubes de carbone organisés en simple feuillet présentent une signature optique et des propriétés électroniques caractéristiques de leur indice de chiralité et de leur diamètre (Fig. 2.24, milieu). De l'ordre de l'électronvolt, la faible largeur de leur bande interdite conduit à une photoluminescence infrarouge entre 900 et 1400 nm particulièrement adaptée aux applications biologiques et aux travaux sur le petit animal⁸⁰. Malgré le faible rendement quantique associé à ces signaux de photoluminescence⁸¹, les nanotubes de carbone en simple feuillet ont déjà démontré leur potentiel pour l'imagerie optique *in vivo*⁸².

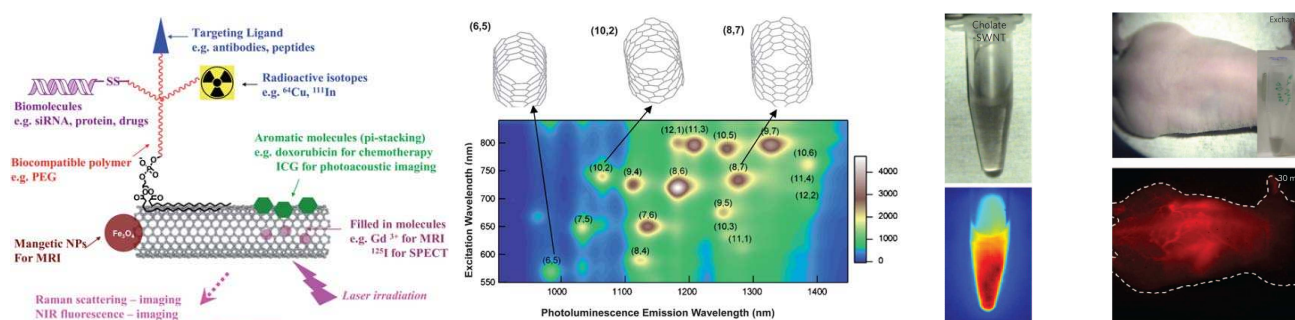


FIGURE 2.24 – Utilisation des nanotubes de carbone pour l'imagerie optique du petit animal dans l'infrarouge. *A gauche*, quelques applications des nanotubes de carbone en imagerie. *Au milieu*, les propriétés optiques des nanotubes de carbone⁸⁰. *A droite*, observation de la vascularisation d'une souris *nude* par la fluorescence des nanotubes de carbone⁸³.

Plus récemment, les travaux de Dai et al. ont rapporté la possibilité de suivre *in vivo* la biodistribution de nanotubes de carbones après injection systémique chez la souris⁸³. Ces images de photoluminescence, d'une résolution étonnante, font nettement apparaître le réseau vasculaire sous-cutané de l'animal après excitation laser à 808 nm et recueil du signal des nanotubes entre 1100 et 1700 nm (Fig. 2.24, droite). En dépit de résultats souvent encourageants, nous remarquerons que les applications biomédicales des nanotubes de carbone sont régulièrement freinées, voire découragées, par des rapports accablants concernant leurs effets sur la santé humaine⁸⁴ et leur toxicité *in vivo* chez le petit animal⁸⁵.

Les boîtes de carbone Parmi les structures carbonées les moins répandues dans le domaine biomédical, les boîtes de carbone tirent leur nom d'une analogie avec les boîtes quantiques. Récemment introduite comme alternative "verte" permettant d'éviter les problèmes de toxicité associés aux métaux lourds qui composent la plupart des boîtes quantiques⁸⁶, cette nouvelle architecture carbonée présente plusieurs

78. Vilatela JJ, Eder D. Nanocarbon composites and hybrids in sustainability : a review. *ChemSusChem*. 2012 ;5(3) :456-78

79. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. 1991 ;354 :56-58

80. Liu Z, Yang K and Lee ST. Single-walled carbon nanotubes in biomedical imaging. *J. Mater. Chem*. 2011 ;21 :586-598

81. Pansare VJ, Hejazi S, Faenza WJ and Prud'homme RK. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials : Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers. *Chem. Mater*. 2012 ;24 :812-827

82. Cherukuri P, Gannon CJ, Leeuw TK, Schmidt HK, Smalley RE, Curley SA, Weisman RB. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 ;103(50) :18882-6

83. Welsher K, Liu Z, Sherlock SP, Robinson JT, Chen Z, Darancioglu D, Dai H. A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice. *Nat Nanotechnol*. 2009 ;4(11) :773-80

84. Lam CW, James JT, McCluskey R, Arepalli S, Hunter RL. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit Rev Toxicol*. 2006 ;36(3) :189-217

85. Kostarelos K. The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat Biotechnol*. 2008 ;26(7) :774-6

86. Zhao QL, Zhang ZL, Huang BH, Peng J, Zhang M and Pang DW. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chem. Commun*. 2008 ;5116-5118

avantages décisifs sur ses aïeux quantiques⁸⁷ : une grande inertie chimique, une section efficace d'absorption à deux photons élevée, une grande photostabilité de l'émission ainsi qu'une faible toxicité.

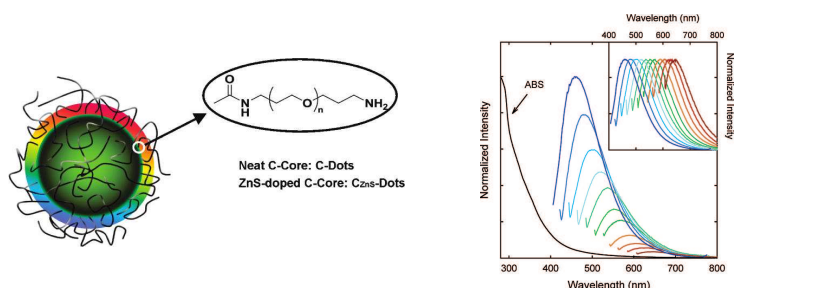


FIGURE 2.25 – Des boîtes de carbone pour l'imagerie optique du petit animal dans l'infrarouge^{88,89}

Dans leur forme initiale, ces boîtes de carbone ne sont à l'origine d'aucun signal de photoluminescence. Lorsque la surface du cœur de carbone est passivée par une couche organique (Fig. 2.25, gauche), il apparaît un signal de fluorescence particulièrement intense dont la longueur d'onde d'émission dépend de la longueur d'onde d'excitation⁸⁸ (Fig. 2.25, milieu). Une équipe chinoise a récemment démontré que ces nanoparticules de carbone pouvaient ainsi être utilisées *in vivo* pour l'imagerie optique du petit animal⁸⁹ (Fig. 2.25, droite). Après injection systémique chez la souris, le signal des boîtes de carbone est en majorité retrouvé dans la vessie et les urines, suggérant une rapide élimination des sondes, seulement 3 heures après l'administration, ainsi qu'une faible capture par le système monocyte macrophage. Ces premiers résultats *in vivo* suggèrent un fort potentiel de ces nanoparticules de carbones dans le domaine de l'imagerie optique, mais aussi un large champ d'applications aux disciplines biomédicales.

Les nanodiamants Le centre coloré NV^- du diamant, nous l'avons vu, est à l'origine d'un signal de fluorescence infrarouge particulièrement intense et photostable. Face au problème de photoblanchiment associé à la plupart des sondes fluorescentes organiques, ces propriétés optiques deviennent essentielles lorsqu'il s'agit d'évaluer la dynamique de phénomènes biologiques, ou encore de faire des observations répétées sur de longues durées. En 2005, une équipe de Taiwan propose l'utilisation de nanodiamants pour l'imagerie cellulaire⁹⁰. En plus de propriétés optiques uniques, liées à la présence des centres colorés NV^- dans le réseau carboné, leur étude rapporte une faible toxicité des nanodiamants *in vitro* (Fig. 2.26).

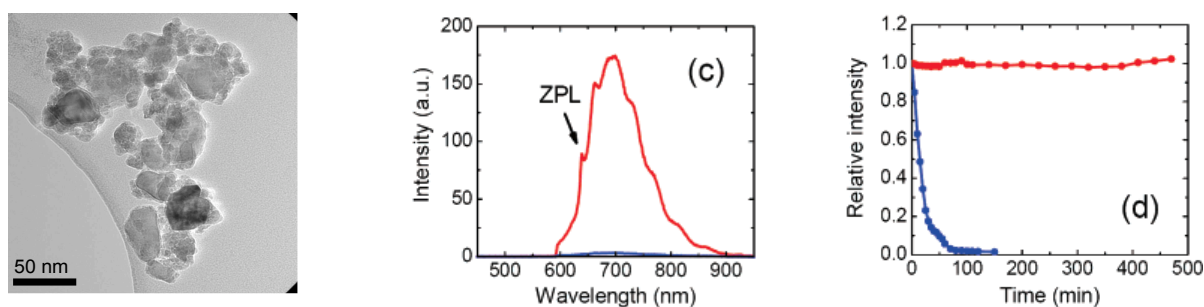


FIGURE 2.26 – Quelques propriétés des nanodiamants fluorescents. *A gauche*, cliché de microscopie électronique à transmission de nanodiamants. *Au milieu*, spectre d'émission des nanodiamants. *A droite*, comparaison de la stabilité du signal des nanodiamants à celle de nanosphères fluorescentes.

87. Wang F, Xie Z, Zhang H, Liu CY and Zhang YG. Highly Luminescent Organosilane-Functionalized Carbon Dots. *Adv. Funct. Mater.* 2011 ;21 :1027-1031

88. Sun YP, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KA, Pathak P, Meziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang H, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie SY. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc.* 2006 ;128(24) :7756-7

89. Yang ST, Cao L, Luo PG, Lu F, Wang X, Wang H, Meziani MJ, Liu Y, Qi G, Sun YP. Carbon dots for optical imaging *in vivo*. *J Am Chem Soc.* 2009 ;131(32) :11308-9

90. Yu SJ, Kang MW, Chang HC, Chen KM, Yu YC. Bright fluorescent nanodiamonds : no photobleaching and low cytotoxicity. *J Am Chem Soc.* 2005 ;127(50) :17604-5

On remarque sur la figure 2.26 que la fluorescence des nanosphères est détectable pendant environ une heure avant extinction quasi-complète de son signal (bleu). Les nanodiamants, en revanche, émettent un signal de fluorescence aussi intense après dix heures d'excitation continue qu'au début de l'expérience (rouge).

Ces deux résultats importants ont ainsi placé le diamant au cœur de nouvelles problématiques biologiques, lui permettant d'être pressenti pour de nouvelles applications *in vitro* et *in vivo*. Les travaux de Curmi et Treussart introduisent notamment la détection de nanodiamants uniques dans le cytoplasme de cellules HeLa par des techniques poussées de microscopie optique confocale⁹¹, ou étudient les voies d'internalisation du nanodiamant dans les cellules de mammifères⁹². Malgré la grande stabilité du signal de fluorescence des centres colorés, le futur du diamant *in vivo* chez le petit animal semble encore bien incertain. En effet, l'excitation des nanodiamants s'effectue en grande majorité dans la partie jaune-orangée du spectre visible, encore trop éloignée de la zone de transparence des tissus. Pour cette raison, il semble assez difficile d'envisager une excitation efficace des centres colorés à travers les tissus biologiques autrement que par les techniques multiphotoniques.

L'une des seules applications des nanodiamants *in vivo* rapporte l'observation de la fluorescence des centres colorés chez le nématode *Caenorhabditis elegans*⁹³. L'équipe de Chang démontre ainsi qu'il est possible de suivre le trajet de nanodiamants *in vivo* chez cet organisme modèle après micro-injection dans la gonade du ver ou simple gavage. Il est également démontré que la fonctionnalisation de ces nanodiamants par de l'albumine ou du dextran induit un tropisme au niveau de l'appareil digestif du ver et une absorption majoritaire des nanoparticules par les cellules intestinales (Fig. 2.27).

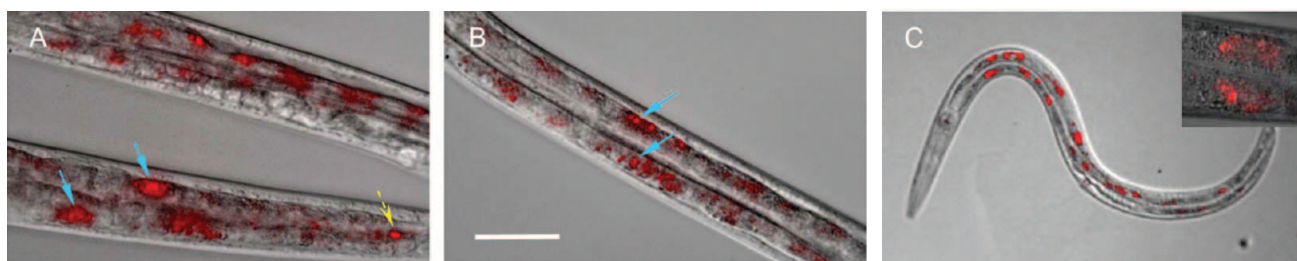


FIGURE 2.27 – Observation de nanodiamants *in vivo* chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. *A gauche*, les vers ont été nourris pendant trois heures avec des nanodiamants recouverts de dextran. *Au milieu*, les vers ont été nourris pendant trois heures avec des nanodiamants recouverts d'albumine de serum bovin. *A droite*, image du ver entier après ingestion de nanodiamants recouverts de dextran.

2.3.3 Les boîtes quantiques ou *quantum dots*

Les boîtes quantiques restent très certainement les sondes optiques inorganiques les plus populaires de ces dix dernières années. Elles sont constituées de semi-conducteurs colloïdaux dont les tailles varient usuellement entre 2 et 10 nm. Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre traitant des mécanismes physiques associés aux émissions lumineuses (Chapitre 1, Le confinement des boîtes quantiques), la plupart des boîtes quantiques commercialisées ont des structures à base de cadmium, sélénium, tellure, ou encore indium, et présentent une émission dépendante de la taille de la particule⁹⁴. Pour une composition donnée, le phénomène de confinement quantique conduit à une émission de longueur d'onde plus élevée lorsque

91. Faklaris O, Garrot D, Joshi V, Druon F, Boudou JP, Sauvage T, Georges P, Curmi PA, Treussart F. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway. *Small*. 2008;4(12) :2236-9

92. Faklaris O, Joshi V, Irinopoulou T, Tauc P, Sennour M, Girard H, Gesset C, Arnault JC, Thorel A, Boudou JP, Curmi PA, Treussart F. Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling : study of the uptake mechanism in mammalian cells. *ACS Nano*. 2009 ;3(12) :3955-62

93. Mohan N, Chen CS, Hsieh HH, Wu YC, Chang HC. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett*. 2010;10(9) :3692-9

94. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater*. 2005 ;4(6) :435-46

le diamètre de la nanoparticule augmente. A titre d'exemple pour un cristal de CdSe, une particule de 2 nm émet aux alentours des 475 nm lorsque son homologue de 8 nm émet après 650 nm (Fig. 2.28).

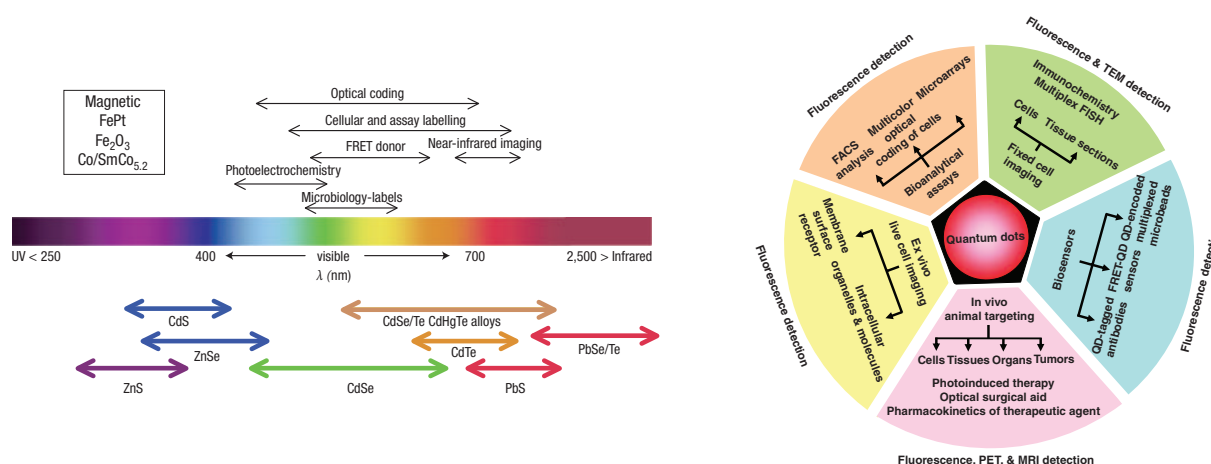


FIGURE 2.28 – Quelques propriétés et applications des boîtes quantiques⁹⁴

Des boîtes quantiques ont été envisagées pour la plupart des applications biologiques qui exploitent les phénomènes de fluorescence. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les marquages par immunofluorescence⁹⁵, la technologie des puces à ADN⁹⁶, ou encore la bioimagerie moléculaire et cellulaire⁹⁷. L'ensemble de ces applications repose sur la construction de sondes versatiles, dont l'état de surface doit être adapté à la détection de molécules d'intérêt biologique. Ces "nanocapteurs" sont construits par fonctionnalisation de la surface des boîtes et greffage de biomolécules.

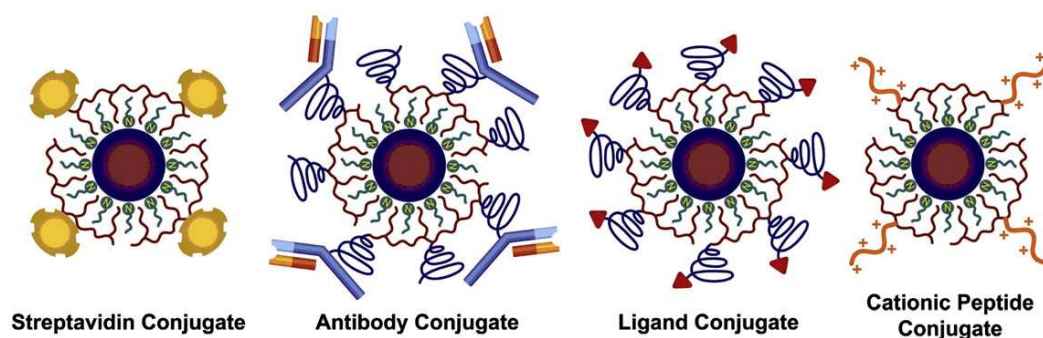


FIGURE 2.29 – Création de sondes biologiques sur la base de boîtes quantiques⁹⁶

Outre un rendement quantique nettement supérieur à celui de la grande majorité des sondes organiques couramment utilisées en immunofluorescence et pour la détection d'autres espèces moléculaires *in vitro*, le principal avantage des boîtes quantiques réside dans leur résistance au photoblanchiment. Cette propriété est particulièrement efficace pour la reconstruction 3D d'acquisitions successives en z au microscope confocal, altérée dans le cas de fluorophores sensibles au photoblanchiment⁹⁸.

Les résultats encourageants obtenus *in vitro* avec ces semi-conducteurs poussèrent à la réalisation des premières preuves de concept *in vivo*⁹⁹. L'équipe de Nie et Gao apporta la preuve que la détection

95. Lidke DS, Nagy P, Heintzmann R, Arndt-Jovin DJ, Post JN, Grecco HE, Jares-Erijman EA, Jovin TM. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol.* 2004;22(2) :198-203

96. Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S. Bioconjugated quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11) :1226-40

97. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol.* 2004;22(1) :47-52

98. Tokumasu F, Dvorak J. Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J Microsc.* 2003;211(Pt 3) :256-61

99. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science.* 2005;307(5709) :538-44

multicolore des boîtes était possible après injection dorsale de billes de polymère chargées avec des cristaux de couleurs différentes¹⁰⁰. De nombreuses études de biodistribution suivirent chez la souris saine¹⁰¹ ainsi que sur des modèles murins de tumeurs solides¹⁰² (Fig. 2.30). Il ressort plusieurs constats importants de l'ensemble de ces travaux *in vivo* :

- une élimination rénale des sondes se produit pour des diamètres inférieurs à 6 nm¹⁰³
- lorsque le diamètre hydrodynamique dépasse la limite des 6 nm, les nanocristaux sont en majorité captés par les organes du système monocyte-macrophage
- une fonctionnalisation de surface efficace permet d'améliorer de manière significative le temps de circulation des sondes après injection systémique chez le petit animal. Cette modification chimique de surface peut se faire par fixation covalente (ex : polyéthylène glycol¹⁰⁴), encapsulation dans un assemblage de phospholipides et de copolymères à bloc¹⁰⁵, ou encore interaction électrostatique (ex : assemblage multicouche d'acide hyaluronique et poly-L-lysine¹⁰⁶).

Ce dernier exemple concerne une voie de fonctionnalisation assez peu répandue : la technique *layer by layer LbL* ou assemblage multicouche. Ce procédé consiste à faire interagir la surface du cristal avec des couches successives de polymères de charges opposées. L'équipe de Hammond arrive ainsi à obtenir des boîtes quantiques enrobées de multiples couches de polymères dont le temps de demi-vie dans la circulation générale est sensiblement augmenté par rapport au particules nues. Ces cristaux furtifs sont ensuite appliqués à la détection de tumeurs solides *in vivo* (Fig. 2.30).

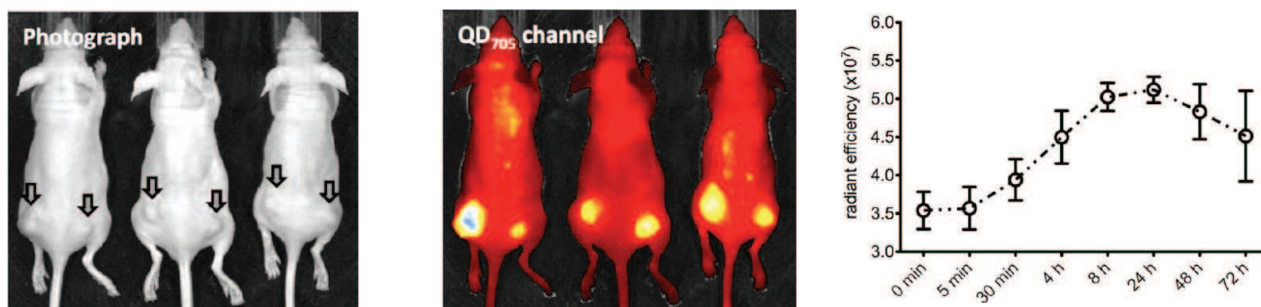


FIGURE 2.30 – Exemple de ciblage de tumeurs solides *in vivo* avec les boîtes quantiques¹⁰⁶. *A gauche*, localisation des tumeurs murines. *Au milieu*, détection du signal des boîtes quantiques au niveau des tumeurs, 24 heures après injection systémique des sondes. *A droite*, évolution temporelle du signal de fluorescence au niveau des tumeurs.

Malgré une émission relativement intense en comparaison des autres sondes d'imagerie accessibles sur le marché, ces semi-conducteurs inorganiques requièrent une excitation constante à travers l'animal. Les phénomènes d'absorption et de diffusion rencontrés lorsque la lumière traverse les tissus biologiques sont responsables d'une forte atténuation du signal d'excitation à laquelle s'ajoute le bruit d'autofluorescence. Il s'ensuit une émission constamment limitée par la quantité maximale d'énergie susceptible de traverser les tissus pour finalement arriver au niveau de la boîte quantique. Une équipe de Stanford a proposé une construction hybride organique/inorganique dans laquelle le cristal est associé à une protéine biolumi-

100. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2004 ;22(8) :969-76

101. Schipper ML, Iyer G, Koh AL, Cheng Z, Ebenstein Y, Aharoni A, Keren S, Bentolila LA, Li J, Rao J, Chen X, Banin U, Wu AM, Sinclair R, Weiss S, Gambhir SS. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small.* 2009 ;5(1) :126-34

102. Cai W, Shin DW, Chen K, Gheysens O, Cao Q, Wang SX, Gambhir SS, Chen X. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.* 2006 ;6(4) :669-76

103. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007 ;25(10) :1165-70

104. Daou TJ, Li L, Reiss P, Jossierand V, Texier I. Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots. *Langmuir.* 2009 ;25(5) :3040-4

105. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science.* 2002 ;298(5599) :1759-62

106. Poon Z, Lee JB, Morton SW, Hammond PT. Controlling in vivo stability and biodistribution in electrostatically assembled nanoparticles for systemic delivery. *Nano Lett.* 2011 ;11(5) :2096-103

nescente¹⁰⁷. Une activation chimique de la protéine permet ainsi de déclencher l'émission de lumière qui viendra exciter la boîte quantique via un transfert d'énergie. On parle souvent de BRET pour décrire ce phénomène : *bioluminescence resonance energy transfer*. Cette technique originale permet alors d'éviter la première étape d'excitation optique des cristaux à travers les tissus, de supprimer toute pollution liée à l'autofluorescence, et de finalement améliorer la sensibilité de détection (Fig. 2.31).

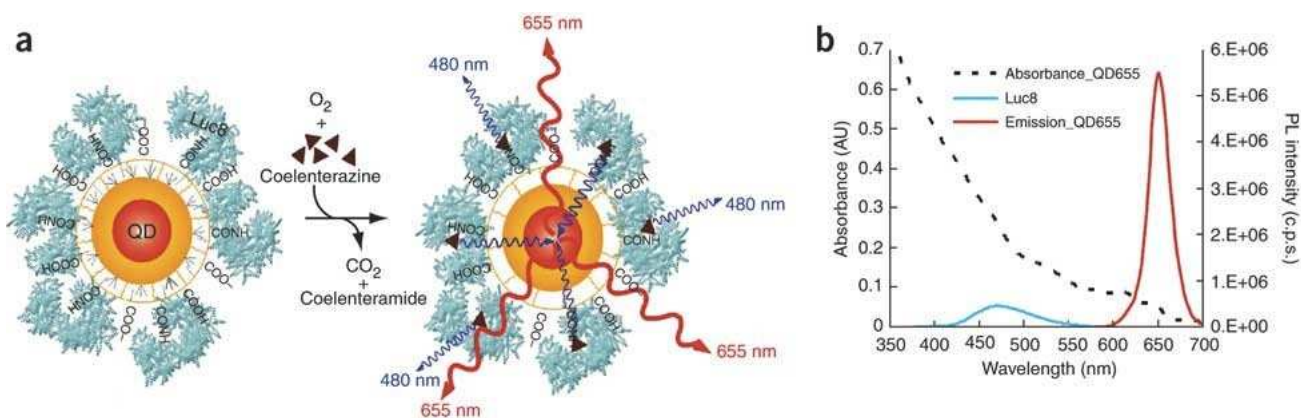


FIGURE 2.31 – Le BRET avec les boîtes quantiques¹⁰⁷. A gauche, construction hybride protéines/boîte quantique pour la réalisation du transfert d'énergie. A droite, propriétés optiques de l'architecture obtenue.

L'engouement suscité par l'utilisation de ces matériaux inorganiques en recherche préclinique pose la question de son éventuelle translation en clinique. Cette question fait encore débat au sein de la communauté scientifique et regroupe de nombreuses positions parmi les confiants et ceux qui doutent de l'applicabilité en clinique¹⁰⁸. Une récente étude pilote de toxicité chez le primate semble pourtant confirmer l'absence de toxicité aiguë après injection de boîtes quantiques à la dose de 25 mg/kg, sans toutefois préciser ce que devient le cadmium des cristaux après 90 jours de résidence dans le foie, la rate et les reins¹⁰⁹.

2.3.4 Les nanoparticules à upconversion

Cette famille de nanosondes constitue en réalité une sous-catégorie et un cas particulier des oxydes dopés avec des ions terres-rares. Du fait de la grande variété de lanthanides et d'oxydes dopés correspondants, nous porterons essentiellement notre attention sur les matériaux ayant abouti à des applications biologiques chez le petit animal. Il se trouve que l'ajout de cette condition restreint de manière quasi-exclusive le champ aux nanoparticules à upconversion, dont l'utilisation comme sonde d'imagerie optique *in vivo* est en pleine expansion depuis maintenant quelques années.

Comme nous l'avons introduit dans la partie dédiée à la description physique des phénomènes luminescents (Chapitre 1, Upconversion de photons), le nanocristal le plus connu et le plus étudié dans le domaine des matériaux à upconversion est très certainement $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$. Il existe sous deux formes cristallines :

- une phase cubique, $\alpha\text{-NaYF}_4$;
- une phase hexagonale, $\beta\text{-NaYF}_4$, dont le rendement quantique apparait de un à deux ordres de grandeur supérieur¹¹⁰.

Nous pouvons ici remarquer que ce type de nanoparticules tient son succès de plusieurs caractéristiques physico-chimiques et optiques particulièrement adaptées aux applications *in vivo* chez le petit animal.

107. So MK, Xu C, Loening AM, Gambhir SS, Rao J. Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol.* 2006 ;24(3) :339-43

108. Cai W, Hsu AR, Li ZB, Chen X. Are quantum dots ready for *in vivo* imaging in human subjects? *Nanoscale Res Lett.* 2007 ;2(6) :265-281

109. Ye L, Yong KT, Liu L, Roy I, Hu R, Zhu J, Cai H, Law WC, Liu J, Wang K, Liu J, Liu Y, Hu Y, Zhang X, Swihart MT, Prasad PN. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nat Nanotechnol.* 2012 ;7(7) :453-8

110. Haase M, Schäfer H. Upconverting nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 ;50(26) :5808-29

Tout d'abord, de nombreuses équipes rapportent la synthèse de nanoparticules à partir de ces matériaux. Ainsi, Cohen et al. décrivent la synthèse de nanocristaux à upconversion dont la taille est plus petite que la dizaine de nanomètre¹¹¹ (Fig. 2.32).

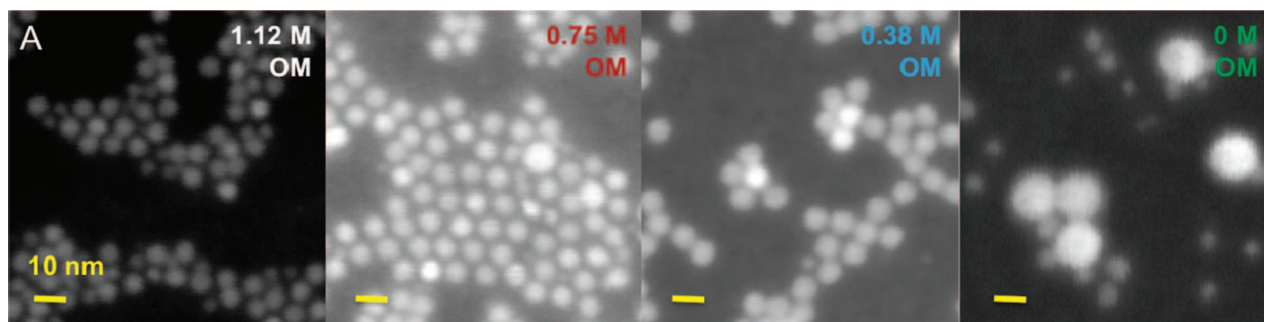


FIGURE 2.32 – Caractérisation de nanocristaux de $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ par microscopie électronique à balayage¹¹¹

Cette première qualité que constitue l'accessibilité à des nanoparticules dont le diamètre moyen est de quelques nanomètres seulement permet d'anticiper certains problèmes de circulation couramment rencontrés avec les cristaux de plus gros diamètres : un faible temps de vie des sondes dans la circulation générale associé à une capture rapide par le système monocyte-macrophage. Une autre grande qualité de ces matériaux provient de propriétés optiques exceptionnelles (Fig. 2.33) :

1. Le phénomène d'upconversion, nous l'avons vu dans le début de cette introduction générale, permet une excitation laser à des longueurs élevées, souvent au-delà des 900 nm, qui n'ont aucun mal à traverser les tissus biologiques \Rightarrow excitation en profondeur possible à travers le corps de l'animal sans autofluorescence des tissus
2. Le spectre d'émission se situe dans la fenêtre de faible absorption des tissus \Rightarrow possibilité de détecter l'émission de la sonde en profondeur dans les tissus vivants
3. Une photostabilité digne des centres colorés du diamant \Rightarrow accès aux observations répétées sans risque de photoblanchiment de la sonde

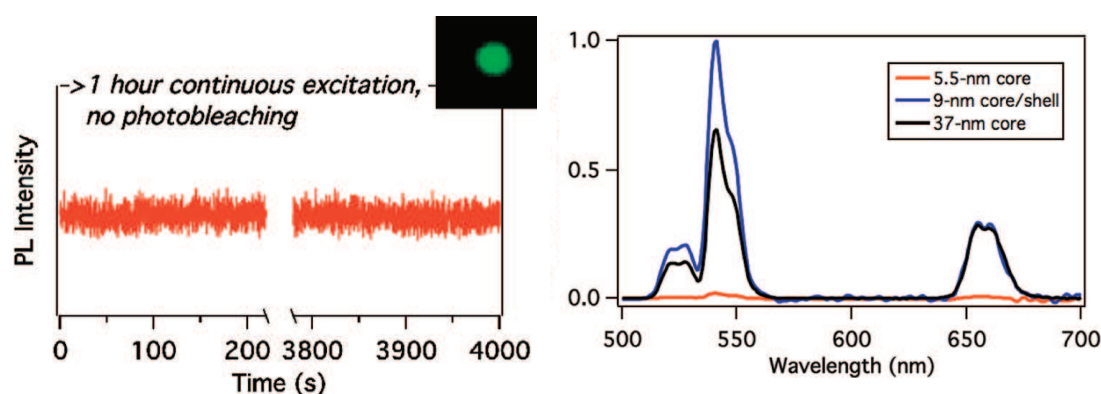


FIGURE 2.33 – Propriétés optiques des nanocristaux de $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ¹¹¹. *A gauche*, photostabilité associée à l'émission des nanoparticules à upconversion. *A droite*, le spectre de photoluminescence est enregistré sous excitation laser continue à 980 nm.

La combinaison de ces singularités, associée aux multiples voies de fonctionnalisation envisageables en surface de ce type de cristaux, a rapidement conduit à de nombreuses applications de ces matériaux photoluminescents au domaine de l'imagerie optique *in vivo*¹¹², notamment pour la détection de tu-

111. Ostrowski AD, Chan EM, Gargas DJ, Katz EM, Han G, Schuck PJ, Milliron DJ, Cohen BE. Controlled synthesis and single-particle imaging of bright, sub-10 nm lanthanide-doped upconverting nanocrystals. *ACS Nano*. 2012;6(3) :2686-92

112. Zhan Q, Qian J, Liang H, Somesfalean G, Wang D, He S, Zhang Z, Andersson-Engels S. Using 915 nm laser excited $\text{Tm}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ -doped NaYbF_4 upconversion nanoparticles for in vitro and deeper in vivo bioimaging without overheating irradiation. *ACS Nano*. 2011;5(5) :3744-57

meurs solides¹¹³ et le suivi de cellules¹¹⁴. Dans ce premier exemple d'application, Zhao et al. démontrent qu'un dopage de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ par le manganèse Mn^{2+} permet de faire passer le rapport émission rouge/émission verte de 0.8 à 163 sans altérer la photostabilité du signal d'upconversion¹¹⁵ (Fig. 2.34). Cette nouvelle composition est rendue stable dans les milieux physiologiques par ajout de polyéthylène glycol en surface des nanoparticules, puis injectée *in vivo* à une souris saine.

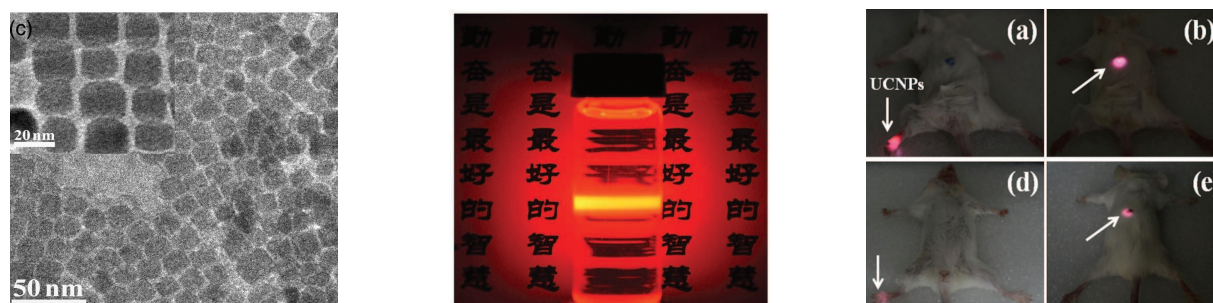


FIGURE 2.34 – Observation de nanoparticules de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$ dopées Mn^{2+} chez la souris¹¹⁵. *A gauche*, cliché de microscopie électronique à transmission des nanoparticules. *Au milieu*, suspension de nanoparticules de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$ dopées Mn^{2+} traversée par un laser émettant à 980 nm. *A droite*, exemple de signal obtenu *in vivo* après injection locale des mêmes nanoparticules.

Les images confirment la possibilité d'utiliser ces nanocristaux à upconversion pour l'imagerie optique du petit animal. Le signal de photoluminescence peut aisément être excité à une profondeur de 10 mm, et permet une localisation relativement précise et sensible de la sonde *in vivo*. Le succès reconnu de ces applications *in vivo* du phénomène d'upconversion, en comparaison des autres sondes d'imagerie, a encouragé la recherche de nouvelles compositions, présentant des propriétés optiques améliorées par rapport aux premières générations dérivées du système $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$. Participant à cet effort d'optimisation, l'équipe de Gao et al. a récemment présenté des nanoparticules de $\text{YOF}:\text{Yb}/\text{Er}$ pour l'observation sélective de cellules cancéreuses. Ces nanocristaux sont à l'origine d'un signal d'upconversion rouge bien plus intense que l'émission verte du précédent $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$, et évidemment pressentis pour de futures applications chez le petit animal¹¹⁶ (Fig. 2.35).

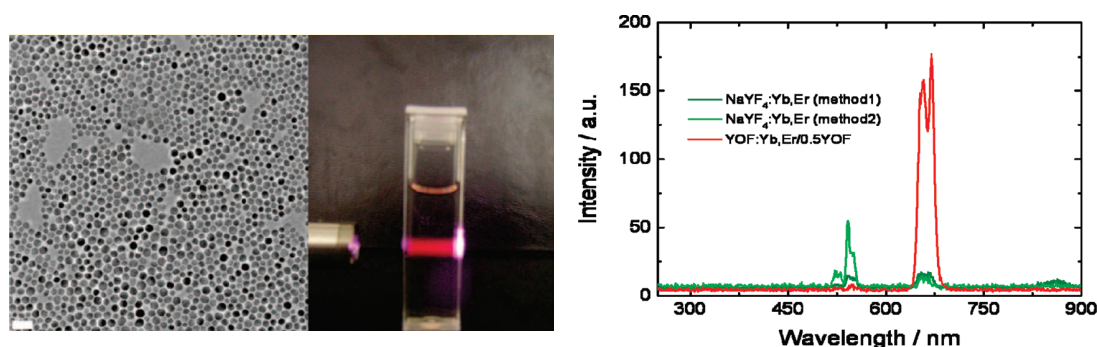


FIGURE 2.35 – Propriétés optiques des nanoparticules de $\text{YOF}:\text{Yb}/\text{Er}$ ¹¹⁶

Enfin nous remarquerons que ces sondes d'imagerie basées sur le phénomène d'upconversion participent également au développement d'outils et de kits pour la détection de molécules d'intérêt biologique *in vitro*. Ainsi, l'exemple ci-dessous prévoit l'utilisation de nanoparticules à upconversion pour la détection

113. Xiong L, Chen Z, Tian Q, Cao T, Xu C, Li F. High contrast upconversion luminescence targeted imaging *in vivo* using peptide-labeled nanophosphors. *Anal Chem.* 2009;81(21):8687-94

114. Idris NM, Li Z, Ye L, Sim EK, Mahendran R, Ho PC, Zhang Y. Tracking transplanted cells in live animal using upconversion fluorescent nanoparticles. *Biomaterials.* 2009;30(28):5104-13

115. Tian G, Gu Z, Zhou L, Yin W, Liu X, Yan L, Jin S, Ren W, Xing G, Li S, Zhao Y. Mn^{2+} dopant-controlled synthesis of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$ upconversion nanoparticles for *in vivo* imaging and drug delivery. *Adv Mater.* 2012;24(9):1226-31

116. Guangshun Yi, Yanfen Peng, and Zhiqiang Gao. Strong Red-Emitting near-Infrared-to-Visible Upconversion Fluorescent Nanoparticles. *Chem. Mater.* 2011, 23, 2729–2734

intracellulaire du glutathion¹¹⁷ (Fig. 2.36). L'équipe utilise des nanofeuilles d'oxydes de manganèse pour éteindre le signal d'upconversion des nanoparticules par transfert d'énergie. L'ajout de glutathion permet de réduire l'oxyde de manganèse, déposé en surface des nanoparticules, en Mn^{2+} et de retrouver le signal d'upconversion.

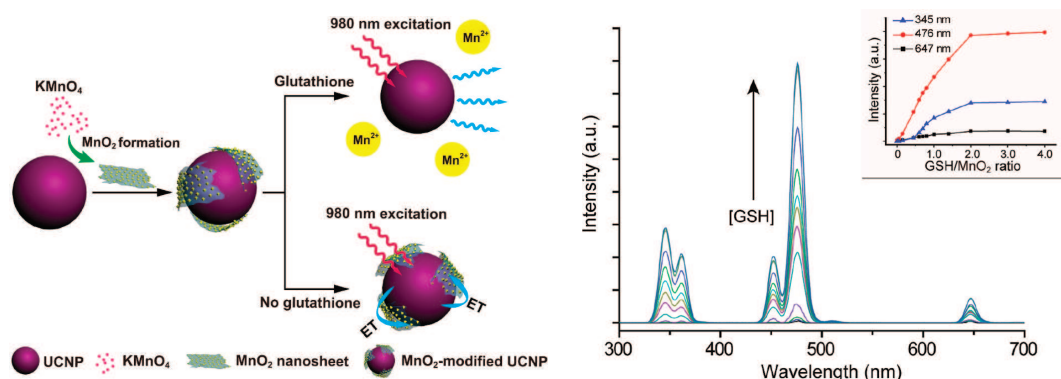


FIGURE 2.36 – Détection du glutathion par l'intermédiaire de nanoparticules à upconversion¹¹⁷

Nous avons vu que les matériaux à upconversion trouvaient justement leur place parmi les sondes d'imagerie optique. Du fait de leur petite taille et de propriétés optiques particulièrement intéressantes, ces nanocristaux ont déjà été utilisés pour de nombreuses applications, de la détection de macromolécules et de cellules au diagnostic *in vivo* chez le petit animal. Par ailleurs, une série d'études sur la biodistribution à long terme et la toxicologie de ces nanomatériaux réalisée chez la souris n'a rapporté aucune toxicité notable *in vivo*¹¹⁸. Ces derniers résultats encouragent l'exploration de nouvelles applications de cette nanotechnologie au domaine biomédical.

2.3.5 Les nanoparticules à luminescence persistante

L'utilisation du phénomène de luminescence persistante pour des applications en biologie date de 2007 avec l'apparition des nanoparticules à luminescence persistante. Ce travail de thèse, réalisé au laboratoire par Quentin le Masne de Chermont, rapporte la possibilité d'éviter le phénomène d'auto fluorescence des tissus *in vivo* sans traitement mathématique des images, par suppression de l'étape d'excitation continue habituellement nécessaire à l'observation de la plupart des sondes d'imagerie optique à travers les tissus vivants¹¹⁹. L'idée consiste à utiliser des nanocristaux qui stockent l'énergie d'excitation pour la rendre sous forme d'émission infrarouge pouvant durer plusieurs dizaines de minutes (Fig. 2.37).

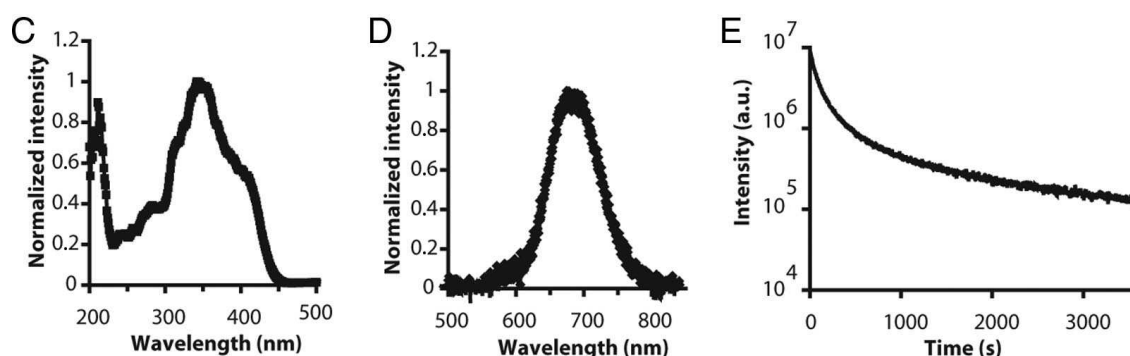


FIGURE 2.37 – Propriétés optiques des premières nanoparticules à luminescence persistante¹¹⁹. Spectres d'excitation (à gauche), d'émission (au milieu), et déclin de la luminescence persistante (à droite).

117. Deng R, Xie X, Vendrell M, Chang YT, Liu X. Intracellular glutathione detection using MnO_2 -nanosheet-modified upconversion nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2011;133(50):20168-71

118. Liang Cheng, Kai Yang, Mingwang Shao, Xinhua Lu & Zhuang Liu. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution and toxicology study of functionalized upconversion nanoparticles in mice. *Nanomedicine* 2011;6(8):1327-1340

119. le Masne de Chermont Q, Chanéac C, Seguin J, Pellé F, Maîtrejean S, Jolivet JP, Gourier D, Bessodes M, Scherman D. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(22):9266-71

Ces nanoparticules sont constituées d'un silicate de formule $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6 : \text{Eu}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$. Si nous reprenons le mécanisme décrit dans le premier chapitre de cette introduction, l'euporium joue le rôle d'activateur, le manganèse celui du centre luminescent, enfin le piège à électron est ici le dysprosium. Nous pouvons alors résumer le phénomène de luminescence persistante par un schéma dans lequel apparaissent les deux étapes du processus : le chargement du matériau par piégeage optique de charges, et la thermoluminescence (Fig. 2.38). Notons que le rôle de chaque dopant dans le phénomène de luminescence persistante a été identifié par une équipe du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée à Chimie ParisTech (LCMCP) au cours du travail de thèse d'Aurélie Lecointre^{120, 121}.

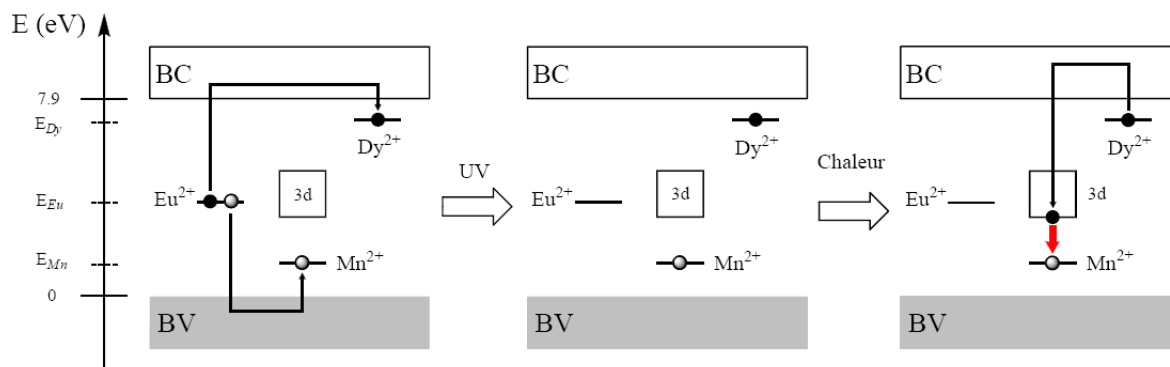


FIGURE 2.38 – Mécanisme de luminescence persistante dans $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6 : \text{Eu}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$

Le principe d'utilisation des nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique du petit animal *in vivo* est parmi les plus simples. La suspension de nanoparticules est tout d'abord activée sous un rayonnement UV par lequel se produit l'étape de piégeage optique (Fig 2.38). Les nanoparticules sont ensuite injectées dans la circulation générale d'une souris anesthésiée, puis suivies à l'aide d'un système de détection approprié (Photon Imager, Biospace Lab). Le signal de luminescence persistante permet alors une détection des nanoparticules à travers le corps de l'animal, sans source d'excitation supplémentaire (Fig. 2.39).

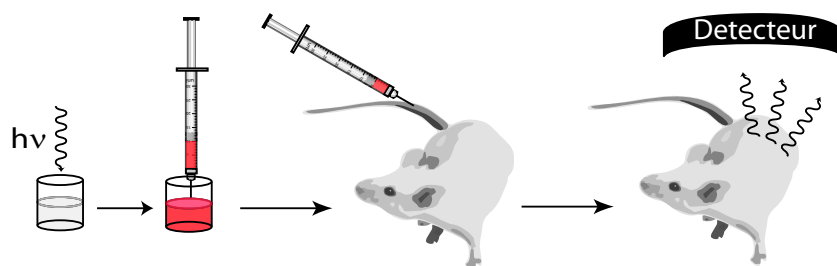


FIGURE 2.39 – Principe d'utilisation des nanoparticules à luminescence persistante¹¹⁹

Les images obtenues pendant l'acquisition des données donnent accès à la biodistribution des nanoparticules à luminescence persistante en temps réel. Le déclin de luminescence peut être suivi un peu plus d'une heure *in vivo*, sans excitation continue de la sonde.

La biodistribution des nanoparticules à luminescence persistante, comme celle de la plupart des autres systèmes de cette taille, est largement dépendante de l'état de surface du matériau¹²². La fixation d'amines primaires en surface des nanoparticules permet d'observer un tropisme au niveau des poumons, très certainement le résultat de multiples embolies causées par la formation d'agrégats de nanoparticules dans

120. A. Lecointre, B. Viana, Q. LeMasne, A. Bessière, C. Chanéac, D. Gourier. Red long-lasting luminescence in clinooenstatite. *Journal of Luminescence* 129 (2009) 1527–1530

121. A. Lecointre, A. Bessière, B. Viana, D. Gourier. Red persistent luminescent silicate nanoparticle. *Radiation Measurements* 45 (2010) 497–499

122. Faure AC, Dufort S, Josserand V, Perriat P, Coll JL, Roux S, Tillement O. Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small*. 2009 ;5(22) :2565-75

la circulation sanguine. Les nanoparticules dont la surface est recouverte de charges négatives ont un comportement bien différent et s'accumulent en majorité au niveau du foie et de la rate (Fig. 2.40). Cette capture préférentielle est souvent rapportée pour les systèmes colloïdaux stables et chargés en milieu physiologique¹²³. Elle est le résultat d'un mécanisme de défense déployé par l'organisme pour la capture des substances étrangères et des parasites, le système monocyte-macrophage. Deux groupes cellulaires sont majoritairement impliqués dans ce processus de reconnaissance après opsonisation : les macrophages spléniques et les cellules de Kupffer.

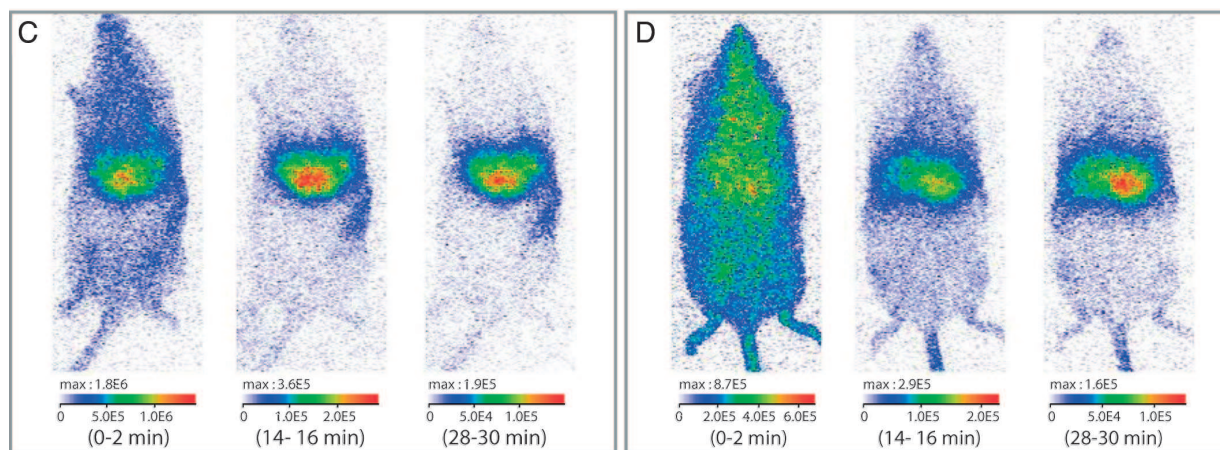


FIGURE 2.40 – Biodistribution de nanoparticules à luminescence persistante en fonction de l'état de surface¹¹⁹. *A gauche*, nanoparticules de charge négative. *A droite*, nanoparticules sur lesquelles sont fixées des chaînes de polyéthylène glycol.

Dans la même étude, le Masne de Chermont et al. montrent qu'il est possible de retarder le phénomène de capture par fonctionnalisation des nanoparticules à luminescence persistante avec un polymère d'éthylène glycol (Fig. 2.40). On remarque sur les images que l'effet n'est appréciable que les deux premières minutes. Il ressort nettement que les particules ne circulent pas plus de dix minutes après injection systémique chez la souris, ce qui limite grandement le champ des applications *in vivo* de ces nanocristaux à luminescence persistante.

Depuis cette introduction de la luminescence persistante dans le domaine de l'imagerie biomédicale *in vivo*, une équipe chinoise a rapporté le premier transfert d'énergie entre des nanoparticules à luminescence persistante et des nanoparticules d'or¹²⁴ (Fig. 2.41).

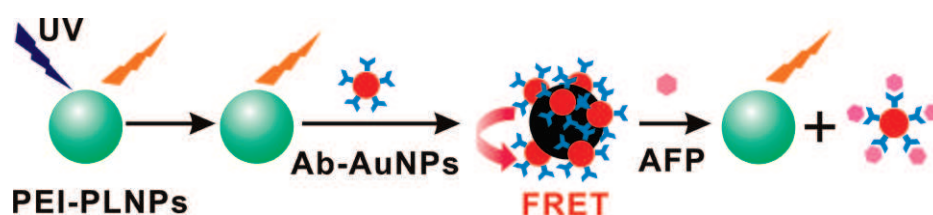


FIGURE 2.41 – Principe d'utilisation d'un assemblage nanoparticules à luminescence persistante/nanoparticules d'or pour la détection de l' α -fétoprotéine (AFP)¹²⁴

Cet intérêt vis-à-vis du phénomène de luminescence persistante présage d'un avantage pressenti de ce phénomène original par rapport aux autres sondes d'imagerie. Un certain nombre de problèmes restent néanmoins sans réponse et limitent pour le moment une réelle utilisation de ces sondes pour tout

123. Landsiedel R, Fabian E, Ma-Hock L, Wohlleben W, Wiench K, Oesch F, van Ravenzwaay B. Toxicokinetics of nanomaterials. Arch Toxicol. 2012 ;86(7) :1021-60

124. Wu BY, Wang HF, Chen JT, Yan XP. Fluorescence resonance energy transfer inhibition assay for α -fetoprotein excreted during cancer cell growth using functionalized persistent luminescence nanoparticles. J Am Chem Soc. 2011 ;133(4) :686-8

type d'application chez le petit animal. Nous citerons quelques inconvénients associés à cette première génération de nanoparticules à luminescence persistante :

- Le diamètre des nanoparticules est encore trop élevé pour des applications *in vivo* et participe très certainement de la forte rétention des nanoparticules au niveau des organes du système monocyte-macrophage et de leur faible temps de demi-vie dans le sang.
- La fonctionnalisation n'a été rapportée que pour fixer du polyéthylène glycol. Nous ne savons pour le moment pas si ces particules peuvent être utilisées pour cibler de manière spécifique certains récepteurs biologiques via une interaction ligand/récepteur.
- Les propriétés optiques actuelles, notamment l'excitabilité de la luminescence persistante par des UV, empêchent toute nouvelle excitation de la sonde à travers les tissus de l'animal. Cette caractéristique limite énormément le temps d'observation des cristaux *in vivo*, détectables seulement l'heure qui suit leur excitation.

L'objectif de ce travail de thèse est de répondre aux limitations de cette première génération de nanoparticules à luminescence persistante dans le but d'en faire un outil versatile, accessible, pratique et particulièrement sensible pour l'imagerie optique du petit animal *in vivo*. Comme nous l'avons évoqué dans la préface, les résultats seront présentés sous la forme d'une succession d'articles scientifiques. Pour chaque grande étape de l'avancement des travaux, une introduction et une conclusion préciseront le contexte ainsi que les perspectives scientifiques associés à l'étude. Enfin, dans le but de ne pas être redondant vis-à-vis du contenu des articles, ces paragraphes ne seront agrémentés d'aucune référence. Toutes les données bibliographiques pourront être trouvées dans les articles correspondants.

Deuxième partie

Un premier nano-outil prometteur :
 $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+} , Mn^{2+} , Dy^{3+})

Chapitre 3

Premières preuves de ciblage *in vitro*

Sommaire

3.1 Réaliser un ciblage <i>in vitro</i>	51
3.2 Deux stratégies efficaces pour le ciblage de cellules cancéreuses	65

3.1 Réaliser un ciblage *in vitro*

Comme nous venons de le voir au cours de la dernière partie de l'introduction consacrée aux différentes utilisations biologiques des nanoparticules à luminescence persistante, il n'existe pour le moment aucune preuve d'application de cette technologie au ciblage spécifique de protéines *in vitro*. Il est en effet courant de provoquer une accumulation préférentielle de nano-sondes/vecteurs au niveau d'un organe ou d'un environnement biologique donné en exploitant l'interaction privilégiée d'un ligand vis-à-vis de son récepteur spécifique. La plupart du temps, la validation de ces stratégies passe par des expériences *in vitro* au cours desquelles l'affinité de nanoparticules ciblantes est comparée à celle de nanoparticules témoins, sur une cible protéique identifiée. Ce type de ciblage peut se faire suivant deux stratégies distinctes que nous qualifierons ici de directe et indirecte :

1. Stratégie directe. Dans ce premier cas de figure, le ciblage se fait par interaction du ligand, fixé en surface des nanoparticules, directement avec sa cible protéique. Il est ici question d'une cible directement associée au groupe cellulaire que l'on souhaite cibler. Si nous prenons l'exemple classique d'un ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$, surexprimées dans un certain nombre de cancers, le ligand d'intérêt utilisé appartiendra à la famille des ligands RGD, connus pour leur affinité vis-à-vis de cette protéine. Il s'agit d'un ciblage direct de la cible par le ligand qui lui correspond. Il arrive cependant que l'efficacité de ce type de stratégie soit limitée par de faibles affinités ligand/récepteur.
2. Stratégie indirecte. Lorsque un ligand présentent une affinité trop faible pour sa cible, une approche indirecte peut être envisagée. Elle consiste à passer par un couple intermédiaire connu pour sa très forte constante d'interaction. C'est notamment le cas du couple biotine/strept(avidine) responsable de l'une des associations non covalentes les plus fortes de la nature, avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-15} M. Lorsque cette technique est envisagée, il est alors nécessaire de modifier la cible de manière à lui permettre d'exprimer la protéine d'intérêt, ici la streptavidine ou l'avidine. Le ciblage est réalisé au moyen de nanoparticules fonctionnalisées par de la biotine et permet une interaction beaucoup plus forte de la sonde avec sa cible.

Les deux premiers articles de cette thèse présentent l'application de ces deux stratégies au ciblage *in vitro* de cellules cancéreuses avec des nanoparticules à luminescence persistante. Le premier article évalue l'emploi d'une stratégie directe pour le ciblage de cellules humaines du cancer de la prostate, les PC-3, par l'intermédiaire d'un ligand moléculaire hydrophobe identifié comme sélectif de cette lignée maligne *in vitro* : le Rak-2. Enfin le second article propose d'exploiter l'interaction biotine/avidine pour le ciblage de cellules de gliome de rat, les BT4C. Ces cellules présentent la particularité d'avoir été transduites pour permettre l'expression d'une protéine de fusion, la lodavine, constituée d'un récepteur aux lipoprotéines de faible densité et d'une avidine extramembranaire.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability

Thomas Maldiney^{a,b,c,d}, Gerardo Byk^e, Nicolas Wattier^{a,b,c,d}, Johanne Seguin^{a,b,c,d}, Raz Khandadash^e, Michel Bessodes^{a,b,c,d}, Cyrille Richard^{a,b,c,d,*}, Daniel Scherman^{a,b,c,d,**}

^a Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, CNRS, UMR 8151, F-75270 Paris Cedex, France

^b INSERM, U1022, F-75270 Paris Cedex, France

^c Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 Cedex, France

^d ENSCP, Chimie Paristech, F-75231 Paris Cedex, France

^e Department of Chemistry, Laboratory of Nano-Biotechnology, and School of Engineering, Bar Ilan University, Ramat Gan 52900, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2011

Accepted 29 June 2011

Available online 23 July 2011

Keywords:

Persistent luminescence nanoparticles

Surface functionalization

Binding

PC-3

In vitro

ABSTRACT

We have recently reported the design and use of inorganic nanoparticles with persistent luminescence properties. Such nanoparticles can be excited with a UV lamp for 2 min and emit light in the near-infrared area for dozen of minutes without any further excitation. This property is of particular interest for small animal optical imaging, since it avoids the autofluorescence of endogenous fluorophores which is one major problem encountered when using fluorescent probes. We report herein the synthesis of persistent luminescence nanoparticles (PLNPs) and their functionalization with two small targeting molecules: biotin and Rak-2. We provide characterization of each PLNP as well as preliminary evidence of the ability of PLNP-PEG-Biotin to target streptavidin and PLNP-PEG-Rak-2 to bind prostate cancer cells *in vitro*.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Optical imaging techniques provide great potential for understanding biological processes at the molecular level and for sensitive cancer diagnosis, particularly at the early stage of cancer development (Bruchez et al., 1998). Biological optical imaging greatly relies upon the use of sensitive and stable optical labels. So far, organic dyes (Kogure et al., 2006), quantum dots (Chan and Nie, 1998; Gao et al., 2004; Michalet et al., 2005; Maysinger et al., 2007) and metal nanoparticles (Storhoff et al., 1998; Taton et al., 2000) are the most commonly used optical labels but still have some limitations. When used *in vivo*, fluorescent probes present numerous drawbacks (Ntziachristos, 2006) such as autofluorescence (Frangioni, 2003) coming from tissue organic components during probe illumination. In addition, deep tissue imaging is difficult because of critical absorption from major components present in living organism (water, melanin, haemoglobin, lipids).

* Corresponding author at: INSERM, U1022, CNRS, UMR 8151, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. Tel.: +33 1 53 73 95 67; fax: +33 1 43 26 69 18.

** Corresponding author at: INSERM, U1022, CNRS, UMR 8151, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

E-mail addresses: cyrille.richard@parisdescartes.fr (C. Richard), daniel.scherman@parisdescartes.fr (D. Scherman).

To overcome these difficulties, we have recently developed inorganic persistent luminescence nanoparticles (PLNPs). The key element of this technology is based on long lasting luminescent nanoparticles which can be optically excited with a UV lamp before emitting in near-infrared range (le Masne de Chermont et al., 2007). The persistent luminescence is still detectable after 1 h. Among the different nanomaterials synthesized, we have shown that the composition $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ doped with luminescent ions (0.5% Eu^{2+} , 1% Dy^{3+} and 2.5% Mn^{2+}) was the best candidate for *in vivo* imaging (le Masne de Chermont et al., 2009). Neutral PLNP functionalized with a polyoxyethylene chain (PEG) could circulate in the blood for more than 30 min if injected *i.v.* 5 min after the preinjection of a negative liposome used to saturate the reticulo-endothelial system (Kamps et al., 1999).

Malignant tumours display both increased angiogenesis and chaotic microenvironment growth, mainly responsible for hyper vascularization, leaky vasculature, and poor lymphatic drainage (Maeda et al., 2000; Brannon-Peppas and Blanchette, 2004). It has been reported that long-circulating nanoparticles with PEG modifications on their surface were able to favour passive tumour targeting (Moghimi et al., 2001; Greenwald, 2001). Injection of our PEG-PLNP to C57BL/6 mouse bearing an *s.c.* implanted Lewis lung carcinoma (3LL) tumour in the inguinal region, allowed us to detect the tumour vasculature during the first 2 min following the injection. However no passive accumulation of our PLNP-PEG could be observed at longer time. In order to favour a passive accumulation

of PEG-PLNP in the tumour area we recently reported the influence of both diameter of the PLNP (80, 120 and 180 nm) and length of the PEG chain (5, 10 and 20 kDa). This study revealed that 6 h after intravenous injection of 80 nm PLNP-PEG_{10 kDa} in 3LL tumour bearing mice, $5.9 \pm 2.8\%$ of the injected dose were located within the tumour micro-environment (Maldiney et al., 2011).

In the present article, we describe the first targeting strategies for the design and functionalization of persistent luminescent nanoparticles with small targeting molecules. The first example is based on the functionalization of PLNP with biotin in order to evaluate their binding affinity on streptavidin coated plate. The second example is based on the functionalization of PLNP with Rak-2, recently reported for its affinity toward PC-3 cells (Byk et al., 2010). This second molecule was taken as an example in this study, but the approach could be extended to other targeting moieties (Byrne et al., 2008; Loomis et al., 2011). Special attention was directed to provide full characterization of the probes through several analytical tools such as infrared spectrophotometry, thermogravimetric analysis, and classical physico-chemical measurements (zeta potential, dynamic light scattering) as well as colloidal stabilities. Finally we discussed preliminary targeting results of PLNP-PEG-Biotin on streptavidin coated plate and PLNP-PEG-Rak-2 on PC-3 cells *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Inorganic salts (magnesium nitrate (Mg(NO₃)₂, 6H₂O), zinc chloride (ZnCl₂), calcium chloride (CaCl₂, 2H₂O), europium chloride (EuCl₃, 6H₂O), dysprosium nitrate (Dy(NO₃)₃, 5H₂O), manganese chloride (MnCl₂, 4H₂O)), and tetraethoxysilane (TEOS), used for the synthesis of PLNP were purchased from Aldrich. 3-Aminopropyltriethoxysilane, diglycolic anhydride and propyl amine, NHS-PEG-Biotin were obtained from Sigma–Aldrich. BOP reagent (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) was purchased from Advanced ChemTech. Triethylamine (>99.5%) and dimethylformamide (>99.9%) were purchased from SDS. COOH-PEG-OMe was purchased from IrisBiotech. Streptavidin coated plate were obtained from Nunc®. Boc-21-amino-hexa oxa heneicosanoic acid (Boc-PEG-COOH) (code no. BA19206) was purchased from NeoMPS, Inc. High resolution p-ESI mass spectra were acquired with a ultra-high resolution mass spectrometer, the hybrid linear ion trap LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). The analyses were performed using flow injection analysis (FIA) with Surveyor Autosampler and LC pump (Thermo Fisher Scientific). 20 µL of each sample (2 ng/µL of sample in MeOH solution) is injected in a continuous flow rate of MeOH at 100 µL/min. The electrospray voltage was set to 3.8 kV, the capillary voltage and the tube lens offset were set to 20 V and 70 V, respectively. The sheath gas flow (nitrogen) was optimized at 45 a.u. and the drying gas temperature was set to 275 °C. The mass resolving power (full width at half maximum height) was set at 6×10^4 FWHM.

2.2. Synthesis of PLNP

The PLNP were prepared using a procedure previously reported in our laboratory (le Masne de Chermont et al., 2009). Briefly, 126 mg of calcium chloride, 993 mg of magnesium nitrate, 527 mg of zinc chloride, 16 mg of europium chloride, 39 mg of dysprosium nitrate, 44 mg of manganese chloride, 4 mL of deionized water at pH 2 and 2 mL of TEOS were vigorously stirred at room temperature for 1 h and then warmed at 70 °C for 2 h (until the sol–gel transition occurred). The wet gel was then dried in an oven at 110 °C for 20 h to

remove water and ethanol. The resulting opaque dry gel was then fired at 1050 °C for 10 h in a zirconium crucible in a weak reductive atmosphere using 10% H₂, 90% Ar (Noxal 4, Air Liquide, Düsseldorf, Germany) to give white crystals.

2.3. Obtention of nanosized (80 and 180 nm) particles

Nanometer-sized particles were obtained by alkaline wet grinding of the solid (500 mg) for 15 min with a mortar and pestle in a minimum volume of 5 mM NaOH solution. Hydroxylation was then performed overnight by dispersing the ground powder in 50 mL of the same NaOH solution to get hydroxy-PLNP. Nanoparticles with a diameter of 180 nm were selected from the whole polydisperse colloidal suspension by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 4500 rpm for 5 min. They were located in the supernatant. The supernatants were gathered and concentrated to a final 5 mg/mL suspension. Nanoparticles with a diameter of 80 nm were obtained by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 4500 rpm for 30 min, the supernatant was concentrated from 50 mL to a final volume of 12 mL and a second centrifugation of the concentrated supernatant was realized on an Eppendorf MiniSpin Plus at 8000 rpm for 5 min. The resulting suspension was concentrated to a final amount of 5 mg/mL.

2.4. Synthesis of the small molecules

2.4.1. Boc-PEG-Rak-2

Trifluoroacetic acid (TFA) (1 mL) was added to a 5 mL round bottom flask containing 150 mg (0.32 mmol) of Rak-2 (synthesized as previously reported in Byk et al., 2010). The solution was stirred for 1 h at RT. Then, the TFA was removed under reduced pressure and the compound was dried in vacuum for 2 days. Then, 200 µL acetonitrile (CH₃CN) was added to the flask to dissolve the deprotected Rak-2 and a solution of Boc-(PEG)₆-OH (143 mg, 0.32 mmol) in 92 µL CH₃CN and BOP (155 mg, 0.352 mmol) were added. TEA (1.4 mmol, 200 µL) was added to the flask and the solution was stirred for 3 days. Then, CH₃CN was evaporated and the product was dried under vacuum to give a yellow oil. The residual oil was dissolved in 18 mL ethyl acetate and washed with water (10 mL $4 \times$), 1 M KHSO₄ (5 mL $3 \times$), 1 M NaHCO₃ (5 mL $3 \times$), saturated NaCl (5 mL $3 \times$) and dried over magnesium sulfate. The solvent was removed under vacuum. The obtained oil was dissolved in 5 mL MeOH and 140 mg Dowex 50 WX2-100 ion exchange resin (0.7 mmol/g) was added to the solution and stirred for 20 min to give 100 mg of pure product (40% yield). The product was fully analysed and deprotected with TFA for 1 h prior to conjugation to PLNPs. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (s, 1H, H-3'), 7.42 (m, 1H, H-2'), 6.40 (bs, 1H, H-4'), 5.66 (s, 1H, H-14), 4.12 (m, 2H, H-12), 3.71 (t, 2H, H-18), 3.65 (m, 20H, H-19 to H-21), 3.53 (t, 2H, H-22), 3.31 (t, J=5.1 Hz, 2H, H-23), 3.2 (m, 2H, H-5), 2.57 (t, J=6 Hz, 2H, H-17), 1.86 (m, 2H, H-2), 1.62–1.68 (m, 4H, H-2 + H-3), 1.44 (s, 9H, H-26), 1.11–1.32 (m, 16H, H-5 to H-10, H-3 + H-2 + H-4), 0.85 (t, J=7.2 Hz, 3H, H-11); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 171.78 (C-13), 168.90 (C-16), 167.861 (C-15), 156.03 (C-24), 143.36 (C-3'), 143.08 (C-2'), 118.98 (C-1'), 111.04 (C-4'), 70.54 (C-20), 70.39 (C-21, C-22), 70.20 (C-19), 67.04 (C-18), 55.24 (C-14), 48.58 (C-1), 46.11 (C-5), 41.62 (C-12), 40.50 (C-23), 36.47 (C-17), 28.41 (C-26), 22.47 (C-10), 14.01 (C-11), 32.74, 31.59, 29.35, 28.68, 26.77, 25.43, 24.71 (C-9, C-8, C-7, C-6, C-4, C-3, C-2). HRMS *m/z* calc. for C₄₁H₇₂N₄O₁₂ = 835.5039; found 835.507.

2.4.2. Boc-PEG-N-propyl amide

Boc-PEG-N-propyl amide was synthesized as Boc-PEG-Rak-2 but propylamine was used instead of deprotected Rak-2 as starting material. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.54 (bs, 1H, H-4), 5.10 (bs, 1H, H-19), 3.72 (t, J=4.2 Hz, 2H, H-17), 3.65 (m, 20H, H-7 to H-16), 3.54 (m, 2H, H-6), 3.31 (m, 2H, H-18), 3.21 (q, J=5.1 Hz, 2H,

H-3), 2.47 (t, $J=4.2$ Hz, 2H, H-5), 1.52 (sextet, $J=5.4$ Hz, 2H, H-2), 1.44 (s, 9H, H-20), 0.91 (t, $J=5.4$ Hz, 3H, H-1); HRMS m/z calc. for $C_{18}H_{39}O_7N_2 = 395.2751$; found 395.2760.

2.5. Surface modification

PLNP functionalized with Rak-2 and N-propyl amide (as negative control) were obtained from 80 or 180 nm hydroxy-PLNP. First, amino-PLNP were obtained from 200 mg of hydroxy-PLNP (80 or 180 nm), dispersed in 20 mL of dimethylformamide (DMF), to which 100 μ L of 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES) was added under constant stirring. The suspension was then stirred overnight at room temperature. A series of centrifugation and redispersion in DMF were performed to wash the excess of APTES.

For binding assays on streptavidin plate, 4 mg of amino-PLNP (180 nm core) were reacted either with 100 mg of NHS-PEG-Biotin in 10 mL of DMSO or with 40 mg of COOH-PEG-OMe and 40 mg of BOP reagent in 2 mL of DMF. The suspensions were stirred for 10 h and the excess of reagent was removed by centrifugation.

For binding assays on PC-3 cells, carboxyl-PLNP were obtained starting from 20 mg of amino-PLNP redispersed in 7 mL of DMF to which diglycolic anhydride (5.4 mg, dissolved in 1 mL of DMF) were added. The suspension was stirred overnight at room temperature. Again, the excess of reactant was removed by the washing procedure. Finally, 19 mg of BOP dissolved in 2 mL of DMF were prepared and 400 μ L of this solution added to 5 mg of carboxy-PLNP and 10 μ mol of NH_2 -(PEG)₆-Rak-2 or NH_2 -(PEG)₆-N-propyl amide were added plus 5 μ L of triethylamine. The mixture was stirred for 16 h and sonicated the first 2 h. The excess of reactant was removed by the washing procedure.

2.6. Characterization of functionalized PLNP

Each type of nanoparticles was characterized by different techniques. Dynamic light scattering and zeta potential measurements in 20 mM NaCl were performed on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA) equipped with a 632.8 nm helium neon laser and 5 mW power, with a detection angle at 173° (non-invasive back scattering). FT-IR spectra of PLNP-PEG-Rak-2 and PLNP-PEG-N-propyl amide were recorded on an Irtaffinity-1 spectrophotometer from Shimadzu. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Setaram Setsys evolution 1600 (Argon atmosphere, temperature range: from 20 °C to 780 °C, 10 °C/min) on 10 mg of dry samples of 180 nm core PLNP, at each functionalization step. Briefly, for TGA analysis, the sample is gradually heated from 20 °C to 780 °C under argon atmosphere, and precision scales allow monitoring the weight loss as a function of temperature. Colloidal stabilities in DMEM culture medium of N-propyl amide or Rak-2 functionalized PLNP were determined by following the hydrodynamic diameter of the PLNP over 50 min after dispersion in DMEM.

2.7. Binding on streptavidin plate

To investigate the ability of the biotinylated PLNP to interact with streptavidin, we used a 96 wells Nunc® plate passively coated with streptavidin (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). After being washed three times with a 0.05% PBS/Tween 20 solution, 100 μ L of a 1 mg/mL suspension of nanoparticles dispersed in PBS, were deposited on the plate, incubated for 1 h at room temperature and washed three times to remove the unfixed nanoparticles. The amount of PLNP present on the plate was determined by luminescence detection using Wallac Victor² Multilabel Counter from Perkin Elmer (excitation filter: D355, emission filter: D615, counting delay: 1 ms, counting window: 5 ms, counting cycle: 6.1 ms).

Table 1

Zeta potential in 20 mM NaCl of the differently coated PLNP.

Nanoparticles	Zeta potential (mV)
Hydroxy-PLNP	-40
Amino-PLNP	+35
Carboxy-PLNP	-30
PLNP180-PEG-Rak-2	-16
PLNP180-PEG-N-propyl amide	-11
PLNP80-PEG-Rak-2	-13
PLNP80-PEG-N-propyl amide	-7

2.8. Cell culture

PC-3 cells, obtained from ATCC, were cultured in Nutrient Mixture Kaighn's Modification medium (F-12K) supplemented with 10% fetal calf serum, and antibiotics (100 μ g/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin). Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.9. In vitro binding study to PC-3 cells

PC-3 cells were seeded in flat bottom 96-well at a density of 10⁴ cells/well and grown overnight in 100 μ L medium. For binding assay, each type of nanoparticle was incubated for either 15 or 30 min in complete DMEM culture medium. Cells were then washed three times with 10 mM PBS before luminescence detection using Wallac Victor² Multilabel Counter from Perkin Elmer (excitation filter: D355, emission filter: D615, counting delay: 1 ms, counting window: 5 ms, counting cycle: 6.1 ms).

3. Results and discussions

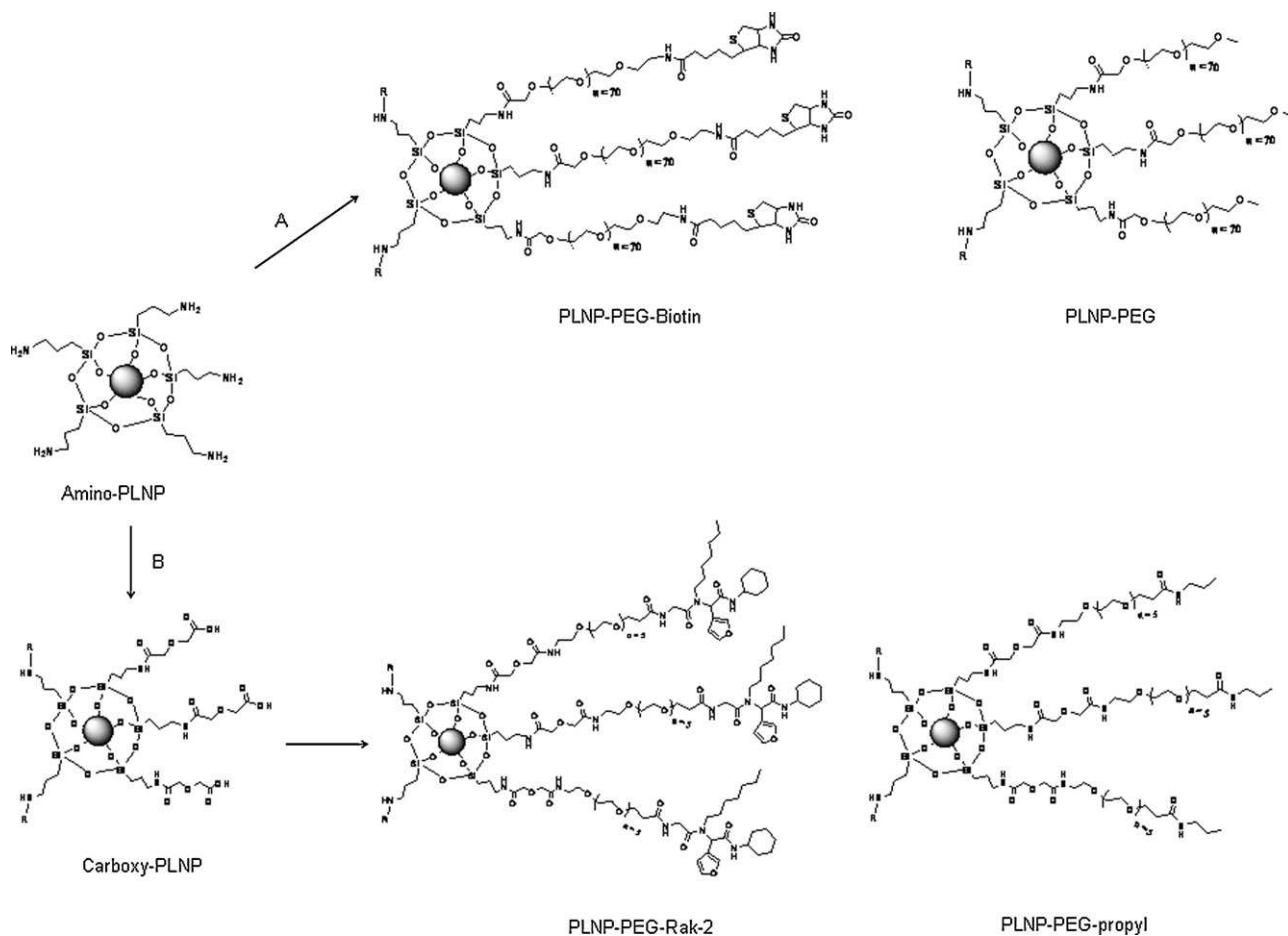
3.1. Synthesis of PLNP and functionalization with small molecules

Starting from 500 mg of crude PLNP, the hydroxylation process followed by centrifugation steps allowed us to isolate 10 mg (2% of total amount) of small (80 nm) hydroxy-PLNP₈₀ and 150 mg (30%) of larger (180 nm) hydroxy-PLNP₁₈₀ (Maldiney et al., 2011). These hydroxy-PLNP (80 and 180 nm) were reacted with APTES to give amino-PLNP. Then reaction were done either with NHS-PEG-Biotin or with COOH-PEG-OMe to give respectively PLNP-PEG-Biotin or PLNP-PEG (Scheme 1A). In parallel, reaction of amino-PLNP with diglycolic anhydride give carboxy-PLNP which reacted either with NH_2 -PEG-Rak-2 or with NH_2 -PEG-N-propyl amide to give respectively PLNP-PEG-Rak-2 or PLNP-PEG-propyl (Scheme 1B).

3.2. Characterization of the functionalized nanoparticles

3.2.1. Zeta potential

Each surface modification introduces molecules responsible for a characteristic global charge on the edge of the particles. Measurement of zeta potential (ZP) thus allows qualitative monitoring of all functionalization steps. Measurements were done using a Zetasizer Nano ZS from Malvern Instruments. As shown in Table 1, before any functionalization, hydroxy-PLNP display a net negative potential, attributed to the presence of silanol groups covering the probe. Amino-PLNP intermediate is characterized by a straight positive ZP due to amino groups on the surface which are protonated at physiological pH. The amino-PLNP were either functionalized by PEG-biotin (or PEG-OMe) for streptavidin binding assay, giving nanoparticles with ZP ~0 mV, or converted to carboxy-PLNP, with a global negative charge, attributed to the carboxylic acid functions. Grafting of PEG-N-propyl amide or PEG-Rak-2 on the surface of the particles led to a significant increase in ZP values, as compared to carboxy-PLNP, switching from highly negative ZP values (-30 mV) to a potential closer to neutrality (from -7 to -16 mV). This shift



Scheme 1. Functionalization of PLNP. (A) NHS-PEG-Biotin, DMSO or COOH-PEG-OMe, DMF. (B) Diglycolic anhydride, DMF, then NH₂-PEG-N-propyl amide, BOP, TEA, DMF, overnight or NH₂-PEG-Rak-2, BOP, TEA, DMF, overnight.

can either be attributed to the disappearance of carboxyls which were transformed into amide bounds during the functionalization process with small molecules, or to the ligands PEG spacer, which partly masked the remaining carboxylic groups. Yet, we notice a little charge difference between N-propyl amide and Rak-2 functionalized PLNP. This deviation is certainly related to the remaining carboxyl groups on the surface of PLNP, which are fewer with N-propyl amide than with Rak-2. Indeed, given the large size of Rak-2 molecule as compared to N-propyl amide, steric hindrance is very likely to be responsible for this effect, limiting accessibility of the ligand to the surface of PLNP.

3.2.2. FT-IR spectra

FT-IR spectra of 180 nm PLNP after each step of the functionalization are presented in Fig. 1. Hydroxy-PLNP spectrum shows characteristic band of silicate powder at 1630 cm⁻¹ (Fig. 1A). After reaction with APTES, the appearance of C–H stretch bands at 2940 cm⁻¹ and at NH₂ bend at 1619 cm⁻¹ (Fig. 1B) are characteristic of the presence of amine on silica nanoparticles (Shen et al., 2004). After reaction with diglycolic anhydride two characteristic peaks at 1640 cm⁻¹ (amide bond) and 1425 cm⁻¹ (CH₂COO) are visible in Fig. 1C. Finally, the introduction of PEG-Rak-2 molecule on PLNP was confirmed by the presence of new peaks at 1540 cm⁻¹ (C–N bond) and 2933 cm⁻¹ (CH₂ stretching, Fig. 1D), which are characteristic of the presence of the polyethylene glycol chain (Oh et al., 2009). Similar spectra were obtained with 80 nm PLNP.

3.2.3. Thermogravimetric analysis

Weight loss curves for 180 nm PLNP-PEG-Rak-2, as well as all intermediates, were obtained by thermogravimetric analysis (TGA) (Fig. 2). From amino-PLNP₁₈₀ to PLNP₁₈₀-PEG-Rak-2, we clearly distinguish two stages in surface decomposition. First, water trapped in the organic layer on the surface of PLNP evaporates before

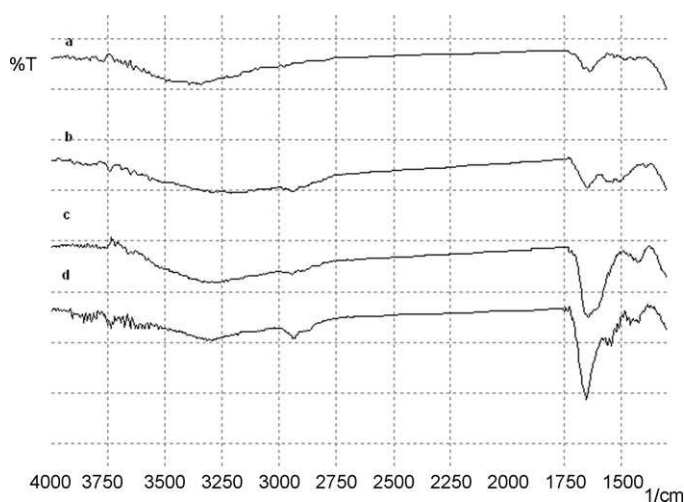


Fig. 1. FT-IR spectra of functionalized 180 nm PLNP. (A) Hydroxy-PLNP; (B) amino-PLNP; (C) carboxy-PLNP; (D) PLNP-PEG-Rak-2.

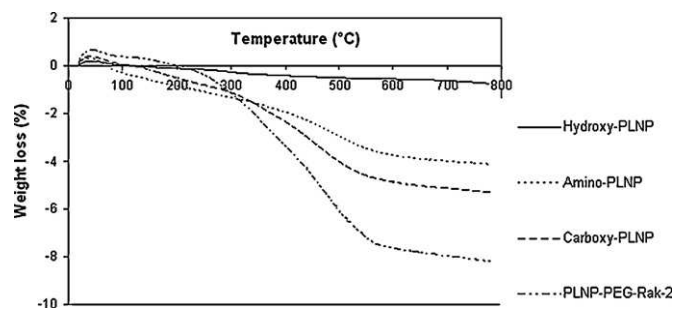


Fig. 2. Weight loss curves for 180 nm PLNP with different surface coverage.

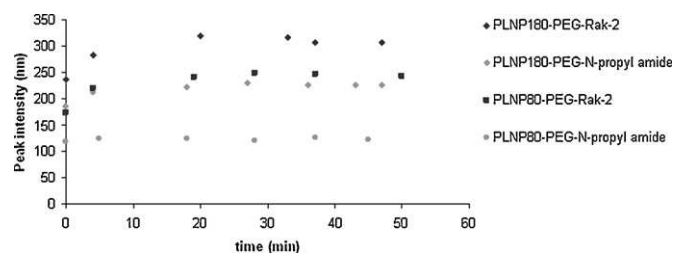


Fig. 3. Colloidal stabilities of 80 and 180 nm PLNP-PEG-Rak-2 and PLNP-PEG-N-propyl amide.

325 °C. The second stage begins after 325 °C and corresponds to the decomposition of organics present on the nanoparticles. Calculated values from weight loss percentage indicate that in the case of PLNP₁₈₀-PEG-Rak-2, the concentration of ligand on the surface of the nanoparticles reaches about 40 nmol/mg of PLNP. This value, which approximately corresponds to 70,000 Rak-2 molecules per nanoparticle, is consistent with our previous study on PEG-PLNP, in which we had shown that the higher the PEG molecular weight, the fewer chains remain on the surface (about 15 nmol/mg of PLNP for 5 kDa PEG) (Maldiney et al., 2011). In the case of PEG-Rak-2, the ligand molecular weight is about 7 times lighter than 5 kDa PEG, thus less affected by steric hindrance and more likely to gain access to nanoparticles surface. This is certainly the reason why we observe such a high value of Rak-2 ligand covalently linked to PLNP (40 nmol/mg) compared to heavier polymer chains.

3.3. Colloidal stability in assay medium

The colloidal stability of the 4 types of nanoparticles (80 and 180 nm PLNP-PEG-Rak-2 and PLNP-PEG-N-propyl amide) were

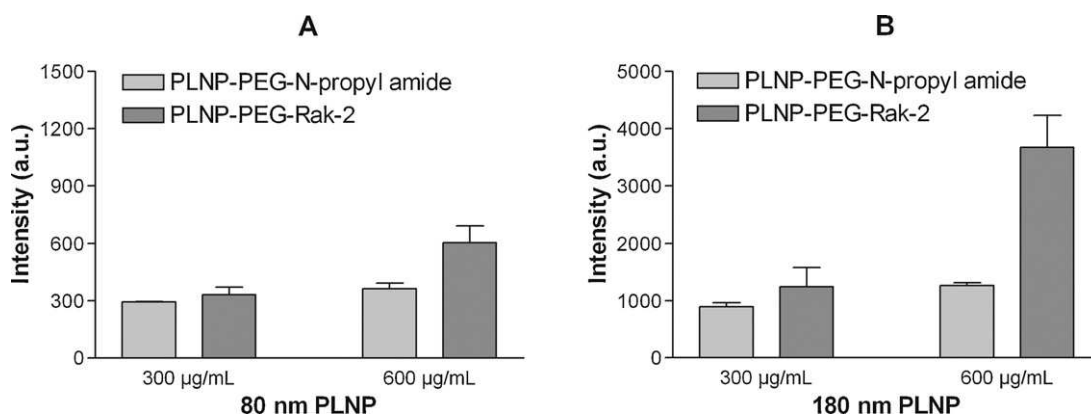


Fig. 4. *In vitro* binding study on PC-3 cells. (A) 80 nm PLNP; (B) 180 nm PLNP. Histograms represent the intensity of luminescence in arbitrary unit (a.u.) after 30 min binding of PLNP on malignant cells.

Table 2

Binding study on streptavidin coated plate. The intensity of luminescence in arbitrary unit (a.u.) after 60 min binding is dependent of the amount of PLNP retained on the plate.

Nanoparticles	Intensity (a.u.)
PLNP-PEG	2000
PLNP-PEG-Biotin	13,000
Biotinylated antibody + PLNP-PEG-Biotin	2000

studied in DMEM culture medium at 2 concentrations (300 and 600 µg/mL) for 50 min. Results concerning the concentration of 300 µg/mL are reported in Fig. 3. From this figure, we can deduce that the 4 types of PLNP are stable in culture medium for at least 50 min. No important increase of the size of each PLNP could be noticed. We also observe that the PLNP functionalized with the Rak-2 molecule (black spots in Fig. 3) always stabilized at a size higher than PLNP functionalized with N-propyl amide (grey spots). The hydrophobic nature of the Rak-2, as compared to N-propyl amide, could be responsible for this difference. However in all cases, stable suspensions of nanoparticles were obtained, which is a prerequisite for *in vitro* assays. Similar results are obtained at 600 µg/mL (data not shown).

3.4. Binding assay on streptavidin plate

Two types of nanoparticles have been prepared: PLNP-PEG and PLNP-PEG-Biotin, dispersed in PBS at a concentration of 1 mg/mL. These nanoparticles (100 µL) were deposited on a streptavidin plate, incubated for 30 min and washed. The quantity of PLNP retained on the streptavidin plate was determined using time-resolved fluorescence. As can be seen in Table 2, the immobilization of the PLNP on the plate is dependent of the presence of biotin: no immobilization occurred with PLNP-PEG, which is coherent with previous results (Longo and Szelefer, 2005). Moreover, we have shown that the immobilization of the PLNP was specific to biotin since a dramatic decrease of PLNP immobilized on the plate was observed when the plate was first incubated with biotinylated antibodies, which saturate the biotin binding site of immobilized streptavidin.

3.5. *In vitro* assays on PC-3 cells

In vitro binding assays were performed on the human prostate cancer PC-3 cell line which has been shown to specifically bind the Rak-2 molecule (Byk et al., 2010). Fig. 4 reports the intensity of PLNP luminescence detected after a 30 min incubation of PLNP on PC-3 cells. Experiments were conducted with either Rak-

2 or N-propyl amide-covered PLNP, with different core diameters (80 and 180 nm), and at two concentrations (300 and 600 µg/mL). The amount of PLNP retained on the cell layer highly depends on both the concentration of the suspension and the nature of the molecules grafted on the surface. Results in Fig. 4A show that at the highest concentration (600 µg/mL), large Rak-2-covered PLNP (180 nm core diameter) bind about 2.9 times more efficiently than non targeted PLNP. A weaker but similar trend is observed with 80 nm PLNP (Fig. 4B), where Rak-2 signal appears only 1.5 times brighter than the negative control. This size-dependent efficiency gap between 80 nm and 180 nm PLNP could either be the result of a combined gravitational-targeting effect (Gentile et al., 2008), which is naturally increased for larger particles (more likely to drift toward cell layer). Alternatively, this difference could be related to an avidity effect as a 180 nm nanoparticle would probably display more available Rak-2 ligands to bind PC-3 cell than smaller 80 nm PLNP (Hong et al., 2007; Simnick et al., 2010). This first binding study provides interesting preliminary results on the ability of Rak-2 functionalized PLNP to target PC-3 cells. However, additional work is needed, especially control binding on other cell lines (prostate non-cancer primary cells, for example), in order to ensure that such preferential binding on PC-3 cells is really specific to the presence of Rak-2 on the nanoparticles.

4. Conclusion

We have successfully synthesized and functionalized an original bioimaging probe, based on persistent luminescence nanoparticles, with two small targeting molecules: biotin and Rak-2. The latter was shown to be highly stable in complete DMEM culture medium, no matter how large the core diameter or high the concentration of the suspension. Pursuing the idea that such functionalized nanoparticles could be used as future sensitive optical probes for cancer imaging, we reported preliminary results showing immobilization of PLNP-PEG-Biotin on streptavidin plate and binding of PLNP-PEG-Rak-2 on prostate cancer cells.

Acknowledgements

This work has been supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project no. ANR-08-NANO-025) and by the Region Ile-de-France (In Actio project no. I07-876/R). G. Byk is indebted to the Israel-USA Binational Science Foundation (BSF 1998378) and to the AFIRST Israel/France (programs of the French Ministry of Foreign Affairs and the Israeli Ministry of Sciences). R. Khandadash would like to express his sincere gratitude to the Israel Council for Higher Education for waiving the Converging Technologies Fellowship, to BIU President Scholarships for waiving fellowship and to the Marcus Center for Medicinal Chemistry for their continuous support.

References

Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O., 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1649–1659.

- Bruchez, M.J., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A.P., 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281, 2013–2016.
- Byk, G., Partouche, S., Weiss, A., Margel, S., Khandadash, S., 2010. Fully synthetic phage-like system for screening mixtures of small molecules in live cells. *J. Comb. Chem.* 12, 332–345.
- Byrne, J.D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L., 2008. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1615–1626.
- Chan, W.C.W., Nie, S., 1998. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 281, 1016–1018.
- Frangioni, J.V., 2003. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 626–634.
- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W.K., Nie, S., 2004. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 22, 969–976.
- Gentile, F., Curcio, A., Indolfi, C., Ferrari, M., Decuzzi, P., 2008. The margination propensity of spherical particles for vascular targeting in the microcirculation. *J. Nanobiotechnol.* 6, 1–9.
- Greenwald, R.B., 2001. PEG drug: an overview. *J. Controlled Release* 74, 159–171.
- Hong, S., Leroueil, P.R., Majaros, I.J., Orr, B.G., Baker, J.R., Banaszak Holl, M.M., 2007. The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chem. Biol.* 14, 107–115.
- Kamps, J.A., Morselt, H.W.M., Scherphof, G.L., 1999. Uptake of liposomes containing phosphatidylserine by liver cells *in vivo* and by sinusoidal liver cells in primary culture: *in vivo-in vitro* differences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 57–62.
- Kogure, T., Karasawa, S., Araki, T., Saito, K., Kinjo, M., Miyawaki, A., 2006. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat. Biotechnol.* 24, 577–581.
- le Masne de Chermont, Q., Chanéac, C., Seguin, J., Pelle, F., Maitrejean, S., Jolivet, J.-P., Gourier, D., Bessodes, M., Scherman, D., 2007. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9266–9271.
- le Masne de Chermont, Q., Richard, C., Seguin, J., Chanéac, C., Bessodes, M., Scherman, D., 2009. Silicates doped with luminescent ions: useful tools for optical imaging applications. *Proc. of SPIE* 7189, 71890B/1–71890B/9.
- Longo, G., Szeleifer, I., 2005. Ligand–receptor interactions in tethered polymer layers. *Langmuir* 21, 11342–11351.
- Loomis, K., McNeely, K., Bellamkonda, R.V., 2011. Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications. *Soft Matter* 7, 839–856.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Controlled Release* 65, 271–284.
- Maldiney, T., Richard, C., Seguin, J., Wattier, N., Bessodes, M., Scherman, D., 2011. Effect of core diameter, surface coating and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescent nanoparticles in mice. *ACS Nano* 5, 854–862.
- Maysinger, D., Behrendt, M., Lalancette-Hebert, M., Kriz, J., 2007. Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: *in vivo* screening model system for biocompatibility of nanoparticles. *Nano Lett.* 7, 2513–2520.
- Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S., 2005. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science* 307, 538–544.
- Moghimi, S.M., Hunter, C., Murray, J.C., 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 53, 283–318.
- Ntziachristos, V., 2006. Fluorescence molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 1–33.
- Oh, C., Lee, Y.-G., Choi, T.-S., Jon, C.-U., Oh, S.-G., 2009. Facile synthesis of PEG-silica hybrid particles using one-step sol-gel reaction in aqueous solution. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 349, 145–150.
- Simnick, A.J., Valencia, C.A., Liu, R., Chilkoti, A., 2010. Morphing low-affinity ligands into high-avidity nanoparticles by thermally triggered self-assembly of a genetically encoded polymer. *ACS Nano* 4, 2217–2227.
- Shen, G., Horgan, A., Levicky, R., 2004. Reaction of N-phenyl maleimide with aminosilane monolayers. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 35, 59–65.
- Storhoff, J.J., Elghanian, R., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., 1998. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1959–1964.
- Taton, T.A., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., 2000. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 289, 1757–1760.

In Vitro Targeting of Avidin-Expressing Glioma Cells with Biotinylated Persistent Luminescence Nanoparticles

Thomas Maldiney,[†] Minna U. Kaikkonen,^{*,‡} Johanne Seguin,[†] Quentin le Masne de Chermont,[†] Michel Bessodes,[†] Kari J. Airene,[‡] Seppo Ylä-Herttua,^{‡,§,||} Daniel Scherman,[†] and Cyrille Richard^{*,†}

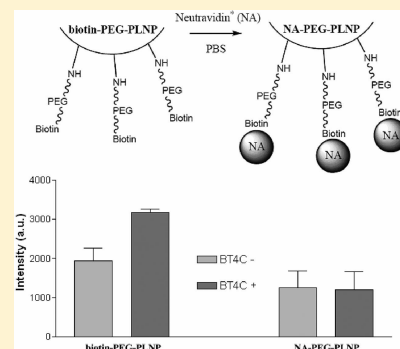
[†]Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, CNRS, UMR 8151, Inserm, U 1022, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 Cedex, and ENSCP, Chimie Paristech, Paris, F-75231 Cedex, France

[‡]A.I. Virtanen Institute, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, University of Eastern Finland, FIN-70211 Kuopio, Finland

[§]Gene Therapy Unit and ^{||}Department of Medicine, Kuopio University Hospital, P.O. Box 1777, FI-70211 Kuopio, Finland

Supporting Information

ABSTRACT: Far red emitting persistent luminescence nanoparticles (PLNP) were synthesized and functionalized with biotin to study their targeting ability toward biotin-binding proteins. First, the interaction of biotin-decorated PLNP with streptavidin, immobilized on a plate, was shown to be highly dependent on the presence of a PEG spacer between the surface of the nanoparticles and the biotin ligand. Second, interaction between biotin-PEG-PLNP and free neutravidin in solution was confirmed by fluorescence microscopy. Finally, in vitro binding study on BT4C cells expressing lodavin fusion protein, bearing the extracellular avidin moiety, showed that such biotin-covered PLNP could successfully be targeted to malignant glioma cells through a specific biotin–avidin interaction. The influence of nanoparticle core diameter, incubation time, and PLNP concentration on the efficiency of targeting is discussed.



INTRODUCTION

Optical imaging techniques have great potential to help us further understand biological processes at the molecular level and provide excellent tools for sensitive cancer diagnosis, particularly at the early stage of cancer development.¹ Biological optical imaging greatly relies upon the use of sensitive and stable optical labels. So far, organic dyes,^{2,3} quantum dots,^{4–6} and metal nanoparticles^{7–9} are the most commonly used optical labels, but they also come with essential limitations. Organic dyes suffer from a short observation time, partly due to photobleaching, poor stability under physiological conditions, and limited Stokes shift. Although quantum dots display good photostability, size-dependent emissions, and high quantum yield, they still require constant excitation, which is responsible for undesirable autofluorescence and elevated background signal that reduce the sensibility of the assay.^{10,11}

To overcome some of the inherent problems encountered with optical imaging probes,¹² we have recently reported the sol–gel synthesis of inorganic near-infrared persistent luminescence nanoparticles (PLNP), also referred to as nanophosphors, with the formula $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ doped with luminescent ions (0.5% Eu^{2+} , 1% Dy^{3+} , and 2.5% Mn^{2+}), which are suitable for in vivo imaging.¹³ The key element of this technology resides in the ability to induce the optical excitation of the probe before systemic injection. The long lasting luminescence can last up to several hours and permits the

avoidance of the background noise originating from in situ excitation. An in vivo study in healthy and tumor-bearing mice revealed that PLNP biodistribution was highly dependent on surface charge, PEGylation, and core diameter of the particle. Small and stealth PEGylated PLNP were shown to circulate much longer, postponing the uptake from the reticulo-endothelial system (RES) and showing promise for future application in cancer imaging.¹⁴

We have previously constructed a fusion protein, lodavin, which is composed of avidin and the endocytotic low-density lipoprotein (LDL) receptor to target biotinylated molecules to cells of a desired tissue.¹⁵ Pursuing the idea that avidin–biotin technology holds great promise for targeted therapy and diagnosis,¹⁶ we recently produced a lentiviral vector expressing lodavin, allowing the long-term expression of avidin on the surface of transduced glioma cells. Targeting of biotinylated nanoparticles loaded with paclitaxel to lodavin-expressing tumor cells was able to significantly decrease cell viability, demonstrating the therapeutic potential of this approach for targeted cancer therapy.¹⁷

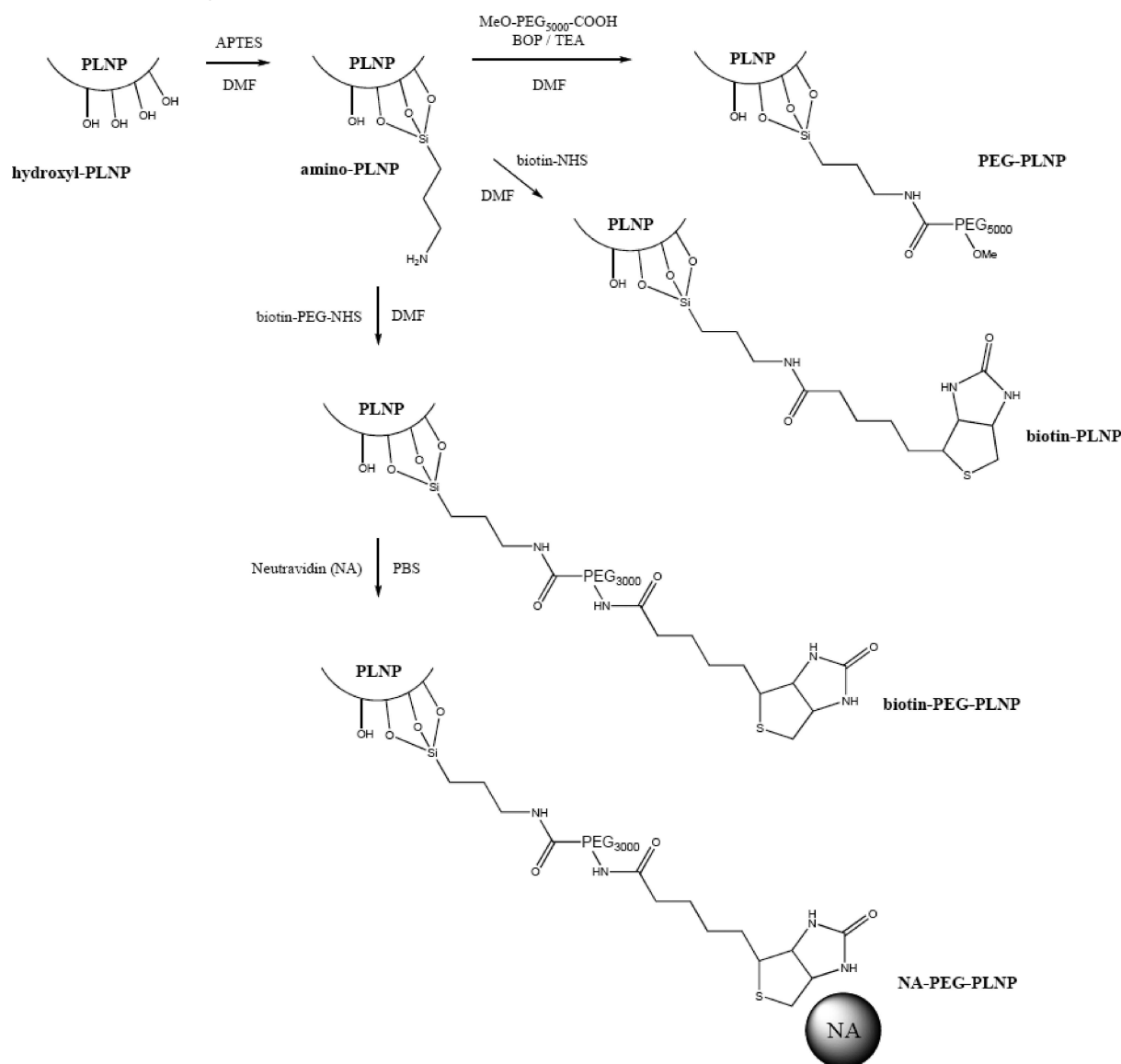
In this article, we focus on the avidin–biotin technology as a versatile approach to target red-emitting nanophosphors into

Received: September 14, 2011

Revised: December 15, 2011

Published: January 17, 2012

Scheme 1. Schematic Representation of PLNP Functionalization



tumor tissues or cells, taking advantage of the strongest noncovalent interaction found in nature ($K_a \cong 10^{15} \text{ M}^{-1}$).^{18,19} We report the first use of biotinylated persistent luminescence nanoparticles to target avidin-expressing glioma cells, paving the way for new avenues of noninvasive optical imaging.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. BOP reagent (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) was purchased from Advanced ChemTech. (3-Aminopropyl)-triethoxysilane (99%), (+)-biotin *N*-hydroxysuccinimide ester (>98%), NeutrAvidin-Tetramethylrhodamine conjugate, and *O*-[2-(biotinyl-amino)-ethyl]-*O'*-[3-(*N*-succinimidyl)oxy]-3-oxopropyl]polyethylene glycol (3,000 Da) were obtained from Sigma-Aldrich. Triethylamine (>99.5%) and dimethylformamide (>99.9%) were purchased from SDS. Alpha-methoxy-omega-carboxylic acid poly(ethylene glycol) (3,000 Da) was purchased from Iris Biotech GmbH. Streptavidin coated plates were obtained from Nunc.

PLNP Synthesis and Populations Selection. Crude and crystallized material was synthesized according to a previously described protocol based on a sol-gel approach followed by heating at 1050 °C under reducing atmosphere.²⁰ Nanometer-sized particles were obtained by basic wet grinding of the solid (500 mg) for 15 min with a mortar and pestle in a minimum volume of 5 mM NaOH solution. Hydroxylation was then performed overnight by dispersing the ground powder in 50 mL of the same NaOH solution to get hydroxyl-PLNP.

The first population of nanoparticles, with a diameter of 180 nm, was selected from the whole polydisperse colloidal suspension by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 4500 rpm for 5 min. When the centrifugation time was lengthened to 30 min, a second population of 120 nm PLNP was obtained. They were located in the supernatant by dynamic light scattering. The supernatants were gathered and concentrated to a final 5 mg/mL suspension.

PLNP Functionalization. Amino-PLNP (Scheme 1) were obtained by the addition of 20 μL of 3-aminopropyl-

triethoxysilane (APTES 99%, Sigma-Aldrich) to a suspension of 5 mg of hydroxyl-PLNP in 2 mL of dimethylformamide (DMF). The final concentration of APTES, related to the added volume of DMF, was 1% v/v. The reaction mixture was sonicated the first 15 min using a Branson Ultrasonic Cleaner 1210 and kept under vigorous stirring for 5 h. Particles were washed from the unreacted APTES by three centrifugation and redispersion steps in DMF.

PEGylated PLNP were obtained by stirring 10 μ mol of MeO-PEG-COOH (30 mg of MeO-PEG₃₀₀₀-COOH), 5 mg of BOP reagent, 5 μ L of triethylamine (TEA), and 5 mg amino-PLNP in 2 mL of DMF at room temperature for 12 h (Scheme 1). A similar washing procedure was used to remove the excess of PEG, BOP, and TEA. To ensure maximum PEG density, this functionalization step was performed overnight, under vigorous stirring, with a large excess of PEG and BOP reagent (20-fold molar excess compared to the free amino groups on the surface of amino-PLNP).

Biotin-PLNP (or biotin-PEG-PLNP) were obtained by stirring 10 μ mol of biotin-NHS (or biotin-PEG-NHS) and 5 mg of amino-PLNP in 2 mL of DMF at room temperature for 15 h (Scheme 1). Finally, NA-PEG-PLNP were obtained by incubation of 2.5 mg of biotin-PEG-PLNP for 2 h with 100 μ g of NeutrAvidin-Tetramethylrhodamine in PBS (Scheme 1). The resulting suspension was then centrifuged at 14 100 rpm for 5 min at room temperature to remove the excess of unbound proteins.

Each type of nanoparticle was characterized by using dynamic light scattering (DLS), trinitrobenzene sulfonate (TNBS qualitative test), to reveal free primary amines, and zeta potential measurements in 20 mM NaCl, performed on Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA) equipped with a 632.8 nm helium neon laser and 5 mW power, with a detection angle at 173° (noninvasive back scattering).

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Setaram Setsys evolution 1600 (Argon atmosphere, temperature range: from 20 to 780 °C, 10 °C/min) on 10 mg of the largest population of amino and biotin-PEG-covered PLNP (180 nm).

The interaction of NeutrAvidin-Tetramethylrhodamine conjugate (NA) with biotin-PEG-PLNP was assessed by fluorescence microscopy on an Axiophot fluorescence microscope (Carl Zeiss France, Le Pecq, France) using classical excitation and emission filters for rhodamine (545 nm excitation; 566 nm emission). Images were acquired with a Retiga 2000 CCD camera (Q Imaging, Canada).

In Vitro Binding of Biotinylated Nanoparticles on Streptavidin-Coated Plates. After being washed three times with a 0.05% PBS/Tween 20 solution, increasing amounts of nanoparticles (PEG-PLNP, biotin-PLNP, biotin-PEG-PLNP) dispersed in PBS were deposited on a 96 well Nunc plate passively coated with streptavidin (Nunc A/S, Roskilde, Denmark), incubated for 1 h at room temperature, and washed three times to remove the unbound nanoparticles. Red luminescence from PLNP after 320 nm excitation was used to follow their binding to streptavidin, using a Wallac Victor² Multilabel Counter from Perkin-Elmer (excitation filter, D355; emission filter, D615; counting delay, 1 ms; counting window, 5 ms; counting cycle, 6.1 ms).

Rat Glioma BT4C Cell Transduction. BT4C rat glioma cells (BT4C-) were transduced with 1:100 dilution of the Lodavin-viral stock. Three day post-transduction cells were stained with goat anti-avidinD (diluted 1:40; Vector

Laboratories) followed by Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-goat (1:200; Invitrogen) in 1% BSA and 10 mM HEPES in PBS. Positive cells (BT4C+) were separated by fluorescence-activated cell sorting and allowed to grow to confluency before freezing aliquots. The percentage of positive cells was monitored over several passages and was shown to remain constant (at least 55%).¹⁷

Cell Culture. BT4C cells were cultured in Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 μ g/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin). Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ humidified atmosphere.

Immunofluorescence Cellular Assay. BT4C rat glioma cells were fixed (4% paraformaldehyde), permeabilized, and saturated with a 3% BSA solution containing 0.1% Triton X100. They were then processed for indirect immunofluorescence as follows: cells were incubated overnight at 4 °C with a monoclonal anti-avidin antibody produced in mice (Sigma) at 1/2,000 dilution and further incubated with an antimouse fluorescein isothiocyanate (FITC) from Sigma at 1/400 dilution for 45 min in the dark at room temperature. The nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 1/7000 dilution factor. Bright field and fluorescence photographs were taken on an Axiophot fluorescence microscope (Carl Zeiss France, Le Pecq, France) using classical excitation and emission filters for fluorescein (488 nm excitation; 530 nm emission). Images were acquired with a Retiga 2000 CCD camera (Q Imaging, Canada).

In Vitro Binding of Biotinylated PLNPs on BT4C Glioma Cells. The BT4C cells were seeded in flat bottom 96-well at a density of 10⁴ cells/well and grown overnight in 100 μ L of medium. For binding assay, each type of nanoparticle, with either 120 or 180 nm core diameters, was incubated at the concentrations of 150 μ g/mL and 300 μ g/mL for 15 or 30 min at 37 °C in complete DMEM culture medium. Cells were then washed three times with 10 mM PBS before the detection of photoluminescence from PLNPs using a Wallac Victor² spectrophotometer (355 nm excitation; 670 nm emission).

Statistical Analysis. All analyses were performed using GraphPad Prism software. In vitro experimentation results on BT4C cells were analyzed with classical unpaired *t* test using two-tailed *P*-values. Results with *p* < 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

PLNP Characterization. First, both hydroxyl-PLNP populations were characterized by dynamic light scattering (DLS) measurements to ensure the successful extraction of two different size distributions of nanoparticles. Results shown in Figure S1 (Supporting Information) reveal the selection of two narrow populations: one centered on 120 nm and the other around 180 nm, both displaying good polydispersity index (PDI), close to 0.1. Surface functionalization was followed by zeta potential measurement and TNBS test after each reaction step. Silanol groups on hydroxyl-PLNP are responsible for a negative surface potential at neutral pH (ζ = -20 mV). Conversion to amino-PLNP was assessed by positive TNBS test (PLNP turn orange) and a global positive surface charge (ζ = +30 mV) due to primary amines covering the probe. After further functionalization with either PEG, biotin, or biotin-PEG, the PLNP surface became neutral (ζ around 0 mV) and returned a negative TNBS test (no coloration of the particles). Such evolution of zeta potential values is in complete

agreement with our previous study on the circulation of intravenously injected PEGylated PLNP in mice.¹⁴

The precise estimation of the amount of biotin on biotin-PEG-PLNP was obtained from weight loss curves for 180 PLNP by thermogravimetric analysis (TGA). Results in Figure 1 reveal two main stages in surface decomposition of both

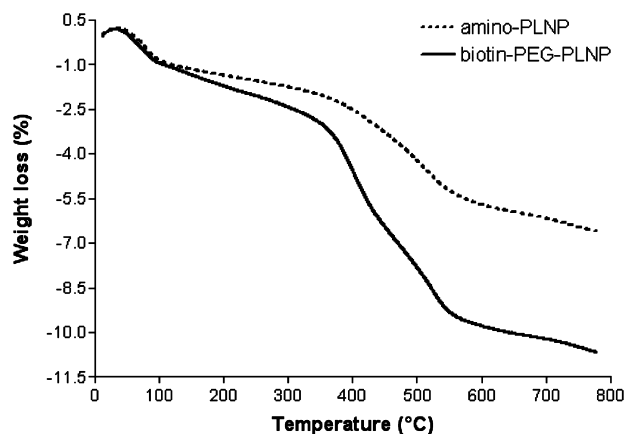


Figure 1. Weight loss curves for amino and biotin-PEG-functionalized 180 nm PLNP.

amino-PLNP and biotin-PEG-PLNP. First, water trapped in the organic layer on the surface of PLNP evaporates before 375 °C.

The second stage begins after 375 °C and corresponds to the decomposition of organic products, such as biotin, the APTES layer, and PEG coverage on the particles. We notice a clear stabilization in the decomposition dynamics after 550 °C. For this reason, by comparing mean weight loss percentages (average value in the 550–750 °C range) between amino-PLNP and biotin-PEG-PLNP, we could easily determine the amount of biotin-PEG grafted on the surface, therefore the approximate amount of biotin per unit mass of PLNP. Calculated values from weight loss percentages indicate that biotin concentration on biotin-PEG-PLNP reaches about 12.5 nmol/mg of PLNP. This value greatly corroborates our previous estimation of 5 kDa PEG concentration on similar PLNP: 15 nmol/mg.¹⁴

In Vitro Binding of Biotinylated Nanoparticles on Streptavidin-Coated Plates. To investigate the ability of the biotinylated PLNP to interact with streptavidin and study the influence of a PEG spacer on such interaction, we first focused on the binding of PLNP on passively coated streptavidin plates. Results from Figure 2A indicate that when using PEG-PLNP (circles) no nonspecific binding occurred since luminescence from particles was undetectable. Similarly, when biotin-PLNP were used (diamonds), no luminescence signal was detected indicating no binding of these nanoparticles on the streptavidin plate. It is possible that biotin, which is directly linked to the PLNP surface, cannot gain access to the streptavidin receptor. However, when the experiment was performed using biotin-PEG-PLNP (triangles), the luminescence was proportional to

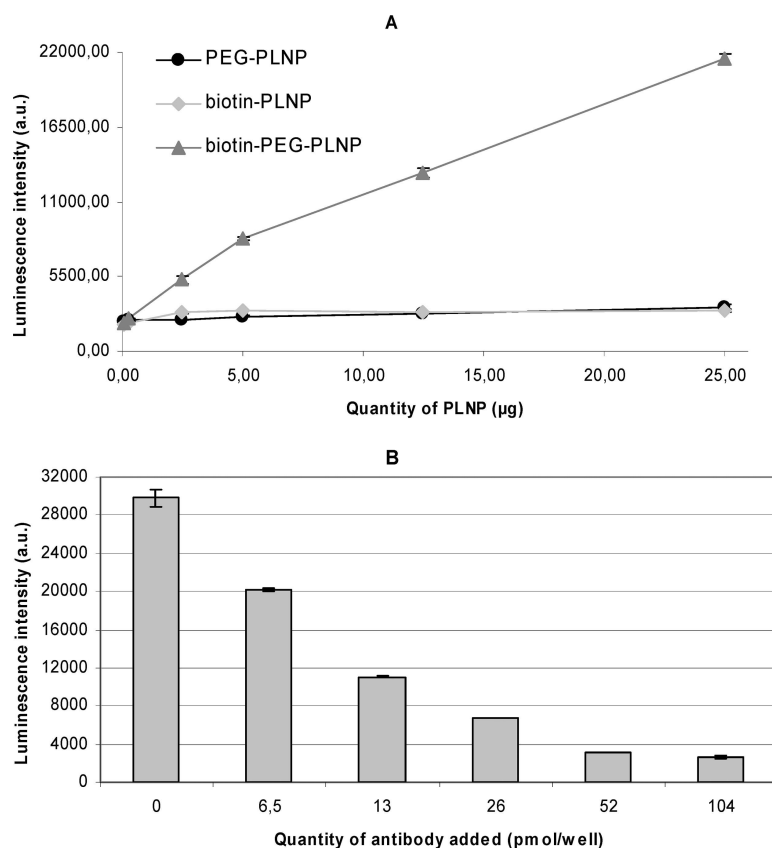


Figure 2. (A) Interaction of increasing amounts of PLNP with streptavidin coated on plates. (B) Effect of preincubation with a biotinylated antibody on the interaction of biotin-PEG-PLNP with streptavidin. In both cases, the signal corresponds to the detection of photoluminescence from PLNP using a Wallac Victor² spectrophotometer (355 nm excitation; 670 nm emission).

the quantity of nanoparticles deposited on the plate. Therefore, the PEG 3000 Da spacer appears to be essential for the interaction of biotin on plate-coated streptavidin. This result is in good agreement with several theoretical descriptions of the general ligand–receptor interaction in the presence of tethered polymer spacer.²¹ More precisely, Szeleifer's theoretical model applied to mimic the binding of biotin to streptavidin predicts that the spacer length is a critical parameter in the interaction and that longer PEG spacers would maximize biotin binding to its protein receptor.²²

To confirm that the interaction of biotin-PEG-PLNP with the streptavidin plate was ligand/receptor dependent and specific to biotin, a second set of experiments was realized using a streptavidin coated plate in which the biotin receptors of the protein were partially saturated with a biotinylated antibody. As seen in Figure 2B, as the amount of biotinylated antibody increases, the intensity of the luminescence signal decreases. These results indicate that the binding of biotin-PEG-PLNP to streptavidin is ligand/receptor dependent and that the interaction is undoubtedly specific to biotin.

Immunofluorescence Cellular Assay. The expression of avidin fusion protein on transduced BT4C cells, referred to as BT4C+, was assessed by immunofluorescence microscopy using FITC staining of the monoclonal antibody antiavidin and nuclear staining with DAPI (Figure 3A and B). BT4C+

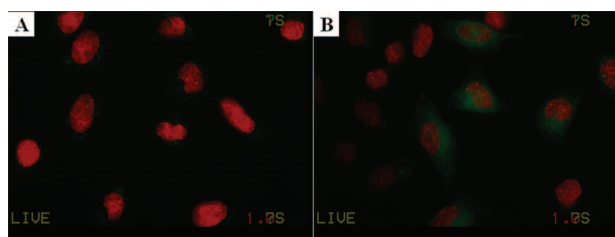


Figure 3. Immunofluorescence staining of wild-type BT4C (A) and transduced BT4C (B). Expression of iodavin appears in green in the photographs and DAPI staining of nuclei in red (field magnification: 400 \times).

cells displayed uniform FITC staining (green staining, Figure 3B) on the surface and in the cytoplasm of the cells, whereas in control BT4C cells, referred to as BT4C–, the green fluorescence was hardly detectable (Figure 3A). This result not only confirms the expression of iodavin on BT4C+ cells but also ensures the accessibility of avidin on their surface.

Fluorescence Microscopy of Neutravidin-Covered PLNP. The success of neutravidin interaction with biotin-PEG-PLNP was assessed by fluorescence microscopy. Results in Figure 4 show both biotin-PEG-PLNP (A,B) and NA-PEG-PLNP (C,D) under bright field (right) and after 545 nm of excitation (left). Before incubation with the protein, we can only distinguish PLNP under bright field observation (A), and the fluorescence signal does not reveal any particles (B). However, after neutravidin (NA) grafting, bright field (C) and fluorescence observations (D) reveal the exact same spots, corresponding to NA-PEG-PLNP. The interaction of neutravidin with nonbiotinylated PEG-PLNP did not lead to any fluorescence signal from rhodamine (data not shown).

Colloidal Stability in DMEM Culture Medium. Prior to any assay on glioma cells, PLNP colloidal stability in DMEM containing 10% FBS was studied for 25 min at different concentrations. Results in Figure 5 display the evolution of the

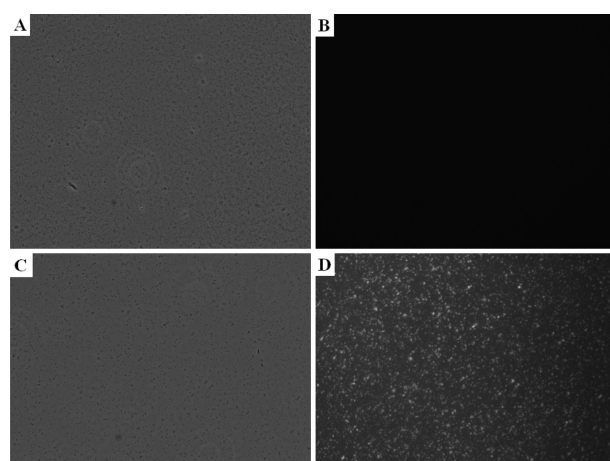


Figure 4. Bright field (A,C) and fluorescence micrographs (B,D) of biotin-PEG-PLNP (A,B) and NA-PEG-PLNP (C,D). We used classical excitation and emission filters for rhodamine (545 nm excitation; 566 nm emission). Images were acquired with a retiga 2000 CCD camera (Q Imaging, Canada).

hydrodynamic diameter of PLNPs at 150 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in culture medium for both populations (120 nm PLNPs in Figure 5A and 180 nm PLNPs in Figure 5B). First, we notice a clear stabilization of the hydrodynamic diameter in all conditions after approximately 10 min. Interestingly, neutravidin grafted on large particles (180 nm PLNP) does not seem to have any influence on the hydrodynamic diameter stabilization value of biotin-PEG-PLNP. Such behavior has already been witnessed on gelatin nanoparticles with similar size, on which neutravidin grafting did not seem to be responsible for any increase of hydrodynamic diameter, given the large nanoparticle core.²³ However, a different trend appears for smaller probes (120 nm PLNP) covered with neutravidin which stabilizes 50 nm above their initial value in the absence of protein coating, corresponding to a diameter 1.5 times larger than the initial one in the culture medium. This effect is very likely to be associated with the core diameter of the probe. Indeed, it is now well established that colloidal stability highly depends on the particle size and surface coverage.²⁴ Reimhult et al. observed the same trend when grafting neutravidin on small iron oxide nanoparticles and reported a 1.5 times increase of their hydrodynamic diameter value after the protein coverage in PBS.²⁵ Again, a noticeable increase in size upon addition of neutravidin has already been observed on 110 nm wide biotin-PEG-PLGA nanoparticles.²⁶ In the case of our PLNP, although the neutravidin protein is characterized by a high molecular weight as well as the relative large size of about 6 nm,²⁷ it is very unlikely to be the only cause to such an increase of the hydrodynamic diameter. As the measurements are realized in DMEM supplemented with 10% FBS, this size effect could be the result of a protein association between neutravidin and proteins from the serum.

In Vitro Binding of Biotinylated PLNPs on BT4C Glioma Cells. The in vitro binding of biotinylated PLNPs was studied on BT4C cells transduced with the avidin-fusion protein (BT4C+) as well as on control BT4C cells (BT4C–) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in DMEM culture medium. As mentioned above, the interaction of biotin-PEG-PLNP with neutravidin was ensured by fluorescence microscopy (Figure 4). In order to unveil the best binding conditions and favor biotinylated-PLNP inter-

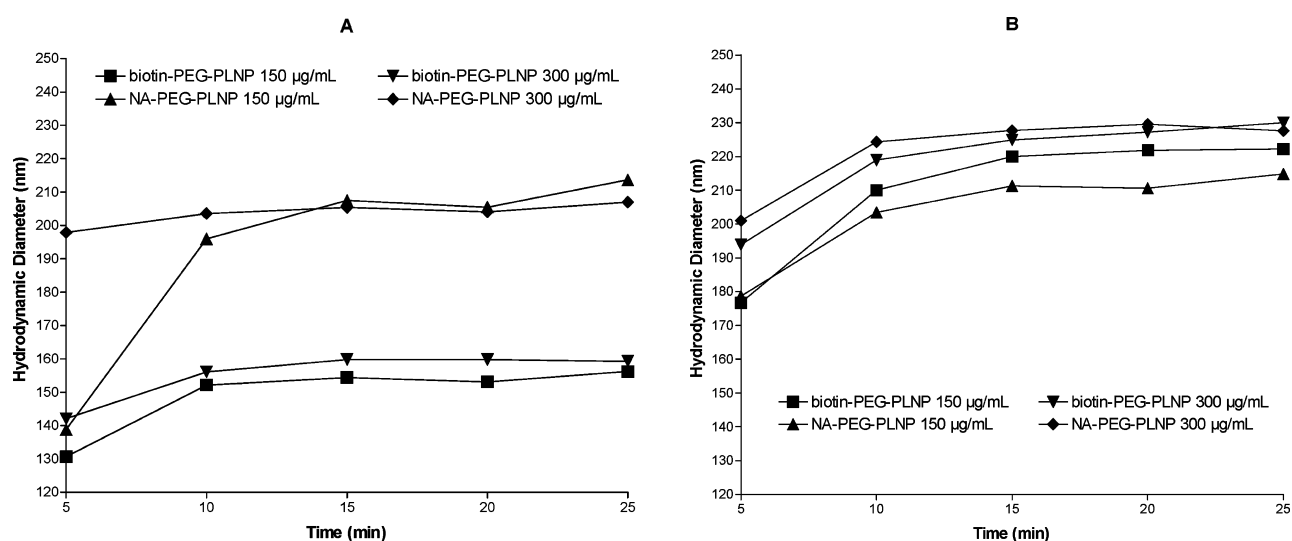


Figure 5. Colloidal stability obtained from DLS measurements of PLNP with either 120 nm core diameter (A) or 180 nm core diameter (B) in DMEM culture medium supplemented with 10% FBS.

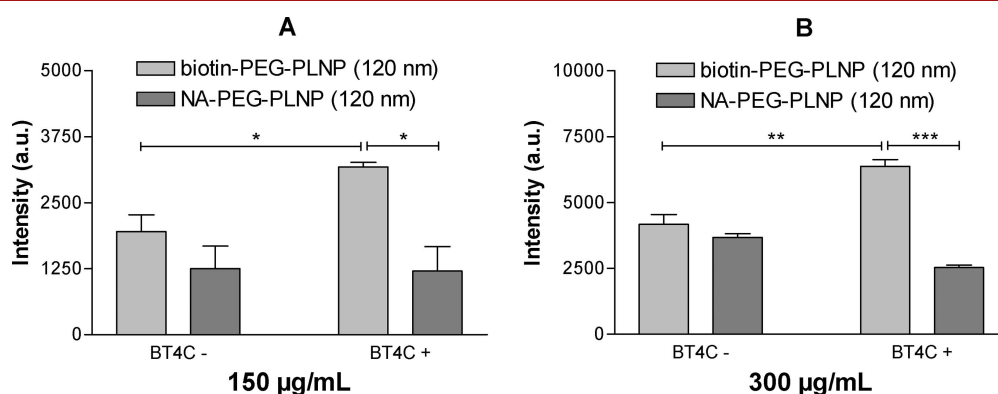


Figure 6. In vitro binding study on BT4C cells after 30 min of incubation at 37 °C with PLNP at 150 µg/mL (A) or 300 µg/mL (B). The signal corresponds to the detection of persistent luminescence from PLNP using a Wallac Victor² spectrophotometer (355 nm excitation; 670 nm emission).

action with cells, we studied the influence of particle concentration, hydrodynamic diameter, and binding time on the targeting of BT4C cells in vitro. Results in Figure 6 show the luminescence intensity from PLNP (120 nm core diameter) after 30 min of incubation time on both BT4C⁻ and BT4C⁺ in DMEM. We noticed a similar trend for 150 µg/mL and 300 µg/mL concentrations. In both cases, biotinylated nanoparticles bound more efficiently to glioma cells expressing the avidin fusion protein (about 60% more signal than on control cells), indicating successful biotin-mediated targeting. However, in order to confirm the specific function of biotin in lodavin targeting and evaluate the proportion of binding related to endogenous biotin-binding proteins (other than lodavin), we achieved a similar assay with NA-PEG-PLNP, on which accessible biotins were saturated with neutravidins. We noticed a significant decrease in particle binding with both BT4C⁻ and BT4C⁺ cells after biotin saturation with neutravidin (Figure 6). First, the results on BT4C⁻ confirm the idea that part of the biotin-PEG-PLNP binding on BT4C cells is associated with endogenous biotin-binding proteins, unable to interact with NA-PEG-PLNP after biotin saturation. However, the comparison with the BT4C⁺ histogram ensures that the preferential

binding of biotin-PEG-PLNP on BT4C cells expressing the fusion protein occurs through a specific interaction of biotin with the avidin moiety of lodavin. We observed the exact same trends following the binding of larger particles (180 nm core diameter) for 15 min (Figure S2, Supporting Information), yet accompanied with a significant decrease in biotin-PEG-PLNP selectivity toward lodavin-expressing cells.

CONCLUSIONS

In this study, we demonstrated successful functionalization of persistent luminescence nanoparticles with biotin and showed, in good agreement with several theoretical models, that the presence of a PEG spacer is critical to allow the efficient binding to streptavidin coated on a plate, by favoring the interaction between the protein and biotins grafted on the surface of the nanoparticle. Taking advantage of such streptavidin–biotin technology,²⁸ we reported the first use of biotinylated PLNP to target glioma cells expressing an avidin-fusion protein (lodavin), and we showed that the binding to lodavin-expressing cells is not only specific to biotin but also highly depends on the particle core diameter. This in vitro binding study, combined with the discovery of a novel efficient

composition with improved persistent luminescence,²⁹ thus provides interesting preliminary results for the future use of biotinylated red-emitting nanophosphors *in vivo* to specifically target the tumor microenvironment in glioma-bearing mice.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Size distribution of each population (120 and 180 nm PLNP) obtained after DLS measurement as well as 15 min of *in vitro* binding of large biotinylated PLNPs (180 nm) on BT4C glioma cells. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: minna.kaikkonen@uef.fi (M.U.K.); cyrille.richard@parisdescartes.fr (C.R.).

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by European Community (Network of Excellence CLINIGENE LSHB-CT-2006-018933) and by French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project number ANR-08-NANO-025). M.U.K. was supported by Ark Therapeutics Oy and a grant from Academy of Finland.

■ REFERENCES

- (1) Bruchez, M. J., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., and Alivisatos, A. P. (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281, 2013–2016.
- (2) Banks, P. R., and Paquette, D. M. (1995) Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis. *Bioconjugate Chem.* 6, 447–458.
- (3) Kogure, T., Karasawa, S., Araki, T., Saito, K., Kinjo, M., and Miyawaki, A. (2006) A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat. Biotechnol.* 24, 577–581.
- (4) Chan, W. C. W., and Nie, S. (1998) Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 281, 2016–2018.
- (5) Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., and Weiss, S. (2005) Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science* 307, 538–544.
- (6) Maysinger, D., Behrendt, M., Lalancette-Hebert, M., and Kriz, J. (2007) Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: *in vivo* screening model system for biocompatibility of nanoparticles. *Nano Lett.* 7, 2513–2520.
- (7) Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L. (1998) One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1959–1964.
- (8) Taton, T. A., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L. (2000) Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 289, 1757–1760.
- (9) He, H., Xie, C., and Ren, J. (2008) Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging. *Anal. Chem.* 80, 5951–5957.
- (10) Ntziachristos, V. (2006) Fluorescence molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 1–33.
- (11) Frangioni, J. V. (2003) *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 626–634.
- (12) Rice, B. W., Cable, M. D., and Nelson, M. B. (2001) *In vivo* imaging of light-emitting probes. *J. Biomed. Opt.* 6, 432–440.
- (13) le Masne de Chermont, Q., Chanéac, C., Seguin, J., Pellé, F., Maitrejean, S., Jolivet, J. P., Gourier, D., Bessodes, M., and Scherman, D. (2007) Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9266–9272.
- (14) Maldiney, T., Richard, C., Seguin, J., Wattier, N., Bessodes, M., and Scherman, D. (2011) Effect of Core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano* 5, 854–862.
- (15) Lehtolainen, P., Wirth, T., Taskinen, A. K., Lehenkari, P., Leppänen, O., Lappalainen, M., Pulkkanen, K., Marttila, A., Marjomäki, V., Airenne, K. J., Horton, M., Kulomaa, M. S., and Ylä-Herttuala, S. (2003) Targeting of biotinylated compounds to its target tissue using a low-density lipoprotein receptor-avidin fusion protein. *Gene Ther.* 10, 2090–2097.
- (16) Lesch, H. P., Kaikkonen, M. U., Pikkarainen, J. T., and Ylä-Herttuala, S. (2000) Avidin-biotin technology in targeted therapy. *Expert Opin. Drug. Delivery* 7, 551–564.
- (17) Lesch, H. P., Pikkarainen, J. T., Kaikkonen, M. U., Taavitsainen, M., Samaranyake, H., Lehtolainen-Dalkilic, P., Vuorio, T., Määttä, A. M., Wirth, T., Airenne, K. J., and Ylä-Herttuala, S. (2009) Avidin fusion protein-expressing lentiviral vector for targeted drug delivery. *Hum. Gene Ther.* 20, 871–882.
- (18) Chaiet, L., and Wolf, F. J. (1964) The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 106, 1–5.
- (19) Green, N. M. (1975) Avidin. *Adv. Protein Chem.* 29, 85–133.
- (20) le Masne de Chermont, Q., Richard, C., Seguin, J., Chanéac, C., Bessodes, M., and Scherman, D. (2009) Silicates doped with luminescent ions: useful tools for optical imaging applications. *Proc. SPIE* 7189, 71890B/1–71890B/9.
- (21) Longo, G., and Szeifer, I. (2005) Ligand-receptor interactions in tethered polymer layers. *Langmuir* 21, 11342–11351.
- (22) Ren, C.-L., Carvajal, D., Shull, K. R., and Szeifer, I. (2009) Streptavidin-biotin binding in the presence of a polymer spacer. A theoretical description. *Langmuir* 25, 12283–12292.
- (23) Tseng, C.-L., Wang, T.-W., Dong, G.-C., Wu, S. Y.-H., Young, T.-H., Shieh, M.-J., Lou, P.-J., and Lin, F.-H. (2007) Development of gelatine nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting. *Biomaterials* 28, 3996–4005.
- (24) Zhang, G., Yang, Z., Lu, W., Zhang, R., Huang, Q., Tian, M., Li, L., Liang, D., and Li, C. (2009) Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and *in vivo* biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials* 30, 1928–1936.
- (25) Amstad, E., Zurcher, S., Mashaghi, A., Wong, J. Y., Textor, M., and Reimhult, E. (2009) Surface Functionalization of single superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted magnetic resonance imaging. *Small* 5, 1334–1342.
- (26) Townsend, S. A., Evrony, G. D., Gu, F. X., Schulz, M. P., Brown, R. H. Jr., and Langer, R. (2007) Tetanus toxin C fragment-conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons. *Biomaterials* 28, 5176–5184.
- (27) Berndt, M., Lorenz, M., Enderlein, J., and Diez, S. (2010) Axial nanometer distances measured by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nano Lett.* 10, 1497–1500.
- (28) Maldiney, T., Byk, G., Wattier, N., Seguin, J., Kahndadash, R., Bessodes, M., Richard, C., and Scherman, D. (2012) Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability. *Int. J. Pharm.* 423, 102–107.
- (29) Maldiney, T., Lecointre, A., Viana, B., Bessière, A., Bessodes, M., Gourier, D., Richard, C., and Scherman, D. (2011) Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 11810–11815.

3.2 Deux stratégies efficaces pour le ciblage de cellules cancéreuses

Ces deux études séparées démontrent la faisabilité des deux stratégies de ciblage *in vitro*. Il apparaît ainsi possible, au moyen d'une chimie de greffage/couplage peptidique relativement simple, de modifier l'état de surface de nanoparticules à luminescence persistante dans le but obtenir une nouvelle sonde d'imagerie ciblante destinée à la détection spécifique de plusieurs lignées cancéreuses *in vitro*. L'utilisation conjointe de plusieurs techniques d'analyse telles que la diffusion dynamique de la lumière ou encore l'analyse thermogravimétrique donne accès à une caractérisation complète du système ciblant, de sa charge globale de surface à une évaluation précise de la quantité de ligands par particule. Ces deux séries de résultats sont particulièrement encourageantes et permettent d'envisager l'application de ces nanoparticules à luminescence persistante au ciblage actif de modèles tumoraux *in vivo*.

Néanmoins, ce type de transposition au petit animal suppose la manipulation de systèmes colloïdaux stables en milieu physiologique et dont le temps de demi-vie dans la circulation sanguine est suffisamment élevé pour permettre une accumulation progressive au niveau de l'environnement tumoral. Nous allons voir que la conception d'un tel système requiert un double travail sur le diamètre des sondes utilisées ainsi que leur recouvrement de surface. Cette optimisation des propriétés de surface devrait permettre d'avoir une emprise sur le comportement des nanoparticules *in vivo*, après injection systémique chez le petit animal.

Chapitre 4

Contrôler la biodistribution de nanoparticules *in vivo*

Sommaire

4.1	Deux paramètres essentiels à la circulation des nanocristaux	67
4.2	Des propriétés optiques qui limitent les futures utilisations <i>in vivo</i>	77

4.1 Deux paramètres essentiels à la circulation des nanocristaux

Les premiers travaux de le Masne de Chermont et al. sur l'utilisation des nanoparticules à luminescence persistante, réalisés au sein du laboratoire, démontrent qu'il est possible de fonctionnaliser la surface des cristaux pour changer leur biodistribution chez le petit animal. L'ajout de polyéthylène glycol permet ainsi à très court terme de retarder la capture des nanoparticules par le système monocyte-macrophage. Placée dans une perspective d'application au diagnostic de tumeurs solides chez le petit animal, cette séquestration quasi-instantanée des nanoparticules au niveau du foie et de la rate empêche malheureusement tout espoir sérieux d'aboutir à un ciblage efficace de l'environnement malade.

Pour contourner cet écueil de taille et améliorer le temps de circulation des nanoparticules de $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+} , Mn^{2+} , Dy^{3+}), nous avons fait le choix de travailler sur deux paramètres physico-chimiques ayant une influence déterminante sur le comportement de nanoparticules après injection systémique chez la souris :

1. La taille du cristal. Elle est rapportée comme l'un des paramètres les plus importants pour obtenir des sondes qui résident de manière prolongée dans la circulation générale. Il est souvent reconnu que des nanoparticules de faible diamètre hydrodynamique ont un temps de demi-vie plus élevé dans le sang. Cet effet serait le résultat d'une diminution de la capture des cristaux par le système monocyte-macrophage, moins capable de distinguer les petites particules *in vivo*.
2. Le recouvrement de surface. Il définit l'identité des cristaux au cours de leur voyage dans le sang. Ainsi, les protéines plasmatiques s'associent aux nanoparticules via des interactions de surface dès leur injection. Ce processus d'opsonisation conduit à une adsorption sélective de certaines protéines du sang sur la surface des particules et à la définition d'une "cartographie protéique" de surface dont les caractéristiques dépendent de l'état initial de la particule. Cette cartographie protéique détermine l'efficacité de capture par le système monocyte-macrophage et peut être modifiée par des étapes de fonctionnalisation chimique.

Le prochain article étudie l'influence de la taille et du recouvrement de surface sur le comportement de nanoparticules à luminescence persistante *in vivo*. Outre une simple modification de la charge de surface par ajout de polyéthylène glycol, nous avons cherché à évaluer les effets d'une variation de la longueur de la chaîne de polyéthylène glycol sur la capture des nanoparticules au niveau des deux organes principaux du système monocyte-macrophage : le foie et la rate.

Effect of Core Diameter, Surface Coating, and PEG Chain Length on the Biodistribution of Persistent Luminescence Nanoparticles in Mice

Thomas Maldiney,* Cyrille Richard,* Johanne Seguin, Nicolas Wattier, Michel Bessodes, and Daniel Scherman

Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, CNRS, UMR 8151, Paris, F-75270 cedex France, Inserm, U1022, Paris, F-75270 cedex France, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 cedex France, ENSCP, Paris, F-75231 cedex France, Chimie Paristech, France

By using fluorescent organic dyes to luminescent nanocrystals, optical imaging raises growing interest for the understanding of physiological mechanisms or new diagnosis and therapeutic applications.¹ Photonic probes offer not only practicable living sensors, but also rely on low-cost or affordable imaging devices and techniques. The semiconductor quantum dots^{2,3} exhibit high quantum yield, good photostability, and tunable emission wavelength. Luminescent porous silicon nanoparticles can act as both diagnostic⁴ and therapeutic tool.⁵ At last, near-infrared fluorescent molecules,⁶ show some ability to overcome the autofluorescence from tissues under constant illumination.

Each of the above quoted probes displays characteristics that limit future therapeutic application. First, the emission wavelength of semiconductor QDs must be tuned by changing the particle diameter (ranging from 2 to 10 nm) or the composition. On the one hand, this opens alternatives for renal clearance,⁷ but it also shortens circulation time of the probe and impairs effective targeting, levying strict regulations on its design.⁸ Luminescent porous silicon nanoparticles show great promise as nontoxic, self-destructive, and traceable cargo for anticancer drugs, but they suffer from limited quantum yield⁹ (~10%) compared to QDs (>80% in organic solvent). As for near-infrared fluorescent probes, it is now well established that organic dyes are susceptible to photobleaching and are most often unstable under physiological conditions, which make them hardly the best candidate for a long-term biological or biomedical purpose.¹⁰

We previously reported the synthesis of an inorganic optical nanoprobe (Ca_{0.2}Zn_{0.9}Mg_{0.9}-Si₂O₆) doped with rare-earth cations (Eu²⁺, Dy³⁺, Mn²⁺), which possesses near-infrared

ABSTRACT A growing insight toward optical sensors has led to several major improvements in the development of convenient probes for *in vivo* imaging. Efficient optical detection using quantum dots (QDs) as well as near-infrared organic dyes relies on several key driving principles: the ability to lower background absorption or autofluorescence from tissue, a good photostability of the probe, and a high quantum yield. In this article, we report the real-time biodistribution monitoring of lanthanide-doped persistent luminescence nanoparticles (PLNP), emitting in the near-infrared window, in healthy and tumor-bearing mice. We focused on the influence of hydrodynamic diameter, ranging from 80 to 180 nm, and polyethylene glycol (PEG) surface coating on the behavior of our probes. Tissue distribution was found to be highly dependent on surface coverage as well as core diameter. The amount of PLNP in the blood was highly increased for small ($d < 80$ nm) and stealth particles. On the opposite, PEG shield molecular weight, ranging from 5 to 20 kDa, had only negligible influence on the *in vivo* biodistribution of our silicate-based material.

KEYWORDS: nanoparticle · luminescence · biodistribution · PEGylation · tumor targeting · 3LL

persistent luminescence.¹¹ Mimicking a capacitor, this material can be excited under UV light a few minutes before use and subsequently emits in the near-infrared window for about 1 h without the need for further illumination. This material could be used to monitor real-time biodistribution in mice,¹² but it displayed major uptake by reticulo-endothelial system (RES) organs (mostly liver and spleen), even after surface functionalization with 5 kDa PEG polymers.

Starting from the recent observation that increasing PEG chain length could slow down RES uptake,¹³ we have presently studied the effect of methoxy-PEG coating of different molecular weights (5, 10, and 20 kDa) on the biodistribution of PLNP of various sizes in healthy and tumor-bearing mice.

RESULTS AND DISCUSSION

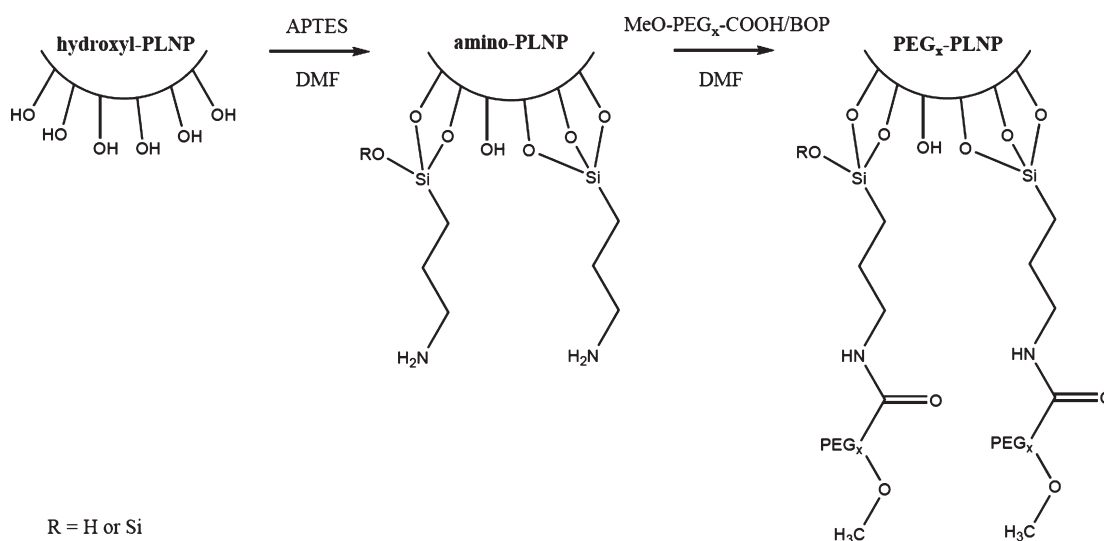
PLNP Characterization. Starting from hydroxyl-PLNP, polyethylene glycol coating of our

* Address correspondence to cyrille.richard@parisdescartes.fr, thomas.maldiney@parisdescartes.fr.

Received for review August 6, 2010 and accepted January 25, 2011.

Published online February 03, 2011 10.1021/nn101937h

© 2011 American Chemical Society



Scheme 1. Schematic representation of amino-PLNP and PEG-PLNP synthesis from the unconjugated hydroxyl-PLNP (x referring to PEG molecular weight, being 5000, 10000, or 20000 Da).

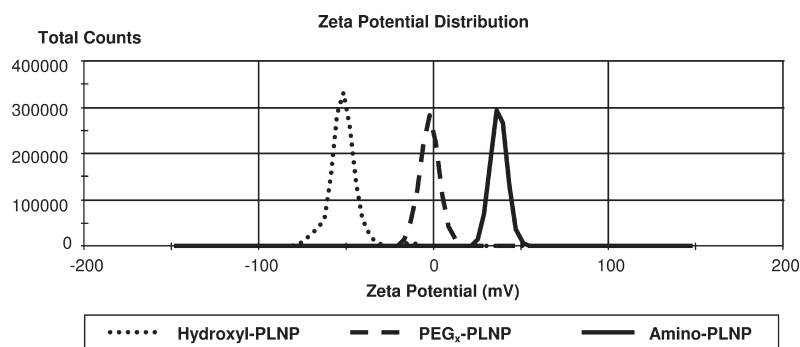


Figure 1. Zeta potential distribution in 20 mM NaCl for differently coated nanoparticles.

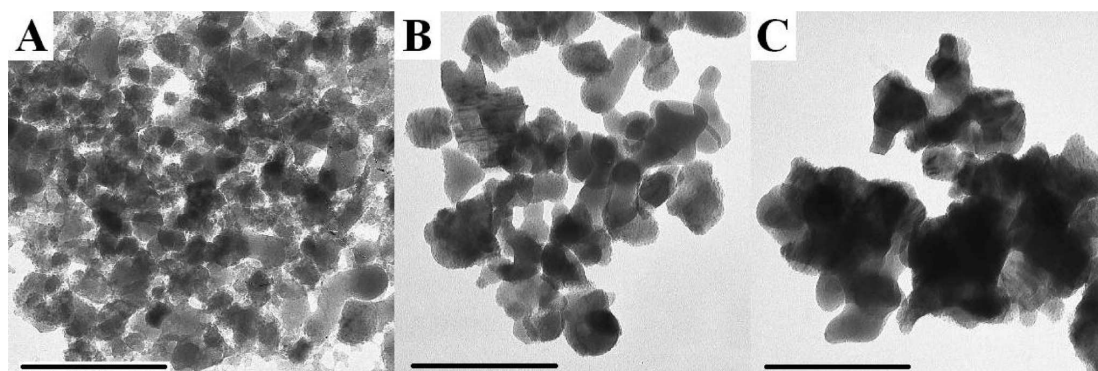


Figure 2. TEM of hydroxyl-PLNP suspended in water: 80 nm (A), 120 nm (B), and 180 nm (C). Scale bar represents 100 nm.

silicate-based nanoparticles was achieved through the formation of amino-PLNP (Scheme 1). Hydrodynamic diameter and zeta potential were monitored to follow the functionalization. Prior to any modification of the surface, hydroxyl groups are responsible for a global negative zeta potential (-50 mV) of the core particle (Figure 1). After aminosilanization, all intermediates were characterized by a straight positive zeta potential ranging from $+35$ to $+40$ mV corresponding to the amino-terminated silanes covering the probe

(Figure 1). Once the PEG layer coated the nanoparticle, zeta potential switched from positive to neutral values, no matter how long the chain length or wide the particle (Figure 1).

Table S1 (in Supporting Information) displays the hydrodynamic diameter in water before any surface modification and after PEG grafting. First, selective sedimentation allowed us to isolate three different populations from the initial polydisperse colloidal solution, approximately centered on 80, 120, and 180 nm. TEM of

hydroxyl-PLNP suspended in water for all three populations are shown in Figure 2. We notice a significant shift from core diameter obtained by transmission electron micrographs and DLS measurements. This gap was highly predictable, since DLS measurements uses Brownian movement of the solvated particle, it assumes that the particle is spherical in shape and covered with a solvent layer, whereas in the case of TEM, the solvent cannot be seen and we distinguish that bare PLNP are not exact spheroids. The addition of polyethylene glycol significantly changes the average value of hydrodynamic diameter, leading to particles from 40 to 70 nm larger than the initial hydroxyl-PLNP and providing high colloidal stability in normal saline solution, as shown in Figure 3. The PEG coverage is certainly not the only reason that explains such a wide increase in the particle diameter. Indeed, it has been observed that the aminosilanes used in the first functionalization step are likely to form a layer on the particle whose thickness can be up to 10 nm.¹⁴ As shown in Supporting Information Table S1 and contrary to an already assumed trend for a core-diameter to expand with the polymer chain on its surface,¹⁵ in the case of our silicate-based nanoparticles, PEG length does not seem to

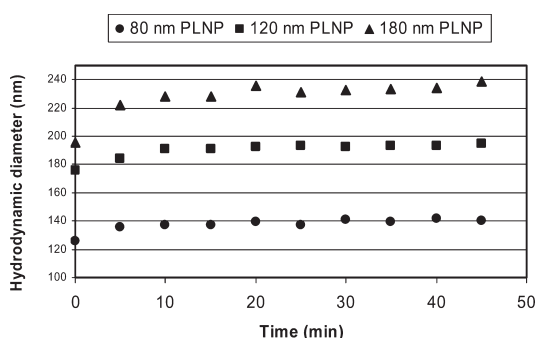


Figure 3. Colloidal stability of 5 kDa PEG-PLNP: evolution of the hydrodynamic diameter in 150 mM NaCl for 45 min.

have much impact on the overall hydrodynamic diameter. This tendency, which has already been observed for poly methoxypolyethyleneglycol cyanoacrylate-co-*n*-hexadecyl cyanoacrylate (PEG-PHDCA) nanoparticles¹⁶ with sizes approximately ranging from 80 to 250 nm, may be because larger PEG chain lengths attach to a lesser extent on the surface of PLNP, then limit the size effect of longer PEG, or to the relatively big size of the core, masking the effect of polymer extension.

To further characterize surface properties of our probes, weight loss curves for 120 nm PLNP were obtained from thermogravimetric analysis (TGA) after each functionalization step (Figure 4). From amino-PLNP to PEGylated PLNP we clearly distinguish two stages in surface decomposition. First, water trapped in the organic layer on the surface of PLNP evaporates before 325 °C. The second stage begins after 325 °C and corresponds to the decomposition of organic APTES and PEG coverage on the particles. When comparing TG curves for different PEG, we notice that the longer the PEG chain length, the fewer PEGylated chains remain grafted on the surface. Calculated values from weight loss percentages indicate that in the case of 5 kDa PEG, polymer concentration reaches about 15 nmol/mg of PLNP. This value drops significantly when increasing the size of the PEG to 9 nmol/mg for 10 kDa PEG and 3 nmol/mg for 20 kDa PEG. Despite the 20-fold molar excess of PEG (compared to the amount of free amino groups previously estimated on the surface: about 60 nmol/mg), it seems that steric hindrance hampers the approach of larger PEG near the particle, thus preventing quantitative reaction as well as equimolar loadings of the different PEG.

In a previous work, we have demonstrated that particle functionalization has only a negligible effect on the persistent luminescence properties (data not shown). As the same mass was to be injected for each

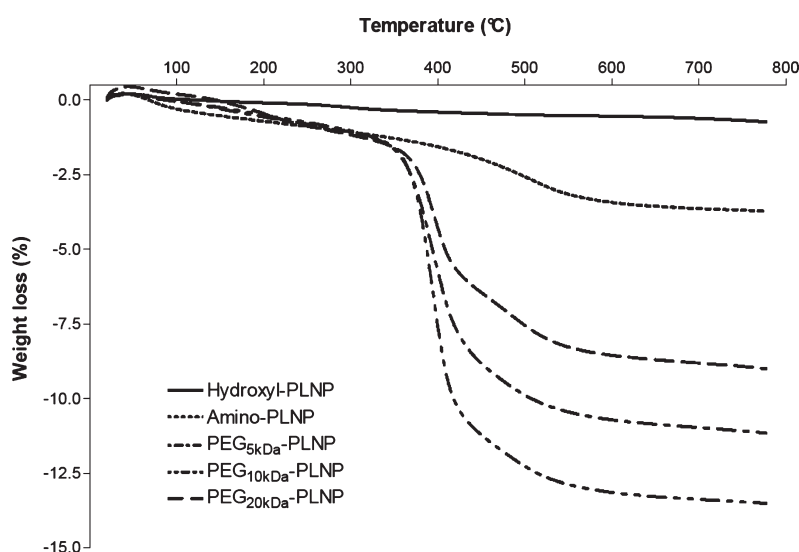


Figure 4. Weight loss curves for 120 nm PLNP with different surface coverage.

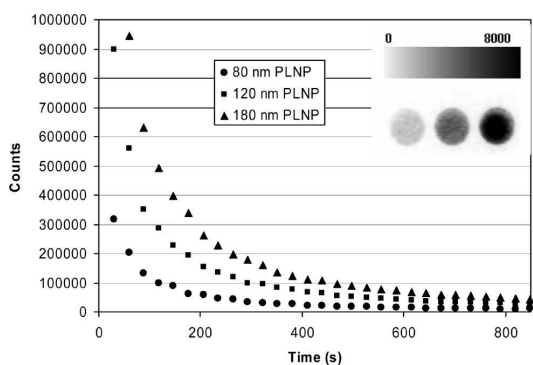


Figure 5. Luminescence decline curve of hydroxyl-PLNP in water (2 mg). The insert represents the corresponding image obtained after a 15 min acquisition (from left to right: 80, 120, and 180 nm hydroxyl-PLNP; luminescence intensity is expressed in gray unit: 1 unit = 2800 photons per s cm² steradians).

size population, we wanted to compare their luminescence properties under the photon-counting system. Figure 5 shows the influence of diameter on the emission behavior of hydroxyl-PLNP during the first 13 min after excitation. Luminescence intensity decreases with the diameter of the particle: 180 nm crystals were approximately 5 times brighter than 80 nm ones. To date, the mechanism of persistent luminescence has not yet been elucidated, and the major driving forces responsible for this phenomenon remain unclear.¹⁷ Among the many processes discussed in literature, incorporated defects¹⁸ in the structure (typically holes and electrons), or surface¹⁹ properties, seem to have a major impact on the final optical signature of the crystal. In the case of our silicate-based nanoparticles, the loss of luminescence energy associated with smaller cores could be either due to a decreased probability to find all three doping cations in an infinitesimal volume element (volume effect), or to a variation in the surface to volume ratio, which can be related to nonradiative recombination and quenching.²⁰ However, the emission lifetime was equivalent for all populations.

Imaging Study and Semiquantitative Biodistribution in RES.

PLNP biodistribution is dramatically dependent on surface functionalization (Figure 6). Within a few minutes only, 120 nm hydroxyl-PLNP appear to be quickly trapped in the liver. Indeed, the main lower and pectoral limbs' circulation routes remain hardly distinguishable. Adding the PEG coverage leads to an improved PLNP systemic distribution and to the lighting of the most vascularized areas, such as lower limb and liver which permanently shelters about 10% of the total blood. For larger particles, of 180 nm core diameter, PEG coverage seemed to lead to spleen accumulation (Figure 6). These observations highly corroborate the results from our first imaging study with carboxyl-PLNP and 5 kDa PEG-PLNP, emphasizing the critical role of surface charge in PLNP distribution. Owing to the global negative charge of their hydroxyl groups under physiological conditions in mice (pH = 7.4),

hydroxyl-PLNP happened to be quickly localized within liver, subjected to the same recognition process than carboxyl-PLNP with Kupffer cells in liver. Neutral PLNP, acquired through PEGylation, hamper interaction with opsonins and circumvent uptake process. This selectivity for negatively charged nanoparticles toward liver was also observed with organically modified silica (ORMOSIL) nanoparticles. In a recent study combining PET and fluorescence imaging, Kumar *et al.* proved that interaction with serum proteins was favored for nanoparticles displaying a global negative surface charge, leading to larger particle–protein systems (more likely to undergo the uptake process). A great majority of dye (DY776) conjugated ORMOSIL nanoparticles thus quickly accumulated in liver.²¹

Since liver and spleen are blood reservoirs, it can be hard to visually dissociate the amount of free PLNP in the blood circulation from the PLNP trapped in Kupffer cells or splenic macrophages. Therefore, in order to precise the short-term PLNP biodistribution, we focused on two well-defined regions of interest (ROI), comprising liver (Figure 6, left) and spleen (Figure 6, right), and compared the luminescence emitted from these ROI to the global luminescence signal arising from the mouse. The use of our biospace photon-counting process (Photon-Imager) led to an optical semiquantization of the amount of PLNP localized in the liver and spleen 15 min after the injection. Given the little difference observed between 5, 10, and 20 kDa PEG-covered nanoparticles (data not shown), an average value was calculated from all three PEG chain lengths. Figure 7 reports the percentage of total luminescence retained within these two major RES organs for hydroxyl-PLNP and PEG-grafted PLNP.

As shown in Figure 7A, crude material predominantly ends in the liver. Indeed, 15 min after the injection of negatively charged 180 nm particles, almost 70% of the total intensity is located in the liver. This percentage decreases with the diameter and finally reaches the value of approximately 25% for 80 nm hydroxyl-PLNP. As larger particles are almost instantly trapped in the liver, they do not have enough time to circulate through the other organs (spleen, in particular). On the contrary, small particles run longer through the vascular network gaining time to come across splenic macrophages. This is probably the reason why we observe, yet less intense, an opposite trend for hydroxyl-PLNP in the spleen (Figure 7B).

PEG-coated nanoparticles globally distributed much better through the organism. Indeed, with 180 nm PEG-PLNP, only 23% of total luminescence was observed in liver after 15 min (compared to 70% with hydroxyl-PLNP). For 80 nm PEG-PLNP, this proportion falls down to 14%, which represents almost the same value as the percentage of blood constantly running through the organ. Ballou *et al.* witnessed the same effect with PEGylated covered QDs and showed that methoxy-terminated 5 kDa PEG could slowed down the uptake process in

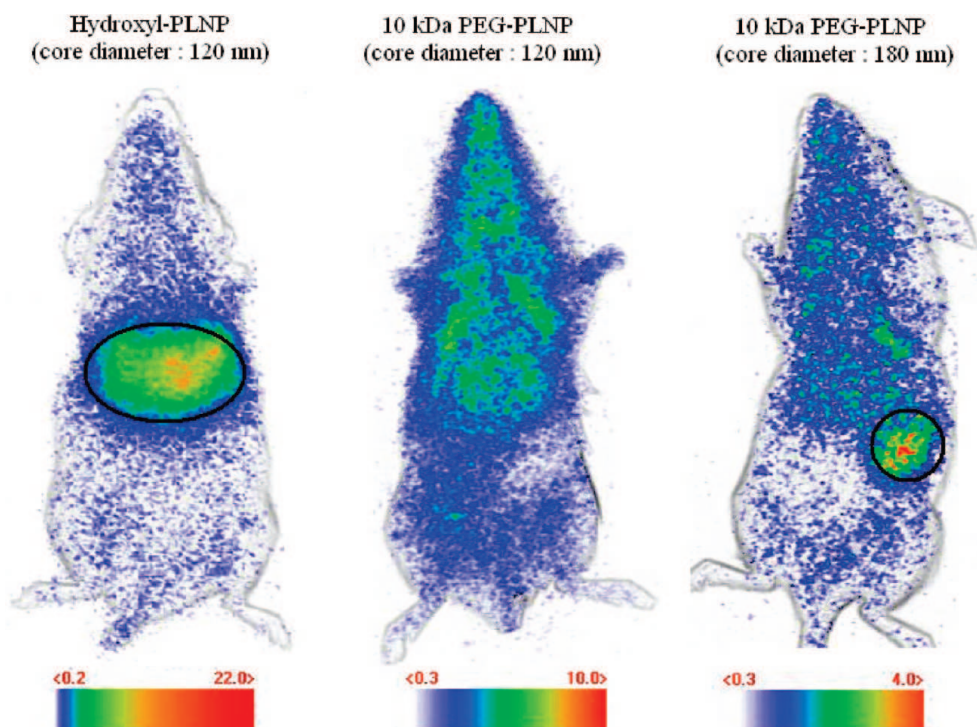


Figure 6. *In vivo* imaging of different PLNP under the photon-counting system. The signal was acquired for 15 min following systemic injection of the probes (300 μ g). Luminescence intensity is expressed in false color unit (1 unit = 2800 photons per $\text{s}\cdot\text{cm}^2$. Dark lines represent drawn ROI for the optical semiquantization (liver on the left image; spleen on the right image).

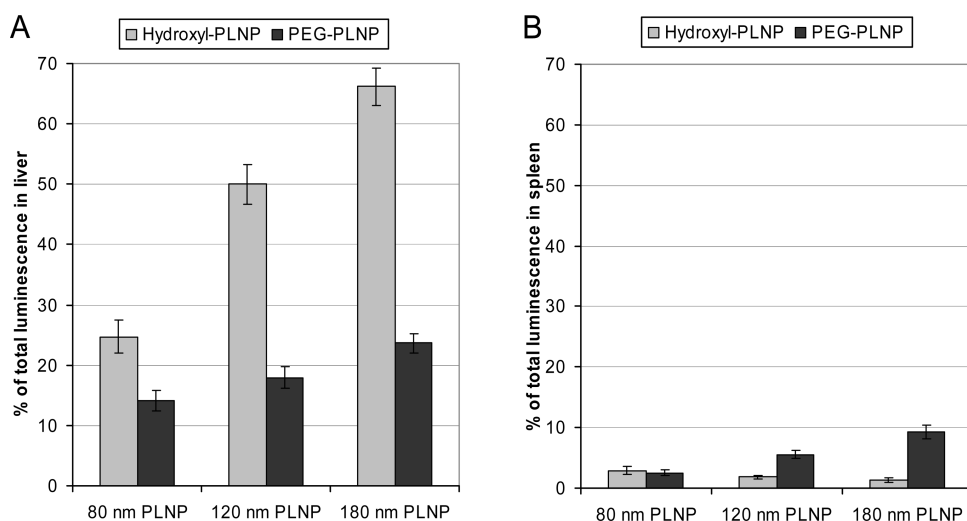


Figure 7. Semiquantitative image-based evaluation of the amount of PLNP located within RES organs, 15 min after the systemic injection in the tail vein (percentage of total luminescence represents the signal from the ROI compared to the one arising from the whole mouse). (A) liver; (B) spleen ($n = 6$). Error bars correspond to standard deviation.

liver and allowed longer visualization of their probe within the animal.²² Interestingly, although PEG-covered particles distribute much better through the body, they seem to be directed more likely toward spleen. This tendency, which is particularly noticeable for larger particles, declines with the diameter of the core. Thus, 80 nm PEG-PLNP seem more likely to evade both liver and spleen. These variations can be summarized by calculating the ratio of luminescence in the liver as compared to that in spleen. As shown in Table S2, this ratio, subsequently

growing with the hydrodynamic diameter for hydroxyl-PLNP, was stabilized to a much lower value for the PEG-covered PLNP, indicating that stealth PLNP were more likely trapped in spleen.

Unfortunately, luminescence from the smallest particles was hardly distinguishable for periods longer than 15 min after the injection. Therefore, to quantify the PLNP biodistribution after a long period of time, we used an *ex vivo* determination of the delayed fluorescence from europium ions, entrapped in the crystal.

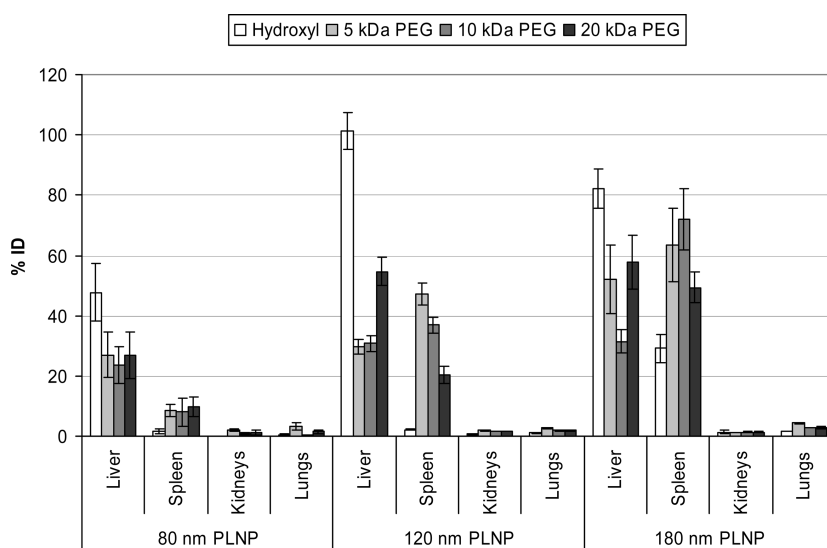


Figure 8. PLNP tissue distribution 6 h after systemic injection to healthy mice ($n = 6$). Error bars correspond to standard deviation.

Ex Vivo Quantitative Biodistribution in Healthy Mice. Relative long-term biodistribution in healthy mice was achieved 6 h after systemic injection to validate a potential use of this probe for *in vivo* applications. Delayed fluorescence from europium ions allowed an *ex vivo* quantitative analysis through tissue homogenates after animal sacrifice. As shown in Figure 8, similarly to several classes of nanoparticles, and regardless of surface coverage, long-term PLNP biodistribution occurs predominantly within liver and spleen.²³ Combined uptake in the kidneys and lungs remains below 5% of the injected dose. PEG chain length seems to have little influence on the global RES accumulation (combined uptake in liver and spleen), being responsible for a slight change in the liver/spleen ratio (only noticeable for 120 nm PLNP). On the contrary, core diameter appears to be critical. As shown in Supporting Information, Table S3, decreasing the particle core diameter from 180 to 80 nm causes a much lower combined RES uptake of PEG-PLNP from 100% down to around 35% of the injected dose. The correlation between particle size and RES accumulation (liver and spleen) 6 h after i.v. injection follows a very similar trend to that observed by semiquantitative analysis 15 min after PLNP administration.

To validate this ability of smaller PEGylated nanoparticles to escape RES uptake, and to assess their propensity to circulate within the body, novel experiments were conducted for which blood was collected by cardiac puncture. As PEG chain length has only poor influence on the combined uptakes within RES organs, we selected the 10 kDa PEG-grafted nanoparticles for this experiment. Indeed, for smallest particles, up to $12.6 \pm 0.8\%$ of the injected dose were retrieved in the blood, indicating that 80 nm PEG-PLNP were still circulating 6 h after the administration. This value is particularly high for nanoparticles of this size and represents approximately three times the percentage

retrieved in the blood for 12 nm PEGylated QDs.²⁴ The amount of material in the blood quickly decreased when increasing the core diameter, down to $3.3 \pm 0.5\%$ for 120 nm PLNP, and to $1.2 \pm 0.1\%$ of the injected dose for 180 nm PLNP. Our results can be compared to those obtained by Lipka *et al.* with smaller (5 nm inorganic core diameter) radioactive-labeled gold nanoparticles (Au-NPs). They managed to increase, in a significant manner, the circulation time of their Au-NPs after functionalization with PEG 10 kDa and reported that 18% of the injected dose were still circulating 24 h after intravenous injection.²⁵

Decreasing nanoparticle size limits RES uptake and allows sustained PLNP blood circulation, thus making them suitable for prospective applications in active targeting. Availability of 10 kDa PEG-covered PLNP, defined as the amount of PLNP in the blood compared to that in harvested organs (see Figure 9A), can be quantified by validating a dimensionless parameter. It is almost increased by a factor of 33 when switching from 180 nm PLNP to 80 nm PLNP.

Spleen/liver ratios, estimated from semiquantitative and quantitative biodistributions of PEGylated PLNP at 15 min and 6 h, are compared in Figure 9B. The relative uptake in spleen and liver is the lowest for 80 nm PLNP, and only slightly increases after 6 h, suggesting that nanoparticles evade the spleen and that distribution remains unmodified after relative long circulation. On the contrary, for 120 and 180 nm PLNP, the ratio switches from a value lower than 1 to one higher, emphasizing a greater accumulation in spleen than in liver, and a highly time-dependent distribution, characteristic of larger PLNP. Schipper *et al.*²⁶ have already observed a similar trend for smaller particles made of polymer- or peptide-coated ⁶⁴Cu-labeled QDs to be more likely trapped in spleen after 2 kDa PEG grafting. They showed that PEG functionalization has not only the ability to slow down the

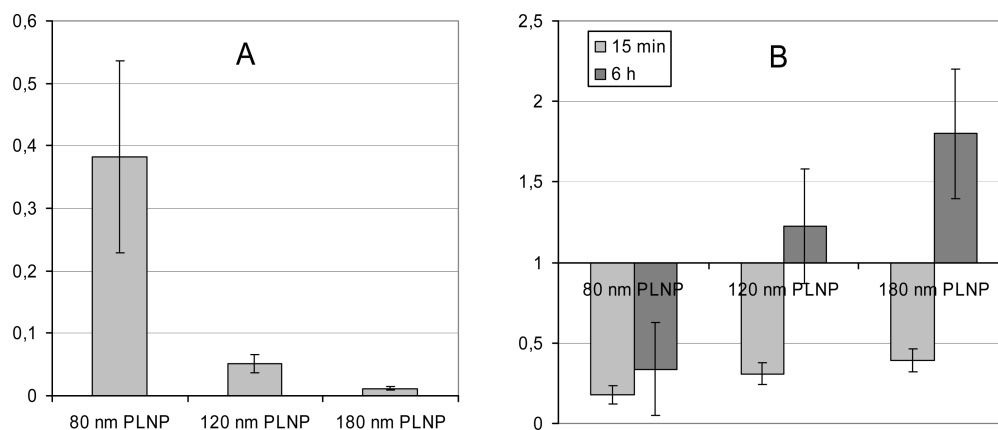


Figure 9. (A) Evolution of the rate (% ID in the blood/cumulated % ID in harvested organs) as a function of the particle core diameter for 10 kDa PEG-covered PLNP (6 h after injection). (B) Evolution of the rate (% ID in the spleen/% ID in the liver) as a function of the particle core diameter at 15 min and 6 h for PEGylated PLNP. Error bars correspond to standard deviation.

uptake process by liver and spleen, but that it can also significantly increase the uptake of nanoparticles by spleen.

Ex Vivo Quantitative Biodistribution in Tumor-Bearing Mice.

We finally examined the ability of the long circulating PLNP (80 nm, 10 kDa PEG-covered) to passively target the tumor microenvironment on subcutaneous 3LL tumor-bearing mice. Delayed fluorescence from europium ions allowed quantitative analysis through tumor tissue homogenates after animal sacrifice. Measurements indicate that a non-negligible amount of PLNP ($5.9 \pm 2.8\%$ of the injected dose, $n = 3$) was still located within the tumor microenvironment 6 h after systemic injection. This result, yet certainly due to the fact that 3LL tumor is highly vascularized, is promising for the development of targeted PLNP.

CONCLUSION

We have managed to dramatically extend PLNP circulation in mice by showing that blood retention

was highly dependent on the particle core diameter and surface coating. The PEG coverage allowed the formation of stealth particles that globally distributed much better through the animal. However, in opposition to studies reporting the influence of PEG chain length on the biodistribution of small probes,¹¹ we observed that increasing the molecular weight of the PEG moiety from 5 to 20 kDa had no significant effect on combined uptakes in major RES organs such as liver and spleen.

We also demonstrated that persistent luminescence could be used as a powerful tool for real-time monitoring and semiquantization, in a noninvasive manner. Unfortunately, the long-lasting afterglow remains far too low, preventing access to long-term exploration. Improving PLNP composition could open alternative to new materials with higher quantum yield and brighter luminescence that would allow quantification as well as noninvasive long-term optical imaging.²⁷

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. BOP reagent (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) was purchased from Advanced ChemTech. (3-Aminopropyl)-triethoxysilane (99%) was obtained from Sigma-Aldrich. Triethylamine (>99.5%) and dimethylformamide (>99.9%) were purchased from SDS. Alpha-methoxy-omega-carboxylic acid poly(ethylene glycol) PEG MW 10,000 and 20,000 Da were bought from Iris Biotech GmbH. The 5,000 Da PEG was previously synthesized from a published protocol of our team.²⁸

PLNP Synthesis and Size Selection. Crude and crystallized material was synthesized according to a previously described protocol based on a sol-gel approach¹¹ followed by a heating at 1050 °C. Nanometer-sized particles were obtained by basic wet grinding of the solid (500 mg) for 15 min with a mortar and pestle in a minimum volume of 5 mM NaOH solution. Hydroxylation was then performed overnight by dispersing the ground powder in 50 mL of the same NaOH solution to get hydroxyl-PLNP.

Nanoparticles with a diameter of 180 nm were selected from the whole polydisperse colloidal suspension by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 4500 rpm for 5 min (centrifugation time was lengthened to 30 min in order to obtain 120 nm PLNP). They were located in the supernatant (assessed by dynamic light

scattering). The supernatants were gathered and concentrated to a final 5 mg/mL suspension. Nanoparticles with a diameter of 80 nm were selected from the 120 nm concentrated suspension by centrifugation on an Eppendorf MiniSpin Plus at 8000 rpm for 5 min. Following the same approach, the centrifugation step was repeated four times and the resulting suspension concentrated to a final amount of 5 mg/mL.

PLNP Functionalization. Nanoparticles were coated according to slightly modified existing protocols.¹¹ Amino-PLNP were obtained by the addition of 20 μ L of 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES) to a suspension of 5 mg of hydroxyl-PLNP in 2 mL of DMF (Scheme 1). The reaction mixture was sonicated the first 15 min using a Branson Ultrasonic Cleaner 1210 and kept under vigorous stirring for 5 h. Particles were washed from the unreacted APTES by three centrifugation and redispersion steps in DMF.

PEG_n-PLNP were obtained by adding 10 μ mol of MeO-PEG_n-COOH (50 mg of MeO-PEG_{5,000}-COOH, 100 mg of MeO-PEG_{10,000}-COOH, and 200 mg of MeO-PEG_{20,000}-COOH), 5 mg of BOP reagent, and 5 μ L of triethylamine to a suspension of 5 mg of amino-PLNP in 1 mL of DMF (Scheme 1). To ensure a maximum PEG density for all distributions, the last functionalization step was achieved overnight, under vigorous stirring, with a large excess of PEG and BOP

reagent (20-fold molar excess compared to the free amino groups on the surface of amino-PLNP).

Each type of nanoparticles was characterized using transmission electron microscopy (TEM, JEOL JEM-100S), dynamic light scattering, and zeta potential measurements in 20 mM NaCl, performed on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA) equipped with a 632.8 nm helium neon laser and 5 mW power, with a detection angle at 173° (noninvasive back scattering).

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Setaram Setsys evolution 1600 (argon atmosphere; temperature range from 20 to 780 °C, 10 °C/min) on 10 mg dry samples of 120 nm core PLNP, at each functionalization step.

Biodistribution in Healthy Mice. Five weeks old female BALB/c mice (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were anesthetized by i.p. injection of a mix of ketamine (85.8 mg/kg) (Centravet, Plancoët, France) and xylazine (3.1 mg/kg) (Bayer, Leverkusen, Germany) diluted in 150 mM NaCl. A 100 μ L portion of a colloidal solution (1 mg PLNP resuspended in 1 mL of sterile 150 mM NaCl) was injected in the tail vein. Six hours after the injection, mice were anesthetized, and the blood was collected by cardiac puncture. For extraction of PLNP from the blood, red cells lysis was performed by mixing the specimen with a 5x cell culture lysis reagent from Promega. Hemoglobin was then removed by a series of centrifugation and PLNP were redispersed in 10 mM PBS. Right after cardiac puncture, mice were euthanized by cervical dislocation, and the different organs (liver, spleen, kidney, and lungs) were harvested, weighed, and crushed in 10 mM PBS (5 mL/g tissue). The amount of nanoparticles in a sample was evaluated by measuring delayed fluorescence from europium ions (rare earth doping cations, trapped in the core of our material) using a Wallac Victor² Multilabel Counter from Perkin-Elmer (excitation filter, D340; emission filter, D615; counting delay, 1000 μ s; counting window, 5000 μ s; counting cycle, 6100 μ s). Results are given as percentage of the injected dose (% ID).

Biodistribution in Tumor-Bearing Mice. 3LL tumors fragments (about 3 mm³) were implanted s.c. in both flanks of 5-week-old female C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest St. Isle, France), and 15 days later, tumors were harvested for quantization (see method described in previous section for tissue quantization).

Imaging Study. Nanoparticles (1 mg/mL) were excited for 5 min under UV light (254 nm) and injected *via* the tail vein. Immediately after the injection, the animal was placed on its back under the photon-counting device, and the acquisition was performed during 15 min. Signal acquisition was done using a photon-counting system based on a cooled GaAs intensified charge-coupled device (ICCD) camera (Photon-Imager; Biospace, Paris, France) without external excitation source. Acquired images processing, ROI drawing, and semi-quantization were achieved through the use of Biospace developed software, PhotoVision+. Experiments were conducted following the NIH recommendations and in agreement with a regional ethic committee for animal experimentation.

Acknowledgment. This work has been supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project No. ANR-08-NANO-025).

Supporting Information Available: Informations concerning the hydrodynamic diameter of the different PLNP as well as data on the biodistributions. This material is available free of charge *via* the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES AND NOTES

- Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the Era of Molecular Oncology. *Nature* **2008**, *452*, 580–589.
- Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446.
- Smith, A. M.; Duan, H.; Mohs, A. M.; Nie, S. Bioconjugated Quantum Dots for *in Vivo* Molecular and Cellular Imaging. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2008**, *60*, 1226–1240.
- Li, Z. F.; Ruckenstein, E. Water-Soluble Poly(acrylic acid) Grafted Luminescent Silicon Nanoparticles and Their Use as Fluorescent Biological Staining Labels. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1463–1467.
- Salonen, J.; Kaukonen, A. M.; Hirvonen, J.; Lehto, V.-P. Mesoporous Silicon in Drug Delivery Applications. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *97*, 632–653.
- Chen, W.; Mahmood, U.; Weissleder, R.; Tung, C. Arthritis Imaging Using a Near-Infrared Fluorescence Folate-Targeted Probe. *Arthritis Res. Ther.* **2005**, *7*, R310–317.
- Choi, H. S. Renal Clearance of Quantum Dots. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165–1170.
- Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine U.K.* **2008**, *3*, 703–717.
- Park, J. H.; Gu, L.; von Maltzahn, G.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. Biodegradable Luminescent Porous Silicon Nanoparticles for *in Vivo* Applications. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 331–336.
- Resch-genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.
- le Masne de Chermont, Q.; Chanéac, C.; Seguin, J.; Pelle, F.; Maîtrejean, S.; Jolivet, J.-P.; Gourier, D.; Bessodes, M.; Scherman, D. Nanoprobes with Near-Infrared Persistent Luminescence for *in Vivo* Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **2007**, *104*, 9266–9271.
- le Masne de Chermont, Q.; Richard, C.; Seguin, J.; Chanéac, C.; Bessodes, M.; Scherman, D. Silicates Doped with Luminescent Ions: Useful Tools for Optical Imaging Applications. *Proc. SPIE* **2009**, *7189*, 71890B/1–71890B/9.
- Daou, T. J.; Li, L.; Reiss, P.; Jossierand, V.; Texier, I. Effect of Poly(ethylene glycol) Length on the *in Vivo* Behavior of Coated Quantum Dots. *Langmuir* **2009**, *25*, 3040–3044.
- Kim, J.; Seidler, P.; Wan, L. S.; Fill, C. Formation, Structure, and Reactivity of Amino-Terminated Organic Films on Silicon Substrates. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *329*, 114–119.
- Sperling, R. A.; Liedl, T.; Duhr, S.; Kudera, S.; Zanella, M.; Lin, C.-A. J.; Chang, W. H.; Braun, D.; Parak, W. J. Size Determination of (Bio)conjugated Water-Soluble Colloidal Nanoparticles: A Comparison of Different Techniques. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11552–11559.
- Fang, C.; Shi, B.; Pei, Y.; Hong, M. H.; Wu, J.; Chen, H. Z. *In Vivo* Tumor Targeting of Tumor Necrosis Factor- α -Loaded Stealth Nanoparticles: Effect of MePEG Molecular Weight and Particle Size. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *27*, 27–36.
- Lecointre, A.; Viana, B.; Le Masne, Q.; Bessière, A.; Chanéac, C.; Gourier, D. Red Long-Lasting Luminescence in Clinostatite. *J. Lumin.* **2009**, *129*, 1527–1530.
- Holsa, J.; Aitasalo, T.; Jungner, H.; Lastusaari, M.; Niittykoski, J.; Giorgio, S. Role of Defect States in Persistent Luminescence Materials. *J. Alloy. Compd.* **2004**, *374*, 56–59.
- Kudrawiec, R.; Nyk, M.; Syperek, M.; Podhorodecki, A.; Misiewicz, J. Photoluminescence from GaN Nanopowder: The Size Effect Associated with Surface-to-Volume Ratio. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 181916–181916.
- Abrams, B. L.; Holloway, P. H. Role of the Surface in Luminescent Processes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5783–5801.
- Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Vathy, L. A.; Bergey, E. J.; Sajjad, M.; Prasad, P. N. *In Vivo* Biodistribution and Clearance Studies Using Multimodal Organically Modified Silica Nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *4*, 699–704.
- Ballou, B.; Lagerholm, B. C.; Ernst, L. A.; Bruchez, M. P.; Waggoner, A. S. Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 79–86.
- Minchin, R. F.; Martin, D. J. Nanoparticles for Molecular Imaging—An Overview. *Endocrinology* **2010**, *151*, 474–481.
- Schipper, M. L.; Cheng, Z.; Lee, S.; Bentolila, L. A.; Iyer, G.; Rao, J.; Chen, X.; Wu, A. M.; Weiss, S.; Gambhir, S. S. MicroPET-based Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1511–1518.
- Lipka, J.; Semmler-Behnke, M.; Sperling, R. A.; Wenk, A.; Takenaka, S.; Schleh, C.; Kissel, T.; Parak, W. J.; Kreyling,

- W. G. Biodistribution of PEG-Modified Gold Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Intravenous Injection. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6574–6581.
26. Schipper, M. L.; Iyer, G.; Koh, A. L.; Cheng, Z.; Ebenstein, Y.; Aharoni, A.; Keren, S.; Bentolila, L. A.; Li, J.; Rao, J.; Chen, X.; Banin, U.; Wu, A. M.; Sinclair, R.; Weiss, S.; Gambhir, S. S. Particle Size, Surface Coating, and PEGylation Influence the Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice. *Small* **2009**, *5*, 126–134.
27. Van den Eeckhout, K.; Smet, P. F.; Poelman, D. Persistent Luminescence in Eu^{2+} -Doped Compounds: A Review. *Materials* **2010**, *3*, 2536–2566.
28. Masson, C.; Scherman, D.; Bessodes, M. 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy/[bis(acetoxy)-iodo]benzene-mediated Oxidation: A Versatile and Convenient Route to Poly(ethylene glycol) Aldehyde or Carboxylic Acid Derivatives. *J. Polym. Sci., A1* **2001**, *39*, 4022–4024.

4.2 Des propriétés optiques qui limitent les futures utilisations *in vivo*

Cette étude nous permet de confirmer le rôle essentiel de la taille et de l'état de surface dans la circulation de nanoparticules à luminescence persistante. Tout d'abord, il est démontré que le greffage covalent de polyéthylène glycol permet de masquer les charges en surface des nanoparticules, et de sensiblement retarder leur capture au niveau du foie et de la rate, cela pour les trois populations de tailles sélectionnées dans le cadre de ce travail.

La longueur des motifs de polyéthylène glycol, contrairement à la charge de surface, ne semble pas avoir de grande influence sur le comportement des nanoparticules *in vivo*. Pour une population donnée, l'augmentation de la longueur de chaîne de polyéthylène glycol de 5 kDa à 20 kDa n'est responsable d'aucune variation significative de la quantité de nanoparticules captées par le système monocyte-macrophage. Ce résultat est toutefois à nuancer dans la mesure où il ne nous a pas été possible de contrôler de manière précise la densité de polyéthylène glycol fixé en surface des nanoparticules.

La conséquence n'est plus la même lorsqu'il s'agit du diamètre hydrodynamique des nanoparticules. En effet, le second résultat important de cette étude concerne l'influence de la taille des nanoparticules sur leur temps de résidence dans le sang, ainsi que leur rétention comparée dans le foie et la rate. Une diminution du diamètre de cœur de 180 à 80 nm permet de faire passer le pourcentage de nanoparticules retrouvées dans le sang de 1 à presque 13% de la dose injectée, cela 6 heures après administration de la sonde. On remarque également, associé à la même évolution du diamètre des particules, un changement de répartition foie-rate au terme de la capture : plus le diamètre de cœur augmente, plus les particules semblent susceptibles d'être captées au niveau de la rate. Dans le cas des nanoparticules de plus faible diamètre, i.e. environ 80 nm, une quantité correspondant à 27% de la dose injectée est retrouvée dans le foie, contre seulement 8% dans la rate.

Les résultats semblent *a priori* de bonne augure pour une future utilisation de ces sondes *in vivo*. Les nanoparticules de faible diamètre hydrodynamique et recouvertes de polyéthylène glycol présentent un temps de circulation prolongé dans le sang, en comparaison des premières expériences réalisées *in vivo* chez la souris. Malheureusement, cette étude rapporte également que le signal de luminescence persistante dépend grandement de la taille des cristaux. Ainsi, en comparaison d'une population de 180 nm de diamètre en moyenne, les nanoparticules de 80 nm émettent 5 fois moins de lumière et permettent difficilement d'obtenir une image de biodistribution *in vivo*, même au cours des quelques minutes qui suivent l'injection.

Ce constat vis-à-vis des propriétés optiques de cette première génération de nanoparticules à luminescence persistante nous a poussé à réorienter nos objectifs scientifiques vers la recherche de nouvelles compositions plus efficaces, présentant une persistance plus longue et un signal de luminescence plus intense. Nous allons voir que cette amélioration des propriétés optiques peut se faire par changement radical du couple matrice/dopants ou optimisation plus fine de la concentration ou du type de dopants à partir d'une composition initiale.

Troisième partie

Amélioration des propriétés optiques de matériaux à luminescence persistante

Chapitre 5

Le cas isolé du nitridosilicate : $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ (Eu^{2+} , Tm^{3+})

Sommaire

5.1	Pourquoi le nitridosilicate plutôt que le silicate	81
5.2	Une transposition difficile aux applications <i>in vivo</i>	90

5.1 Pourquoi le nitridosilicate plutôt que le silicate

La première stratégie abordée pour améliorer les propriétés optiques du silicate fut un changement radical de matrice. Une collaboration avec l'équipe de Poelman et Smet, de l'université de Gent, nous a permis de mettre la main sur un matériau présentant des propriétés optiques particulièrement intéressantes : $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ (Eu^{2+} , Tm^{3+}), en particulier un signal de luminescence persistante cinq fois plus intense que notre silicate de référence $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+} , Mn^{2+} , Dy^{3+}) après excitation UV.

Cette observation nous a poussé à envisager les premières utilisations du nitridosilicate chez la souris. Malheureusement, la voie de synthèse de ce matériau conduit à des cristaux de taille micrométrique, impossibles à exploiter *in vivo*. Pour répondre à ce problème d'échelle, nous avons tenté de réduire la taille des cristaux pour obtenir des particules de plus faible diamètre. Il existe plusieurs techniques reconnues permettant de réduire la taille de particules. La première consiste à changer de voie de synthèse pour directement former des nanoparticules. C'est le cas de procédés comme la voie sol-gel ou Stöber qui permettent d'obtenir des nanocristaux au cours de la synthèse. Ces deux méthodes en solution n'étant pas applicables à la famille des nitridosilicates, dont la synthèse requiert une constante atmosphère protectrice d'azote, nous avons finalement opté pour deux stratégies qui prennent appui sur le traitement des matériaux *a posteriori* :

1. La technique d'ablation laser. Elle consiste à focaliser la puissance d'un laser sur une pastille de matériau massif. L'énergie du laser permet alors d'abraser la surface de la pastille et de libérer des nanoparticules dont la taille peut aller jusqu'à quelques nanomètres.
2. Le broyage mécanique. Cette solution plus simple consiste à écraser la poudre du matériau massif entre un mortier et un pilon. Les chocs et frottements générés au cours du broyage permettent alors de libérer des nanoparticules.

L'article suivant présente une comparaison de ces différentes techniques pour l'extraction de nanoparticules à partir d'un nitridosilicate massif. Les premières expériences d'injection de nanoparticules, extraites sur la base de $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ (Eu^{2+} , Tm^{3+}), permettent finalement d'évaluer l'intérêt potentiel de cette nouvelle composition pour des applications en imagerie optique du petit animal *in vivo*.

In vivo optical imaging with rare earth doped $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ persistent luminescence nanoparticles

T. Maldiney,^{1,2} G. Sraiki,³ B. Viana,^{3,6} D. Gourier,³ C. Richard,^{1,2,5} D. Scherman,^{1,2}
M. Bessodes,^{1,2} K. Van den Eeckhout,⁴ D. Poelman,⁴ and P. F. Smet⁴

¹Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie; CNRS, UMR 8151, Inserm, U1022, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 cedex France

²ENSCP, Chimie Paristech, Paris, F-75231 cedex France

³LCMCP, UPMC, Collège de France, UMR-CNRS 7574, Chimie Paristech, 11 rue P. et M. Curie, 75005 Paris, France

⁴LumiLab, Department of Solid State Sciences, Center for Nano- and Biophotonics (NB-Photonics), Ghent University, Krijgslaan 281-S1, 9000 Gent, Belgium

⁵cyrille.richard@parisdescartes.fr

⁶bruno-viana@chimie-paristech.fr

Abstract: $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}^{2+},\text{Tm}^{3+}$ presents outstanding long lasting luminescence at about 610 nm. However, to be useful for *in vivo* optical imaging, persistent luminescence materials should possess high optical performance combined with sizes in the nanoscale. With this aim, we investigated two different techniques for the preparation of nanoparticles from $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}^{2+},\text{Tm}^{3+}$ bulk powder. First, nanoparticles were successfully prepared with the pulsed laser ablation method in liquid (abbreviated as PLAL). Secondly, nanoparticles obtained by selective sedimentation from the bulk compound resulted in satisfactory yield and allowed to perform the first real-time *in vivo* imaging with $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}^{2+},\text{Tm}^{3+}$ host. Finally the influence of surface functionalization on the biodistribution of the probe after systemic injection is discussed.

©2012 Optical Society of America

OCIS codes: (160.4670) Optical materials; (250.5230) Photoluminescence; (160.4760) Optical properties; (300.2140) Emission.

References and links

1. A. M. Smith, H. Duan, A. M. Mohs, and S. Nie, "Bioconjugated quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**(11), 1226–1240 (2008).
2. Q. le Masne de Chermont, C. Chanéac, J. Seguin, F. Pellé, S. Maîtrejean, J. P. Jolivet, D. Gourier, M. Bessodes, and D. Scherman, "Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(22), 9266–9271 (2007).
3. A. Lecointre, A. Bessiere, B. Viana, and D. Gourier, "Red persistent luminescent silicate nanoparticles," *Radiat. Meas.* **45**(3–6), 497–499 (2010).
4. A. Lecointre, B. Viana, Q. le Masne de Chermont, A. Bessière, C. Chanéac, and D. Gourier, "Red long-lasting luminescence in clinoenstatite," *J. Lumin.* **129**(12), 1527–1530 (2009).
5. A. Lecointre, A. Bessiere, A. J. J. Bos, P. Dorenbos, B. Viana, and S. Jacquart, "Designing a Red Persistent Luminescence Phosphor: The Example of $\text{YPO}_4:\text{Pr}^{3+},\text{Ln}^{3+}$ (Ln = Nd, Er, Ho, Dy)," *J. Phys. Chem. C* **115**(10), 4217–4227 (2011).
6. A. J. J. Bos, P. Dorenbos, A. Bessiere, and B. Viana, "Lanthanide energy levels in YPO_4 ," *Radiat. Meas.* **43**(2–6), 222–226 (2008).
7. T. Maldiney, C. Richard, J. Seguin, N. Wattier, M. Bessodes, and D. Scherman, "Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice," *ACS Nano* **5**(2), 854–862 (2011).
8. T. Maldiney, G. Byk, N. Wattier, J. Seguin, R. Khandadash, M. Bessodes, C. Richard, and D. Scherman, "Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability," *Int. J. Pharm.* **423**(1), 102–107 (2012).
9. T. Maldiney, M. U. Kaikkonen, J. Seguin, Q. le Masne de Chermont, M. Bessodes, K. J. Airenne, S. Ylä-Herttua, D. Scherman, and C. Richard, "In vitro targeting of avidin-expressing glioma cells with biotinylated persistent luminescence nanoparticles," *Bioconjug. Chem.* (2012), doi:10.1021/bc200510z.
10. T. Maldiney, A. Lecointre, B. Viana, A. Bessière, M. Bessodes, D. Gourier, C. Richard, and D. Scherman, "Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for *in vivo* imaging," *J. Am. Chem. Soc.* **133**(30), 11810–11815 (2011).

11. A. Bessière, S. Jacquart, K. Priolkar, A. Lecointre, B. Viana, and D. Gourier, "ZnGa₂O₄:Cr³⁺: a new red long-lasting phosphor with high brightness," *Opt. Express* **19**(11), 10131–10137 (2011).
12. K. Van den Eeckhout, P. F. Smet, and D. Poelman, "Persistent luminescence in rare-earth codoped Ca₂Si₅N₈:Eu²⁺," *J. Lumin.* **129**(10), 1140–1143 (2009).
13. K. Van den Eeckhout, P. F. Smet, and D. Poelman, "Luminescent afterglow behavior in the M₂Si₅N₈:Eu family (M=Ca, Sr, Ba)," *Materials* **4**(6), 980–990 (2011).
14. P. F. Smet, K. Van den Eeckhout, A. J. J. Bos, E. Van der Kolk, and P. Dorenbos, "Temperature and wavelength dependent trap filling in M₂Si₅N₈:Eu (M=Ca, Sr, Ba) persistent phosphors," *J. Lumin.* **132**(3), 682–689 (2012).
15. T. Schlieper and W. Schnick, "Nitrido-silicate. I-Hochtemperatur-Synthesen und Kristallstrukturen von Ca₂Si₅N₈," *Z. Anorg. Allg. Chem.* **621**(6), 1037–1041 (1995).
16. G. Ledoux, D. Amans, C. Dujardin, and K. Masenelli-Varlot, "Facile and rapid synthesis of highly luminescent nanoparticles via pulsed laser ablation in liquid," *Nanotechnology* **20**(44), 445605 (2009).
17. A. Hahn, S. Barcikowski, and B. N. Chichkov, "Influence on Nanoparticle Production during Pulsed Laser Ablation," *J. Laser Micro/Nanoeng.* **3**(2), 73–77 (2008).
18. F. Mafuné, J.-Ya. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, and H. Sawabe, "Formation and Size Control of Silver Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution," *J. Phys. Chem. B* **104**(39), 9111–9117 (2000).
19. H. Usui, Y. Shimizu, T. Sasaki, and N. Koshizaki, "Photoluminescence of ZnO nanoparticles prepared by laser ablation in different surfactant solutions," *J. Phys. Chem. B* **109**(1), 120–124 (2005).
20. D. Amans, C. Malaterre, M. Diouf, C. Mancini, F. Chaput, G. Ledoux, G. Breton, Y. Guillin, C. Dujardin, K. Masenelli-Varlot, and P. Perriat, "Synthesis of Oxide Nanoparticles by Pulsed Laser Ablation in Liquids Containing a Complexing Molecule: Impact on Size Distributions and Prepared Phases," *J. Phys. Chem. C* **115**(12), 5131–5139 (2011).
21. L. Yang, P. W. May, L. Yin, R. Brown, and T. B. Scott, "Direct growth of highly organized crystalline carbon nitride from liquid phase pulsed laser ablation," *Chem. Mater.* **18**(21), 5058–5064 (2006).
22. P. Dorenbos, "Energy of the first 4f(7)→4f(6)5d transition of Eu²⁺ in inorganic compounds," *J. Lumin.* **104**(4), 239–260 (2003).
23. K. Van den Eeckhout, P. F. Smet, and D. Poelman, "Persistent luminescence in Eu²⁺ doped compounds: a review," *Materials* **3**(4), 2536–2566 (2010).
24. B. Mercier, "Propriétés de luminescence et effets de confinement dans Gd₂O₃:Eu," Ph-D thesis (University Claude Bernard Lyon, 2005), http://pcml.univ-lyon1.fr/texte-theses_pdf/these%20B-MERCIER.pdf.
25. V. Buisson, A. Huignard, T. Gacoin, J. P. Boilot, P. Aschehoug, and B. Viana, "Luminescence properties of YVO₄:Ln (Ln = Nd, Yb, and Yb-Er) nanoparticles," *Surf. Sci.* **532-535**, 444–449 (2003).
26. D. L. Harame, L. J. Bousse, J. D. Shott, and J. D. Meindl, "Ion-sensing devices with silicon nitride and borosilicate glass insulators," *IEEE Trans. Electron. Dev.* **34**(8), 1700–1707 (1987).
27. J. Kim, P. Seidler, L. S. Wan, and C. Fill, "Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates," *J. Colloid Interface Sci.* **329**(1), 114–119 (2009).
28. A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization," *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**(4), 279–293 (2004).

1. Introduction

In vivo optical imaging using photons as direct information source, has been extensively developed in the last few years [1]. We have recently focused our attention on nanosized crystalline mixed oxides presenting persistent luminescence properties, mainly silicates and phosphates [2–6]. Such materials possess the ability to be excited under UV-light or X-rays and emit long-lasting luminescence during several hours after the excitation has ended. Focusing on the use of persistent luminescence for *in vivo* bioimaging, we recently reported the synthesis of persistent luminescence nanoparticles (PLNP), extracted from a silicate host, that could emit in the red/near-infrared range and could be used as sensitive optical probe for *in vivo* imaging, circumventing autofluorescence from animal tissues [2]. Biodistribution of these nanoparticles (NPs) was shown to be highly dependent on both core diameter and global surface charge [7]. Briefly, we reported that for a given surface coverage, the smaller the nanoparticle, the longer its residency time in the bloodstream. In particular, 80 nm nanoparticles with polyethylene glycol surface coverage, compared to nanoparticles with a 180 nm core, were shown to evade more easily the classical uptake by liver and spleen. Besides, we showed that these PLNP could successfully target cancer cells *in vitro* [8,9]. However, to permit longer observation, the luminescence from such nanophosphors still needs to be improved and new hosts are still required [10,11] in order to provide long-term monitoring of *in vivo* probes accumulation and improved optical imaging.

We have already shown that bulk Ca₂Si₅N₈:Eu²⁺,Tm³⁺ has outstanding long lasting luminescence at about 610 nm [12–14]. However, solid state synthesis of this material produces powder with grain sizes in the micrometer range, thus limiting direct use in living

animals. Conception of an efficient probe for *in vivo* imaging requires several critical conditions to be fulfilled: a long and intense persistent luminescence in suspension, an emission in the range of low tissue absorption, the ability to be functionalized, good chemical stability and the need for small particles with sizes in the nanometer range. The present paper investigates the formation of nanoparticles from rare earth doped nitridosilicate, $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}^{2+},\text{Tm}^{3+}$ (referred as CSN), and their use as potential nanoprobe for *in-vivo* optical imaging.

In order to obtain such nanoparticles, two ways are envisioned in this article: first, a laser ablation treatment of bulk powder in solution is explored, or a wet grinding of the same powder followed by selective sedimentation in alkaline solution. The yield and persistent luminescence of the recovered nanoparticles are investigated and discussed to provide the best result for *in vivo* optical bioimaging in small animal.

2. Synthesis and optical characteristics of CSN bulk powder

$\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}^{2+}$ (1%), Tm^{3+} (1%) powder was prepared by mixing appropriate amounts of Ca_3N_2 (Alfa Aesar, 99%) and $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$ (Alfa Aesar, 99.85%) precursors for the host material and EuF_3 and TmF_3 (Alfa Aesar, 99.9%) for the dopants, under a protective nitrogen atmosphere. The powder mixture was then sintered during 1 hour at 1300°C under reducing atmosphere (90% N_2 , 10% H_2) [12].

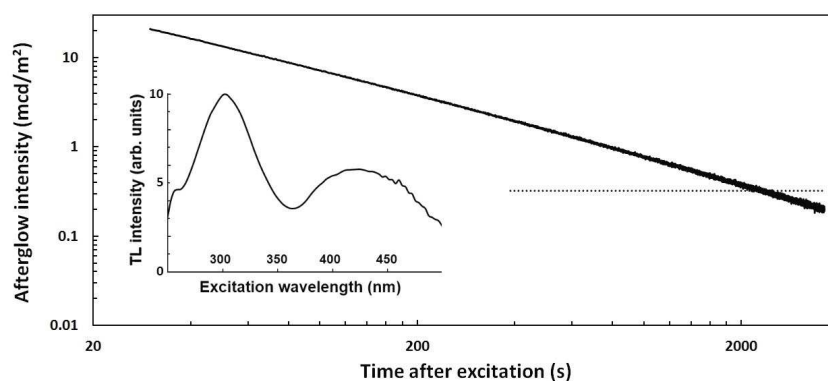


Fig. 1. Decay of the afterglow intensity in CSN after 1 min excitation with 1000 lx of an unfiltered Xe arc lamp. The dotted line indicates the 0.32 mcd/m^2 threshold level. Inset: Trap filling probability using various excitation wavelengths, as measured with thermoluminescence excitation spectroscopy [14].

The $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ host belongs to the monoclinic space group Cc [15]. Like the other nitridosilicates, it is very resistant against heat and moisture, thanks to the interconnected SiN_4 tetrahedrons. This is of crucial importance to retain the luminescent properties when used in solution. We found that the afterglow intensity of the bulk powder after two years storage in water has dropped by only 2%, compared to 25% for $\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7:\text{Eu}^{2+},\text{Dy}^{3+}$ and 52% for $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+},\text{Dy}^{3+}$, which shows the excellent stability of $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ in an aqueous medium.

The active divalent Eu^{2+} cation easily substitutes the Ca^{2+} cation while the trivalent Tm^{3+} presumably induces defects responsible for the very long afterglow (or persistent luminescence). The emission spectrum consists of a single broad band (FWHM of 100 nm) peaking at 610 nm, responsible for the orange colour of the luminescence. The excitation spectrum for the steady state photoluminescence extends well into the visible region, up to 550 nm [12,13].

The decay time of the material can be defined as the time between the end of the excitation and the moment when the afterglow intensity drops below 0.32 mcd/m^2 , about 100 times the sensitivity of the human eye. For CSN this is approximately 2500 seconds after 1 minute excitation with a Xe arc lamp at 1000 lux (Fig. 1). The persistent luminescence can be induced

both by UV- and visible light up to 500 nm (Fig. 1). This was confirmed by thermoluminescence excitation spectroscopy [14].

3. Extraction of CSN nanoparticles by Pulsed laser ablation in solution (PLAL)

Laser ablation seems to combine many advantages compared to other extraction techniques, notably regarding size distributions of the resulting NPs [16,17]. Besides, various materials have already been obtained with this method such as metal NPs [18], semiconductors [19], dielectric compounds [20], but also nitride-based compounds such as C_3N_4 [21]. For this reason, we first focused on PLAL in order to obtain CSN nanoparticles. For all experiments, we used the third harmonic of a pulsed YAG:Nd³⁺ laser (355 nm, 10ns). The laser irradiation could vary from a few minutes to 3 hours.

As mentioned earlier, the nitridosilicate compound could be well excited in the UV range [12,13]. For PLAL experiments, the CSN targets (size 8mm) were placed at the bottom of a 50 ml beaker and covered with 35 ml of deionised water. The influence of irradiation time and power was investigated. During irradiation under focalized laser beam, the solution becomes milky and at the end the supernatant is collected and analyzed. The variation of the NPs number in the supernatant is determined by using dynamic light scattering measurements (Fig. 2).

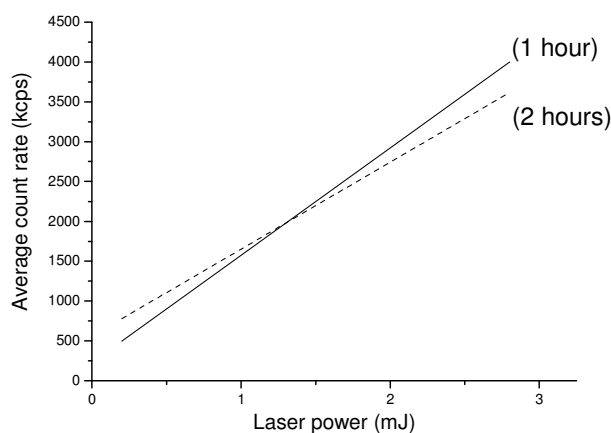


Fig. 2. 355 nm laser power effect on the particles concentration measured according to the intensity of the diffuse light and the irradiation time (1 hour or 2 hours).

As we can see in Fig. 2, the number of particles in the supernatant increases with the laser power. It seems that an increase of the laser ablation duration do not necessary increases the scattering centers number. The sedimentation of the bigger particles or aggregates could be faster than the particles formation. Formation of aggregates with this method has already been reported and to limit such formation, additives are currently used [19,20]. Without any additives, aggregates with size larger than 350 nm are obtained. Such NPs aggregation can be prevented by adding 5 mM NaOH in the beaker. In these conditions, negative charges appear at the surface of the nanoparticles, avoiding their aggregation. TEM measurements of the supernatant reveal that NPs obtained with this technique display relative small diameters in the range 3-5 nm (Fig. 3-left) in agreement with published results [20]. Indeed, the point of zero charge (PZC) is about 3.7 for this compound and the pH of the solution is about 7-8. This gives a surface charge of about -40 mV, sufficient to issue efficient electronic repulsion between nanoparticles.

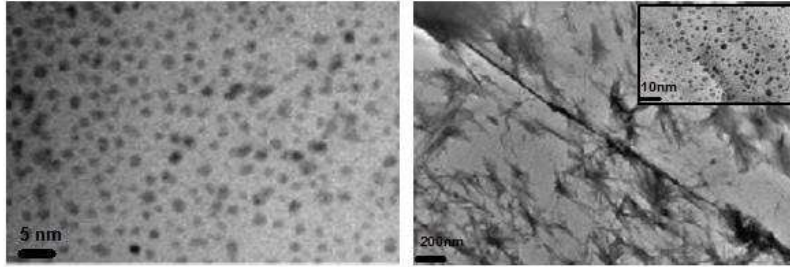


Fig. 3. Transmission electron micrographs (TEM) of the CSN NPs obtained from the PLAL technique. TEM measurements were performed on a EI Tecnai 120 Twin microscope operating at 120 kV and equipped with a high resolution Gatan Orius CCD 4 k 6 4 k numeric camera. Left: NPs in NaOH aqueous solution (scale bar: 5 nm). Right: NPs in NaOH with acetate as stabilizing agent. Inset: NPs magnification (scale bar: 10 nm).

The addition of acetate as stabilizing agent during the experiment also seems to prevent NPs' aggregation, by the formation of a web-like structure (Fig. 3, right), without affecting size distribution of the obtained NPs (Insert in Fig. 3, right). These observations are in good agreement with the literature [10]. Results from dispersive X-rays spectroscopy (EDS) on the TEM apparatus, indicate that the Ca/Si ratio is 2/5, which is in good agreement with the $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ material composition. Yet, due to the very small amount of NPs in solution, it was not possible to check their structure by conventional X-ray diffraction.

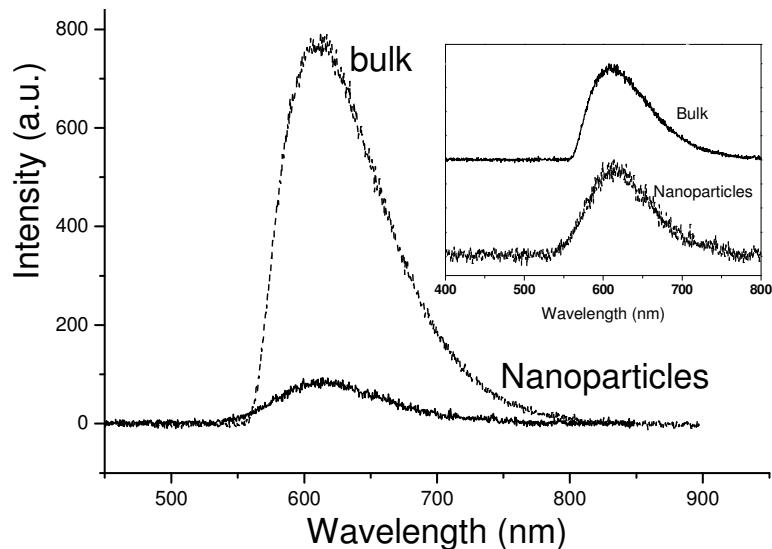


Fig. 4. Emission spectrum of bulk and nanoparticles made from CSN in solution under UV light excitation.

As presented in Fig. 4, the optical properties of the NPs and bulk materials are very similar. A broad band due to the $5d \rightarrow 4f \text{Eu}^{2+}$ emission is observed at 610 nm. For the parity allowed $5d \rightarrow 4f$ transition, it is well known that crystal field variation and structure modifications strongly affect the emission profile and energetic position [22,23]. As the emission bands are located at the same position for the NPs and the bulk material, and even if the quantity of obtained NPs is too small to further control structural modification by X-ray diffraction, laser ablation in solution seems to be an efficient way to elaborate very small (3.5 nm) nanoparticles of rare earth doped CSN.

The duration of the persistent luminescence appears lower for the nanoparticles in comparison to the bulk powder. Such effect has already been witnessed with silicate-based

PLNP [7] and could be the result of nonradiative recombination and quenching effects associated to the important variation in the surface to volume ratio when decreasing the size of the crystal to 3-5 nm [24,25]. In that latter case there is about 40% of the dopant close to the surface. In addition, the persistent luminescence process is related to the interplay between Eu^{2+} ions and traps in the vicinity of the Tm^{3+} co-dopant. For the given sizes of the NPs there is a lower probability to find the two doping cations in close proximity. Thus it is important to keep the nanoparticles at a sufficient size and to increase the NPs concentration in solution in order to perform *in vivo* imaging.

To go further and determine the potential of the rare earth doped nitridosilicate as material for optical imaging, a second method for the preparation of nanoparticles was used.

4. Extraction of CSN nanoparticles by selective sedimentation and surface functionalization

We have previously reported a general method based on selective centrifugation for the extraction of nanoparticles in basic solution (5 mM NaOH) after wet grinding of a polydisperse silicate bulk powder [2,7,8]. This technique was successfully translated to the present bulk nitridosilicate powder in order to obtain a narrow size distribution of negatively charged hydroxyl-terminated CSN nanoparticles with a mean diameter close to 200 nm and a 10% yield.

Indeed, due to rapid surface oxidation at room temperature after exposure to oxygen-containing atmosphere, air especially; silicon nitride-based compounds are known to display surface properties very close to silicon dioxide and silicate materials [26]. For this reason, we were able to transpose the reaction scheme optimized for the functionalization of silicate-based persistent luminescence nanoparticles [7] to the present CSN surface (Fig. 5).

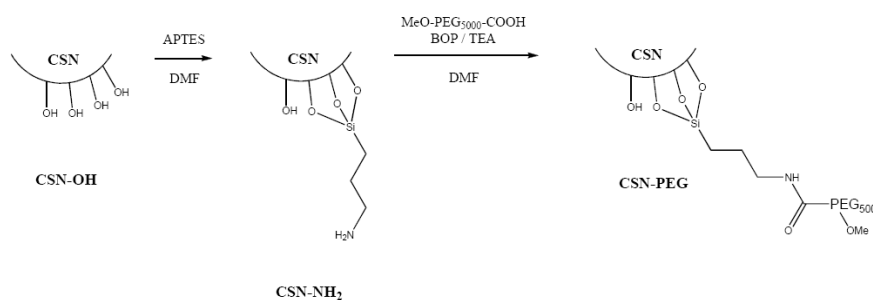


Fig. 5. Schematic representation of CSN-NH₂ and CSN-PEG synthesis from CSN-OH.

First, 5 mg of hydroxyl-terminated CSN nanoparticles (Fig. 6A, 6B and 6C) were reacted with 3-aminopropyltriethoxysilane (40 μmol) in 2 mL DMF (dimethylformamide) to give positively charged CSN displaying primary amines on their surface (Fig. 6B). This intermediate was then reacted with polyethylene glycol (PEG 10 μmol) via classical coupling reaction using a slight excess of BOP (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) as activating agent (Fig. 5).

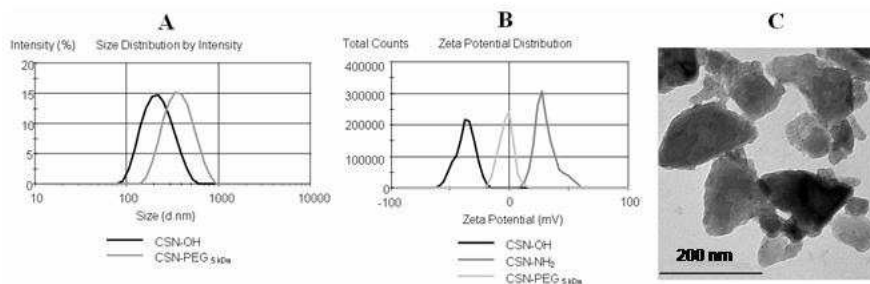


Fig. 6. Characterization of CSN nanoparticles before and after functionalization steps. A: Size distribution of hydroxyl-terminated CSN and PEGylated CSN in 150 mM NaCl; B: Zeta potential measurements after each functionalization step; C: Transmission electron micrography of CSN-OH in 5mM NaOH (scale bar: 200 nm).

Each step was characterized using zeta potential measurements in order to follow the evolution of global surface charge of the nanoparticle with surface coverage and functional groups decorating the probe. As observed with many other nanomaterials intended for biological applications, PEG grafting has the ability to mask the surface charge of the nanoparticle (zeta potential close to neutral value in Fig. 6B). This change in surface properties associated with PEG grafting also comes with a large increase of the hydrodynamic diameter (Fig. 6A). Such size distribution shift is certainly not the result of PEG chain length only. Indeed, a similar trend has already been described with silicate host and is very likely to be related to the first reaction with the aminosilanes, known to form a thick layer around the particle [27].

5. Real-time *in vivo* optical bioimaging in healthy mice

In order to investigate a possible application of nitridosilicate hosts for bioimaging in living animal, we compared the biodistribution of two different surface coverages (hydroxyl and PEG-terminated CSN) after systemic injection to BALB/c mice. For the experiment, mice were intravenously injected with 10^{12} nanoparticles of either CSN-OH or CSN-PEG after 5 minutes excitation of both suspensions under UV light (6 W lamp, 254 nm). Figure 7 displays the optical images obtained 15 minutes after intravenous injection. The signal, coming from persistent luminescence CSN-based nanoprobe, is detected with a photon-counting system (Photon-Imager, Biospace Lab, France).

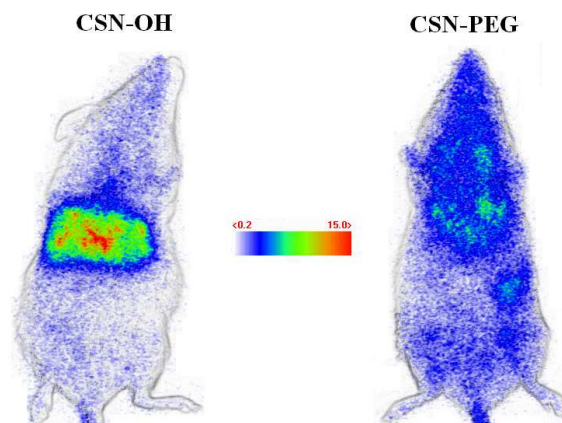


Fig. 7. Biodistribution of CSN-OH and CSN-PEG, 15 minutes after tail vein injection. Luminescence intensity is expressed in false color unit (1 unit = 2800 photons per $\text{s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{steradians}$).

First, we clearly observe the signal from the two types of CSN-based persistent luminescence nanoparticles through the animal no matter which type of surface coverage is used. We should notice that the signal coming from the probe is very clearly detectable through living tissues. The emission of the nitrido-silicate, around 610 nm puts this phosphor at the edge of the tissue transparency window. Due to lipids, blood and water the absorption is relatively high for wavelengths shorter than 600 nm [28]. However, the broad and intensive emission of CSN yields significant emission intensity in the long wavelength region. As observed in Fig. 7, hydroxyl-terminated CSN nanoparticles are almost instantly trapped within the liver. This behaviour of negatively charged nanoparticles has already been described with several carriers displaying similar surface coverage [1]. It is the result of a two-step recognition process initiated by opsonins from the bloodstream that bind negatively charged nanoparticles and trigger a global uptake of the resulting opsonised nanoprobe by Kupffer cells in the liver. The image from the other mouse shows a different behaviour of PEGylated CSN nanoparticles that evade instant trapping from the reticulo-endothelial system and circulate much longer in the bloodstream (Fig. 7).

6. Conclusion

We report the first use of orange-emitting $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}^{2+},\text{Tm}^{3+}$ persistent luminescence nanoparticles for real-time bioimaging in living animal. The preparation of the $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}^{2+},\text{Tm}^{3+}$ persistent luminescence nanoparticles by pulsed laser ablation in solution gives NPs with diameters in the range of 3-5 nm but the low quantity in solution prevents further use for bioimaging. However, extraction of nanoparticles after wet grinding gives enough NPs to realise the first proof that such nitridosilicate host can be used as optical probe for small animal *in vivo* imaging. Functionalization through simple surface chemistry could be used to change the behaviour of the probe *in vivo*. PEG grafting is responsible for a better distribution of the nanoparticles after systemic injection, delaying their uptake by the reticulo-endothelial system.

Acknowledgments

The authors acknowledge C. Rosticher and P. Legriel for the TEM measurements, D. Amans and D. Giaume for fruitful discussion for the pulsed laser ablation in liquid method and NPs characterization and P. Aschehoug for technical assistance. We thank also R. Lai Kuen, B. Saubaméa, and J. Seguin for their contribution and help to perform transmission electron micrographs, *in vivo* experiments, and image analysis with Image J software. This work has been supported by the French National Research agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project n° ANR-08-NANO-025).

5.2 Une transposition difficile aux applications *in vivo*

Il ressort de cette étude que la méthode par ablation laser, tout comme le broyage classique, permettent l'extraction de nanoparticules à partir d'une poudre de $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ (Eu^{2+} , Tm^{3+}) massif. Les deux stratégies ne sont cependant pas équivalentes. L'ablation laser libère des nanoparticules de petits diamètres, compris entre 3 et 5 nm, mais les rendements d'extraction sont particulièrement faibles. Cette méthode ne permet malheureusement pas d'obtenir assez de cristaux pour envisager une manipulation chez la souris. La seconde méthode, par broyage du matériau dans un mortier, conduit au rendement d'extraction raisonnable de 10% et à une quantité de cristaux suffisante pour effectuer la première preuve d'injection *in vivo*. En revanche, le diamètre des cristaux obtenus, d'environ 200 nm, est beaucoup plus important que celui des nanoparticules libérées par ablation laser, et risque de limiter l'application de cette matrice à l'imagerie optique du petit animal.

L'injection de ces nanoparticules de $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ (Eu^{2+} , Tm^{3+}) après excitation UV permet une détection de la luminescence persistante à travers les tissus de l'animal. Nous avons également prouvé que ces nanoparticules pouvaient être fonctionnalisées par du polyéthylène glycol, permettant ainsi de prolonger leur temps de demi-vie dans le sang. Ces résultats ne poussent pourtant pas à envisager un remplacement de l'ancienne matrice par ce nitridosilicate. Si l'on se base sur l'étude de biodistribution effectuée avec le silicate, il semble raisonnable de prévoir une capture majoritaire et rapide de ces cristaux de nitridosilicate par les organes du système monocyte-macrophage. Il devient pour ces raisons difficile d'envisager un passage à cette matrice pour les applications *in vivo* chez le petit animal.

Face à la difficulté de trouver un nanomatériau à luminescence persistante dont les propriétés optiques permettent une utilisation *in vivo* à travers les tissus vivants, nous avons fait le choix de conserver une matrice silicate proche de celle décrite dans les travaux de le Masne de Chermont et al., et d'optimiser le dopage en prenant appui sur le mécanisme de luminescence persistante. Cette approche constitue notre seconde stratégie pour améliorer les propriétés optiques des nanoparticules à luminescence persistante.

Chapitre 6

Vers une persistance plus longue du silicate *in vivo*

Sommaire

6.1	Le modèle de la diopside : $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$	91
6.2	Une nouvelle composition pour l'imagerie optique du petit animal	98

6.1 Le modèle de la diopside : $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$

L'étude qui suit est le résultat d'une étroite collaboration avec le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Chimie ParisTech (LCMCP), et prend largement appui sur les résultats de thèse d'Aurélié Lecointre intitulée "mécanismes de luminescence persistante de nouveaux types de marqueurs pour l'imagerie optique *in vivo*".

Nous avons vu dans la partie consacrée au mécanisme de luminescence persistante que le piège à électron jouait un rôle déterminant dans le processus d'émission/relaxation contrôlé par la chaleur, ou thermoluminescence. Il se trouve que le niveau du piège à électron sous la bande de conduction peut être modifié par changement du cation lanthanide impliqué dans le mécanisme. L'équipe de Bos et Dorenbos, de l'université de Delft, a montré qu'il était possible de placer les niveaux de chaque lanthanide sous la bande de conduction selon la schéma ci-dessous (Fig. 6.1) :

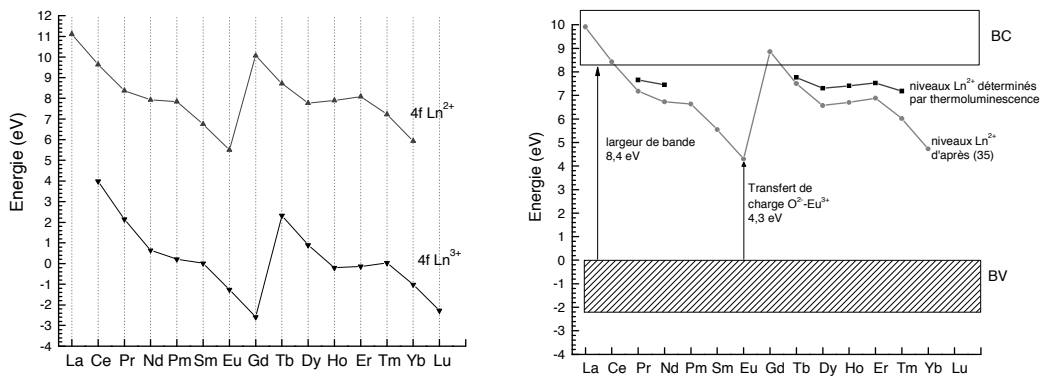


FIGURE 6.1 – Le modèle de Dorenbos. *A gauche*, diagramme des niveaux d'énergie des ions Ln^{2+} et Ln^{3+} sans rapport à une matrice. *A droite*, les mêmes niveaux placés dans une matrice de diopside.

Nous proposons dans l'article suivant une étude de l'influence de la profondeur du piège à électron, i.e. de sa localisation par rapport à la bande de conduction, sur les propriétés optiques de diopsides à luminescence persistante. Cette stratégie est tout d'abord appliquée aux diopsides dont la luminescence persistante s'excite sous rayons X, qui ne comprennent pas d'euprimum $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ (Mn^{2+} , Ln^{3+}), puis transposée au cas des diopsides tridopées $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+} , Mn^{2+} , Ln^{3+}) excitable sous UV.

Controlling Electron Trap Depth To Enhance Optical Properties of Persistent Luminescence Nanoparticles for In Vivo Imaging

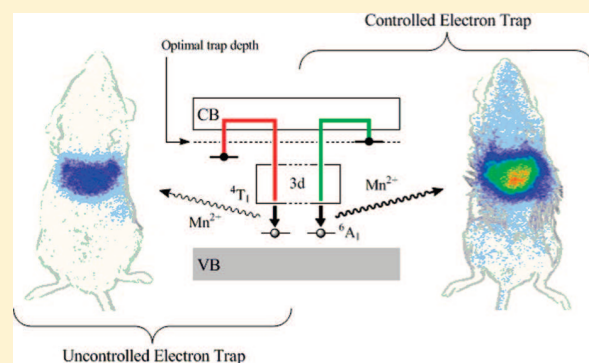
Thomas Maldiney,[†] Aurélie Lecointre,[‡] Bruno Viana,^{*,†} Aurélie Bessière,[‡] Michel Bessodes,[†] Didier Gourier,[‡] Cyrille Richard,^{*,†} and Daniel Scherman[†]

[†]Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie, CNRS, UMR 8151, Paris, F-75270 cedex France, Inserm, U1022, Paris, F-75270 cedex France, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, F-75270 cedex France, and ENSCP, Chimie ParisTech, Paris, F-75231 cedex France

[‡]Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (Chimie ParisTech), CNRS, UMR 7574, Paris, 75231 cedex 05, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Focusing on the use of nanophosphors for in vivo imaging and diagnosis applications, we used thermally stimulated luminescence (TSL) measurements to study the influence of trivalent lanthanide Ln^{3+} ($\text{Ln} = \text{Dy}, \text{Pr}, \text{Ce}, \text{Nd}$) electron traps on the optical properties of Mn^{2+} -doped diopside-based persistent luminescence nanoparticles. This work reveals that Pr^{3+} is the most suitable Ln^{3+} electron trap in the diopside lattice, providing optimal trap depth for room temperature afterglow and resulting in the most intense luminescence decay curve after X-ray irradiation. This luminescence dependency toward the electron trap is maintained through additional doping with Eu^{2+} , allowing UV-light excitation, critical for bioimaging applications in living animals. We finally identify a novel composition ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6:\text{Eu}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Pr}^{3+}$) for in vivo imaging, displaying a strong near-infrared afterglow centered on 685 nm, and present evidence that intravenous injection of such persistent luminescence nanoparticles in mice allows not only improved but highly sensitive detection through living tissues.



INTRODUCTION

In vivo optical imaging, using photons as primary information, has witnessed several major improvements in the last decades.¹ Among a wide panel of very sensitive and efficient photonic probes, inorganic-based sensors, such as quantum dots (QDs), potentially offer the highest quantum efficiency through living tissue.² Yet genuinely intense, QDs emission requires continuous illumination and thereby suffers from significant background signal (autofluorescence) emitted from irradiated tissues.³

To address this important issue, we reported the synthesis of persistent luminescence nanoparticles (PLNP) with the formula $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ (hereafter referred to as CZMSO:Eu,Dy) and sharing the same crystalline structure as diopside $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$.⁴ Such material possesses the ability to be excited under UV light before intravenous injection in mice, and to emit in the near-infrared window without further irradiation, circumventing autofluorescence from animal tissues. We have shown that PLNP could be used as a sensitive optical probe for in vivo imaging, and that their biodistribution was highly dependent on both core diameter and global surface charge.⁵ However, luminescence from these PLNP was not intense enough to provide long-term monitoring of in vivo probe accumulation, unveiling the need to work on new nanomaterials with improved optical characteristics.

To better understand the origin of such a phenomenon in the CZMSO lattice, and to ensure pure diopside crystalline structure, we have previously suggested a mechanism of persistent luminescence in the diopside host, with Mn^{2+} acting both as the hole trap and the recombination center. The X-ray induced thermally stimulated luminescence (TSL) measurements revealed that when Dy^{3+} was added as a codoping ion, the red persistent luminescence was enhanced.⁶ We then hypothesized that trivalent lanthanide ions could act as an efficient electron trap for persistent luminescence.⁷

Starting from the hypothesis that controlling electrons trap depth could help to enhance the optical properties of PLNP,⁸ we presently report the synthesis of several Mn^{2+} doped diopside nanoparticles, either codoped with trivalent lanthanide ions $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6:\text{Mn}^{2+}, \text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Dy}, \text{Pr}, \text{Ce}, \text{Nd}$), only excitable with X-rays (hereafter referred to as CMSO:Ln), or tridoped with divalent europium and trivalent lanthanide ions $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6:\text{Mn}^{2+}, \text{Eu}^{2+}, \text{Ln}^{3+}$, to enable UV excitation (hereafter referred to as CMSO:Eu,Ln). These nanomaterials were compared to hybrid enstatite–diopside CZMSO already used for in vivo imaging. Divalent manganese, present in all the compounds, is at

Received: May 25, 2011

Published: June 24, 2011

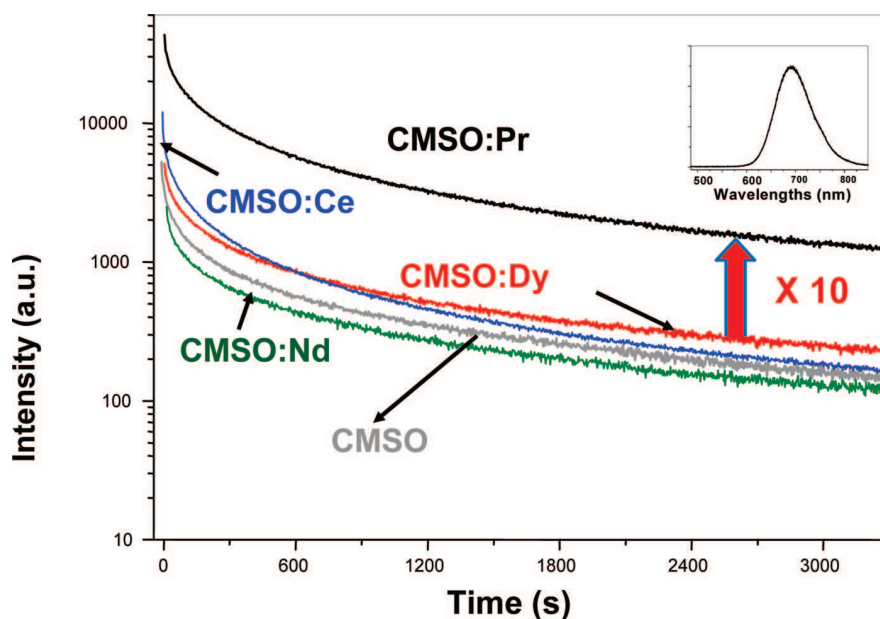


Figure 1. Decay of the Mn^{2+} luminescence intensity at 685 nm of CMSO and rare-earth-codoped CMSO:Ln compounds, recorded after 10 min X-ray irradiation. Inset: LLP spectrum, 6 s after X-ray irradiation, due to the ${}^4\text{T}_1 \rightarrow {}^6\text{A}_1$ transition of Mn^{2+} ions in the Mg^{2+} sites.

the origin of the red emission (transition from ${}^4\text{T}_1$ to the fundamental ${}^6\text{A}_1$ manifold).⁶ In this work, we identify Pr^{3+} as the optimal electron trap in the diopside host, which led to an improved nanomaterial, excitable with UV light and displaying the most intense afterglow in the near-infrared region. We finally managed to extract nanoparticles with narrow distribution from the initial polydispersed powder and report their application for highly sensitive real-time *in vivo* bioimaging in mice.

RESULTS AND DISCUSSION

Sol–Gel Synthesis of Diopside Nanoparticles and X-ray Diffraction (XRD) Characterization. Inorganic phosphors are generally synthesized by solid-state reaction, leading to micrometer-sized particles, unsuitable for *in vivo* experiments.^{9,10} For this reason, we preferred a sol–gel processing¹¹ under acidic conditions that allows a lower calcination temperature and provides nanocrystalline materials. The XRD patterns of CMSO:Eu, Pr and CMSO:Eu,Dy, shown in Figure S1 (Supporting Information), confirm the formation of pure monoclinic diopside crystallizing with space group $C2/c$ (JCPDS file No. 78-1390). Similar patterns were observed for CMSO:Dy, CMSO:Pr, CMSO:Ce, and CMSO:Nd. Hybrid hosts CZMSO:Eu,Pr and CZMSO:Eu,Dy also displayed the diopside pattern, but with broadened peaks, certainly due to the presence of enstatite residual phase (data not shown). Besides, we noticed that switching trivalent lanthanide or adding divalent europium as an extra dopant has no significant effect on the global structure of our final products.

Optical Characteristics of Mn^{2+} in the Diopside Host. Photoluminescence excitation and emission spectra, displayed in Supporting Information (Figure S2), show that near-infrared optical properties of tridoped CMSO:Eu,Pr are very similar to those previously observed in tridoped CZMSO:Eu,Dy.⁴ The same characteristics were observed for each synthesized compound (data not shown). All diopside nanomaterials display

several broad excitation bands between 270 and 420 nm due to 4f-5d transitions of Eu^{2+} . The emission spectra are composed of two emission bands at 580 and 685 nm. These bands are similar to those observed for diopsides doped only with Mn^{2+} and correspond to the same ${}^4\text{T}_1 \rightarrow {}^6\text{A}_1$ transition of Mn^{2+} in two different surroundings.⁷ Mn^{2+} in the Mg^{2+} site is responsible for the 685 nm emission band, whereas Mn^{2+} in the Ca^{2+} site leads to the 580 nm emission band.

Interestingly, we notice from the long-lasting phosphorescence (LLP) spectrum (insert in Figure 1) that emission from Mn^{2+} in the Ca^{2+} site has disappeared, resulting in a characteristic and exclusive red persistent luminescence around 685 nm due to Mn^{2+} in the Mg^{2+} site, which is very suitable for *in vivo* applications.¹²

Controlling Electron Trap Depth in CMSO:Ln Nanoparticles. Taking into account the results from X-ray-induced TSL measurements in the CMSO host, we have previously hypothesized that Mn^{2+} acts both as recombination center and hole trap.⁷ The efficiency of persistent luminescence is determined by thermally activated detrapping of electrons. Moreover, preliminary experiments on Dy^{3+} - and Mn^{2+} -codoped diopside (referred to here as CMSO:Dy) suggested that the rare earth ion is an electron trap.⁷ Owing to the variation of electron affinity and ionization energy along the lanthanide (Ln^{3+}) series, we may expect to control the electron trap depth by specific Ln^{3+} doping.^{13,14} Figure 1 shows the persistent afterglow at 685 nm following X-ray excitation of CMSO (only doped with manganese) and CMSO:Ln with $\text{Ln} = \text{Dy}^{3+}$, Pr^{3+} , Ce^{3+} , and Nd^{3+} . It appears that CMSO, CMSO:Dy, CMSO:Ce, and CMSO:Nd matrixes exhibit similar long-lasting phosphorescence (LLP), while CMSO:Pr shows a 10 times increased emission intensity with the same nonexponential decay kinetics.

This luminescence enhancement by Pr^{3+} doping can be understood by comparing TSL spectra of the different CMSO matrixes, shown in Figure 2. The dashed rectangle represents the approximate temperature range where electron traps contribute

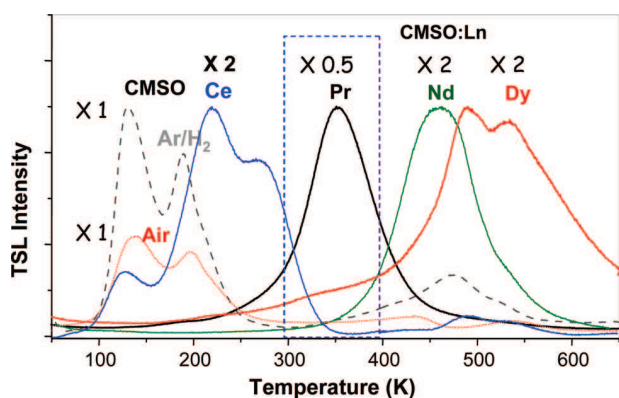


Figure 2. Mn^{2+} TSL intensity at 685 nm of CMSO and CMSO:Ln materials, recorded after 10 min X-ray irradiation. The approximate temperature range of interest for room temperature persistent luminescence is delimited by a dotted rectangle. The dotted curve (in red) and the interrupted curve (in black) represent TSL of CMSO treated at 1100 °C in air and in Ar/H_2 atmosphere, respectively. The other curves represent TSL of CMSO:Ln, with 1% doping with Ln = Ce^{3+} , Nd^{3+} , Dy^{3+} , and Pr^{3+} . Except for the case of CMSO treated in air, all the TSL curves are normalized to that of CMSO treated in Ar/H_2 , with the amplification (or reduction) coefficients given in the figure.

to the room temperature afterglow. Uncodoped CMSO (i.e., only doped with 2.5% Mn^{2+}) sintered at 1100 °C for 10 h in air and in a reducing Ar/H_2 atmosphere gives the red dotted curve and the discontinuous black glow curve, respectively. One observes intense TSL peaks at 130 K and 190 K, and weaker peaks above room temperature due to intrinsic defects acting as electron traps. Low temperature peaks are twice enhanced in CMSO thermally annealed under reducing conditions, and a new and intense peak appears at 475 K. Therefore, reducing conditions favor the formation of intrinsic defects, and the new peak at 475 K is likely due to oxygen vacancies,^{15,16} known as efficient electron traps.

The situation where TSL peaks are located far below and far above room temperature is not optimal for a strong LLP, as the low temperature peaks only contribute to the short time part of the afterglow, while thermal energy at room temperature is not sufficient to induce a significant electron release from deep traps, which control the intensity and the length of the afterglow.

The TSL signal is strongly modified upon doping with trivalent rare earth ions (Figure 2), with new peaks in a broad temperature range, replacing the low temperature peaks at 130 K and 190 K. This confirms that Ln^{3+} ions act as electron traps and that their depth can be tuned by changing the trivalent lanthanide. The TSL peaks of Nd^{3+} (460 K) and Dy^{3+} (480 K and 530 K) are in the same temperature range as oxygen vacancy intrinsic defects (475 K). This explains why Nd^{3+} and Dy^{3+} doping have little effect on the intensity and length of the afterglow. The TSL glow curve of CMSO:Ce is more complex, with a low temperature peak (≈ 130 K) similar to the undoped material, and two peaks at higher temperatures (216 K and 270 K). However, the latter are still below room temperature so they do not influence the intensity and length of the afterglow. On the contrary, Pr^{3+} gives a very strong TSL peak centered at 353 K (see the normalizing coefficient for the different Ln^{3+} cations in Figure 2). The position of this TSL peak just above room temperature explains why an intense and long-lasting luminescence is observed for CMSO:Pr. The high intensity of

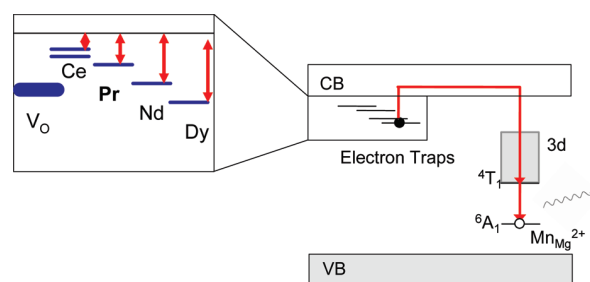


Figure 3. Schematic energy level diagram of Mn^{2+} and Ln^{3+} in CMSO. The main hole traps are Mn^{2+} ions in the Mg^{2+} site, while electrons are trapped by oxygen vacancies (V_O) and Ln^{3+} ions. TSL and persistent luminescence occur by thermally activated electron release and capture by Mn^{3+} ions, giving the Mn^{2+} emission. The insert shows the relative positions of electron trap levels with respect to the conduction band edge.

the TSL peak of CMSO:Pr compared to CMSO:Nd and CMSO:Dy by a factor close to 4 may be partly due to the thermal quenching of Mn^{2+} luminescence when going from room temperature to higher temperature.

The mechanism of TSL and long lasting luminescence is summarized in Figure 3, which displays a schematic energy level diagram of Mn^{2+} - and Ln^{3+} -doped CMSO. During irradiation, holes are mainly trapped by Mn^{2+} ions in Mg^{2+} sites,⁷ giving Mn^{3+} , while electrons are trapped by oxygen vacancies and Ln^{3+} ions. Upon thermal activation, electrons are released from their traps and captured by Mn^{3+} , giving rise to the ${}^4\text{T}_1 \rightarrow {}^6\text{A}_1$ Mn^{2+} emission. The different trap depths E (with respect to the conduction band edge) can be roughly estimated by the simple expression¹⁷ $E \approx 0.002T_M$, where T_M is the temperature of the peak maximum. It gives $E \approx 0.95$ eV for the oxygen vacancies ($T_M = 475$ K), and $E \approx 0.4$ and 0.5 eV (Ce^{3+}), $E \approx 0.7$ eV (Pr^{3+}), $E \approx 0.92$ eV (Nd^{3+}), and $E \approx 0.96$ – 1 eV (Dy^{3+}). It thus appears that an electron trap depth of about 0.7 eV is a good compromise for a strong room temperature long-lasting luminescence in diopside.

UV-Induced Persistent Luminescence in CMSO:Eu,Ln Nanoparticles. We have seen that persistent luminescence occurs in CMSO:Ln and that controlling electron trap depth could lead to more efficient materials with intense persistent luminescence properties. However, X-ray irradiation hampers further use of these materials for in vivo imaging. Thereby, in order to afford practical application, divalent europium was used as an extra dopant for sensitization to UV irradiation. Persistent luminescence decay was followed under the photon counting system after 5 min UV excitation. Figure 4 shows the decay curves for CMSO:Eu,Dy and CMSO:Eu,Pr nanoparticles compared to our previous silicate CZMSO:Eu,Dy, described as the first long-lasting luminescence material for real-time bioimaging,⁴ as well as CZMSO:Eu,Pr. The afterglow dependency, witnessed with X-ray excitable bidoped compounds, is preserved after additional doping with divalent europium. Indeed, Pr^{3+} still acts as the most efficient electron trap for persistent luminescence, leading to a CMSO:Eu,Pr emission more than 100 times brighter than in the case of CMSO:Eu,Dy. Interestingly, the factor 10 that kept apart both CMSO:Dy and CMSO:Pr after X-ray excitation transforms into a factor superior to 100 in europium-doped CMSO:Eu,Dy and CMSO:Eu,Pr after UV excitation. This amplification of the difference between Dy- and Pr-doped materials can be explained from the role of europium, required

to capture UV photons (there is no persistent luminescence under UV excitation without Eu^{2+} doping), as Ln^{3+} ions are localized close to Eu^{2+} ions, which decreases the competition with other electron traps. Yet, the most promising result comes from the comparison of the new $\text{CMSO}:\text{Eu},\text{Pr}$ nanoparticles to the first generation of $\text{CZMSO}:\text{Eu},\text{Dy}$ nanoparticles.⁴ Experimental results in Figure 4 show that the red luminescence from $\text{CMSO}:\text{Eu},\text{Pr}$ appears about 7 times more intense than that in the previously described $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu}^{2+},\text{Mn}^{2+},\text{Dy}^{3+}$ ($\text{CZMSO}:\text{Eu},\text{Dy}$) NPs. We notice that Pr^{3+} failed to increase the afterglow in hybrid CZMSO host, comprising both enstatite and diopside. Although Pr^{3+} seems to be the optimal electron trap in diopside, this trend has no reason to be maintained in a different silicate host, enstatite in particular. Indeed, TSL measurements (not shown) show that the peaks at 480 K and 530 K of $\text{CMSO}:\text{Dy}$ are weaker, broader, and shifted to 330 K and 475 K in $\text{CZMSO}:\text{Dy}$, which corresponds to electron trap depths of 0.66 and 0.95 eV, respectively. As a trap depth of ≈ 0.7 eV is optimal for an optimized long-lasting luminescence, this result

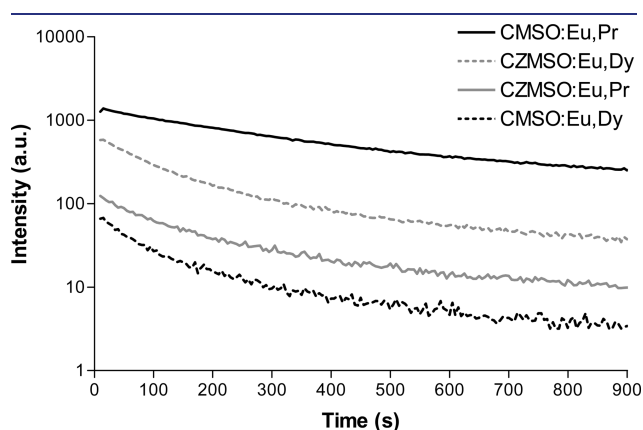


Figure 4. Decay of the persistent luminescence of $\text{CZMSO}:\text{Eu},\text{Dy}$, $\text{CZMSO}:\text{Eu},\text{Pr}$, $\text{CMSO}:\text{Eu},\text{Dy}$, and $\text{CMSO}:\text{Eu},\text{Pr}$ compounds recorded after 5 min UV excitation (6 W lamp, 254 nm) with the Biospace Photon-Imager (for each composition, we used 10 mg of powder).

indicates that dysprosium act as a better electron trap in enstatite than praseodymium, while the contrary holds for diopside.

In order to validate a potential use of this new efficient composition for *in vivo* imaging, we selected the best two candidates from polydisperse samples ($\text{CZMSO}:\text{Eu},\text{Dy}$ and $\text{CMSO}:\text{Eu},\text{Pr}$) and confronted them with the exact same nano-sized distribution for mice bioimaging.

CZMSO- and CMSO-Based PLNP Characterization. In a previous study, we have demonstrated that the intensity of persistent luminescence in diopside is not only dependent on the amount of material but also on the diameter of nanoparticles.⁵ For this reason, it was critical to extract persistent luminescence nanoparticles (PLNP) with an identical size for each compound in order to compare their emission properties. As indicated in Supporting Information (Figure S3), particle size distribution (measured by dynamic light scattering) as well as transmission electron micrographs for CZMSO - and CMSO -based PLNP show that both types of PLNP display the same shape (not exact spheroids) and have the same hydrodynamic diameter of approximately 140 nm in aqueous solution. The persistent luminescence decay curves of crude PLNP suspended in normal saline solution (injection medium, 150 mM NaCl, pH = 5.5) were acquired for 15 min with a photon imager (Biospace, Paris, France). Results in Supporting Information (Figure S4) show that a significant difference is still noticeable between CZMSO and CMSO hosts after narrowing the nanoparticle size distribution. Nevertheless, calculated values emphasize a slight decrease in the ratio of intensities (CMSO compared to CZMSO), and the factor 7 observed for polydisperse nanomaterials turns into a factor 5 with the same nanoparticle distribution. This weak decrease in the ratio could be attributed to different surface-quenching effects, depending on the host structure, composition, or crystallization degree.^{18,19}

In Vivo Imaging. A comparative *in vivo* study of the two best UV-excitable diopside-based compositions ($\text{CZMSO}:\text{Eu},\text{Dy}$ and $\text{CMSO}:\text{Eu},\text{Pr}$) was therefore necessary in order to ensure a significant difference between selected luminescent nanoparticles through living animal tissues. Figure 5 shows the luminescence images obtained from the photon-counting system after

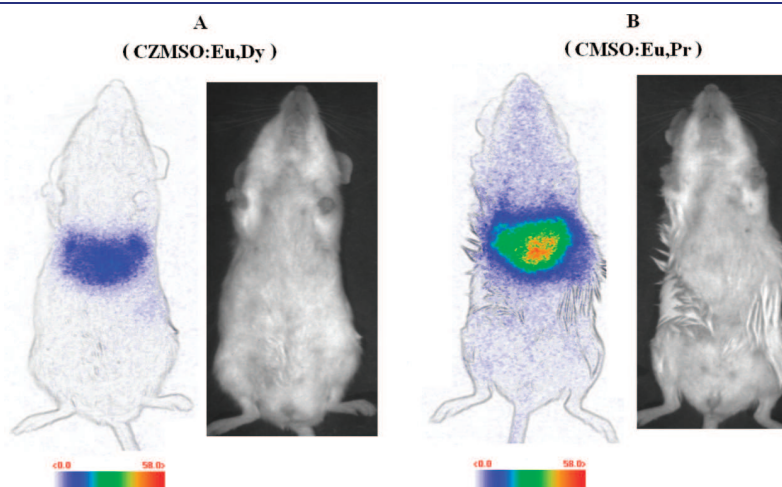


Figure 5. *In vivo* imaging of different CZMSO and CMSO diopside PLNPs under the photon-counting system. (A) $\text{CZMSO}:\text{Eu},\text{Dy}$; (B) $\text{CMSO}:\text{Eu},\text{Pr}$. The signal was recorded for 15 min following systemic injection of the probes (100 μg , excited 5 min under a 6 W UV lamp at 254 nm before injection). Luminescence intensity is expressed in false color units (1 unit = 2800 photons per $\text{s} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{steradians}$). For both compositions (A and B), the left picture represents the luminescence signal from PLNP, and the right picture represents the photograph of the imaged mouse.

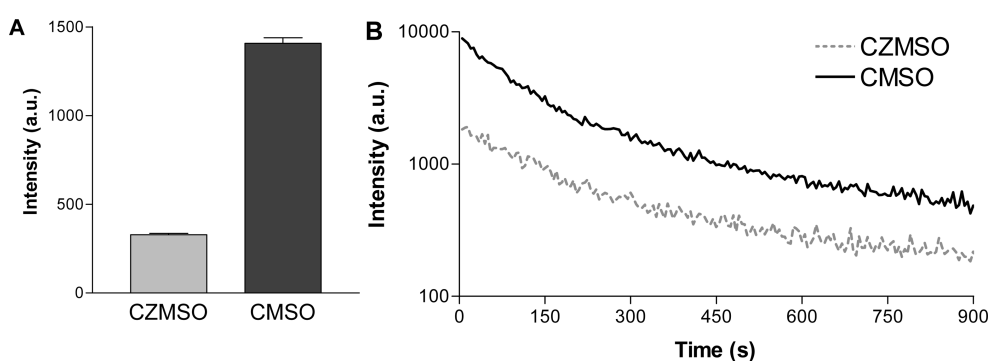


Figure 6. (A) Semiquantitative image-based comparison of the signals acquired after 1 min from the whole mouse body. (B) Comparative luminescence decay curves corresponding to the signal of each mouse.

15 min acquisition, as well as photographs of the imaged mice. Both compositions have the same biodistribution: PLNP almost instantly concentrates within the liver. This trend, already witnessed with many nanoparticle systems,²⁰ is mainly related to the global negative charge of the nanoprobe under physiological pH that triggers a recognition process via opsonins, leading to a major uptake of hydroxyl-PLNP by Kupffer cells in the liver. The difference between CZMSO:Eu,Dy- and CMSO:Eu,Pr-injected mice is striking. First, the new composition lightens some of the main pectoral limbs' circulation routes, indistinguishable on the CZMSO-injected mouse. Then, a closer look at the luminescence signals reveals a significant change in the surface delimited by equal intensities around liver. Indeed, after adjustment of threshold and appropriate binarization treatment, image analysis of the liver from mice A and B in the bottom of Figure S5 (Supporting Information) indicates that the ROI surface calculated from the PLNP signal in liver significantly increases from mouse A (injected with CZMSO:Eu,Dy) to mouse B (injected with CMSO:Eu,Pr). This result, obviously dependent on photon scattering by tissues, indicates that praseodymium-doped diopside (CMSO:Eu,Pr) returns additional information on PLNP in vivo local distribution within the liver, allowing a more sensitive detection of the probe through living tissues.

The Biospace photon-counting process allowed semiquantization of the signals from comparative study of PLNP in mice A and B. Results presented in Figure 6 indicate that CMSO:Eu,Pr is almost five times more intense through living tissues (Figure 6A). Despite a weak trend to decrease with time, this factor remains quite stable after several minutes (Figure 6B) and ensures an observation for longer periods of time (from 3 to 5 times longer). For example, the emission intensity for CMSO after 900 s is equivalent to that of CZMSO after only 200 s. This improvement should allow new applications for real-time in vivo imaging. Moreover, it shows an exciting perspective in the development of new targeting PLNP to visualize tumor environment, generally achievable through longer circulation of the probe. At last, although diopside appears very likely to be biocompatible,^{21,22} the improved signal could be used to reduce injected dose and circumvent, or at least reduce, possible toxic effects to be expected after intravenous administration of silicate- and zinc-containing nanoprobe.

CONCLUSION

We managed to control lanthanide electron trap depth to highly enhance the red-afterglow of this material. We found that

doping CMSO with Pr³⁺ ions provides electron trap levels about 0.7 eV below the conduction band edge, which allows optimal electron release and recombination at room temperature responsible for the highest persistent luminescence. Additional doping with divalent europium not only allowed UV excitation of PLNP, critical for a suitable in vivo application, but also left the relative efficiency of electron traps unchanged. Particle size selection and surface modification led to a novel near-infrared optical nanoprobe with high sensitivity and negative surface charge. We finally demonstrated the advantages of these intense in vivo PLNP, for real-time optical imaging in healthy mice, responsible for a significant signal benefit through living tissue and the ability to access longer monitoring of the probe.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. XRD patterns, TEM images, optical properties, and size distributions of the injected nanoparticles, as well as image analysis results (from Image J software) after PLNP systemic injection in mice. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

cyrille.richard@parisdescartes.fr; bruno-viana@chimie-paristech.fr

ACKNOWLEDGMENT

We thank René Lai Kuen, Bruno Saubaméa, and Johanne Seguin for their contribution and help to record transmission electron micrographs and perform in vivo experiments and image analysis with Image J software. This work has been supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project no. ANR-08-NANO-025).

REFERENCES

- (1) Weissleder, R.; Pittet, M. J. *Nature* **2008**, *452*, 580–589.
- (2) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446.
- (3) Frangioni, J. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 626–634.
- (4) le Masne de Chermont, Q.; Chanéac, C.; Seguin, J.; Pelle, F.; Maîtrejean, S.; Jolivet, J.-P.; Gourier, D.; Bessodes, M.; Scherman, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 9266–9271.

- (5) Maldiney, T.; Richard, C.; Seguin, J.; Wattier, N.; Bessodes, M.; Scherman, D. *ACS Nano* **2011**, *5*, 854–862.
- (6) Lecointre, A.; Viana, B.; LeMasne, Q.; Bessière, A.; Chanéac, C.; Gourier, D. *J. Lumin.* **2009**, *129*, 1527–1530.
- (7) Lecointre, A.; Bessière, A.; Viana, B.; Gourier, D. *Radiat. Meas.* **2010**, *45*, 497–499.
- (8) Lü, X.; Shu, W.; Fang, Q.; Yu, Q.; Xiong, X. *J. Mater. Sci.* **2007**, *42*, 6240–6245.
- (9) *Phosphor Handbook*; Weber, M. J. Ed. CRC Press: Boca Raton, Boston, London, New York, Washington DC, 1999.
- (10) Escribano, P.; Julian-Lopez, B.; Planelles-Arago, J.; Cordoncillo, E.; Viana, B.; Sanchez, C. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 23–40.
- (11) Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *The Physics and Chemistry of the Sol Gel Processing*; Academic: London, 1990.
- (12) Cheong, W. J.; Prahl, S. A.; Welch, A. J. *IEEE J. Quantum Electron.* **1990**, *26*, 2166–2185.
- (13) Lecointre, A.; Bessière, A.; Bos, A. J. J.; Dorenbos, P.; Viana, B.; Jacquart, S. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 4217–4227.
- (14) Dorenbos, P.; Krumpel, A. H.; van der Kolk, E.; Boutinaud, P.; Bettinelli, M.; Cavalli, E. *Opt. Mater.* **2010**, *32*, 1681–1685.
- (15) Pauwels, D.; Le Masson, N.; Viana, B.; Kahn-Harari, A.; van Loef, E. V. D.; Dorenbos, P.; van Eijk, C. W. E. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **2000**, *47*, 1787–1790.
- (16) Pidol, L.; Kahn-Harari, A.; Viana, B.; Virey, E.; Ferrand, B.; Dorenbos, P.; de Haas, J. T. M.; van Eijk, C. W. E. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **2004**, *51*, 1084–1087.
- (17) Randall, J. T.; Wilkins, M. H. F. *Proc. R. Soc. A* **1945**, *184*, 366–389.
- (18) Mialon, G.; Turkcan, S.; Alexandrou, A.; Gacoin, T.; Boilot, J. P. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18699–18706.
- (19) Buissette, V.; Huignard, A.; Gacoin, T.; Boilot, J. P.; Aschehoug, P.; Viana, B. *Surf. Sci.* **2003**, *532*, 444–449.
- (20) Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Vathy, L. A.; Bergey, E. J.; Sajjad, M.; Prasad, P. N. *ACS Nano* **2010**, *4*, 699–704.
- (21) Nonami, T.; Tsutsumi, S. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1999**, *10*, 475–479.
- (22) Wu, C.; Chang, J. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2007**, *83*, 153–160.

6.2 Une nouvelle composition pour l'imagerie optique du petit animal

Prenant appui sur le mécanisme de luminescence persistante dans la diopside et l'hypothèse selon laquelle la profondeur du piège à électron contrôle le dépiégeage de charge à l'origine de l'émission de lumière dans cette matrice, nous avons montré qu'il était possible de préparer une composition optimisée excitable sous rayons X, $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ (Mn^{2+} , Pr^{3+}), présentant de meilleures propriétés optiques que ses homologues $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ (Mn^{2+} , Ln^{3+}). Les résultats de cette étude confirment l'existence d'une profondeur optimale de piège, obtenue avec Pr^{3+} , à laquelle se produit l'émission de luminescence persistante la plus intense et durable à température ambiante.

L'ajout d'euporium au cours de la synthèse a permis de transposer ces observations aux diopsides excitables sous rayonnements UV et de faire apparaître une nouvelle composition pour l'imagerie optique *in vivo* : $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+} , Mn^{2+} , Pr^{3+}). Cette composition présente des propriétés optiques bien supérieures à la génération précédente de nanoparticules à luminescence persistante, décrite par le Masne de Chermont et al, cela sans changement de la voie de synthèse ou de la température de calcination. Ainsi, l'extraction de nanoparticules est accessible suivant le même traitement par broyage/hydroxylation et permet d'obtenir des nanoparticules à luminescence persistante bien plus intenses que celles de la génération précédente. Leur utilisation chez le petit animal donne notamment accès à des observations cinq fois plus longues *in vivo*, ainsi qu'à la possibilité de réduire les doses injectées aux souris.

Malgré un certain nombre de progrès encourageants au regard des différentes applications envisagées *in vivo*, l'utilisation de la luminescence persistante empêche toujours les observations sur de très longs termes, de l'ordre de la dizaine d'heures ou de la journée. Pourtant, la plupart des sondes d'imagerie optique évoquées dans l'introduction permettent ce type d'observations prolongées, sans contrainte de temps. Malheureusement, aucune optimisation de la luminescence persistante telle que nous l'envisageons dans ces matériaux excitables sous UV ne permettra un jour de répondre à cette limitation critique. Il apparaît ici nécessaire de reconsidérer le principe même d'utilisation de ces nanoparticules pour l'imagerie optique du petit animal, moyennant un changement radical de leurs propriétés optiques ou la possibilité de rendre accessible leur observation prolongée *in vivo*.

Quatrième partie

Le pas en avant pour l'imagerie optique
in vivo : ZnGa_2O_4 (Cr^{3+})

Chapitre 7

L'excitation visible de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+})

Sommaire

7.1	L'efficacité du gallate massif	101
7.2	De nouvelles perspectives pour l'imagerie optique <i>in vivo</i>	124

7.1 L'efficacité du gallate massif

Aurélie Bessière et son équipe du LCMCP ont récemment rapporté les propriétés de luminescence persistante d'un gallate de zinc dopé chrome : ZnGa_2O_4 (Cr^{3+}). Préparé par voie solide, ce composé émet après excitation UV un signal de luminescence persistante centré sur 700 nm environ dix fois plus intense que celui de la composition initiale de le Masne de Chermont et al. Comme nous l'avons évoqué au chapitre précédent, toute obstination à poursuivre la recherche de composés excitables dans l'UV, si efficaces soient-ils, serait assujettie au mêmes contraintes d'observation que les matériaux précédents. Pourtant, cette nouvelle composition présente un avantage décisif vis-à-vis des autres matériaux à luminescence persistante : son centre luminescent est un métal de transition particulier, le chrome. Une fine observation de la spectroscopie de cet élément dans la matrice du gallate indique qu'il est possible d'exciter sa photoluminescence dans plusieurs zones du spectre visible : le bleu et l'orange-rouge. Ces propriétés d'excitation de la photoluminescence dans une zone proche de la fenêtre de transparence des tissus ont fait naître dans notre équipe l'espoir de pouvoir utiliser ce couple chrome/gallate pour obtenir un signal de luminescence persistante excitable *in situ*, à travers le corps de l'animal.

La seconde information importante à propos de ces matériaux concerne les nombreuses voies de synthèse accessibles : solide, hydrothermale, micro-ondes... Ces deux derniers procédés permettent notamment la formation directe de nanoparticules de gallate de zinc, sans calcination à haute température. Nous remarquerons que l'étape de calcination est bien souvent limitante dans la formation de nanoparticules. Le phénomène de frittage, qui se produit pendant le chauffage, est responsable d'une augmentation significative de la taille des grains. Ainsi, il peut être utile de sensiblement diminuer les températures de traitement thermique, cela pour limiter la croissance des grains au cours de la synthèse. Cette observation sur les procédés de synthèse du gallate permet d'envisager la formation de nanoparticules plus petites, avec de meilleurs rendements d'extraction, susceptibles de satisfaire au besoin des applications *in vivo*.

Partant de l'idée que le gallate de zinc pourrait nous permettre de préparer des nanoparticules à luminescence persistante excitables dans la zone de faible absorption des tissus, nous présentons pour la première fois dans l'article suivant l'utilisation de nanoparticules de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+}) comme nouvelle sonde d'imagerie optique *in vivo*.

Persistent nanophosphors activated *in vivo* for the optical imaging of vascularization, tumors and grafted cells

Thomas Maldiney,^a Johanne Seguin,^a Aurélie Bessière,^b Bruno Viana,^b Didier Gourier,^b Michel Bessodes,^a Daniel Scherman,^a Cyrille Richard,^{a,*}

^aUnité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie; UMR 8151 CNRS; U 1022 Inserm; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 cedex France; Chimie-ParisTech, Paris, F-75231 cedex France;

^bEcole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (Chimie-ParisTech) Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris; CNRS, UMR 7574, Paris, 75231 Paris Cedex 05, France.

Corresponding author: cyrille.richard@parisdescartes.fr

Optical imaging constantly demands more sensitive tools intended for biomedical research and medical applications. Near-infrared persistent luminescence nanoparticles have recently been introduced to enable highly sensitive *in vivo* optical detection and complete avoidance of tissue autofluorescence. However, the first generation of persistent luminescence nanoparticles had to be excited *ex vivo*, prior to systemic administration, which prevented long-term imaging in living animal. We presently introduce a novel generation of optical nanoprobe, based on chromium-doped zinc gallate, whose persistent luminescence can be activated *in vivo* through living tissues using highly penetrating low energy photons from the red region of the visible spectrum. Surface functionalization of this photonic probe can be adjusted to favor multiple challenging biomedical applications such as tumor-targeting. Noteworthy for the growing scientific community involved in studying cell tropism and cellular recognition, we

show that cells can endocytose these nanoparticles *in vitro* and that, after intravenous injection, we can track these labelled cells in the body of the injected animal and follow cell biodistribution by a simple whole animal optical detection, opening new perspectives for cell therapy research and for a variety of diagnosis applications.

KEYWORDS. Persistent luminescence, Nanoparticle, Tumor targeting, In vivo Imaging, Cellular Tracking.

Persistent luminescence relates to a particular optical phenomenon, in which the excitation light is stored by the material within a few minutes to be slowly released upon thermal activation to emitting centers, thereby producing a light emission which can last for hours. The past five years have witnessed several major advances to establish near-infrared (NIR) emitting persistent luminescence nanoparticles (PLNP) as a novel, unique, and highly sensitive technology for real-time optical imaging in small animal.^{1,2,3} Based upon their ability to circumvent autofluorescence from living tissues,⁴ and contrary to the widely known Quantum Dots (QDs)⁵ or other fluorescence-based techniques,⁶ these nanomaterials can be optically excited under UV light or X-rays before their injection to small animals and emit a NIR persistent luminescence, which can be monitored *in vivo* for up to one hour after their systemic injection.⁷ Recent developments have led to the description of a persistent luminescence-based Förster resonance energy transfer,⁸ and to the first proofs that such nanocrystals could be specifically directed against malignant cells through proper surface functionalization with targeting ligands.^{9,10}

Though intended for diagnosis applications in living animals, PLNP still suffer from limitations. In particular, the first generation PLNP have to be excited *ex vivo* by UV light prior to systemic administration, which prevents long-term imaging in living animal. Thus, these PLNP cannot allow to assess *in vivo* tumor homing strategies such as those relying on slow accumulation of stealth nanocarriers within malignant stroma by the enhanced permeability and retention (EPR) effect.^{11,12} Depending on the nanoparticle characteristics, such retention process usually requires from 2 to 24

hours.^{13,14} This is far too long in relation to the emission from persistent luminescence nanoparticles, which hardly exceeds one hour *in vivo*. To overcome this major restriction, the development of new compounds with longer decay time in the NIR region appears critical. Efforts to unravel the mechanism of persistent luminescence have resulted in optimized compositions and enhanced optical characteristics.^{15,16,17} In particular, bulk powder from trivalent chromium-doped gallate ($\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}$) has attracted serious attention, due to its bright near-infrared persistent luminescence after UV excitation.¹⁸ Recently, Pan et al. reported that the same transition metal ion in micrometric gallogermanates ($\text{Zn}_3\text{Ga}_2\text{Ge}_2\text{O}_{10}:\text{Cr}^{3+}$) could be responsible for a similar near-infrared persistent luminescence signal excitable up to 590 nm.¹⁹

Given the predominant role of surface effects in luminescent phenomenon,²⁰ the optical properties from bulk samples with sizes in the micrometric range may hardly be transposed to monodisperse nanosized crystals, and still depends highly on both nanoparticle diameter and shape.² In the present study, we report the first design of NIR-emitting PLNP based on chromium-doped zinc gallate structure ($\text{ZnGa}_{2(1-x)}\text{Cr}_{2x}\text{O}_4$) that can be activated *in situ*, through the animal tissues, upon a simple illumination under orange/red light-emitting diodes (LEDs). This breakthrough for *in vivo* optical imaging allows the most simple and convenient recovery of persistent luminescence signal, whenever needed, as well as highly sensitive detection of the probe in deep tissues, freed from autofluorescence and signal loss associated with spectral analysis and background subtraction.⁶

Nanoparticles with formula $\text{ZnGa}_{1.995}\text{Cr}_{0.005}\text{O}_4$ in the form of a fine white powder, referred to as ZGO, were synthesized by low-temperature sintering in air after hydrothermal crystallization of chromium-doped zinc gallate under pressure.^{21,22} Dynamic light scattering measurements on the powder after wet grinding in diluted sodium hydroxide (5mM) and ultrasound dispersion indicated the formation of ZGO nanoparticles characterized by a large distribution centered on 150 nm with relatively high polydispersity index comprised between 0.3 and 0.4. The X-ray diffraction pattern confirmed the crystallization of pure zinc gallate from cubic spinel phase (Supplementary Fig. S1). The

photoluminescence excitation spectrum of ZGO monitored at 705 nm was composed of four broad bands that covered a wide spectral region from UV to red (Fig. 1a). The most intense band peaking at 245 nm corresponds to $O^{2-}Ga^{3+}$ charge transfer transitions, responsible for the optical band gap of $ZnGa_2O_4$. Excitation in this band allows the promotion of electrons from the valence band to the conduction band, i.e. the creation of free holes in the valence band and of free electrons in the conduction band. The other three bands peaking at 290 nm, 425 nm and 580 nm, originate from Cr^{3+} doping ion and are ascribed to ${}^4A_2({}^4F) \rightarrow {}^4T_2({}^4P)$, ${}^4A_2({}^4F) \rightarrow {}^4T_1({}^4F)$ and ${}^4A_2({}^4F) \rightarrow {}^4T_2({}^4F)$ d-d transitions of Cr^{3+} , respectively. The latter broad excitation band (${}^4A_2({}^4F) \rightarrow {}^4T_2({}^4F)$ of Cr^{3+}) partly superimposes to a low tissue absorption zone (red rectangle, Fig. 1a). Interestingly, in addition to these well-known photoluminescence characteristics, ZGO nanoparticles displayed an intense and long-lasting NIR luminescence centered on 695 nm after two minutes UV excitation at 254 nm (Fig. 1b. and c), just like their micrometric bulk counterpart.¹⁸ The 254 nm excitation leads to the creation of free electrons and holes that get trapped at specific defects of the crystal and allow the material to store the excitation light. After the end of the excitation, the carriers are progressively released by thermal assistance from the trapping defects and radiatively recombine at Cr^{3+} ions. This persistent luminescence phenomenon, which originates from this delayed release of carriers, had never been reported before on ZGO nanoparticles. Our observations show that decreasing the size of the ZGO particle from the micrometer to the nanometer range does not cause any systematic luminescence quenching effect, which might have been induced by either non-radiative recombination due to surface defects, by a poor crystal order in the particles, or alternatively by a decreased probability to find chromium and the active trapping defects in the same infinitesimal volume element. The hydrothermal crystallization procedure that we have used, ensures most probably a high crystal order for the particles as well as a homogeneous repartition of Cr^{3+} ions and defects, which is favorable to persistent luminescence. Furthermore, a mechanism implying a major role for Cr^{3+} (see below) and for trapping defects in the close vicinity of Cr^{3+} may explain that surface defects are not detrimental to the persistent

luminescence in ZGO nanoparticles.

In addition to this UV-excited persistent luminescence property, the ZGO nanoparticles revealed their ability to retrieve similar NIR persistent luminescence after two minutes illumination under a simple orange/red LEDs source (Fig. 1a, b and d). This unexpected result shows that carriers separation and trapping in zinc gallate lattice is possible, not only after free carriers creation (254 nm illumination), but also after a simple excitation of Cr^{3+} in its ${}^4\text{T}_2$ (${}^4\text{F}$) excited state (orange/red illumination, Fig. 1d). This refers to a very singular persistent luminescence mechanism in ZGO nanoparticles, which is currently under investigation. Regarding optical imaging applications in living animal, this crucial result opens the perspective to use orange/red LEDs source to go through the animal tissues and excite persistent luminescence *in situ*, according to the general principle described in Fig. 2.

The *in vivo* colloidal stability and biodistribution of any nanocarrier highly depend on several critical parameters, among which size and surface properties certainly come first.²³ We have shown that reticulo-endothelial uptake could be successfully delayed by the use of relatively small persistent luminescence nanoparticles, with diameters between 40 and 100 nm.² For this reason, *in vivo* experiments were performed with a monodisperse selection of small particles with a hydrodynamic diameter of 40 nm (polydispersity index below 0.1), which were obtained by selective sedimentation of the previous basic suspension of hydroxyl-terminated ZGO nanoparticles, referred to as ZGO-OH nanoparticles. A total of 10^{13} crude ZGO-OH nanoparticles, with a slightly positive surface charge (22.2 ± 1.32 mV), were injected in the caudal vein of a BALB/c mouse after UV excitation (6W, 254 nm). Such positive surface charge can be explained by the relatively high ZGO-OH isoelectric point of 7.57, as compared to silica nanoparticles whose point of zero charge is usually comprised in the range of 1-3. After only ten minutes, most of the persistent luminescence signal was detected within liver (75%) and spleen (10%), which both constitute the reticuloendothelial system (RES, Supplementary Fig. S2). As observed before,^{1,2,15} this trend is very likely associated with a global uptake of nanoparticles by Kupffer cells, but also with a temporary stay in the spleen. The signal from persistent luminescence remained

largely detectable two hours after the end of UV excitation, and gently decayed until complete extinction a few hours later (Fig. 3a). After 15 hours, the animals were shaved and irradiated on the front for two minutes with highly penetrating low energy photons (orange/red LEDs source), which were mainly composed of wavelengths higher than 605 nm. Mice were then placed on their back under the photon-counting system for persistent luminescence acquisition. Such a simple illumination through living tissues with visible light was sufficient to activate persistent luminescence of ZGO-OH nanocrystals (Fig. 3b. and c) and to retrieve an intense signal from the main RES organs, even in deep tissues. In addition to the *in vivo* application displayed in Fig. 3, such an *in situ* triggering of persistent luminescence also enables absolute optical quantification *ex vivo*, after organ collection and illumination (Supplementary Fig. S3a. and b). We observed a major localization of the nanoparticles in liver, associated with a low uptake by spleen, which is in total agreement with the results obtained by *in vivo* imaging (Fig. 3b).

These first results open promising alternatives to long-term imaging with persistent luminescence nanoparticles, as well as new biological applications such as tumor imaging. As already mentioned, tumor targeting can be achieved by taking advantage of the EPR effect resulting from the chaotic tumor microenvironment and leaky vasculature characterized by disorganized endothelial cells and large fenestrations.¹² But this EPR effect can only be observed with nanoparticles or colloids which remain long enough in the blood circulation. Crude persistent luminescence nanoparticles, referred to as ZGO-OH, are rapidly cleared from general circulation and taken up by the RES organs, mostly liver and spleen (Supplementary Fig. S2). However, this recognition process can be delayed by masking surface charges on the nanoparticles to prevent opsonisation in plasma and final recognition by Kupffer cells.^{11,12,13} A stealth character was conferred to the ZGO-OH nanoparticles by polyethylene glycol (PEG) grafting via a two steps reaction route (Fig. 4a). Transmission electron microscopy confirmed the initial formation of nanoparticles with a core diameter ranging from 20 to 60 nm (Fig. 4b). Effective functionalization was assessed through classical physico-chemical measurements of both zeta potential

and hydrodynamic diameter by dynamic light scattering. The grafting of the PEG chains was responsible for a significant increase in hydrodynamic diameter, which led to 80 nm nanoparticles (Fig. 4c) highly stable in 5% glucose solution (data not shown). The condensation of aminosilanes on the surface was responsible for an increase in global surface charge certainly due to primary amines covering the probes, whereas PEG grafting caused an opposite shift from 26.9 mV for ZGO-NH₂ zeta potential to -6.70 mV for ZGO-PEG (Fig. 4d). Animals were injected via caudal vein with 10¹³ nanoparticles of ZGO-PEG nanoparticles, previously excited under UV light. The biodistribution in healthy mice clearly revealed a longer circulation of the PEGylated probes (Fig. 5a), as compared to crude nanoparticles (Supplementary Fig. S2), up to 2 hours after the injection. The persistent luminescence was homogeneously detected in the main blood circulation routes, from lower to pectoral limbs, and in the most vascularized organs. Activation of the nanoparticles under the LED source was performed to restore persistent luminescence signal after longer periods (4h and 6h post injection). A final accumulation of stealth nanoparticles within liver was observed 6 hours after the injection.

The biodistribution in healthy and tumor-bearing mice was similar during the first two hours after systemic injection (Fig. 5a and b). Interestingly, images of tumor-bearing mice acquired at 4h or 6h after nanoparticles administration, following visible illumination under the orange/red LEDs source, clearly displayed the tumors. A semi-quantitative analysis was performed, based on software operation of the data acquired with the photon-counting system. Regions of interest (ROI) were schematically defined around the main uptake perimeters (Fig. 5c. and d), and luminescence from these ROI was compared to the global luminescence signal coming from the entire animal. Results in Fig. 5e confirm a progressive uptake of ZGO-PEG nanoparticles within liver. From 1 to 6 hours after the injection, the luminescence intensity in liver increased from 18 % to about 50 % of the total emission from the mouse. This result is in good agreement with a large panel of PEGylated nanocarriers which concentrate in liver through opsonin recognition and final uptake by Kupffer cells.^{24,25} A quite different trend was observed within tumor ROI, with a maximum of 15 % of total light located within subcutaneous CT26 tumors, reached 4

hours after the injection of ZGO-PEG nanoparticles. Such tumor permeation profile, which was confirmed by *ex vivo* analysis 24 hours after the injection (Supplementary Fig. S4), is typical of a transient targeting based on the EPR effect, in which no active interaction such as a ligand-receptor association can promote sustainable accumulation within the tumor stroma.²⁶ This result constitutes the first proof of *in vivo* tumor passive targeting with stealth persistent luminescence nanoparticles.

We finally investigated, as a proof-of-concept, the possibility of using these persistent luminescence nanoparticles to track injected cells *in vivo*. Experiments were conducted with RAW 264.7 macrophages, a phagocytic cell line. The ability of RAW cells to take up nanoparticles was first evaluated, as a function of nanoparticles surface. Results from Fig. 6a indicate that ZGO-NH₂ nanoparticles, displaying primary amines on their surface along with a high positive surface charge, underwent superior phagocytosis by RAW macrophages than ZGO-OH and ZGO-PEG. Noteworthy, there was no significant influence of the incubation with ZGO-NH₂ on RAW 264.7 cells growth rate, suggesting no apparent cellular toxicity of ZGO-NH₂ nanoparticles (data not shown). After the incubation, cells were washed several times with complete culture medium to remove the excess of free nanoparticles and were resuspended in culture medium. The persistent luminescence signal from phagocytosed ZGO-NH₂ nanoparticles was clearly detectable after visible excitation with the orange/red LEDs source (Fig. 6b). The ability to use persistent luminescence to track cells *in vivo* was then assessed by ~~intravenous injection and~~ comparison of the biodistribution of free ZGO-NH₂ nanoparticles to the biodistribution of RAW 264.7 having taken up nanoparticles. Persistent luminescence images presented in Fig. 6c and Fig. 6d demonstrate a very different behavior of labeled cells and free nanoparticles. While the accumulation of free nanoparticles was exclusively observed in liver and spleen (Fig. 6c), the injection of labeled cells led to a strong luminescence signal in the lungs (Fig. 6d). Such lung homing, which has already been reported before,²⁷ is very certainly associated to a rapid sequestration of phagocytes and phagocytes aggregates in the lungs capillary bed. This different behavior of free nanoparticles and tagged RAW cells *in vivo* was confirmed by *ex vivo* persistent

luminescence acquisition 24 hours after the intravenous injection (Fig. 6e). Thus, these experiments demonstrate that persistent luminescence can be used as highly sensitive optical technology to monitor in real-time cell homing *in vivo*.

Because UV irradiation induces DNA damage²⁸ and significantly reduces telomere sizes in a large number of cell lines,²⁹ the ability to excite persistent luminescence in the visible region, by using low energy red photons, represents an additional advantage of the ZGO nanoparticles over the previously described nanoprobe materials.^{1,3,15}

In conclusion, we have developed a novel generation of optical nanoprobes based on red-excitable persistent luminescence in chromium-doped zinc gallate nanoparticles. For the first time, we report the ability to optically activate a near-infrared emitting persistent luminescence nanomaterial *in vivo*, through living tissues, by excitation through low energy light from the orange/red region of the visible spectrum. Such unprecedented optical characteristics open alternatives to high sensitivity, long-term bioimaging in living animals. Relative simple surface functionalization could be used to mold this technology at will and favor either tumor-targeting *in vivo*, or efficient cell tagging to track cells biological fate *in vivo*. This technology should not only introduce and generalize persistent luminescence nanoparticles as one of the most versatile and user-friendly optical nanoprobes with excitation achievable through common halogen or LED bench lamps, but also be of wide applications to biologists and pharmacologists involved in cancer diagnosis, vascular biology, as well as cell tropism, cell homing, or cell therapy research.

METHODS.

Chemicals. (3-Aminopropyl)-triethoxysilane (99%) was obtained from Sigma-Aldrich. Zinc nitrate hexahydrate (>99%) was purchased from Fluka. Gallium oxide (99.999%) and chromium (III) nitrate nonahydrate (99.99%) were purchased from Alfa Aesar. Dimethylformamide (>99.9%) was purchased from SDS. Alpha-methoxy-omega-N-hydroxysuccinimide poly(ethylene glycol) PEG MW 5.000 Dalton was bought from Iris Biotech GmbH.

Preparation of ZGO nanoparticles. $\text{ZnGa}_{1.995}\text{Cr}_{0.005}\text{O}_4$ nanoparticles were synthesized by hydrothermal method and low-temperature sintering in air. First, gallium nitrate was formed by reacting 8.94 mmol of gallium oxide with 10 mL concentrated nitric acid (35 wt%) under hydrothermal condition at 150°C overnight. Then, a mixture of 0.04 mmol of chromium nitrate and 8.97 mmol of zinc nitrate in 10 mL of water was added to the previous solution of gallium nitrate under vigorous stirring. The resulting solution was adjusted to pH 7.5 with an ammonia solution (30 wt%), stirred for 3 hours at room temperature, and transferred into a 25 mL Teflon-lined stainless steel autoclave for 24h heat treatment at 120°C. The resulting compound was washed several times with water and ethanol before drying at 60°C for 2 hours. The dry white powder was finally sintered in air at 750°C for 5 hours. Hydroxylation was performed by basic wet grinding of the powder (500 mg) for 15 minutes, with a mortar and pestle in 50 mL of 5 mM NaOH solution, and overnight vigorous stirring of the resulting suspension at room temperature. Nanoparticles with a diameter of 60 nm were first selected from the whole polydisperse colloidal suspension by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 4500 rpm for 5 minutes. They were located in the supernatant (assessed by Dynamic Light Scattering). The supernatants were gathered and concentrated to a final 5 mg/mL suspension. Then, nanoparticles with a diameter of 40 nm were selected from the 60 nm concentrated suspension by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 3500 rpm for 5 minutes. The centrifugation step was repeated 4 times and the resulting suspension concentrated to 5 mg/mL in 5 mM NaOH.

Nanoparticles functionalization. ZGO-OH nanoparticles were coated according to slightly modified

existing protocols.¹ Briefly, ZGO-NH₂ nanoparticles were obtained by adding 20 μ L of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) to a suspension of 5 mg ZGO-OH in 2 mL DMF (Figure 4.a). The reaction mixture was sonicated for the first 2 minutes using a Branson Ultrasonic Cleaner 1210 and kept under vigorous stirring for 5 hours at room temperature. Particles were washed from the unreacted APTES by three centrifugation and redispersion steps in DMF. ZGO-PEG nanoparticles were obtained by reacting 10 μ mol of MeO-PEG_{5kDa}-NHS (50 mg) with 5 mg of ZGO-NH₂ nanoparticles in 1 mL DMF (Figure 4.a). To ensure a maximum PEG density, the last functionalization step was achieved overnight, under vigorous stirring at 90°C.

Nanoparticles characterization. X-rays diffraction patterns were obtained on a Panalytical X'Pert Pro diffractometer with an incident-beam Ge monochromator, at $U = 45$ kV and $I = 40$ mA. The photoluminescence excitation spectrum was recorded on a Varian Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer at room temperature. Persistent luminescence emission spectrum was measured after 2 minutes excitation under the orange/red LEDs source (Bridgelux). Light was collected via an Acton SpectraPro monochromator coupled with a Princeton CCD camera cooled at -70°C.

ZGO nanoparticles were characterized using transmission electron microscopy (JEOL JEM-100S) and dynamic light scattering and zeta potential measurements in 20 mM NaCl, performed on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA) equipped with a 632.8 nm helium neon laser and 5-mW power, with a detection angle at 173° (non-invasive backscattering).

Cell Culture. RAW 264.7 cells were purchased from the ATCC and cultured in Dubecco's Modified Eagles Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 μ g/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin). Cells were grown at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere.

In vitro ZGO phagocytosis. RAW cells were seeded in flat bottom 6-well at a density of 10⁶ cells/well and grown overnight in 100 μ L medium. For phagocytosis, nanoparticles with different surface coverage were incubated at the concentrations of 1 mg/mL for 6 hours at 37°C in DMEM culture medium. Cells were then washed three times with complete DMEM prior to the detection of

persistent luminescence.

Preparation of tumor model. CT26 tumors fragments (about 3 mm³) were implanted s.c. in both flanks of 5-week-old female BALB/c mice (Janvier, Le Genest St. Isle, France). After 11 days, the mice were injected with persistent luminescence nanoparticles.

In vivo systemic injections. Five weeks old female BALB/c mice (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were anesthetized by i.p. injection of a mixture of ketamine (85.8 mg/kg, Centravet, Plancoët, France) and xylazine (3.1 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Germany) diluted in 150 mM NaCl. Systemic injections of 10¹³ ZGO nanoparticles, dispersed in 5% sterile glucose solution, or 10⁶ labeled RAW cells, dispersed in 200 µL DMEM, were then realized to perform imaging studies.

Imaging. Signal acquisition was carried out using a photon-counting system based on a cooled GaAs intensified charge-coupled device (ICCD) camera (Photon-Imager, Biospace, Paris, France). The ICCD aperture time was set to three minutes. ZGO nanoparticles (10¹³ in sterile 150 mM NaCl) were first excited *ex vivo* for 2 minutes under UV light (6W mercury discharge 254 nm lamp) before injection to mice via the caudal vein. Animals were then placed on their back under the photon-counting device, and the signal acquisitions were performed. After a 3 hours period and complete persistent luminescence extinction, the orange/red LEDs source was shined on the animal for two minutes to re-activate the persistent luminescence from ZGO nanoparticles, and the signal acquisition was resumed. Semi-quantization was achieved through the use of Biospace developed software, PhotoVision+. Experiments were conducted in agreement with a regional ethic committee for animal experimentation.

ACKNOWLEDGMENT. We thank René Lai-Kuen and Bruno Saubamea from Technical Platform of the IFR71/IMTCE–Cellular & Molecular Imaging–Faculty of Pharmacy–Paris Descartes University. This work has been supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project n°ANR-08-NANO-025).

FIGURE CAPTIONS.

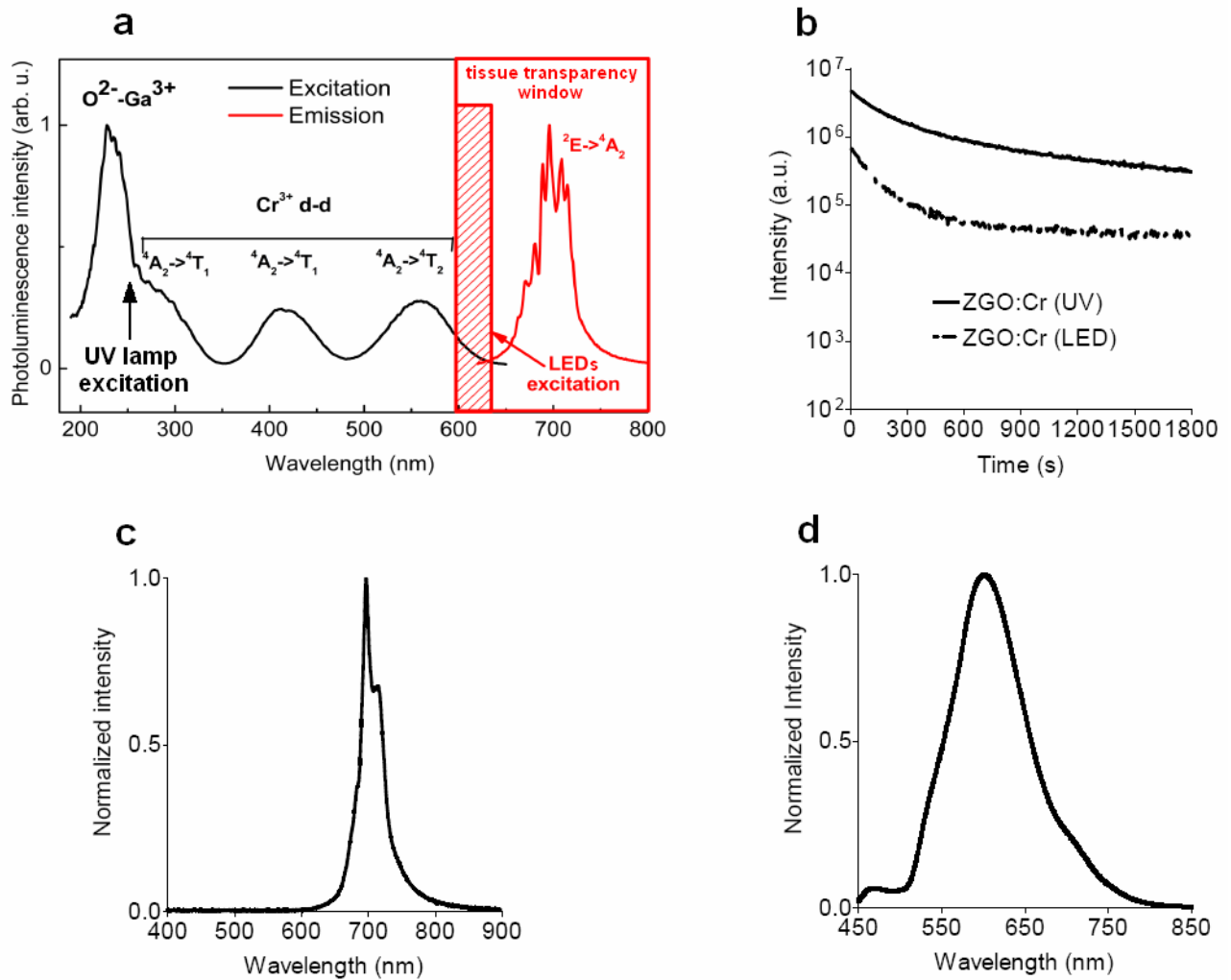


Figure 1. Optical properties of ZGO nanoparticles and LED source. **a**, Photoluminescence excitation and emission spectra of ZGO nanoparticles. The dashed red rectangle represents the region where the ${}^4A_2 ({}^4F) \rightarrow {}^4T_2 ({}^4F)$ excitation band of Cr^{3+} partly superimposes to the tissue transparency window. **b**, Persistent luminescence decay curves after 2 minutes excitation under UV light (6W, 254nm) or LED source. **c**, Persistent luminescence emission spectrum. **d**, Emission spectrum of the orange/red LEDs source.

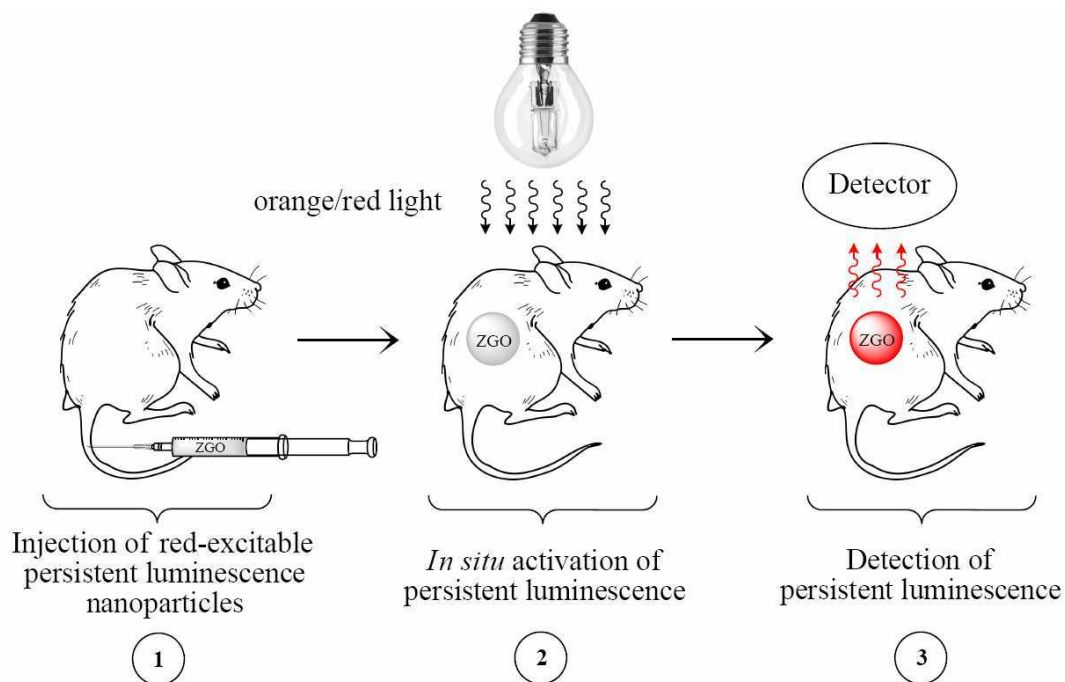


Figure 2. Schematic representation of *in vivo* imaging after *in situ* activation of persistent luminescence nanoparticles.

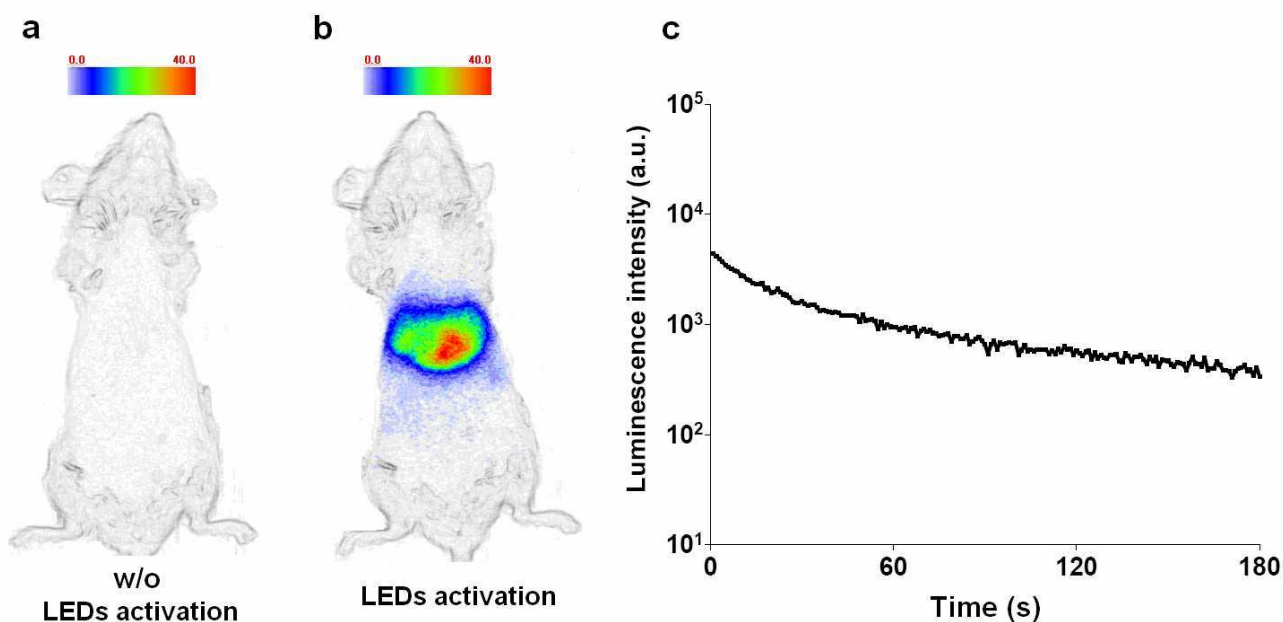


Figure 3. Detection of persistent luminescence nanoparticles after *in vivo* activation. **a**, Persistent luminescence image recorded 15 hours after 2 minutes of UV excitation of the mouse injected with ZGO nanoparticles (15 hours after the injection). **b**, Persistent luminescence image recorded after 2 minutes orange/red LEDs re-excitation. **c**, Persistent luminescence decay curve corresponding to the signal coming from the liver in the condition of Fig. 3b. Persistent luminescence intensity is expressed in false color unit (1 unit = 2800 photons per s.cm².steradians) for all images (Fig. 3a. and b.).

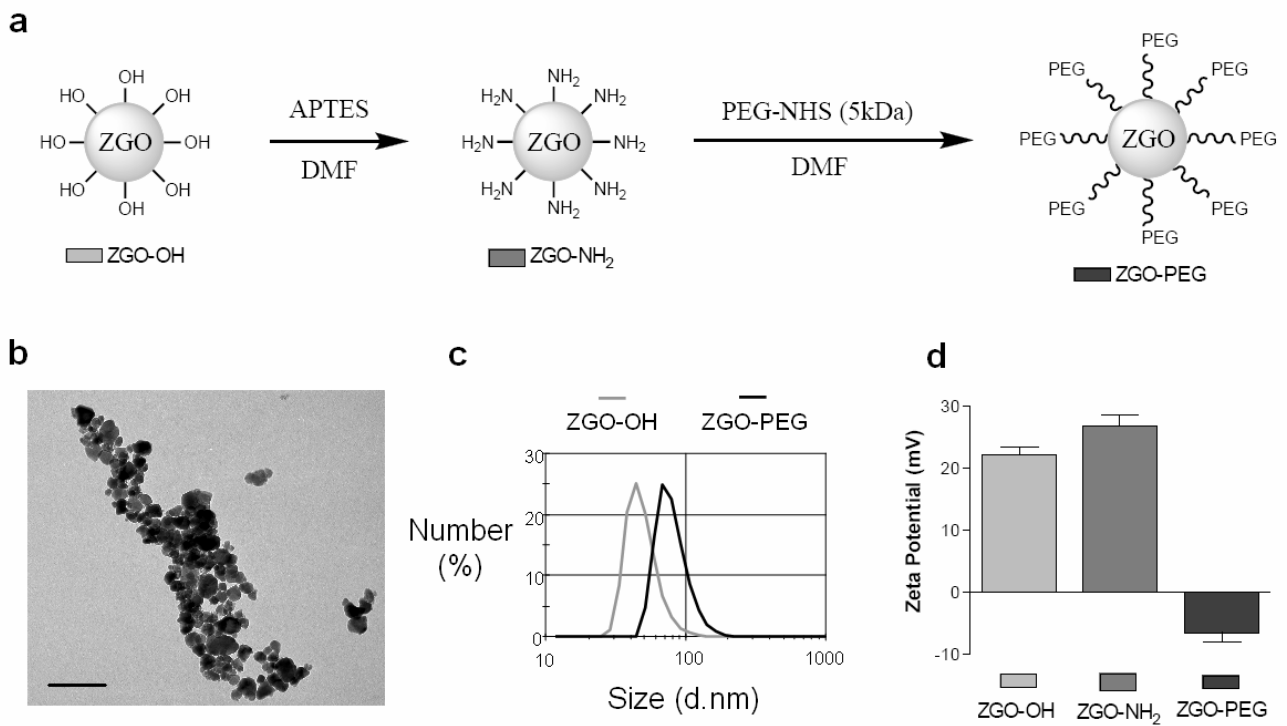


Figure 4. Surface functionalization and characterization of red-excitable persistent luminescence nanoparticles. **a**, Schematic representation of ZGO-OH surface functionalization. **b**, Transmission electron micrograph of ZGO-OH nanoparticles (scale bar represents 100 nm). **c**, Hydrodynamic diameter measured by DLS in 5% glucose before and after PEG coverage. **d**, Evolution of zeta potential as a function of surface coverage.

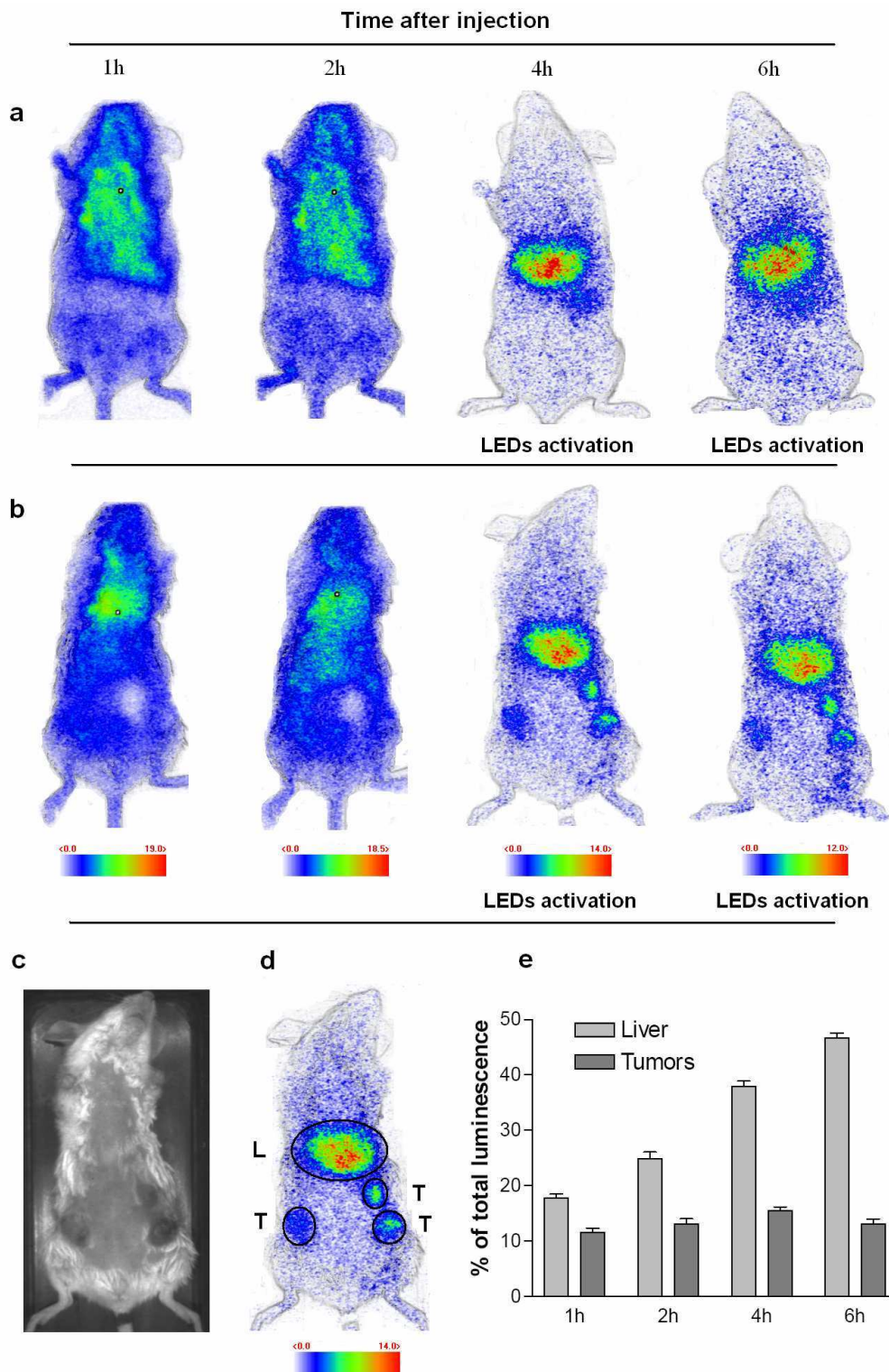


Figure 5. Biodistribution of stealth ZGO-PEG nanoparticles in healthy and tumor-bearing mice (n=3). **a**, Persistent luminescence images of a healthy mouse injected with ZGO-PEG nanoparticles. **b**, Persistent luminescence images of a tumor-bearing mouse injected with ZGO-PEG nanoparticles. **c**, Optical image of a tumor-bearing mouse. **d**, Schematic ROI drawn for semi-quantization analysis. L, liver ; T, tumor. **e**, Accumulation kinetics in the main labeled tissues expressed as a percentage of the total luminescence detected from the whole animal. Persistent luminescence intensity is expressed in false color unit (1 unit = 2800 photons per s.cm².steradians) in all images.

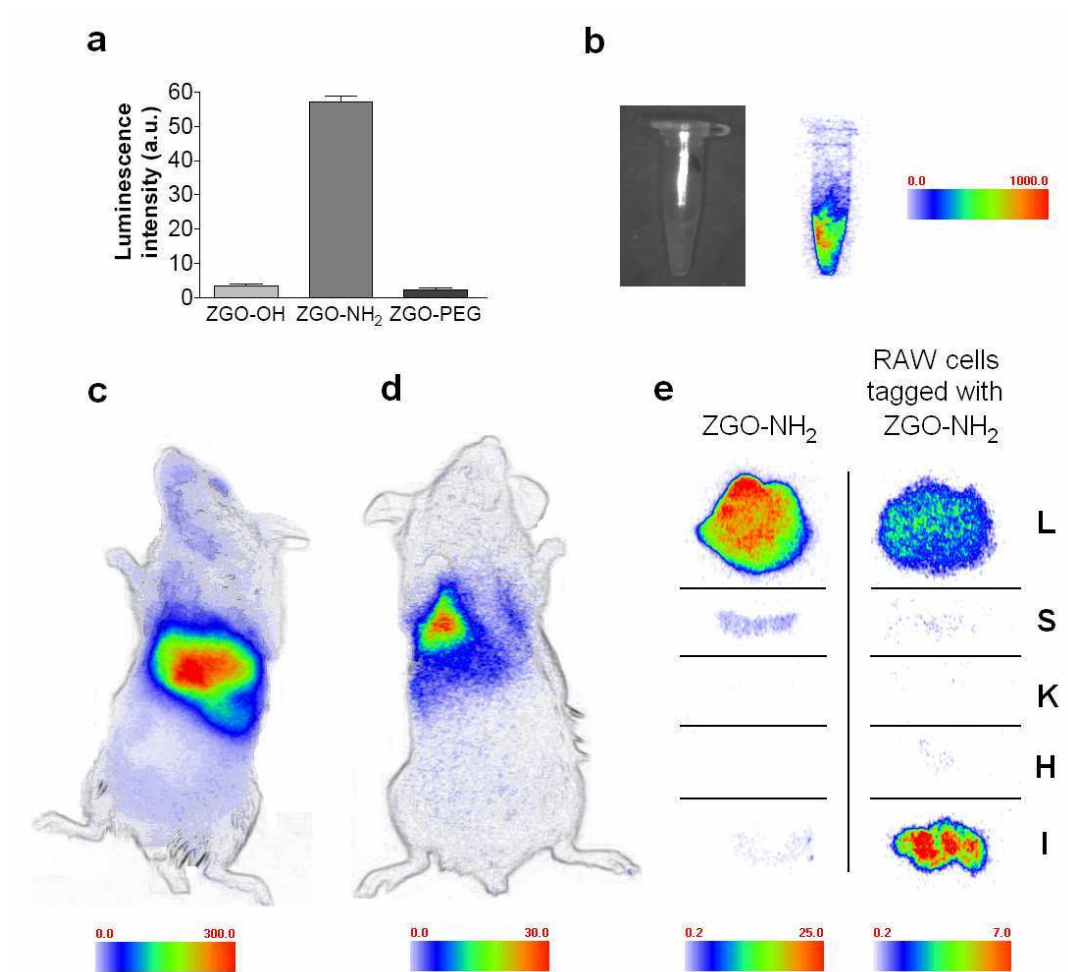


Figure 6. Cellular tracking with persistent luminescence after LED excitation. **a**, Phagocytosis efficiency expressed as persistent luminescence signal retained by RAW macrophages having incorporated ZGO-NH₂ nanoparticles. **b**, Optical detection of tagged cells with persistent luminescence. **c**, Biodistribution of ZGO-NH₂ nanoparticles in healthy mouse, 15 minutes after systemic injection. **d**, Biodistribution of RAW cells tagged with ZGO-NH₂ nanoparticles in healthy mouse, 15 minutes after systemic injection. **e**, 24 hours *ex vivo* biodistribution of free ZGO-NH₂ and tagged RAW macrophages tagged with ZGO-NH₂ nanoparticles. L, liver ; S, spleen ; K, kidneys ; H, heart ; I, lungs. Persistent luminescence intensity is expressed in false color unit (1 unit = 2800 photons per s.cm².steradians) for all images.

SUPPLEMENTARY INFORMATION.

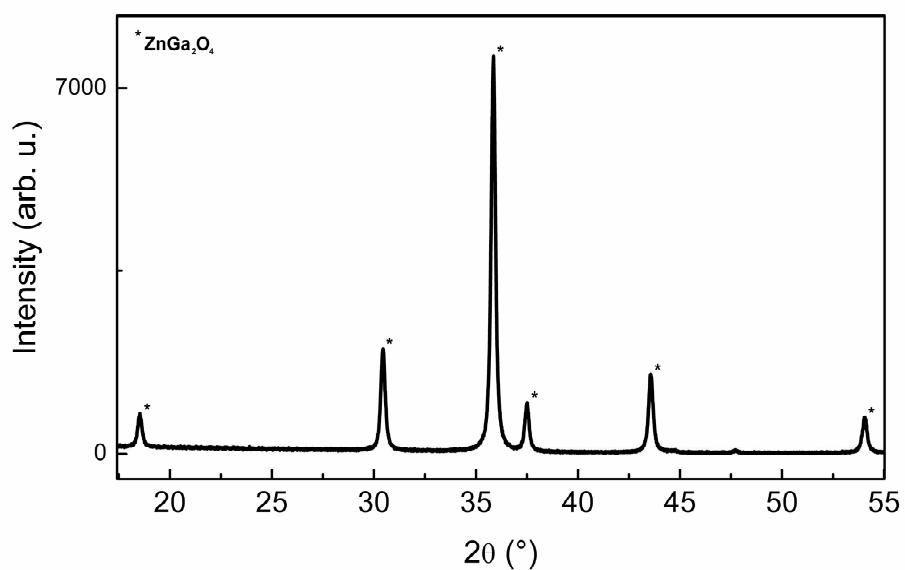


Figure S1. X-ray diffractogram of ZGO nanoparticles.

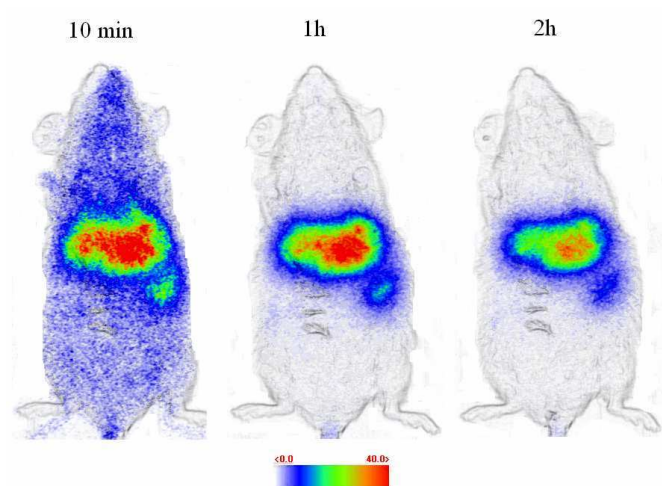


Figure S2. Short-term biodistribution of ZGO-OH nanoparticles. The signal corresponds to near-infrared persistent luminescence from ZGO-OH nanoparticles excited with UV before systemic injection. The persistent luminescence intensity is expressed in false color unit (1 unit = 2800 photons per $\text{s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{steradians}$).

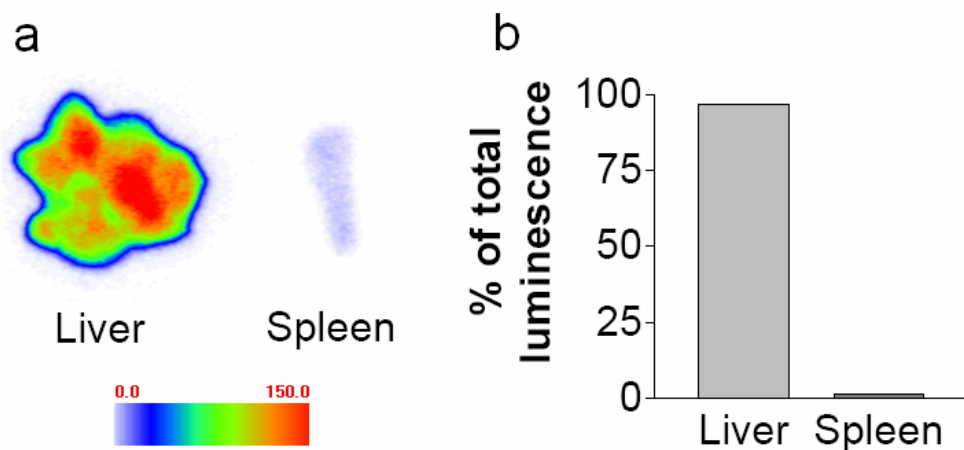


Figure S3. *Ex vivo* biodistribution of ZGO-OH nanoparticles. The acquisition was performed 15 hours after the injection of ZGO-OH nanoparticles in healthy mouse. **a**, Persistent luminescence image after organ collection (1 unit = 2800 photons per s.cm².steradians). **b**, *Ex vivo* optical quantification from persistent luminescence image.

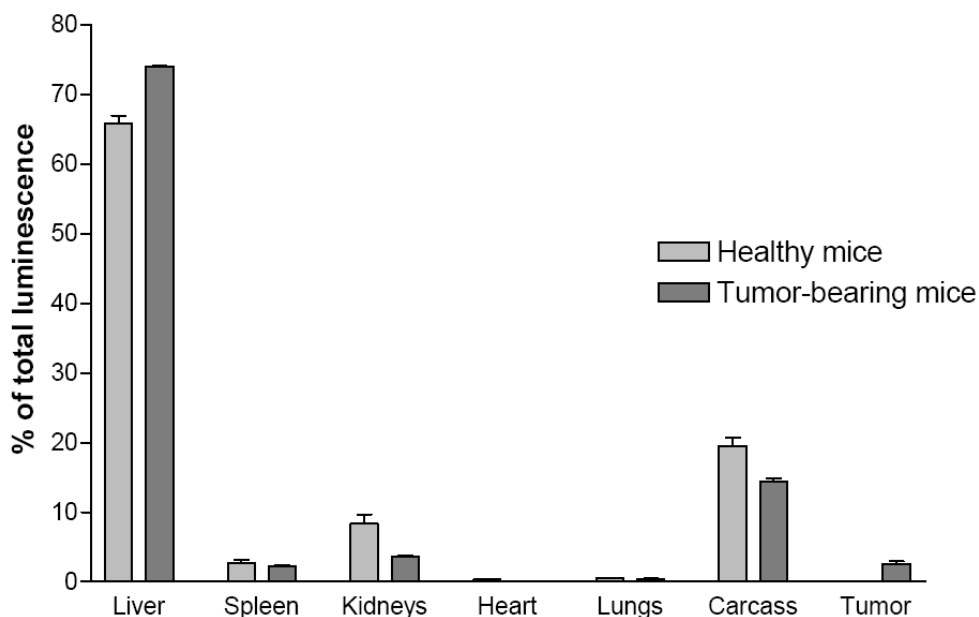


Figure S4. Biodistribution of ZGO-PEG nanoparticles, 24 hours after intravenous injection. After organ collection, *ex vivo* quantification was performed from persistent luminescence signal.

REFERENCES.

- ¹ le Masne de Chermont, Q., Chanéac, C., Seguin, J., Pellé, F., Maîtrejean, S., Jolivet, J.P., Gourier, D., Bessodes, M. & Scherman, D. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 9266-9271 (2007).
- ² Maldiney, T., Richard, C., Seguin, J., Wattier, N., Bessodes, M. & Scherman, D. Effect of Core Diameter, Surface Coating, and PEG Chain Length on the Biodistribution of Persistent Luminescence Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **5**, 854-862 (2011).
- ³ Maldiney, T., Sraiki, G., Viana, B., Gourier, D., Richard, C., Scherman, D., Bessodes, M., Van Den Eeckhout, K., Poelman, D. & Smet, P.F. In vivo optical imaging with rare earth doped Ca₂Si₅N₈ persistent luminescence nanoparticles. *Opt. Mat. Express* **2**, 11810-11815 (2012).
- ⁴ Frangioni, J.V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 626-634 (2003).
- ⁵ Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R. & Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **4**, 435-446 (2005).
- ⁶ Weissleder, R. & Pittet, M.J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 580-589 (2008).
- ⁷ Richard, C., Maldiney, T., le Masne de Chermont, Q., Seguin, J., Wattier, N., Courties, G., Apparailly, F., Bessodes, M. & Scherman, D. Persistent Luminescence Nanoparticles for Bioimaging. *Advances in Intelligent and Soft Computing* **120**, 37-53 (2012).
- ⁸ Wu, B.Y., Wang, H.F., Chen, J.T. & Yan, X.P. Fluorescence Resonance Energy Transfer Inhibition Assay for α -Fetoprotein Excreted during Cancer Cell Growth Using Functionalized Persistent Luminescence Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 686-688 (2011).
- ⁹ Maldiney, T., Byk, G., Wattier, N., Seguin, J., Khandadash, R., Bessodes, M., Richard, C. & Scherman, D. Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability. *Int. J. Pharm.* **423**, 102-107 (2012).
- ¹⁰ Maldiney, T., Kaikkonen, M.U., Seguin, J., le Masne De Chermont, Q., Bessodes, M., Airenne, K.J., Ylä-Herttuala S., Scherman, D. & Richard, C. In Vitro Targeting of Avidin-Expressing Glioma Cells with Biotinylated Persistent Luminescence Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* **23**, 472-478 (2012).
- ¹¹ Jain, R.K. & Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 653-664 (2010).
- ¹² Danhier, F., Feron, O. & Préat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release* **148**, 135-146 (2010).
- ¹³ Al-Jamal, W.T., Al-Jamal, K.T., Tian, B., Cakebread, A., Halket, J.M. & Kostarelos, K. Tumor Targeting of Functionalized Quantum Dot-Liposome Hybrids by Intravenous Administration. *Mol. Pharm.* **298**, 1759-1762 (2009).

-
- ¹⁴ Park, J.H., Gu, L., von Maltzahn, G., Ruoslahti, E., Bhatia, S.N. & Sailor, M.J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nat. Mater.* **8**, 1-6 (2009).
- ¹⁵ Maldiney, T., Lecointre A., Viana, B., Bessièrè A., Bessodes, M., Gourier, D., Richard, C. & Scherman, D. Controlling Electron Trap Depth To Enhance Optical Properties of Persistent Luminescence Nanoparticles for In Vivo Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 11810-11815 (2011).
- ¹⁶ Lecointre A., Bessièrè A., Bos, A.J.J., Dorenbos, P., Viana, B. & Jacquart, S. Designing a Red Persistent Luminescence Phosphor: The Example of $\text{YPO}_4:\text{Pr}^{3+}, \text{Ln}^{3+}$ (Ln = Nd, Er, Ho, Dy). *J. Phys. Chem. C* **115**, 4217–4227 (2011).
- ¹⁷ Maldiney, T., Lecointre, A., Viana, B., Bessièrè, A., Gourier, D., Bessodes, M., Richard, C. & Scherman, D. Trap depth optimization to improve optical properties of diopside-based nanophosphors for medical imaging. *Proc. SPIE* **8263**, 826318 (2012).
- ¹⁸ Bessièrè A., Jacquart, S., Priolkar, K., Lecointre, A., Viana, B. & Gourier, D. $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}^{3+}$: a new red long-lasting phosphor with high brightness. *Opt. Express* **19**, 10131-10137 (2011).
- ¹⁹ Pan, Z., Lu, Y.Y. & Liu, F. Sunlight-activated long-persistent luminescence in the near-infrared from Cr^{3+} -doped zinc gallogermanates. *Nat. Mater.* **11**, 58-63 (2011).
- ²⁰ Abrams, B.L. & Holloway, P.H. Role of the Surface in Luminescent Processes. *Chem. Rev.* **104**, 5783-5802 (2004).
- ²¹ Hirano, M., Imai, M. & Inagaki, M. Preparation of ZnGa_2O_4 Spinel Fine Particles by the Hydrothermal Method. *J. Am. Ceram. Soc.* **83**, 977–979 (2000).
- ²² Zhang, X., Huang, J., Ding, K., Hou, Y., Wang, X. & Fu, X. Photocatalytic Decomposition of Benzene by Porous Nanocrystalline ZnGa_2O_4 with a High Surface Area. *Envir. Sci. Tech.* **43**, 5947-5951 (2009).
- ²³ Walkey, C.D., Olsen, J.B., Guo, H., Emili, A. & Chan, W.C.W. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2139-2147 (2012).
- ²⁴ Schipper, M.L., Iyer, G., Koh, A.L., Cheng, Z., Ebenstein, Y., Aharoni, A., Keren, S., Bentolila, L.A., Li, J., Rao, J., Chen, X., Banin, U., Wu, A.M., Sinclair, R., Weiss, S. & Gambhir, S.S. Particle Size, Surface Coating, and PEGylation Influence the Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice. *Small.* **5**, 126-134 (2009).
- ²⁵ Ishida, O., Maruyama, K. & Sasaki, K. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int. J. Pharm.* **190**, 49-56 (1999).
- ²⁶ Poon, Z., Lee, J.B., Morton, S.W. and Hammond, P.T., Controlling in Vivo Stability and Biodistribution in Electrostatically Assembled Nanoparticles for Systemic Delivery. *Nano Lett.* **11**, 2096-2103 (2011).

²⁷ Fidler, I.J. & Fidler, J. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival in Vivo. *Cancer Res.* **35**, 218-224 (1975).

²⁸ Hewitt, G., Jurk, D., Francisco, D., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R. & Passos, J.F. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat. Commun.* **3**, 708 (2012).

²⁹ Kruk, P.A., Rampino, N.J. & Bohr, V.A. DNA damage and repair in telomeres: Relation to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 258-262 (1995).

7.2 De nouvelles perspectives pour l'imagerie optique *in vivo*

Nous voyons au travers de cette étude que le gallate de zinc constitue une réelle avancée par rapport à la première génération de nanoparticules à luminescence persistante :

- La synthèse hydrothermale permet d'obtenir des nanocristaux plus petits ainsi que des rendements d'extraction bien plus importants que dans le cas des silicates. A titre de comparaison, le rendement d'extraction d'une population de 80 nm à partir du silicate avoisine les 5%. Le passage au gallate permet d'obtenir des rendements de l'ordre de 50%, pour une population de taille similaire.
- Les nanoparticules de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+}) présentent un signal de luminescence persistante particulièrement intense, centré sur 700 nm, excitable sur une large gamme du spectre visible.
- L'injection de ces nanoparticules démontre que le signal de luminescence persistante peut non seulement être détecté *in vivo*, mais également excité *in situ*, à travers les tissus de l'animal. Cette découverte, étonnante d'un point de vue physique et mécanistique, permet d'exploiter les propriétés de luminescence persistante pour réaliser des observations *in vivo* sans contrainte de temps et sans autofluorescence des tissus biologiques.
- La fonctionnalisation de surface est accessible et permet d'obtenir des nanoparticules furtives dont le temps de demi-vie dans le sang a permis de réaliser la première preuve de ciblage passif *in vivo* sur un modèle de tumeur solide.
- Enfin du fait de la remarquable intensité de l'émission de luminescence persistante, nous avons prouvé qu'il était possible de marquer des cellules avec ces nanoparticules et de suivre la biodistribution de cellules marquées *in vivo* au moyen du signal de luminescence persistante.

Ce premier article sur l'utilisation du gallate de zinc *in vivo* a été soumis et se trouve actuellement en processus de révision pour une publication dans le journal *Nature Materials*. Il nous a été demandé par le comité d'édition de répondre de manière précise à trois points peu détaillés dans le cadre de ce manuscrit :

1. Le mécanisme. Comme nous l'avons évoqué, cette excitation de la luminescence persistante à travers les tissus constitue un résultat particulièrement étonnant et tend à bouleverser la représentation classique que l'on se fait des mécanismes de luminescence persistante. Plusieurs expériences sont en cours au LCMCP pour répondre sur cet aspect purement mécanistique.
2. La toxicité. Depuis le début des travaux sur le silicate, nous avons peu évoqué les problèmes de toxicité. Pourtant, toute utilisation de nanoparticules *in vivo* suppose une évaluation conjointe de leurs toxicités, à la fois cellulaire et systémique, chez le petit animal. De la même manière, une série d'expériences allant de l'étude histologique des différents organes au dosage de marqueurs d'une toxicité hépatique devrait nous permettre de répondre précisément aux questions des rapporteurs.
3. La comparaison aux boîtes quantiques. Du fait de l'absence de signal d'autofluorescence, les nanoparticules à luminescence persistante permettent une détection particulièrement sensible à travers les tissus de l'animal, avec un très bon rapport signal à bruit. Les rapporteurs nous demandent d'évaluer cette efficacité en comparant notre sonde d'imagerie aux boîtes quantiques commerciales, couramment utilisées dans la construction de sondes d'imagerie optique destinées au petit animal. Les expériences de comparaison sont en cours de réalisation avec des boîtes quantiques de propriétés optiques comparables, émettant à 705 nm.

Cette nouvelle génération de nanoparticules à luminescence persistante, nous allons le voir, constitue également un outil dynamique de choix pour l'étude des paramètres qui influencent la biodistribution de nanoparticules *in vivo*.

Chapitre 8

Un paramètre de plus pour contrôler la biodistribution *in vivo*

Sommaire

8.1	Comment éviter le système monocyte-macrophage	125
8.2	Une circulation nettement améliorée	147

8.1 Comment éviter le système monocyte-macrophage

L'étude sur la biodistribution du silicate *in vivo* nous a permis de mieux comprendre les effets de charge et de taille associés à la capture de systèmes colloïdaux après injection systémique chez le petit animal. Nous nous proposons ici de porter notre attention sur un autre paramètre régulièrement évoqué dans la littérature au sujet du polyéthylène glycol : la densité fonctionnelle en surface de la particule. Plusieurs équipes ont en effet déjà démontré que la densité de polyéthylène glycol détermine l'aspect de la couronne de protéines adsorbées en surface des nanoparticules. D'un point de vue schématique et simplifié, lorsque la densité de polymère augmente, l'énergie d'interaction inter-chaîne limite le phénomène d'adsorption des protéines en surface des particules et entraîne une nette diminution de leur capture au niveau du système monocyte-macrophage. Cet effet a été observé et vérifié pour le polyéthylène glycol, mais peu d'exemples rapportent l'influence de l'épaisseur de la couche de silanes sur la biodistribution de nanoparticules furtives.

Les premières expériences portant sur la fonctionnalisation de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+}) nous ont permis d'observer que la fixation de l'aminosilane en surface du gallate pouvait être rigoureusement contrôlée par adaptation du temps de réaction et de la concentration de réactif introduit au cours de la synthèse. Il est ainsi possible d'obtenir plusieurs échantillons de nanoparticules avec des couches d'aminosilane plus ou moins épaisses. L'idée de l'article suivant consiste à utiliser le phénomène de luminescence persistante pour évaluer l'influence de la formation d'une couche de silanes sur la biodistribution de nanoparticules furtives.

Nous remarquerons que ces résultats, tout comme ceux des chapitres à venir, exploitent l'excitation *in situ* de la luminescence persistante de nanoparticules de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+}). Pour des raisons d'antériorité, nous sommes contraints d'attendre la publication de l'article précédent pour soumettre les autres résultats. A partir de ce chapitre, les articles présentés ne sont donc pas encore soumis.

Controlling aminosilane layer thickness to extend plasma half-life of stealth persistent luminescence nanoparticles *in vivo*

Thomas Maldiney,^a Michel Bessodes,^a Daniel Scherman,^a Cyrille Richard,^{a,*}

^aUnité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie; CNRS, UMR 8151, Paris, F-75270 cedex France; Inserm, U 1022, Paris, F-75270 cedex France; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 cedex France; Chimie-ParisTech, Paris, F-75231 cedex France.

cyrille.richard@parisdescartes.fr

ABSTRACT. Therapeutic and diagnostics both initiated the development and rational design of nanoparticles intended for biomedical applications. Yet, the fate of these nanosystems *in vivo* is hardly manageable and generally results in their rapid uptake by the mononuclear phagocyte system, i.e. liver and spleen. To overcome this essential limitation, efforts have been widely made to understand the influence of physico-chemical parameters on the behaviour of nanoparticles *in vivo*, and on their ability to be uptaken by phagocytic cells. Notably, polyethylene glycol grafting and precise control of its density have not only been shown to prevent protein adsorption on the surface of nanoparticles, but also to significantly reduce macrophage uptake *in vitro*. In this article, we suggest the use of persistent luminescence to study the influence of another parameter, aminosilane layer thickness, on both *in vitro* protein adsorption and *in vivo* biodistribution of stealth persistent nanophosphors.

KEYWORDS. Persistent luminescence, Nanoparticle, Aminosilane, PEG, Optical Imaging, In vivo, Biodistribution.

Introduction. The field of innovative nanotechnology steadily raises promising perspectives and adaptive tools intended for biological research and future medical applications.¹ Notably, attentions have increasingly focused on the rational design of nanoparticles to introduce novel solutions for the efficient diagnosis² and treatment of cancer.³ Along with the development of such highly sophisticated nanocarriers, appeared the absolute necessity to understand their biological behavior in complex environment.⁴ In particular, widespread preclinical studies *in vivo* unraveled the difficult task to control the biodistribution of nanoparticles following intravenous injection to living animals, whose physiological path through systemic circulation generally leads to a rapid sequestration by macrophages from the mononuclear phagocyte system (MPS), also referred to as the reticuloendothelial system (RES).^{5,6,7}

Such recognition process is mainly associated to the “biological identity” acquired by a nanoparticle following the interaction with opsonins from the blood that decorate its surface and finally constitute a protein “corona”, partly responsible for the biological fate of the particle.^{8,9,10} Latest studies have shown that polyethylene glycol (PEG) grafting could be used to hinder the formation of this “corona” by creating a thermodynamic barrier to protein diffusion,¹¹ and that increasing PEG density or chain length on the surface of a nanoparticle could significantly slow down the uptake process by macrophages from the MPS.^{12,13} In addition to this first method based on the use of PEG polymers, several other strategies have already been envisioned to circumvent this problematic RES uptake. Among them, optimization of shape¹⁴ and surface charge¹⁵ of the nanoparticles were not only shown to enhance blood circulation time, but also to limit the global sequestration within RES organs. Likewise, the technique of layer-by-layer assembly was used to successfully stabilize and control the biodistribution of Quantum Dots (QDs) *in vivo*, leading to multilayer nanoparticles with long blood elimination half-life as well as low accumulation in the liver.¹⁶ Yet, the prerogative to finally reach a proper understanding of such

elaborated biological phenomenon as nanoparticles opsonization or biodistribution generally relies in the necessity to work with a reliable probe that returns accurate information with the best sensitivity.

To this end, we have previously reported the use of persistent luminescence nanoparticles (PLNP) as highly sensitive optical nanoprobe *in vivo* to naturally avoid the autofluorescence from biological tissues.^{7,17} Surface functionalization was shown to enable efficient targeting of these PLNP to malignant cells *in vitro*,^{18,19} as well as enhanced blood half-life for *in vivo* applications.²⁰ However, despite such promising characteristics, persistent luminescence could not be followed more than two hours in living animals, which impeded long-term applications.²¹ We have recently overcome this essential limitation by introducing novel persistent luminescence nanoparticles, with formula $\text{ZnGa}_{1.995}\text{Cr}_{0.005}\text{O}_4$, which could be activated with low energy photons, in the therapeutic window, through living tissues.²²

The present article employs this new generation of persistent luminescence nanoparticles to better understand the way surface functionalization affects the accumulation kinetics within major RES organs and blood half-life of ZGO nanoparticles. In particular, we focused our attention on the effect of aminosilane polycondensation and layer formation on the surface of the particle, showing that a significant increase in the silane layer thickness prior to PEG grafting, at the expense of hydrodynamic diameter, is responsible for a far better circulation of the probe associated with a delayed RES uptake. This unprecedented result not only raises additional information in the understanding of nanoparticles biological fate, but also opens alternatives to several biomedical applications that require long-circulating nanoprobe.

Results and discussion. Persistent luminescence nanoparticles with formula $\text{ZnGa}_{1.995}\text{Cr}_{0.005}\text{O}_4$, referred to as ZGO, were synthesized by a two-step method combining a hydrothermal treatment and a low-temperature sintering in air at 750°C for 5 hours. The diffraction pattern of ZGO powder confirms the formation of pure zinc gallate from cubic spinel phase (Supplementary Fig. S1). The introduction of trivalent chromium in this spinel lattice is responsible for a bright near infrared (NIR) persistent luminescence signal centered on 700 nm (Supplementary Fig. S1, B and C), which can be activated with either UV or orange-red irradiation. These optical properties are in total agreement with previous

results describing the optical behavior of Cr^{3+} in zinc gallate host^{22,23}. Noteworthy regarding *in vivo* applications, persistent luminescence decay curves from Fig. S1.b, acquired over 30 minutes, clearly show the ability to retrieve a significant long-lasting NIR luminescence after a simple activation of the powder under the orange-red LEDs source. This signal, yet diminished compared to the one acquired after UV excitation, has already been proven to be largely sufficient to gain access to long-term optical imaging through living tissues, without any time constraints²². The extraction of monodisperse nanoparticles suspension, with a size distribution approximately centered on 85 nm, was achieved by selective sedimentation in 5 mM NaOH with a global extraction yield comprised between 30 and 40%, depending on the grinding force and hydroxylation time (Table 1, hydrodynamic diameter). The resulting crude nanoparticles, referred to as ZGO-OH, displayed a slightly positive surface charge, very likely to be attributed to protonated Ga-OH groups decorating the crystals (Table 1, zeta potential). This suspension of ZGO-OH was reacted with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) in DMF for 3 or 6 hours, in order to control the aminosilane layer thickness. Both types of amine-covered nanoparticles were then reacted with an identical solution of N-hydroxysuccinimide activated 5 kDa polyethylene glycol in DMF to give birth to stealth ZGO-PEG (DMF/3h) and ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles (Scheme 1).

The physico-chemical parameters from Table 1 confirm a significant increase of both nanoparticles hydrodynamic diameter and global surface charge after aminosilane condensation and formation of primary amine-terminated nanoparticles, referred to as ZGO-NH₂. Noteworthy, due to a critical aggregation of amine-terminated nanoparticles in aqueous solutions, hydrodynamic diameter measurements for ZGO-NH₂ nanoparticles were made in absolute ethanol, leading to stable suspensions. After a 3 hours reaction with APTES, the hydrodynamic diameter of ZGO-NH₂ (DMF/3h) nanoparticles reaches the value of 100 nm, which is about 15 nm above the initial size of ZGO-OH nanoparticles, and keep increasing for ZGO-NH₂ (DMF/6h) nanoparticles to the final value of 130 nm. This net increase in hydrodynamic diameter after aminosilane coupling is associated to a significant change in the global surface charge. The initial zeta potential of ZGO-OH nanoparticles switches from 20 mV to 40 mV after

the reaction with APTES (Table 1), no matter how long the coupling reaction. Similar trends have already been observed with silicate-based persistent luminescence nanoparticles whose surface displayed comparable zeta potential values after aminosilane coupling⁷, and are generally assumed to be the result of primary amine functions covering the probe, protonated at neutral pH. The addition of 5 kDa PEG on the nanoparticles allows efficient masking of the global surface charge that shifts from the highly positive value of 40 mV to one characteristic of the neutral state, around 0 mV. Besides this significant change in surface charge, PEG grafting is responsible for a large increase of nanoparticles hydrodynamic diameter in 5% glucose solution. The ZGO-PEG (DMF/3h) nanoparticles are approximately 120 nm wide, which corresponds to an increase of 20 nm in comparison to the initial ZGO-NH₂ (DMF/3h) nanoparticles (Table 1). The differential between amine and PEG-grafted nanoparticles is even more pronounced in the case of ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles whose hydrodynamic diameter almost reaches the value of 190 nm. When compared to the hydrodynamic diameter of ZGO-NH₂ (DMF/6h) nanoparticles, this result, which corresponds to a global increase of 60 nm after PEG grafting, is very certainly associated to a larger amount of PEG attached to the surface of the nanoparticles. Unfortunately, classical physico-chemical characterization based on dynamic light scattering like hydrodynamic diameter and zeta potential measurements does not give any quantitative information in relation to the amount of aminosilane or PEG chains grafted after each functionalization step. For this reason, and to achieve complete characterization of our systems, we decided to make for a physical method, thermogravimetric analysis (TGA).

In addition to these qualitative physico-chemical measurements, quantitative evaluation of the amount of silane moieties and PEG chains was achieved by having recourse to TGA. Given the high thermal stability of zinc gallate structure, progressive heating of our samples could lead to the effective decomposition of the organic layer, grafted on the surface of the nanoparticles, without affecting the spinel core. The weight loss curves from Fig. 1 allow a clear differentiation of each functionalization step. First, increasing the reaction time of ZGO-OH nanoparticles with APTES from 3 to 6 hours leads to a higher amount of aminosilane on the surface, attested by a significant increase in weight loss

percentage evolving from 1.5 %, for ZGO-NH₂ (DMF/3h) nanoparticles, to the doubled value of 3 % in the case of ZGO-NH₂ (DMF/6h). Despite the same reaction conditions during PEG grafting, increasing the amount of aminosilane is responsible for a concomitant growth in the number of PEG chain. In the case of ZGO-PEG (DMF/3h) nanoparticles, the weight loss percentage stabilizes at 3.5 %, which represents less than half the value reached with ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles of almost 8 % of total weight loss. Starting from the molecular weight of each grafted species, we were able to quantify the concentration of aminosilane and PEG moieties per mass unit of nanoparticles. Results from Table 2 indicate that a longer reaction time in APTES solution leads to a larger amount of aminosilane on the surface of ZGO-NH₂ nanoparticles. The concentration of silane increases from 60 nmol/mg, for ZGO-NH₂ (DMF/3h) nanoparticles, to 182 nmol/mg for ZGO-NH₂ (DMF/6h) nanoparticles. When the silane concentration is multiplied by a factor 3, the amount of PEG chain increases from 4 nmol/mg, for stealth nanoparticles synthesized from ZGO-NH₂ (DMF/3h), to almost 9 nmol/mg for ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles (Table 2). Interestingly, the growth of a thick aminosilane layer highly contributes to the significant increase in PEG chain concentration, without affecting the grafting conditions, i.e without using higher concentration of PEG reagent or higher temperatures during the reaction.

Combining the results from physico-chemical techniques and TGA measurements gave access to an evaluation of the density of aminosilane and PEG chains per surface unit on a single nanoparticle. The calculation leans upon the hydrodynamic diameter of nanoparticles from the previous functionalization step and the approximation that each crystal is an exact sphere. For example, the density of aminosilane grafted on a ZGO-OH nanoparticle after a 3 hours reaction with APTES was evaluated from the accessible surface on a ZGO-OH nanoparticle. The ATG-based aminosilane concentration, divided by the number of particles comprised in one mg of powder, gave the concentration of aminosilane moieties per nanoparticle. This concentration normalized in relation to the total accessible surface on a ZGO-OH nanoparticle finally led to the density of aminosilanes per surface unit. The same protocol was adapted for the calculation of PEG density. When we compare the density of aminosilane grafted after 3 and 6 hours reaction in APTES, we notice a three times increase in the number of silane moieties increasing

from 3 silane moieties/nm² on ZGO-NH₂ (DMF/3h) to more than 9 silane moieties/nm² on ZGO-NH₂ (DMF/6h), which is in total agreement with the concentration reported in Table 2. Surprisingly, the results from PEG density calculation follow a very different trend. The number of PEG moieties poorly increases from 0.15 to 0.19 PEG moieties/nm² for ZGO-PEG (DMF/3h) and ZGO-PEG (DMF/6h), respectively. Such 25 % increase in PEG density should be compared to the 225 % increase in PEG concentration, meaning that the global amount of PEG moieties per surface unit on the nanoparticle is almost left unchanged between ZGO-PEG (DMF/3h) and ZGO-PEG (DMF/6h). Pursuing the idea and recent observation that such difference in stealth nanoparticles surface states and physico-chemical characteristics could control the adsorption of serum proteins onto the surface of persistent luminescence nanoparticles and drastically change the “biological identity” of a crystal *in vivo*¹², we investigated the ability of these different nanoparticles to interact with serum protein *in vitro*.

Each type of nanoparticles, chosen between ZGO-OH, ZGO-PEG (DMF/3h) and ZGO-PEG (DMF/6h), was first incubated for two hours at 37°C with 50% v/v mouse serum diluted in normal saline solution. After several washing steps, the amount and cartography of adsorbed proteins were then determined by combining the Bradford assay to a polyacrylamide gel electrophoresis. Results from the Bradford assay in Fig. 2.a show that PEG grafting is associated with a large decrease in the amount of adsorbed proteins. The global amount of protein per mg of nanoparticles was determined to be of 260 µg on ZGO-PEG (DMF/3h), which is relatively low in comparison to the 335 µg adsorbed per mg of ZGO-OH nanoparticles. This value keeps decreasing and reaches the minimum of 252 µg per mg for ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles. This result, obtained from Bradford assay, was confirmed by running a polyacrylamide gel with the same samples (Fig. 2.b). We clearly notice a similar trend from the rapid observation of lanes distribution and intensity on the gel. In comparison to the control lane, corresponding to 50% v/v mouse serum diluted in normal saline solution, we observe a progressive fainting of the 5 major bands between 39 and 64 kDa upon the addition of PEG on the surface of the nanoparticles. This trend was further analyzed with ImageJ software in order to precisely follow the evolution of the proteins cartography on the surface of ZGO nanoparticles. The analysis of lane profiles

seems to indicate that PEG grafting is responsible for the elimination of the lightest proteins, attested by the complete disappearance of bands 4 and 5 in the two last lanes (Supplementary Fig. S2). Such result is in total agreement with the work of Chan et al. studying the adsorption of serum proteins on the surface of PEGylated gold nanoparticles¹². Regarding both PEGylated nanoparticles, the more aminosilane moieties and the larger the nanoparticles, the fewer proteins adsorbed on their surface. Indeed, contrary to the cartography defined on ZGO-PEG (DMF/3h) nanoparticles, the third band does not appear in the lane associated to ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles. These series of results from physico-chemical characterization as well as protein adsorption on both crude and PEGylated persistent luminescence nanoparticles strongly suggest that a significant increase of aminosilane density, along with a large augmentation of the hydrodynamic diameter, can successfully prevent the adsorption of proteins on the surface of stealth ZGO nanocrystals. Given the minor evolution of PEG density when comparing ZGO-PEG (DMF/3h) to ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles, this general trend is most likely the result of progressive blockage of protein binding sites on the surface of the nanoparticles caused by the dense aminosilane corona surrounding the crystal core.

To fully understand the physiological implications of such adsorption patterns, we finally examined the behavior of these three different types of nanoparticles *in vivo*. Prior to systemic administration, each type of nanoparticles was first activated under UV light to allow real-time and dynamic detection of persistent luminescence signal right after the administration. Biodistribution of the probes was then continuously monitored for 30 minutes, and assessed after 1, 3 and 6 hours. Persistent luminescence images, presented in Fig. 3.a, reveal a very different biodistribution pattern from one nanoparticles type to another. Crude ZGO-OH nanoparticles are almost instantly trapped within major organs of the mononuclear phagocyte system, which is assessed by a clear concentration of the luminescence signal in liver and spleen. The main circulation routes remain completely extinguished, from the lower to the upper limb, and the images demonstrate no significant evolution of the biodistribution over the whole acquisition period. The biodistribution dynamics, recorded for the first 30 minutes and expressed as a percentage of the total luminescence signal retrieved within a region of interest (ROI) drawn around the

major organs of the reticuloendothelial system (RES), are presented in Fig. 3.b. According to the semi quantitation from Fig. 3b, the accumulation process of ZGO-OH within liver and spleen is very fast and ends after 5 minutes, by which approximately 80 % of the nanoparticles remain trapped in the mononuclear phagocyte system. The same measurements after 1, 3, and 6 hours, displayed in Fig. 3.c, confirm this value, without any evolution of the biodistribution. The results are largely different for both ZGO-PEG (DMF/3h) and ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles. First, the images in Fig. 3.a indicate that stealth nanoparticles are predominantly able to remain in the main blood circulation, up to 3 hours for ZGO-PEG (DMF/3h) and up to 6 hours for ZGO-PEG (DMF/6h). We notice that PEG grafting allows a much better distribution of the probes within the animal body, bringing light to the upper and lower limbs circulation routes. When we compare the biodistribution of the two PEGylated crystals, we observe a longer circulation of the ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles for which liver accumulation only appears 6 hours after the injection. In the case of ZGO-PEG (DMF/3h) nanoparticles, liver retention seems to be quicker and slowly evolves from 30 minutes to 3 hours, after which it becomes predominant. The semi-quantitation from persistent luminescence images (Fig. 3.b and c) confirms a slow and progressive accumulation of the stealth nanoparticles within major RES organs. The 24 hours *ex vivo* biodistribution assessed the final uptake of all types of nanoparticles in both liver and spleen (Supplementary Fig. S3). The blood half-life of each type can be evaluated from the biodistribution data in Fig. 3 and evolves from 2-3 minutes, for crude nanoparticles, to 3 hours for ZGO-PEG (DMF/3h) nanoparticles and almost 6 hours for ZGO-PEG (DMF/6h) nanoparticles. Along with the results from physico-chemical characterization and protein adsorption, these biodistribution data demonstrate the important role of functionalization in defining the biological identity of the nanoparticles. Noteworthy, increasing the hydrodynamic diameter of stealth persistent luminescence nanoparticles by growing a thick aminosilane layer seems to prevent serum protein adsorption *in vitro* and finally leads to a longer circulation of the probes *in vivo*, with blood half-lives that almost reach 6 hours after the injection of nanoparticles 190 nm-wide.

Conclusion. We used persistent luminescence to better understand the influence of surface state and physico-chemical properties on the interaction of nanoparticles with serum proteins *in vitro* and their biological fate *in vivo*. Results demonstrate that surface charge and chemistry constitute the two major parameters ruling proteins adsorption on the nanoparticles. Indeed, masking charges and increasing the aminosilane density were both shown to prevent the interaction of proteins with the surface of nanoparticles. This biological identity of the crystal, defined by the amount and type of serum proteins adsorbed on its surface, was proven to govern the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles *in vivo*. Most noteworthy, we were able to prove that, at the expense of a large increase of the nanoparticles hydrodynamic diameter, the larger the aminosilane thickness on the surface of the core, the longer the circulation of the probes *in vivo*. This result not only constitutes the first report of 190 nm-wide stealth persistent luminescence nanoparticles with a blood half-life as high as 6 hours *in vivo*, but should also open exciting perspectives regarding the use of such nanotechnology for multiple diagnostics applications *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Chemicals. (3-Aminopropyl)-triethoxysilane (99%) was obtained from Sigma-Aldrich. Zinc nitrate hexahydrate (>99%) was purchased from Fluka. Gallium oxide (99.999%) and chromium (III) nitrate nonahydrate (99.99%) were purchased from Alfa Aesar. Dimethylformamide (>99.9%) was purchased from SDS. Alpha-methoxy-omega-N-hydroxysuccinimide poly(ethylene glycol) PEG MW 5.000 Dalton was bought from Iris Biotech GmbH.

Preparation of ZGO nanoparticles. $\text{ZnGa}_{1.995}\text{Cr}_{0.005}\text{O}_4$ nanoparticles were synthesized by hydrothermal method and low-temperature sintering in air. First, gallium nitrate was formed by reacting 8.94 mmol of gallium oxide with 10 mL concentrated nitric acid (35 wt%) under hydrothermal condition at 150°C overnight. Then, a mixture of 0.04 mmol of chromium nitrate and 8.97 mmol of zinc nitrate in 10 mL of water was added to the previous solution of gallium nitrate under vigorous stirring. The resulting solution was adjusted to pH 7.5 with an ammonia solution (30 wt%), stirred for 3 hours at room temperature, and transferred into a 25 mL Teflon-lined stainless steel autoclave for 24h heat treatment at 120°C. The resulting compound was washed several times with water and ethanol before drying at 60°C for 2 hours. The dry white powder was finally sintered in air at 750°C for 5 hours.

Hydroxylation was performed by basic wet grinding of the powder (500 mg) for 15 minutes, with a mortar and pestle in 50 mL of 5 mM NaOH solution, and overnight vigorous stirring of the resulting suspension at room temperature. Nanoparticles with a diameter of 85 nm were first selected from the whole polydisperse colloidal suspension by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 4500 rpm for 5 minutes. They were located in the supernatant (assessed by Dynamic Light Scattering). The supernatants were gathered and concentrated to a final 5 mg/mL suspension.

Nanoparticles functionalization. ZGO-OH nanoparticles were coated according to slightly modified existing protocols. Briefly, ZGO-NH₂ nanoparticles were obtained by reacting 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES) with ZGO-OH at the concentration of 2 mg/mL. ZGO-NH₂ (DMF/3h), respectively ZGO-NH₂ (DMF/6h), were obtained by reacting ZGO-OH nanoparticles, dispersed in DMF, and APTES at the concentration of 1% v/v for 3 hours, respectively 6 hours, at room temperature.

Particles were washed from the unreacted APTES by three centrifugation and redispersion steps in DMF. ZGO-PEG nanoparticles were obtained by reacting 10 μmol of MeO-PEG_{5kDa}-NHS (50 mg) with 5 mg of each ZGO-NH₂ nanoparticles dispersed in DMF at the concentration of 2 mg/mL. To ensure a maximum PEG density, the last functionalization step was achieved overnight, under vigorous stirring at 90°C.

Nanoparticles characterization. X-rays diffraction patterns were obtained on a Panalytical X'Pert Pro diffractometer with an incident-beam Ge monochromator, at $U = 45$ kV and $I = 40$ mA. The photoluminescence excitation spectrum was recorded on a Varian Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer at room temperature. Persistent luminescence emission spectrum was measured after 2 minutes excitation under the orange/red LEDs source (Bridgelux). Light was collected via an Acton SpectraPro monochromator coupled with a Princeton CCD camera cooled at -70°C.

ZGO nanoparticles were characterized using transmission electron microscopy (JEOL JEM-100S) and dynamic light scattering and zeta potential measurements in 20 mM NaCl, performed on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA) equipped with a 632.8 nm helium neon laser and 5-mW power, with a detection angle at 173° (non-invasive backscattering).

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Setaram Setsys evolution 1600 (Argon atmosphere, temperature range: from 20°C to 780°C, 10°C/min) on 10 mg dry samples of 120 nm core PLNP, at each functionalization step.

Adsorption of Mouse Serum Proteins and Purification. Nanoparticles at the concentration of 1mg/mL were incubated for two hours at 37°C with 50% v/v mouse serum diluted in normal saline solution. Nanoparticles were washed from unbound proteins by several centrifugation steps (13 200 rpm for 10 minutes at room temperature).

Bradford Assay. Aliquots of 10 μL of each type of ZGO nanoparticles suspended in 5% glucose (20 μg), previously incubated with 50% v/v murine serum, were transferred to a 96-well plate, along with 10 μL aliquots of a bovine serum albumin (BSA) serial dilution. Next, 200 μL of Coomassie blue dye reagent (Bio-Rad) was added to each well, and the plate was incubated at 37°C for 10 minutes.

Absorbance at 595 nm was measured using a plate reader (Wallac Victor² Multilabel Counter, Perkin Elmer). The BSA standard was prepared with ZGO-OH nanoparticles in order to take into account the absorbance of free nanoparticles.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). Aliquots of 10 μ L of each type of ZGO nanoparticles, previously incubated with 50% v/v murine serum, were mixed with 5 μ L of 4x LDS sample buffer (Invitrogen), 2 μ L of 10 x reducing agent (Invitrogen) and incubated at 90°C for 10 minutes. Samples, along with 5 μ L of SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen), were loaded on a 10% Bis-Tris gel in MOPS running buffer (Invitrogen) and resolved at 200 V for 60 minutes. After electrophoresis, the gel was fixed with 10% v/v acetic acid in 40% v/v methanol for 30 minutes and stained with silver (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol.

In vivo systemic injections. Five weeks old female BALB/c mice (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were anesthetized by i.p. injection of a mixture of ketamine (85.8 mg/kg, Centravet, Plancoët, France) and xylazine (3.1 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Germany) diluted in 150 mM NaCl. Systemic injections of 10^{13} ZGO nanoparticles, dispersed in 5% sterile glucose solution were then realized to perform imaging studies.

Imaging. Signal acquisition was carried out using a photon-counting system based on a cooled GaAs intensified charge-coupled device (ICCD) camera (Photon-Imager, Biospace, Paris, France). The ICCD aperture time was set to three minutes. ZGO nanoparticles (10^{13} in sterile 5% Glucose solution) were first excited *ex vivo* for 2 minutes under UV light (6W mercury discharge 254 nm lamp) before injection to mice via the caudal vein. Animals were then placed on their back under the photon-counting device, and the signal acquisitions were performed. After a 3 hours period and complete persistent luminescence extinction, the orange/red LEDs source was shined on the animal for two minutes to re-activate the persistent luminescence from ZGO nanoparticles, and the signal acquisition was resumed. Semi-quantization was achieved through the use of Biospace developed software, PhotoVision+. Experiments were conducted in agreement with a regional ethic committee for animal experimentation.

ACKNOWLEDGMENT. We thank Johanne Seguin for her help performing PAGE analysis and Bradford tests. This work has been supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project n°ANR-08-NANO-025).

SUPPORTING INFORMATION PARAGRAPH.

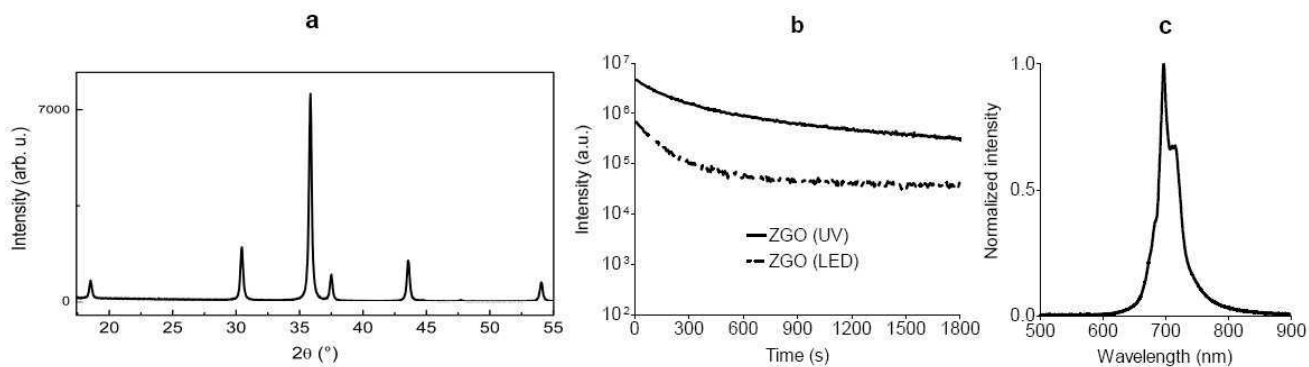


Figure S1. Physical characteristics of ZGO nanoparticles. **a**, X-rays diffraction pattern. **b**, Persistent luminescence decay curves. **c**, Persistent luminescence emission spectrum.

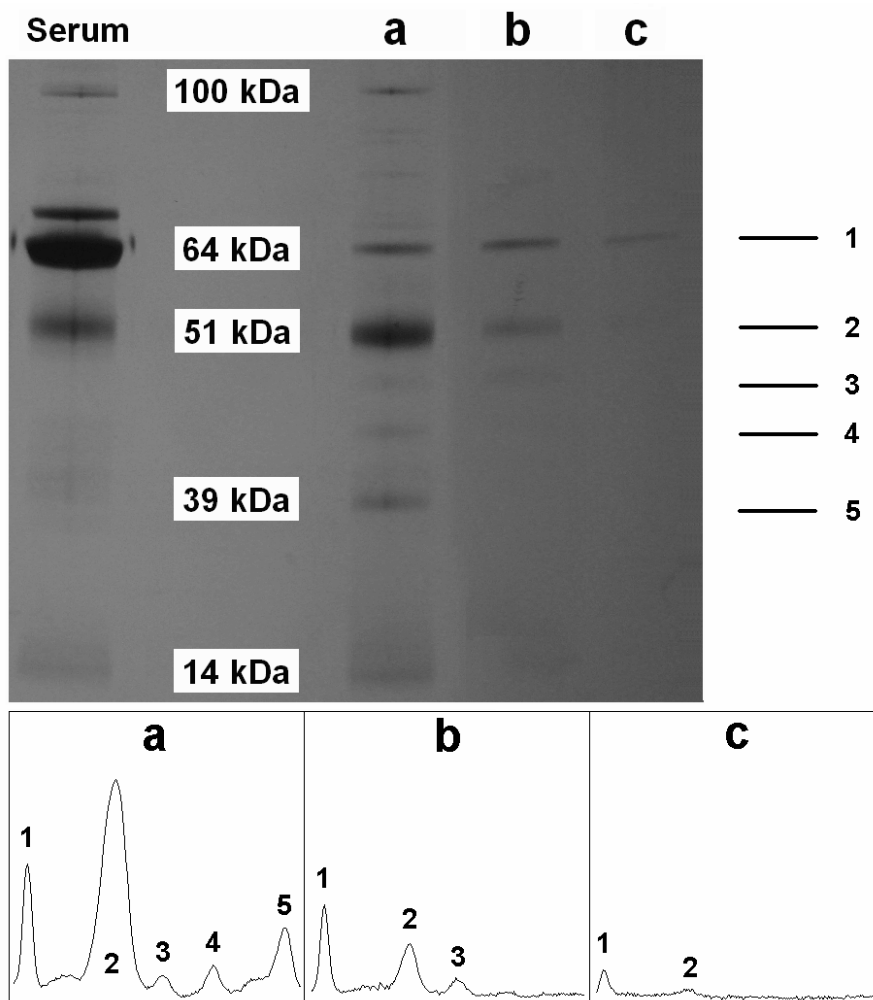


Figure S2. Polyacrylamide gel electrophoresis analysis with ImageJ software.

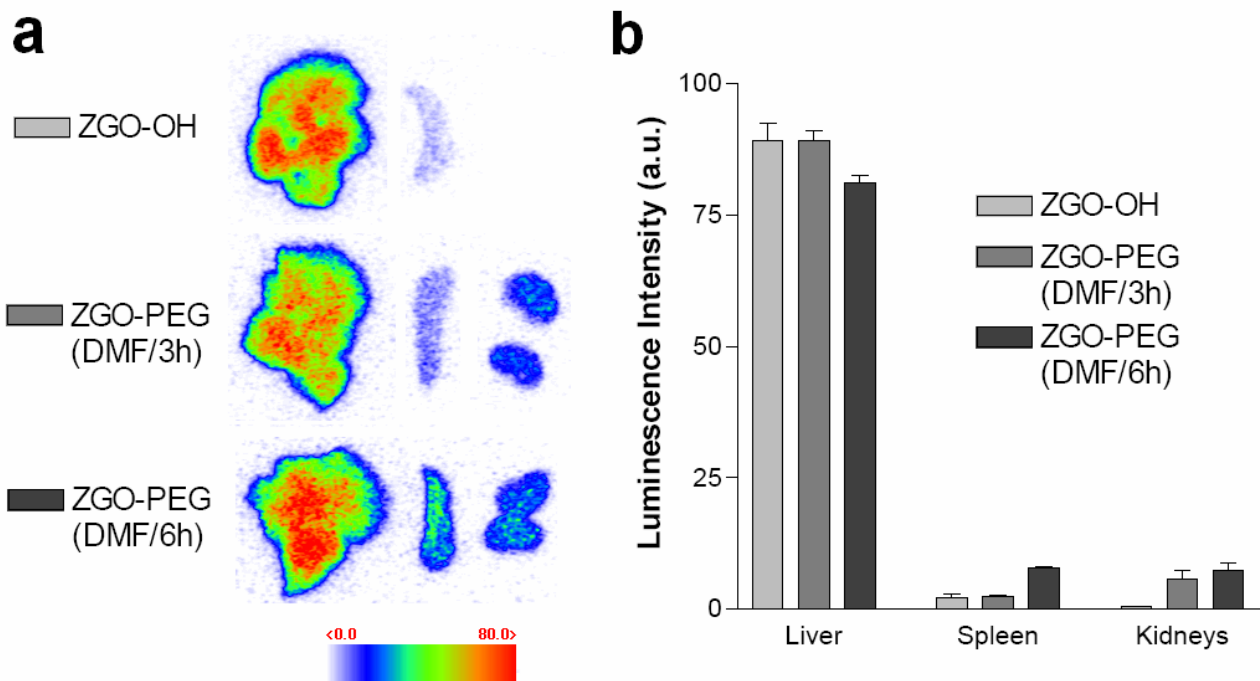


Figure S3. 24 hours *ex vivo* biodistribution of ZGO-PEG nanoparticles (n = 3). **a**, Persistent luminescence images recorded after 2 minutes excitation of the harvested organs under the red-LEDs source. **b**, Image-based quantitative biodistribution of ZGO-PEG nanoparticles.

FIGURES.

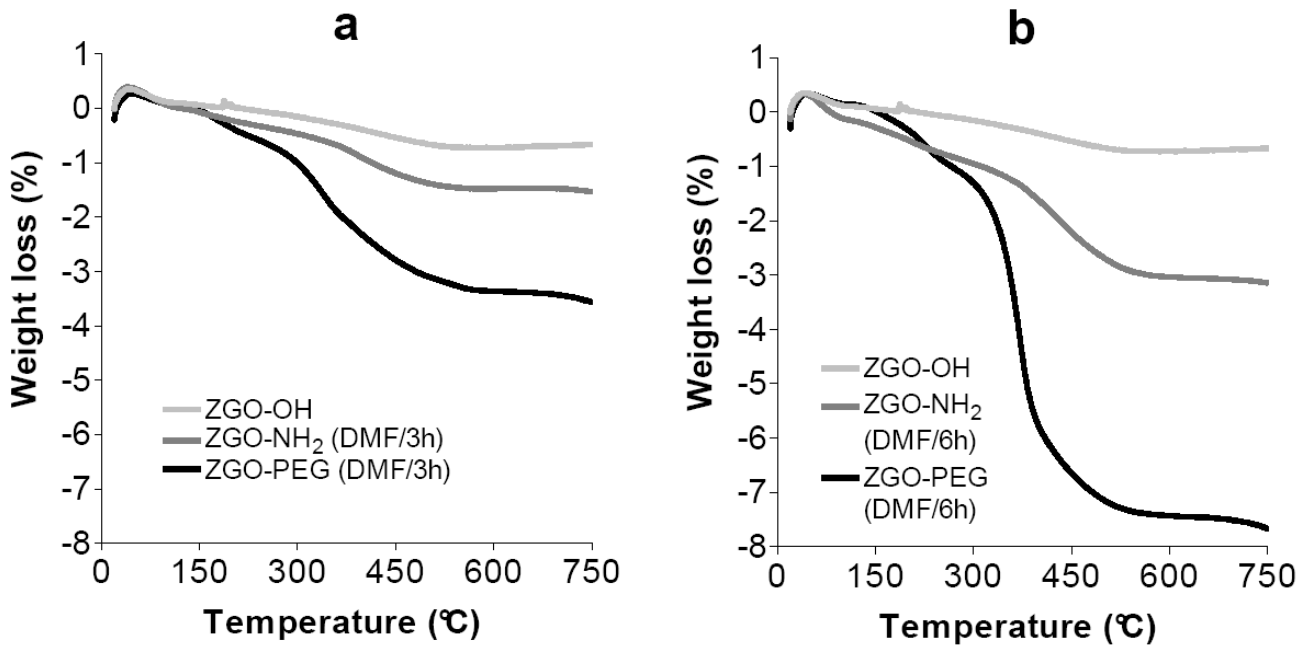


Figure 1. Weight loss curves obtained from thermogravimetric analysis of ZGO nanoparticles after each functionalization step. **a**, Functionalization route from aminosilanization in DMF for 3h. **b**, Functionalization route from aminosilanization in DMF for 6h.

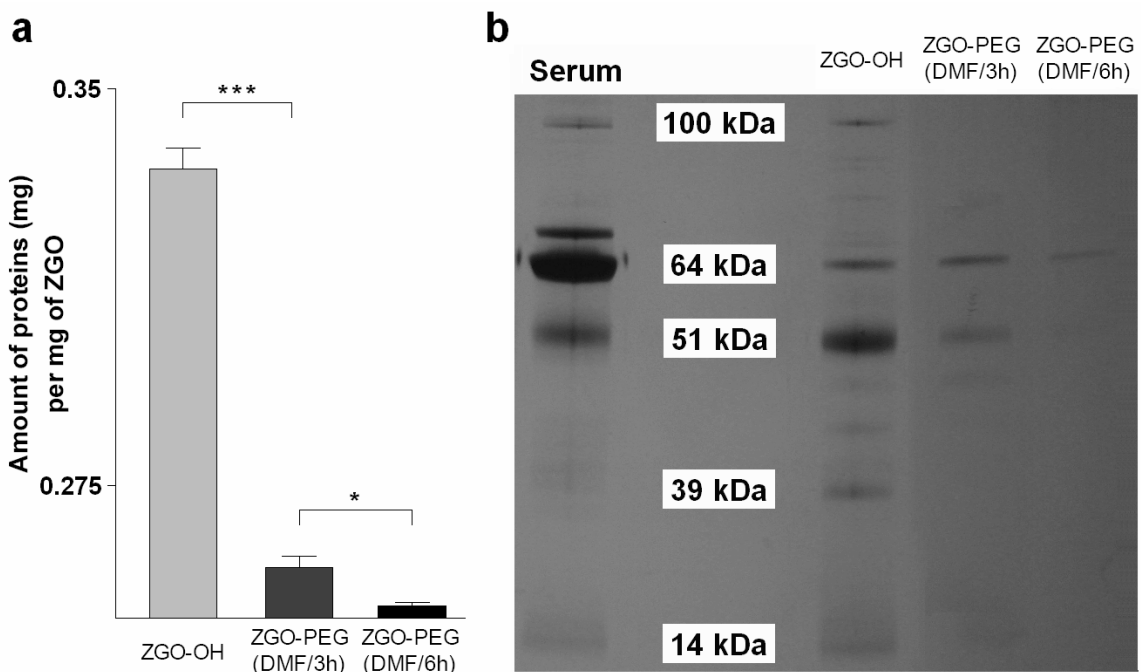


Figure 2. Interaction of ZGO nanoparticles with mouse serum proteins depending on surface coverage. **a**, Bradford assay after a 2 hours incubation of nanoparticles with mouse serum proteins. **b**, Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins adsorbed on the surface of persistent luminescence nanoparticles.

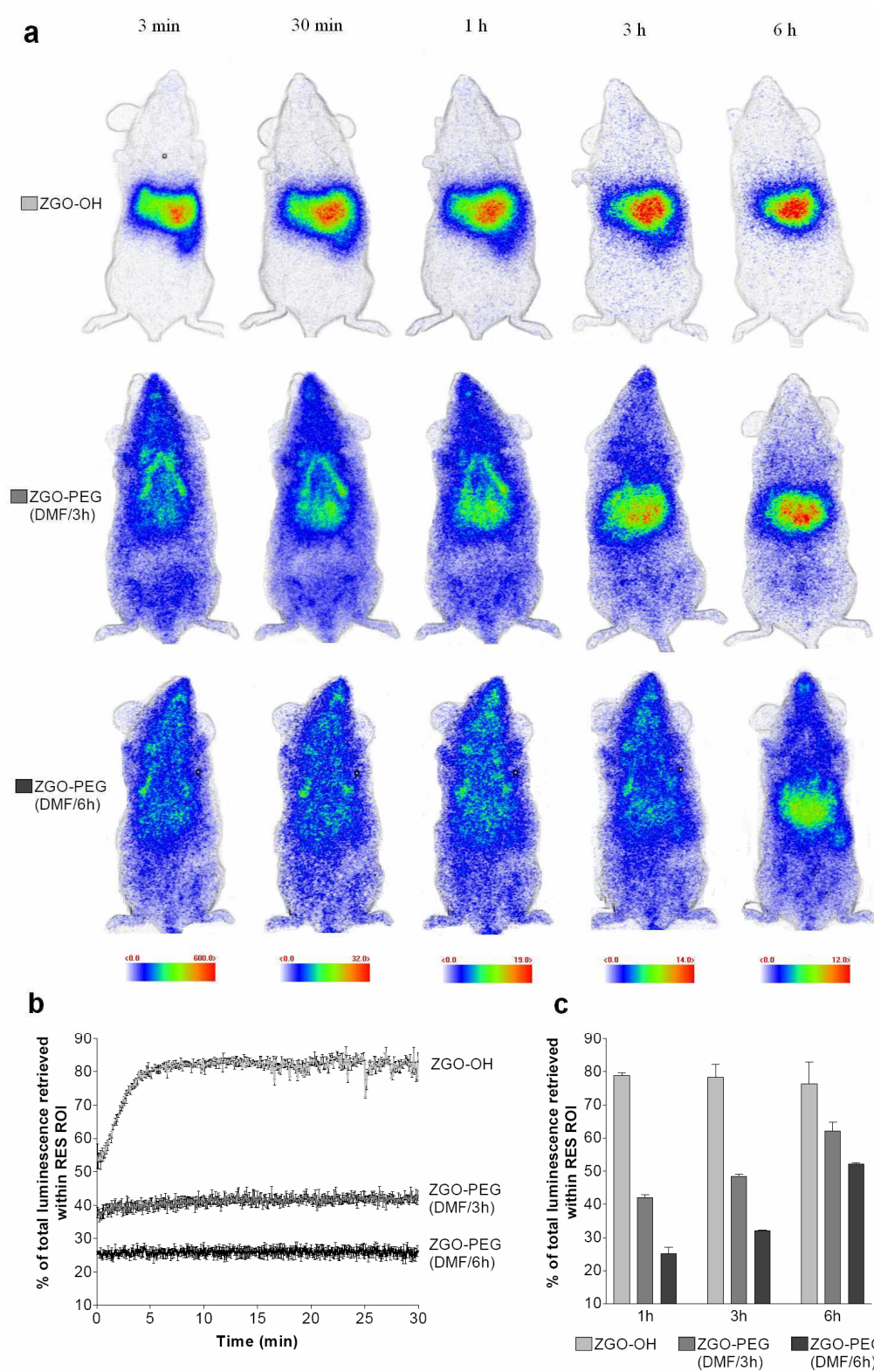
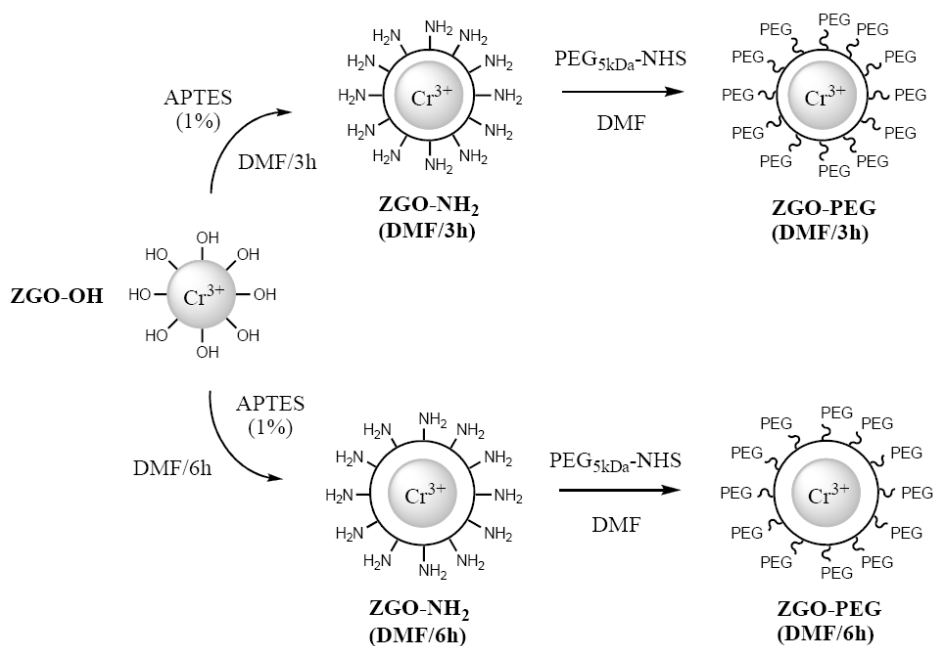


Figure 3. In vivo biodistribution of ZGO-PEG nanoparticles (n = 3). **a**, Persistent luminescence images of ZGO-PEG biodistribution. **b**, Accumulation kinetics of ZGO-PEG nanoparticles within RES ROI the first 30 minutes. **c**, Evolution of persistent luminescence signal within RES ROI after 1, 3 and 6 hours.

SCHEMES.



Scheme 1. Representation of ZGO functionalization routes.

TABLES.

	Hydrodynamic diameter (nm)	Zeta potential (mV)
ZGO-OH	84,52 ± 1,24	22,2 ± 1,32
ZGO-NH ₂ (DMF/3h)	99.02 ± 0.50	39 ± 2.49
ZGO-NH ₂ (DMF/6h)	133,10 ± 1,28	40,7 ± 2,35
ZGO-PEG (DMF/3h)	122.90 ± 0.91	2.04 ± 2.35
ZGO-PEG (DMF/6h)	188,10 ± 0,95	- 0,37 ± 0,58

Table 1. Physico-chemical characterization of ZGO nanoparticles after each functionalization step.

	Silane concentration (nmol/mg)	PEG concentration (nmol/mg)
ZGO-NH ₂ (DMF/3h)	60,87 ± 1,89	-
ZGO-NH ₂ (DMF/6h)	182,55 ± 2,41	-
ZGO-PEG (DMF/3h)	-	3,92 ± 0,06
ZGO-PEG (DMF/6h)	-	8,89 ± 0,06

Table 2. Quantization of aminosilane and PEG density on ZGO nanoparticles from thermogravimetric analysis. Results are expressed as molar concentration per milligram of ZGO nanoparticles.

REFERENCES.

- ¹ Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751-60.
- ² Lin X, Xie J, Niu G, Zhang F, Gao H, Yang M, Quan Q, Aronova MA, Zhang G, Lee S, Leapman R, Chen X. Chimeric Ferritin Nanocages for Multiple Function Loading and Multimodal Imaging, *Nano Lett.* 2011;11(2):814-9.
- ³ Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615-27.
- ⁴ Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J Am Chem Soc.* 2010;132(16):5761-8.
- ⁵ Park JH, Gu L, von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticle for in vivo applications. *Nat Mater.* 2009;8(4):331-6.
- ⁶ Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008;5(4):496-504.
- ⁷ le Masne de Chermont Q, Chanéac C, Seguin J, Pellé F, Maîtrejean S, Jolivet JP, Gourier D, Bessodes M, Scherman D. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(22):9266-71.
- ⁸ Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård 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;104(7):2050-5.
- ⁹ Tenzer S, Docter D, Rosfa S, Wlodarski A, Kuharev J, Rekić A, Knauer SK, Bantz C, Nawroth T, Bier C, Sirirattanapan J, Mann W, Treuel L, Zellner R, Maskos M, Schild H, Stauber RH. Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona, A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis. *ACS Nano.* 2011;5(9):7155-67.
- ¹⁰ 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. *J Am Chem Soc.* 2011;133(8):2525-34.
- ¹¹ Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, De Gennes PG. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci.* 1991;142(1):149-158.
- ¹² Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WC. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J Am Chem Soc.* 2012;134(4):2139-47.
- ¹³ Daou TJ, Li L, Reiss P, Josserand V, Texier I. Effect of Poly(ethylene glycol) Length on the in Vivo Behavior of Coated Quantum Dots. *Langmuir.* 2009;25(5):3040-4.
- ¹⁴ Huang X, Li L, Liu T, Hao N, Liu H, Chen D, Tang F. The Shape Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles on Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility in Vivo. *ACS Nano.* 2011;5(7):5390-9.

-
- ¹⁵ Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonik AM, Agarwal RG, Lam KS. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(13):3435-46.
- ¹⁶ Poon Z, Lee JB, Morton SW, Hammond PT. Controlling in Vivo Stability and Biodistribution in Electrostatically Assembled Nanoparticles for Systemic Delivery. *Nano Lett*. 2011;11(5):2096-103.
- ¹⁷ Maldiney T, Sraiki G, Viana B, Gourier D, Richard C, Scherman D, Bessodes M, Van den Eeckhout K, Poelman D, Smet PF. In vivo optical imaging with rare earth doped Ca₂Si₅N₈ persistent luminescence nanoparticles. *Optical Materials Express*. 2012;2(3):261-268.
- ¹⁸ Maldiney T, Byk G, Wattier N, Seguin J, Khandadash R, Bessodes M, Richard C, Scherman D. Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability. *Int J Pharm*. 2012;423(1):102-7.
- ¹⁹ Maldiney T, Kaikkonen MU, Seguin J, le Masne de Chermont Q, Bessodes M, Airene KJ, Ylä-Herttuala S, Scherman D, Richard C. In vitro targeting of avidin-expressing glioma cells with biotinylated persistent luminescence nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2012;23(3):472-8.
- ²⁰ Maldiney T, Richard C, Seguin J, Wattier N, Bessodes M, Scherman D. Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano*. 2011;5(2):854-62.
- ²¹ Maldiney T, Lecointre A, Viana B, Bessière A, Bessodes M, Gourier D, Richard C, Scherman D. Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for in vivo imaging. *J Am Chem Soc*. 2011;133(30):11810-5.
- ²² Maldiney T, Richard C, Scherman D, Gourier D, Viana B, Bessiere A. Nanoparticules excitables in situ pour l'imagerie optique in vivo, l'imagerie multimodale optique-IRM in vivo, et la théranostique. French Patent (2012) CNRS, FR1250846.
- ²³ Bessière A, Jacquart S, Priolkar K, Lecointre A, Viana B, Gourier D. ZnGa₂O₄:Cr³⁺: a new red long-lasting phosphor with high brightness. *Opt Express*. 2011 May 23;19(11):10131-7.

8.2 Une circulation nettement améliorée

Ces derniers résultats confirment le rôle primordial de la fonctionnalisation de surface dans le comportement de nanoparticules inorganiques *in vivo*. Le signal de luminescence persistante nous permet ici d'obtenir une information dynamique sur l'accumulation des nanoparticules au sein du système monocyte-macrophage.

Le bon déroulement d'une réaction chimique en surface de colloïdes est souvent attesté par mesure des paramètres physico-chimiques principaux tels que le potentiel zeta et la diamètre hydrodynamique des nanoparticules. Nous montrons ici que l'observation de ces seuls paramètres ne suffit pas à la caractérisation du système. En particulier, deux types de nanoparticules peuvent avoir un diamètre hydrodynamique et un potentiel zeta très proches, mais des comportements bien différents *in vivo*. Lorsqu'il s'agit de la construction et de l'étude de systèmes furtifs destinés à l'imagerie du petit animal, il est essentiel d'avoir accès à la densité de fonctions greffées en surface des particules. Ce paramètre est alors directement relié à la quantité de protéines adsorbées sur les nanoparticules. Dans le cas des nanoparticules à luminescence persistante, nous montrons qu'une augmentation de la densité de silanes de surface permet d'augmenter la quantité de polyéthylène glycol par particule et de diminuer de manière significative le nombre de protéines adsorbées en surface des particules.

Les expériences *in vivo* réalisées sur des groupes de souris saines permettent d'associer cette diminution du nombre de protéines de surface à une nette augmentation du temps de demi-vie des nanoparticules dans le sang. Il est ainsi possible d'obtenir des nanoparticules dont le temps de demi-vie avoisine les six heures. Ce résultat confirme également qu'une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules est associée à une augmentation de leur temps de circulation *in vivo* ainsi qu'un ralentissement du processus de capture par le système monocyte-macrophage.

Ce contrôle du temps de circulation par la fonctionnalisation de surface constitue un résultat important pour le type d'applications envisagées chez le petit animal. Une telle amélioration du comportement des nanoparticules *in vivo* ouvre de nouvelles perspectives pour le ciblage de tumeurs solides ou d'autres pathologies, et augmente également nos chances d'observer une accumulation spécifique au niveau de l'environnement malade.

Cinquième partie

Nouveaux concepts à luminescence persistante pour l'imagerie *in vivo*

Chapitre 9

L'imagerie bimodale optique-IRM

Sommaire

9.1 L'idée de plateforme multimodale	151
9.2 La luminescence persistante pour l'imagerie bimodale	160

9.1 L'idée de plateforme multimodale

La récente augmentation du nombre de publications et travaux liés aux nanoparticules est associée au développement de nouveaux outils multifonctionnels basés sur l'exploitation du volume occupé et alloué par la particule, en comparaison des systèmes moléculaires. De nombreux groupes de recherche ont ainsi embrassé l'idée qu'une seule et même particule, conçue de manière intelligente, pouvait occuper plusieurs fonctions de natures différentes. Lorsque ces fonctions correspondent à des modalités d'imagerie différentes, on parle de multimodalité.

Une observation globale des différentes plateformes multimodales permet de faire apparaître trois stratégies différentes couramment employées pour le développement de ces outils d'imagerie :

1. Stratégie de surface. Cette première méthode consiste à utiliser la surface accessible sur la particule pour greffer un support moléculaire de la modalité à ajouter. Un exemple représentatif est la sphère fluorescente en surface de laquelle seraient greffées des molécules d'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) pour complexer le gadolinium. La sonde bimodale ainsi obtenue pourrait être utilisée en imagerie de fluorescence et en imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette technique de surface présente l'avantage de ne pas faire augmenter le volume de la particule pour ajouter la modalité supplémentaire. En revanche, la surface occupée par la seconde modalité sera perdue pour la fixation de ligands ou d'autres molécules d'intérêt biologique.
2. Stratégie en volume. Cette seconde méthode consiste à former un système cœur-coquille dans lequel chaque partie contient une modalité. Nous comprenons bien que cette solution présente un rapport avantage/inconvénient inversé par rapport au cas précédent. Elle permet tout d'abord de conserver la surface efficace de la particule, alors accessible pour une fonctionnalisation par des ligands ou molécules d'intérêt biologique. En revanche, l'ajout de la seconde modalité est associé à une augmentation significative du volume de la particule qui peut limiter certaines applications *in vivo*.
3. Dopage. Cette dernière stratégie réunit les avantages des deux techniques précédentes en ce qu'elle permet de conserver le volume et la surface accessibles de la particule. Dans ce dernier cas, la modalité supplémentaire est ajoutée par substitution de quelques atomes de la structure de départ par d'autres apportant la modalité supplémentaire.

L'article suivant emploie la stratégie de dopage pour le développement d'une sonde d'imagerie multimodale sur la base de nanoparticules à luminescence persistante. Il s'agit ici d'évaluer la possibilité d'utiliser des nanoparticules de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+} , Gd^{3+}) pour l'imagerie optique-IRM *in vivo* chez le petit animal. Le rationnel de ce travail consiste à associer la résolution spatiale élevée de l'IRM à la haute sensibilité de l'imagerie optique pour améliorer la précision de détection *in vivo*.

Red-excitable Magnetic Nanophosphors as Versatile Tool for Multimodal *in vivo* Imaging**

Thomas Maldiney, Bich-Thuy Doan, Michel Bessodes, Daniel Scherman, Cyrille Richard*

Advances in the intelligent design of highly sophisticated nanocarriers have led to the development of several reliable platforms intended for diagnosis^[1] applications. Taking advantage of the large available space within a single nanoparticle, as compared to other systems in the molecular scale, many research groups have pursued the idea that the same rationally engineered cargo could simultaneously carry multiple functions at a time. Thereby, novel nanotechnologies were lately introduced as multifunctional systems, serving as multimodal imaging agents^[2,3] or as hybrid imaging/therapeutic theranostic agents.^[4,5] In particular, the interest is increasing on the development of multimodal imaging probes associating one high sensitivity modality, such as fluorescence or positron emission tomography (PET) imaging, with one high spatial resolution modality, typically magnetic resonance imaging (MRI).^[6] Recently, our group has introduced the use of persistent luminescence nanoparticles as photonic probes for optical imaging *in vivo*.^[7] These nanomaterials can be excited under a UV lamp before the injection to small animals, and emit a near-infrared persistent luminescence through living tissues, which allows real-time detection with absolute sensitivity as well as complete avoidance of the autofluorescence. We have shown that proper surface functionalization of these nanoparticles could not only be used to favor *in vivo* long-lasting blood circulation,^[8] but also to specifically target cancer cells *in vitro*.^[9,10] In addition, the recent elucidation of the fundamental mechanism driving persistent luminescence phenomenon in diopside host led to an optimization of the crystal co-doping conditions, and unveiled a novel composition, displaying better optical characteristics for *in vivo* applications.^[11,12] Nonetheless, despite these improved characteristics of persistent luminescence materials,^[13] the signal could not be followed more than 2 hours in living animals, which impeded long-term biomedical applications such as tumor-targeting. We have recently overcome this limitation by introducing a new generation of persistent luminescence nanomaterials, based on trivalent chromium-doped zinc gallate with formula $\text{ZnGa}_{1.995}\text{Cr}_{0.005}\text{O}_4$, which can be excited

through living tissues by using low energy photons, in the red region of the visible spectrum.^[14] This promising nanotechnology is potentially of wide applications to biologists and pharmacologists involved in cancer diagnosis, vascular biology, as well as cell therapy research.

In the present study, we report the synthesis and functionalization of a novel multimodal imaging probe, based on red-excitable magnetic nanophosphors, and intended for *in vivo* diagnosis applications in small animals. This magnetic nanocrystal bears the ability to be simultaneously used as optical probe, with the main advantage to allow real-time detection and absolute sensitivity associated with persistent luminescence properties, as well as negative contrast agent for MRI, that brings high spatial resolution along with non invasive anatomical precision.

Nanoparticles with formula $\text{ZnGa}_{2(0.9975-x)}\text{Cr}_{0.005}\text{Gd}_{2x}\text{O}_4$ ($x = 0, 2,$ or 4%), referred to as $\text{ZGO}:\text{Cr}^{3+},\text{Gd}^{3+}$ ($x \%$), were synthesized by sintering in air after hydrothermal crystallization of chromium/gadolinium-doped zinc gallate under pressure.^[15] Results from X-ray diffraction (XRD) on bulk powders reveal the formation of pure spinel-type zinc gallate, even after significant gadolinium doping up to 4% (Figure S1). We notice from the XRD patterns that the introduction of gadolinium in the structure is responsible for a progressive decline of resolution, with peak intensities gradually decreasing from the compound without gadolinium to the 4%-doped powder. Indeed, given the significant difference between gadolinium (0.938 Å) and gallium (0.62 Å) ionic radii, such change in the diffraction pattern is very certainly associated with a difficult crystallization of the compound when trying to force gadolinium in gallium sites. The persistent luminescence decline curves from Figure 1 corroborate this explanation, as we notice a loss in global signal intensity after gadolinium doping.

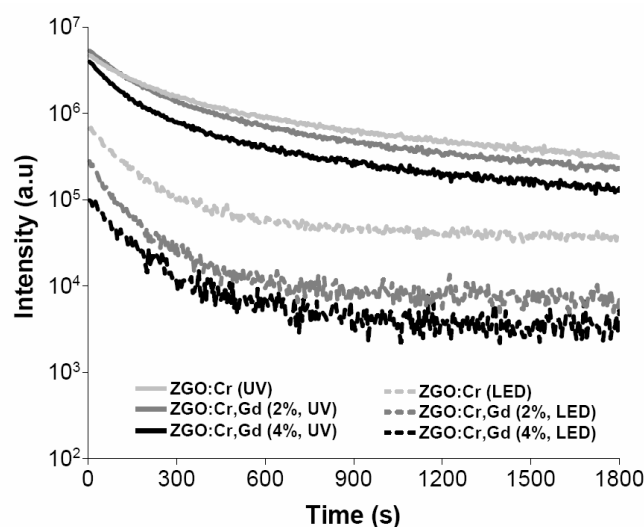


Figure 1. Persistent luminescence decay curves of ZGO nanoparticles

[*] T. Maldiney, Dr. B.T. Doan, Dr. M. Bessodes, Prof. D. Scherman, Dr. C. Richard
Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie; CNRS, UMR 8151; Inserm, U 1022, Paris, F-75270 cedex France; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 cedex France; ENSCP, Paris, F-75231 cedex France
Fax: (+33) 1 43 26 69 18
E-mail: cyrille.richard@parisdescartes.fr

[**] This work has been supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project n°ANR-08-NANO-025).

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

Such correlation between optical properties and crystallinity has already been witnessed with several classes of luminescent materials and led to the conclusion that maximum emission intensity was usually achieved when the phosphor exhibited optical crystallization.^[16] Despite this signal loss, Figure 1 shows that gadolinium doping is not leading to a complete quenching of persistent luminescence. Indeed, no matter which excitation source chosen between either red LEDs or UV lamp, persistent luminescence signal remains highly detectable after a two minutes activation of the powders. In addition to these first observations regarding decline kinetics, we also studied the influence of gadolinium content on the optical signature of long-lasting phosphorescence (LLP) emission. Results in Supplementary Figure S2 confirm that there is no change in the emission profile of the different compositions. Precise determination of the gadolinium content of each powder was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Results indicate a negligible amount of gadolinium in the compound only doped with chromium, 18,15 mg of Gd^{3+} per gram of 2%-doped compound and 45,37 mg of Gd^{3+} per gram of 4%-doped compound which respectively corresponds to the real percentages of 1,29 % and 3,22 %, hereinafter referred to as ZGO:Cr,Gd (2%) and ZGO:Cr,Gd (4%).

In vivo applications in living animals with such persistent luminescence materials are usually achieved through the extraction of nanoparticles' monodisperse distributions.^[8] Such size selection allows removing the large particles, thus improving chances to get a homogeneous distribution of the probes *in vivo*. Thereby, we selected the same monodisperse distribution for each compound, with a mean hydrodynamic diameter of 60 nm (Supplementary Figure S3). T_1 and T_2 -weighted magnetic resonance images presented in figure 2.A were recorded at 7T with stable colloidal solutions of ZGO nanoparticles in diluted sodium hydroxide (5mM).

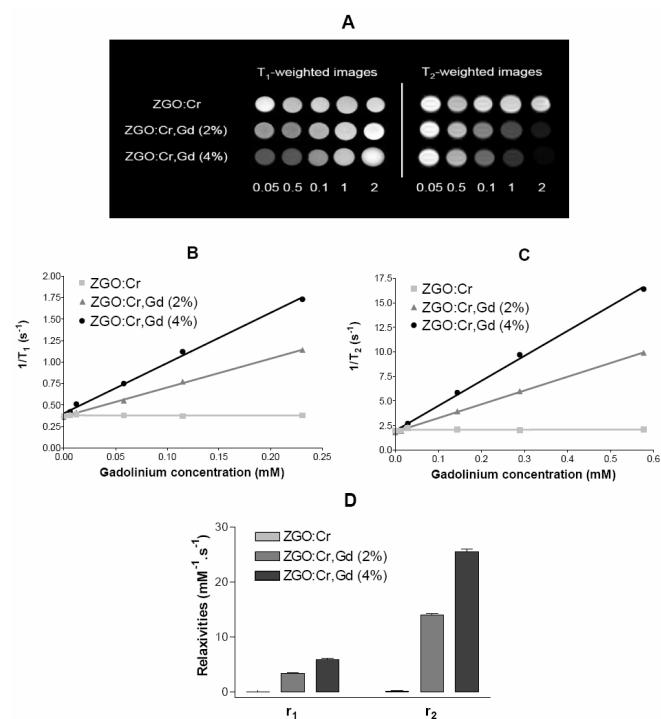


Figure 2. Magnetic properties of ZGO nanoparticles. **A**, T_1 and T_2 -weighted images of ZGO nanoparticles for various concentration of nanoparticles ($T=25^\circ C$). **B**, Plots of R_1 values as a function of the gadolinium concentration. **C**, Plots of R_2 values as a function of the gadolinium concentration. **D**, Relaxivities r_1 and r_2 of ZGO nanoparticles suspended in 5mM NaOH at 7T ($T=25^\circ C$)

The images reveal a significant effect of gadolinium-doping on both longitudinal and transversal relaxation times. Interestingly, a percentage of gadolinium as low as about 1.3 %, reached with ZGO:Cr,Gd (2%), seems to induce a noticeable effect of nanoparticles as positive and negative contrast agent (Figure 2.A). Quantitative measurements of relaxometry performed at 7T confirm a linear dependence of R_1 and R_2 regarding gadolinium concentration (Figure 2.B and C). In both cases, the more gadolinium enters the zinc gallate structure, the more important the relaxation rates. On the contrary, we notice that chromium-doped ZGO nanoparticles, without gadolinium, do not have any influence on the relaxation times of water protons, either T_1 or T_2 . Indeed, the magnetic moment of Cr^{3+} is weaker than that of Gd^{3+} , with 4 unpaired electrons for Cr^{3+} compared to 7 for Gd^{3+} . Although trivalent chromium is usually listed among classical paramagnetic species with putative MRI applications,^[17] the relative low concentration of dopant used to confer optical signature and final persistent luminescence characteristics to the crystals is not sufficient to provide substantial magnetic properties to the probe. A final comparison of relaxivities, calculated from relaxation rates curves, is given in Figure 2.D. The introduction of gadolinium content in chromium-doped persistent luminescence nanoparticles is responsible for a global increase of both longitudinal and transversal relaxivities, while compounds only doped with chromium display almost null r_1 and r_2 . In the case of longitudinal and transversal relaxations, increasing gadolinium content leads to ZGO nanoparticles with higher relaxivities, and a r_2/r_1 ratio close to 4, no matter which gadolinium concentration. Such value of the ratio, combined with the pronounced negative contrast obtained in T_2 -weighted images (Figure 2.A), strongly suggests a further use of these gadolinium/chromium-doped ZGO nanoparticles as multimodal optical imaging probe and negative 'T2' contrast agent for magnetic resonance diagnosis applications in living animals. Noteworthy, gadolinium-based contrast agents, either molecular (Gd-DTPA)^[18] or in the form of small nanoparticles^[2,19] (2-3 nm Gd_2O_3), usually display rather low r_2/r_1 ratios, i.e. inferior or equal to 1, associated with a global tendency to act as positive 'T1' MRI contrast agent. This trend is quite different from the one we observed with gadolinium-doped zinc gallate nanoparticles, which could be the result of size-effects responsible for a significant change in surface/volume phenomenon.^[20] Indeed, surface effects being preponderant when decreasing the size of nanoparticles, protons relaxation is mostly driven by the direct interaction between water protons from the biological environment and gadolinium on the surface of the nanoparticle. On the contrary, a significant increase in nanoparticles' diameter leads to the decrease in surface/volume ratio along with a loss of the dominant interaction between protons and surface gadoliniums. In the case of gadolinium-doped ZGO nanoparticles, in which the volume effects are prevailing, the resulting MRI T_2 -effect is most likely associated with the strong interaction between the global magnetic moment of nanoparticles, which generates a local magnetic field inhomogeneity, and water protons from the solvent.

The optical and magnetic properties of the two compositions, ZGO:Cr,Gd (2%) and ZGO:Cr,Gd (4%), were then compared *in vivo*. First, we investigated the ability of these nanoparticles to be monitored *in vivo* as optical probe. Nanoparticles from both compositions were suspended in 5% glucose solution, excited under UV light (6W, 254 nm) for 2 minutes, and injected in the tail vein of healthy BALB/c mice. Persistent luminescence images and accumulation kinetics are presented in Figure 3. We notice from Figure 3.A that ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles are clearly

detectable through living tissues with absolute sensitivity. After a short 5 minutes period, a significant amount of nanoparticles was trapped in liver. The image acquired 45 minutes after the systemic injection confirms an exclusive retention of the nanoparticles within the main reticulo-endothelial system (RES) organs, liver and spleen.

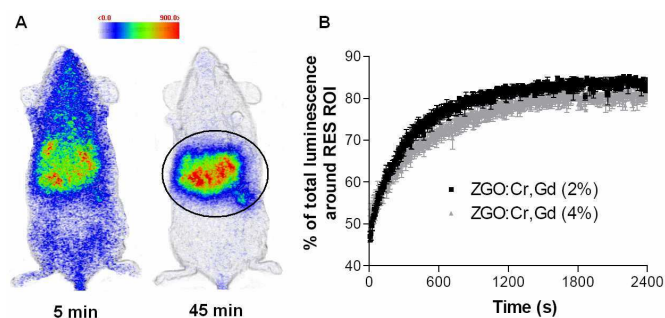


Figure 3. Optical detection of ZGO nanoparticles *in vivo*. **A**, Persistent luminescence images 5 and 45 minutes following the injection of UV-excited ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles (n=3). Black circle corresponds to a global region of interest (ROI) comprising liver and spleen. **B**, Accumulation kinetics of gadolinium-doped ZGO nanoparticles within ROI

Images recorded following the injection of the other composition, ZGO:Cr,Gd (2%), displayed the same biodistribution pattern (data not shown). Such behavior of nanoparticles covered with hydroxyl groups after intravenous injection has already been observed with previous persistent luminescence nanoparticles, based on diopside host.^[8] Briefly, this uptake of nanoparticles by RES is very likely the result of a recognition process initiated by the interaction of nanoparticles with opsonins circulating in the blood that finally triggers their capture by phagocytes located within major RES organs, mainly Kupffer cells in liver and splenic macrophages in spleen.

Quantitative analysis of persistent luminescence images allows accurate determination of the amount of nanoparticles confined in a given region of interest (ROI), compared to the whole mouse. After a preliminary ROI delimitation of the main RES organs (Figure 3.A), this analysis method was used to monitor global accumulation kinetics of persistent luminescence nanoparticles in liver and spleen (Figure 3.B). As expected in view of the similar hydrodynamic diameters and surface characteristics of ZGO:Cr,Gd (2%) and ZGO:Cr,Gd (4%), both compositions display identical accumulation kinetics in RES organs. In particular, a focus on the first 10 minutes of the accumulation curves allows unraveling the mean blood half-life of ZGO nanoparticles, estimated to be about 30 seconds. After 30 minutes, more than 80 % of the total luminescence are retrieved in liver and spleen. As the amount of nanoparticles in liver and spleen remains unchanged after 45 minutes, we decided to acquire magnetic resonance images a few minutes later.

T_2^* -weighted magnetic resonance images of mice abdominal cross section are presented in Figure 4. For each composition and each mouse of the group, a reference image was recorded before the intravenous injection of magnetic persistent luminescence nanoparticles. Comparison of Figure 4.A, reference image before the injection, with Figure 4.B and C, after the injection of ZGO:Cr,Gd (2%) and ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles, clearly reveals a strong change in contrast within liver. The significant drop in signal to noise ratio, as compared to the reference mouse, evolves from 30% after the injection of ZGO:Cr,Gd (2%) nanoparticles (Figure 4.D) to 60% with ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles (Figure 4.E).

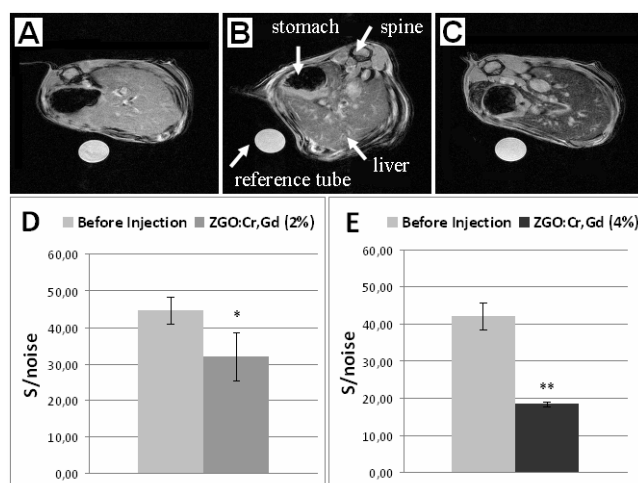
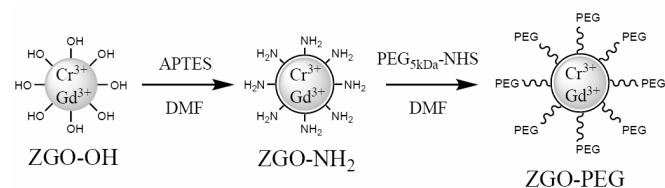


Figure 4. MRI-based detection of ZGO nanoparticles *in vivo*. T_2^* axial MR images of mice liver recorded at 7T (n=3). **A**, Reference mouse before the injection of ZGO nanoparticles. **B**, Reference mouse, 1 hour after the injection of ZGO:Cr,Gd (2%) nanoparticles. **C**, Reference mouse, 1 hour after the injection of ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles. **D**, Comparison of the mean T_2 values from ROI in mouse liver before and after the injection of ZGO:Cr,Gd (2%) nanoparticles. **E**, Comparison of the mean T_2 values from ROI in mouse liver before and after the injection of ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles

Notably, the ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles are responsible for a strong negative contrast within liver tissues, with a highly darkened and emphasized surface, as compared to liver vascularization which returns a clear hypersignal (Figure 4.C). The magnetic resonance images, obtained from mice abdominal cross section, perfectly correlate results from Figure 3, as well as the persistent luminescence images recorded from *in situ* activation of the nanoparticles through living tissues, both *in* and *ex vivo*, 24 hours after their injection (Supplementary Figure S4.A and B). This global result constitutes the first report of multimodal imaging nanoparticles, based on red-excitable magnetic persistent luminescence nanoparticles, for optical-MRI detection. These novel nanoprobe not only ensure absolute detection through living tissues by using persistent luminescence, but also serve as negative contrast agent for MRI-based detection with high spatial *in vivo* resolution, raising thrilling perspectives for bioimaging in living animals. Most biological applications of nanoparticles require surface functionalization to provide either good stability in physiological medium, interesting targeting properties for *in vitro* binding studies, or stealth character to ensure a proper biodistribution *in vivo*.^[21] Focusing on the use of magnetic persistent luminescence nanoparticles for *in vivo* bioimaging, we finally investigated the ability to confer a stealth character to these nanoprobe in order to favor their biodistribution after systemic injection. Functionalization with polyethylene glycol (PEG) was performed on ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles, providing the best contrast for MRI *in vivo* as well as absolute sensitivity for optical detection of persistent luminescence in healthy mice, via a two steps reaction route (Scheme 1). Each functionalization step was characterized by zeta potential measurements. Hydroxyl-terminated nanoparticles displayed slightly positive surface charge (25.2 ± 2.38 mV). The condensation of amino-silanes is responsible for a major increase in global surface charge rising up to 38.6 ± 1.84 mV due to the presence of primary amines covering the probes. Finally, PEG grafting allows complete

charge masking, with a global zeta potential dropping to the value of 0.867 ± 0.992 mV. Classical physico-chemical measurements using dynamic light scattering confirm the formation of a thick PEG layer on the surface of the nanoparticles (Supplementary Figure S5).



Scheme 1. Schematic representation of ZGO:Cr,Gd (4%) surface functionalization

Following the same approach as the one applied for hydroxyl-terminated nanoparticles, we first used the persistent luminescence signal after UV excitation, prior to systemic injection, to monitor short-term biodistribution of the nanoparticles *in vivo*. Images obtained from the optical detection of the nanoparticles are presented in Figure 5.A. A drastically longer blood circulation time was observed following PEG grafting, up to 3 hours after tail vein injection. Interestingly, a closer comparison of the images obtained 5 min, 45 min, and 3 hours after the injection seems to indicate a slow and progressive accumulation of the nanoparticles in spleen (white circle in Figure 5.A), without noticeable retention within liver. This observation was confirmed by MRI a few minutes later. T_2^* -weighted abdominal transversal images of the same mouse (Figure 5.B) clearly indicates a significant loss in signal to noise ratio homogeneously located within spleen (white arrow in the Figure 5.B), compared to the reference mouse before the injection.

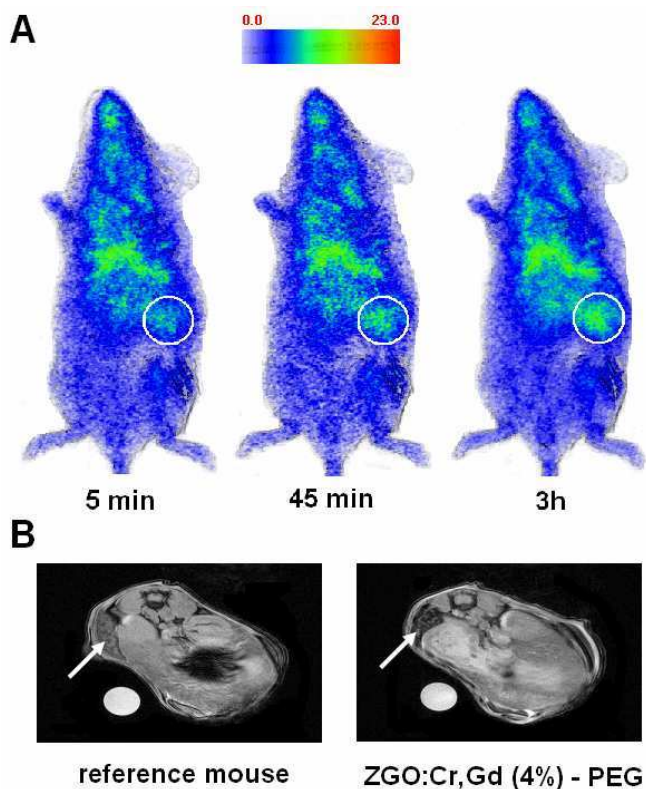


Figure 5. *In vivo* experiments with ZGO:Cr,Gd (4%)-PEG nanoparticles. **A**, Persistent luminescence images 5, 45 and 180 minutes following the injection of UV-excited ZGO:Cr,Gd (4%)-PEG nanoparticles. White circle indicates the region corresponding to

spleen. **B**, Mice liver/spleen T_2^* axial MR images recorded at 7T, 3h30 after the injection of ZGO:Cr,Gd (4%)-PEG nanoparticles

However, such visible changes in negative contrast around the liver were not detected by MRI, comforting the results obtained from optical detection performed with persistent luminescence, and the ability of stealth nanoparticles to successfully evade liver defense system and delay their final uptake by Kupffer cells. Such *in vivo* behavior raises promising perspective for a further use of these stealth nanoparticles to passively target the tumor microenvironment. In conclusion, we have introduced the first multimodal optical-magnetic resonance imaging nanoprobe based on red-excitable magnetic persistent luminescence nanoparticles. This novel generation of gadolinium-doped imaging probes allows not only real-time optical detection through living tissues with absolute sensitivity, but also magnetic resonance imaging with high spatial resolution *in vivo*. In addition, we have shown that successful surface PEG grafting could be used to greatly increase the circulation time and modulate the biodistribution of these magnetic persistent luminescence nanoparticles after systemic injection to healthy mice, and significantly delay the reticulo-endothelial system uptake *in vivo*. The development of this new nanotechnology opens thrilling alternatives to a large panel of diagnosis techniques in the field of biomedical research.

Experimental Section

((Experimental Details))

Received: ((will be filled in by the editorial staff))
Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

Keywords: Persistent luminescence • Nanophosphor • Multimodality • Magnetic Resonance Imaging • Optical Imaging • *In vivo*

- [1] Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* (2008) 452:580-589
- [2] Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast Agents for *In Vivo* Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* (2007) 129:5076-5084
- [3] Chimeric Ferritin Nanocages for Multiple Function Loading and Multimodal Imaging. *Nano Lett.* (2011) 11:814-819
- [4] Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology* (2008) 26(8):425-433
- [5] Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications. *Nature Nanotechnology* (2008) 3:151-157
- [6] Multimodality Imaging Probes : Design and Challenges. *Chem. Rev.* (2010) 110:3146-3195
- [7] Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging. *PNAS* (2007) 104(22):9266-9271
- [8] Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano* (2011) 5(2):854-862
- [9] Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability. *International Journal of Pharmaceutics* (2012) 423:102-107
- [10] *In vitro* targeting of avidin-expressing glioma cells with biotinylated persistent luminescence nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry* (2012) 23:472-478
- [11] Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 133:11810-11815

-
- [12] Trap depth optimization to improve optical properties of diopside-based nanophosphors for medical imaging. *Proc. SPIE* (2012) 8263, 826318
- [13] In vivo optical imaging with rare earth doped $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ persistent luminescence nanoparticles. *Optical Materials Express* (2012) 2(3):261-268
- [14] Nanoparticules excitables in situ pour l'imagerie optique in vivo, l'imagerie multimodale optique-IRM in vivo, et la théranostique. *French Patent* (2012) CNRS, FR1250846
- [15] Photocatalytic decomposition of benzene by porous nanocrystalline ZnGa_2O_4 with a high surface area. *Environmental Science & Technology* (2009) 43(15):5947-5951
- [16] The Role of Sintering in the Synthesis of Luminescence Phosphors. *Sintering of Ceramics - New Emerging Techniques*, ISBN: 978-953-51-0017-1 (2002)
- [17] Chromium-cage complex as contrast agent in MR imaging- Biodistribution studies of the ^{57}Co cobalt analogue. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B* (1991)
- [18] Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* (2006) 35 :512–523
- [19] Gadolinium Oxide Ultranarrow Nanorods as Multimodal Contrast Agents for Optical and Magnetic Resonance Imaging. *Langmuir* (2010) 26(11):8959-8965
- [20] Large-Scale Synthesis of Uniform and Extremely Small-Sized Iron Oxide Nanoparticles for High-Resolution T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* (2011)
- [21] Surface Modification of Gadolinium Oxide Thin Films and Nanoparticles using Poly(ethylene glycol)-Phosphate. *Langmuir* (2012) 28:774-782
-

SUPPORTING INFORMATION PARAGRAPH.

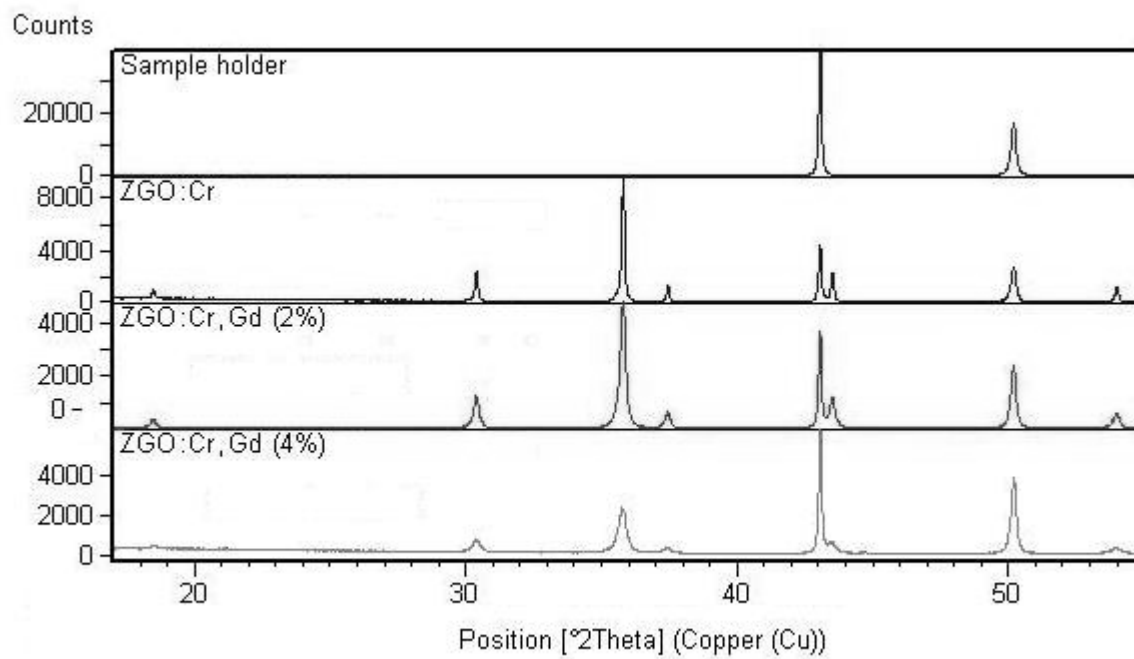


Figure S1. XRD diffractogram of ZGO powders.

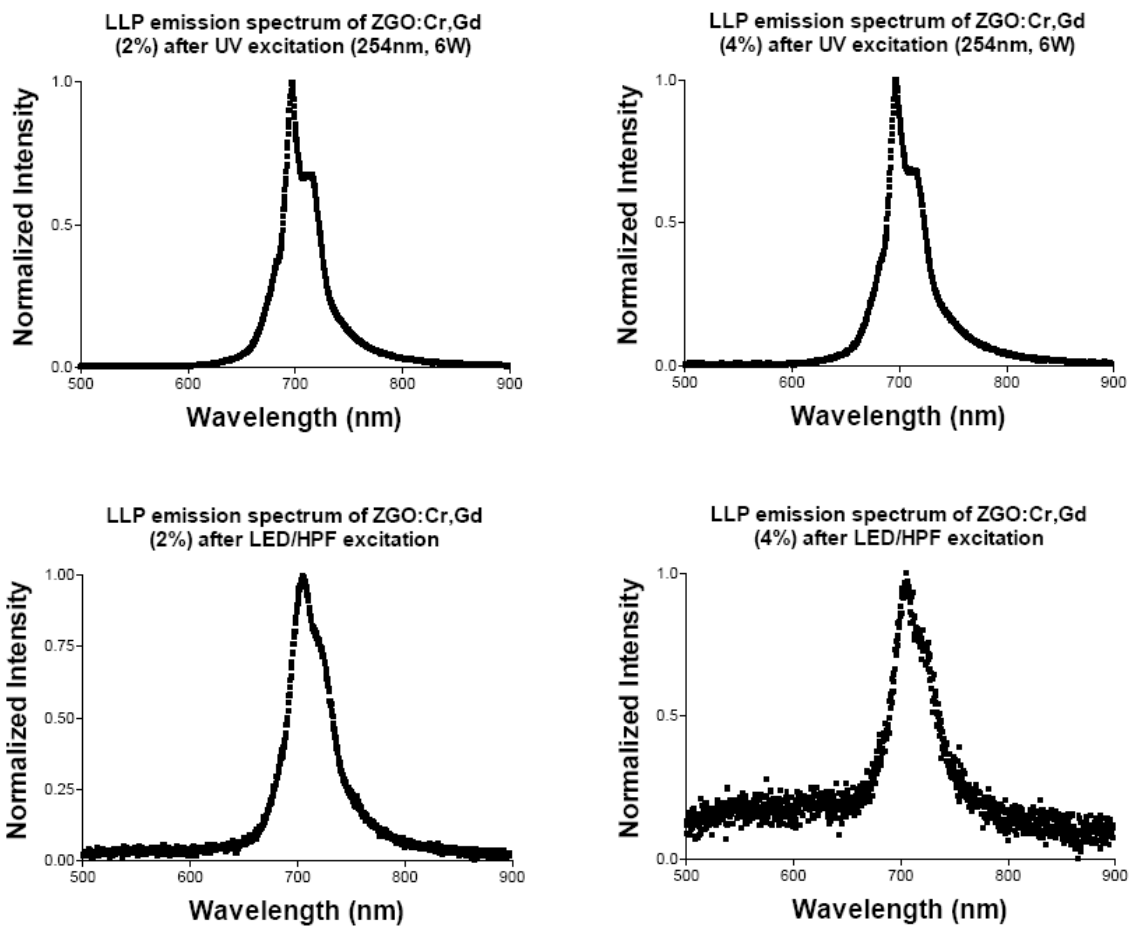


Figure S2. Persistent luminescence emission spectra of gadolinium-doped compounds.

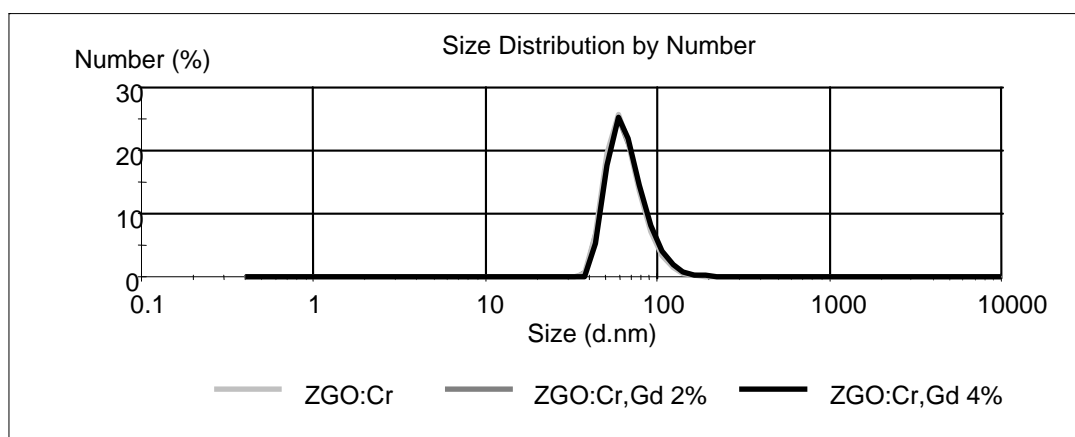


Figure S3. Size distribution of ZGO nanoparticles obtained from dynamic light scattering (DLS) measurements in 5% sterile glucose solution.

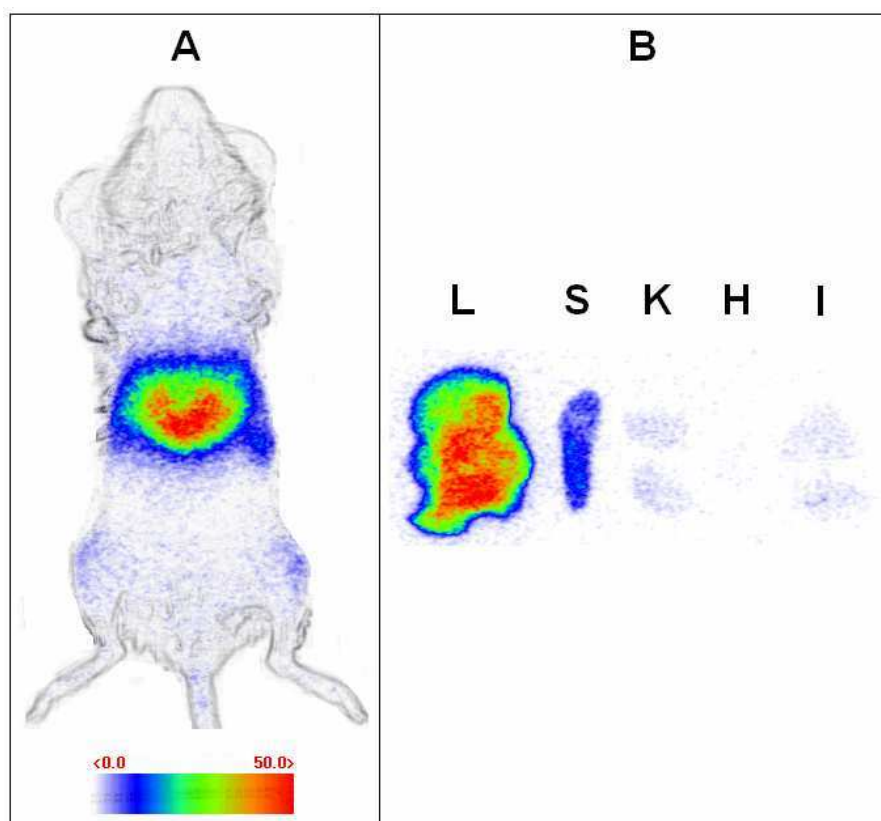


Figure S4. Persistent luminescence images recorded 24 hours after the injection of ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles. **A**, *In vivo* biodistribution following illumination of the whole mouse under the red-LEDs source. **B**, *Ex vivo* biodistribution following illumination of the harvested organs under the red-LEDs source.

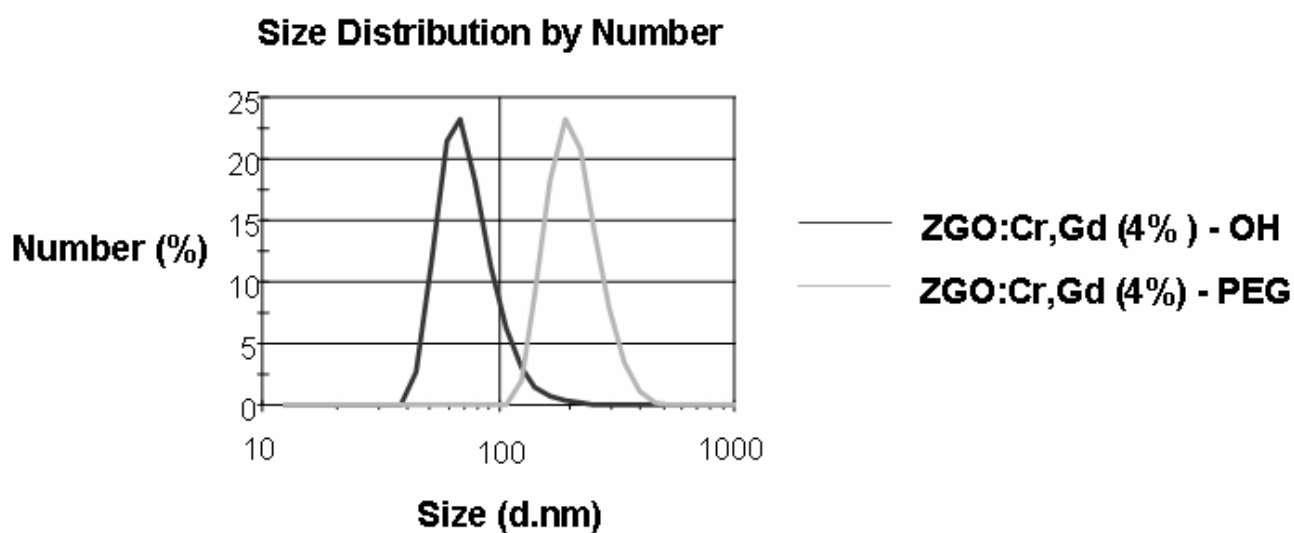


Figure S5. Size distribution of ZGO:Cr,Gd (4%) nanoparticles obtained from DLS measurements in 5% sterile glucose solution, before and after PEG grafting.

9.2 La luminescence persistante pour l'imagerie bimodale

Les résultats de cet article introduisent la première sonde d'imagerie bimodale optique-IRM sur la base de nanoparticules à luminescence persistante. La stratégie adoptée pour cette étude, dopage du matériau par substitution d'atomes de gallium par du gadolinium, permet de conserver la surface accessible de la particule et n'est responsable d'aucune augmentation de son diamètre hydrodynamique. L'introduction de quantités croissantes de gadolinium conduit à une augmentation des relaxivités transversale et longitudinale des cristaux *in vitro*. Malgré l'existence d'un léger effet T_1 *in vitro*, ces nanoparticules de $ZnGa_2O_4$ (Cr^{3+} , Gd^{3+}) ont un effet T_2 prépondérant, et se comportent comme un agent de contraste négatif *in vivo*.

La présence du gadolinium induit une légère baisse du signal de luminescence persistante en comparaison d'une composition similaire sans gadolinium. Nonobstant cette baisse de signal, l'injection d'une quantité de particules identique à celle utilisée dans les articles précédents permet une détection optique tout à fait acceptable des nanoparticules *in vivo*. Il est ainsi possible de suivre la biodistribution des nanoparticules en temps réel sous la caméra optique, puis d'utiliser l'IRM pour localiser la sonde au niveau du principal organe d'accumulation avec une précision anatomique. Cette première preuve de concept *in vivo* chez la souris saine démontre l'intérêt d'associer les deux modalités pour l'imagerie du petit animal.

Enfin nous montrons ici que ces nanoparticules magnétiques à luminescence persistante peuvent être fonctionnalisées suivant une chimie de surface relativement simple. Le greffage covalent de polyéthylène glycol conduit à une circulation prolongée des nanoparticules *in vivo*, vérifiée par une répartition homogène du signal de luminescence persistante sur tout le corps de la souris, ainsi qu'à une augmentation significative du contraste au niveau du foie, en comparaison du groupe injecté avec les nanoparticules sans polyéthylène glycol.

Chapitre 10

Un outil hybride pour la théranostique

Sommaire

10.1 L'intérêt du système cœur-coquille	161
10.2 La luminescence persistante en théranostique	183

10.1 L'intérêt du système cœur-coquille

Nous l'avons vu au cours de l'étude précédente, le volume d'une nanoparticule peut abriter plusieurs fonctions de natures différentes. Dans le cas de modalités d'imagerie différentes, on parle de sonde multimodale. Il peut également être intéressant d'associer une modalité d'imagerie, ou fonction diagnostique, à une fonction thérapeutique au sein de la même plateforme multifonctionnelle, on parle alors d'outil théranostique.

Ces dernières années ont vu fleurir une multitude de nanotechnologies destinées à ce domaine hybride. La plupart du temps, ces constructions reposent sur l'utilisation d'une architecture cœur-coquille : la première fonction est occupée par le(s) cœur(s) alors que l'autre réside dans la coquille. Nous pouvons notamment citer l'exemple de nanoparticules de fer, utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique, emprisonnées dans une coquille de silice mésoporeuse permettant le chargement de molécules cytotoxiques. De telles constructions complexes permettent une localisation précise du vecteur utilisé pour le transport du médicament ainsi qu'un contrôle concomitant du relargage de la molécule d'intérêt.

Nous nous proposons dans cette étude de créer une plateforme multifonctionnelle sur la base de nanoparticules à luminescence persistante. L'idée consiste à emprisonner le cœur à luminescence persistante dans une coquille de silice mésoporeuse pour permettre le chargement et la libération progressive de molécules d'intérêt thérapeutique. Dans le cadre de ces travaux, nous avons choisi de réaliser une preuve de concept avec la doxorubicine, molécule connue pour son activité cytotoxique et utilisée dans un certain nombre de chimiothérapies.

Mesoporous Persistent Nanophosphors for Theranostic Applications

Thomas Maldiney,^a Benoit Ballet,^a Michel Bessodes,^a Daniel Scherman,^a Cyrille Richard,^{a,}*

^aUnité de Pharmacologie Chimique et Génétique et d'Imagerie; CNRS, UMR 8151, Paris, F-75270 cedex France; Inserm, U 1022, Paris, F-75270 cedex France; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, F-75270 cedex France; Chimie-ParisTech, Paris, F-75231 cedex France.

cyrille.richard@parisdescartes.fr

ABSTRACT. Based upon the ambitious idea that one single particle could serve multiple purposes at the same time, theranostics lately arouse as one of the most promising perspective among nanotechnologies directed toward biomedical applications. Intended for both therapeutics and diagnostics *in vivo*, highly complex nanostructures were specifically designed to simultaneously act as optical imaging probe and delivery vehicle. Yet, such multifunctional photonic nanoplatfroms usually exploit fluorescence phenomenons which require constant excitation light through biological tissues and thus significantly reduce detection sensitivity due to the autofluorescence from living animals. In order to overcome this critical issue, the present article introduces for the first time a novel theranostic agent based on persistent luminescence mesoporous nanoparticles. Composed of a hybrid chromium-doped zinc gallate core/mesoporous silica shell architecture, we show that this nanotechnology can be used as efficient doxorubicin-delivery vehicle presenting higher cytotoxicity toward U87MG cells than its unloaded counterpart *in vitro*. In addition, we demonstrate that persistent luminescence signal from these

doxorubicin-loaded mesoporous persistent nanophosphors opens alternative to highly sensitive detection *in vivo*, giving access to the real-time biodistribution of the carrier without any autofluorescence from the animal tissues. This new persistent luminescence-based hybrid nanotechnology should easily be transposed to the delivery of any therapeutic agent, thus constituting a versatile and sensitive optical nanotool dedicated to both therapeutic and diagnostic applications *in vivo*.

KEYWORDS. Persistent luminescence, Nanoparticle, Mesoporous, Silica, Optical Imaging, In vivo, Doxorubicin, Drug-delivery.

Introduction. Along with the development of highly sophisticated and rationally designed nanocarriers^{1,2}, the idea of theranostic has recently emerged as an efficient way to combine diagnostics-therapeutics purposes into one single multifunctional nanoplatform³. One of the main advantages usually claimed about cargo systems in the nanometer scale relies in their ability to avoid renal filtration⁴, successfully circulate in the blood for several hours⁵, and significantly improve efficient targeting to the tissues of interest⁶. Based upon its relative low cytotoxicity and excellent chemical stability, mesoporous silica is very certainly one of the most referred inorganic hosts for the design of hybrid nanostructures intended for biomedical applications^{7,8}. Indeed, due to poor porosity parameters and low specific surface areas associated with their synthesis, common inorganic/imaging nanoprobe-based theranostic agents generally exploit the translational properties of silica for the synthesis of a single mesoporous core-shell architecture⁹. Such approach has already been envisioned with various imaging modalities, from magnetic resonance imaging^{10,11} (MRI) to optical imaging^{12,13}. In the latter case, the use of classical fluorescence-based techniques, which require constant illumination of the emitting centers, most often preclude sensitive detection of the hybrid constructions *in vivo* due to the undesirable autofluorescence from living tissues¹⁴. Upconversion nanoparticles encapsulated in mesoporous silica are currently being envisioned as optical alternative to common photonic theranostic agents¹⁵. Unfortunately, there is still to our knowledge no report of this technology for *in vivo* observations in small animals.

Our group lately introduced the use of persistent luminescence nanoparticles *in vivo*, for the optical imaging of vascularization in living mice^{16,17}. Designed to circumvent the autofluorescence from living tissues and enable highly sensitive detection through living tissues, this nanotechnology has already demonstrated its versatility by showing improved circulation times *in vivo*¹⁸ and positive results for the specific targeting of several cancer cells *in vitro*^{19,20}. However, despite successful optimization of the initial composition²¹, persistent luminescence could not be activated *in situ*, preventing long-term observations in living animals. This critical limitation was recently overcome by the discovery of a novel nanophosphor with formula $\text{ZnGa}_{1.995}\text{Cr}_{0.005}\text{O}_4$, referred to as ZGO, whose persistent luminescence can be activated *in vivo*, under a simple orange-red LEDs source, through living tissues²². For the first time, the present article introduces a multifunctional theranostic agent based on persistent luminescence nanoparticles for multiple *in vivo* applications. Taking advantage of the well-known biocompatibility of mesoporous silica²³, we modeled a novel core-shell structure on the basis of hybrid chromium-doped zinc gallate/mesoporous silica architecture specifically designed to allow both highly sensitive optical detection through living tissues and concomitant drug delivery. Employing doxorubicin as a drug model for the purpose of this study, we demonstrate that these mesoporous persistent nanophosphors can be successfully loaded with an anticancer agent, and subsequently initiate its progressive release in a pH-sensitive manner. The use of such doxorubicin-loaded theranostic agent is finally shown to induce acute cytotoxicity toward U87MG cells *in vitro*, preserve persistent luminescence properties, and allow both sensitive and non invasive localization of the carrier *in vivo*.

Results and discussion. Monodisperse crude ZGO nanoparticles were extracted from a polydisperse powder synthesized by a two-step method combining a hydrothermal treatment followed by a low-temperature sintering in air at 750°C for 5 hours. These nanophosphors, already described in a previous work²², displayed bright near-infrared persistent luminescence centered on 700 nm (data not shown), low porosity (Table 1) and an average hydrodynamic diameter of 85 nm (Table 2). The condensation of tetraethylortosilicate (TEOS), in the presence of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), on the surface of ZGO nanoparticles allowed the formation of ZGO@SiO₂ nanoparticles according to Scheme

1. Due to a relative sensitivity of ZGO nanoparticles to acidic solutions, the extraction of CTAB was performed in a 1% solution of NaCl in methanol. We notice from Table 1 that the number of extraction steps has a critical influence on the final specific surface area of the compound. After a proper extraction of the structure directing agent, the ZGO@SiO₂ nanocomposite was characterized by a large specific surface area of more than 400 m²/g (Table 1), calculated from the N₂ adsorption/desorption isotherms (Fig. 1.a) and the BET plot curve (Supplementary Fig. S1), as well as an average pore size approaching 2 nm (Fig 1.b). These results, in the same order of magnitude as other hybrid nanocarriers based on mesoporous silica²⁴, confirm the formation of a mesoporous architecture with relative high specific surface area. The core-shell structure, was assessed by transmission electron microscopy (TEM) before (Fig. 2.a) and after the formation of the mesoporous silica shell (Fig. 2.b and c). The photomicrographs allow to clearly distinguish the zinc gallate core, that appears as a dark spot on the cliché, embedded in a mesoporous silica shell, discovering a lighter thickness around the core. Besides, we notice that most of the silica shells are filled with one ZGO core, which is the result of a precise control of TEOS concentration²⁵. To this end, the synthesis was adapted according to the protocol described by Joo et al. for the synthesis of magnetic mesoporous nanoparticle nanoparticles.

Physico-chemical characterization of ZGO@SiO₂ nanoparticles are displayed in Table 2 and indicate a significant evolution of the hydrodynamic diameter after encapsulation of the ZGO core into the silica shell. Nanoparticles core diameter increases from 84 nm, for the ZGO core, to 163 nm for the final ZGO@SiO₂ nanoparticles. Along with an important evolution of the nanoparticle size, the encapsulation of ZGO crystals in mesoporous silica goes with a substantial change in surface properties. Indeed, Ga-OH functional groups, on the surface of the initial ZGO nanoparticles, were responsible for a slightly positive charge at neutral pH (Table 2). The condensation of TEOS on the surface of ZGO nanoparticles not only masked these Ga-OH groups, but also created a preeminent silanol-based structure, decorated by Si-OH groups, accountable for the final negative charge of ZGO@SiO₂ nanoparticles. To further characterize these surface properties of the silica shell, in comparison to the zinc gallate core, we studied the evolution of the surface charge as a function of pH. The resulting curves, displayed in Supplementary

Fig. S2, allow to evaluate the point of zero charge (PZC) associated with each structure. As expected from the first measurements of zeta potential in 20 mM NaCl solution, the PZC of ZGO nanoparticles is much higher (~ 7.5) than that of ZGO@SiO₂ nanocomposites (< 1), which is in total agreement with the reported values for gallium oxide²⁶ and silica²⁷. Noteworthy regarding the putative application of such mesoporous structure for diagnostics in living animals, the formation of such silica mesoporous shell around ZGO nanoparticles had only poor influence on the persistent luminescence properties of the chromium-doped zinc gallate crystals (data not shown).

In order to demonstrate the potential interest of ZGO@SiO₂ as efficient nanocarrier, we have chosen doxorubicin as a model drug, evaluated the entrapment efficiency of our system, and measured its ability to release the drug from the mesoporous structure, depending on the pH conditions. The pKa of doxorubicin being 8.6, the entrapment could be envisioned in PBS (pH = 7.4). The strong negative charge from silanol groups at that pH make them very likely to interact with positively charged doxorubicin, via classical electrostatic interactions. The loading content, defined as the weight of doxorubicin in ZGO@SiO₂ in relation to the weight of doxorubicin-loaded ZGO@SiO₂, was determined to be of 49 %. This value, which was found to be almost identical to the highest loading content obtained by Yuan et al. for the adsorption of doxorubicin in mesoporous silica nanoparticles²⁸ (MSNs), confirmed the high loading capacity of our hybrid ZGO@SiO₂ system. Practically, the entrapment of doxorubicin was assessed by exploiting the strong absorption of doxorubicin at 480 nm (Supplementary Fig. S3). The respective absorptions of ZGO@SiO₂ and ZGO@SiO₂-Dox suspended in PBS were compared with a UV-visible spectrophotometer. Results from Fig. 3.a indicate a strong absorption of the loaded nanocarriers ZGO@SiO₂-Dox at 480 nm, in comparison to the empty ZGO@SiO₂ nanoparticles, which attested to the presence of doxorubicin. The comparison of physico-chemical parameters of the nanocarrier before and after doxorubicin loading revealed a significant increase of the hydrodynamic diameter, evolving from 163 nm for ZGO@SiO₂ nanoparticles to 185 nm for ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles (Table 2). Such slight increase of the hydrodynamic diameter after doxorubicin-loading is very certainly the result of a change in the solvation sphere due to the presence of doxorubicin on the

surface of the nanoparticles, and the concomitant adaptation of the system colloidal stability. This little evolution of the colloidal geometry also comes with a radical shift of the zeta potential value, increasing from -27 mV to 13 mV. Upon the addition of doxorubicin in PBS, the negative silanol groups of the mesoporous silica host progressively cover with the positive charges of the encapsulated drug. In the end, the surface of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles ends up completely decorated with doxorubicin, responsible for the global positive charge of the drug-containing carrier. Given the significant visible absorption from the loaded doxorubicin, we also studied the influence of doxorubicin-loading on both UV and orange-red excitability of the persistent luminescence signal from ZGO@SiO₂ nanoparticles. The persistent luminescence decay curves in Fig. 3.b first indicate that the doxorubicin is not responsible for any total quenching of persistent luminescence signal. Yet, ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles displayed a persistent luminescence signal rather diminished compared to their empty counterpart. The signal loss between ZGO@SiO₂ and ZGO@SiO₂-Dox is dependent on the excitation energy, leading to a four times decrease after UV excitation and half this factor following LEDs activation. This wavelength-dependent signal loss can be explained by the optical properties of doxorubicin and more precisely its preferential UV absorption compared to red light, attested by the UV-Vis absorption spectrum from Supplementary Fig. S3.

Prior to comparing the cytotoxicity of ZGO@SiO₂ and ZGO@SiO₂-Dox, we determined the doxorubicin release behavior associated with our mesoporous persistent nanophosphors as a function of pH. The releasing profiles, shown in Supplementary Fig. S4, confirm a clear pH-dependency of the drug release rate, with an increased release for the lowest pH. The cumulative release of doxorubicin at pH 5 reached a little more than 25 % of the initial doxorubicin content after a 30 hours period. In PBS, the release only increased up to half this value after the same period of time. Such profiles are revealing of the electrostatic interaction between doxorubicin and mesoporous silica and very similar to those reported by Yuan et al. in their study about MSNs²⁸. These drug release properties of ZGO@SiO₂-Dox were then exploited for *in vitro* cell assay on U87MG, and comparison of the cytotoxicity induced by doxorubicin alone, ZGO@SiO₂ nanoparticles and their loaded counterpart ZGO@SiO₂-Dox. Relative

U87MG cell viability assay from Fig. 4.a indicate an IC₅₀ value (the concentration of drugs required to reduce cell growth by 50 %) of free DOX equal to approximately 12.5 µg/mL, which corresponds to a doxorubicin concentration of 23 µM, in the same order of magnitude as the one reported by Kumar et al. on the same cell line²⁹. Interestingly, the assay with ZGO@SiO₂ revealed no acute cytotoxicity of the nanoparticles up to 250 µg/mL, which approximately corresponds to the value of the IC₅₀ (Fig. 4.b). The same assay with ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles confirms the cytotoxic effect of the entrapped drug. Indeed, the introduction of doxorubicin into the silica shell of ZGO@SiO₂ nanoparticles causes the IC₅₀ to drastically decrease from 250 µg/mL to approximately 5 µg/mL, which represents a doxorubicin concentration of 9 µM. When comparing this last value to the one obtained with the free drug, we notice that the IC₅₀ of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles represents less than half the IC₅₀ of free doxorubicin. This result not only demonstrates the ability to use this hybrid zinc gallate/mesoporous silica platform as efficient nanocarrier for the vectorization of anticancer drugs and treatment *in vitro*, but also confirms the relative benefit of encapsulating doxorubicin within ZGO@SiO₂ nanoparticles, responsible for a significant decrease of the IC₅₀ value in comparison to free doxorubicin. Despite such promising results *in vitro*, one of the most demanding challenge regarding multifunctional platforms still relies in the ability to properly detect these theranostic agents *in vivo*, i.e. with good sensitivity, but also successfully monitor their biodistribution and accumulation sites through living tissues.

For this reason, we finally investigated as a proof of concept the ability to use the persistent luminescence signal from zinc gallate-cores to follow the real-time biodistribution of the drug-loaded ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles *in vivo*. The persistent luminescence images, acquired after the systemic administration of 2 mg of doxorubicin-loaded mesoporous persistent nanophosphors, clearly demonstrate the optical potential of such technology in living animals (Fig. 5.a). Interestingly, the recourse to persistent luminescence allow complete avoidance of the autofluorescence from biological tissues and highly sensitive detection through living tissues. From the chronological observation of the images in Fig. 5.a, we notice the appearance of a rapid tropism associated with the biodistribution of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles. A few seconds after the injection, most of the signal is located in the

lungs, which corresponds to first vascularized organs following a tail vein injection. Within a few minutes only, the biodistribution profile quickly evolves from the lungs to the liver. After 15 minutes, almost all the signal from ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles is located in the liver area. Such accumulation pattern is highly representative of charged nanoparticles, widely known to undergo a rapid sequestration within major organs of the reticulo-endothelial system, mainly liver and spleen^{16,17}. Image-based semi-quantitative biodistribution within liver and lungs brings additional information concerning the recognition/uptake kinetics of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles by Kupffer cells from the liver (Fig. 5.b). It also shows that the biodistribution freezes 20 minutes after the injection, leaving up to 80 % of the signal from the whole mouse retained in the liver. This accumulation profile was confirmed 24 hours post-injection by the whole-mouse *in vivo* biodistribution (Supplementary Fig. S5.a), obtained after *in situ* activation of persistent luminescence signal from ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles with the LEDs system, and by the *ex vivo* biodistribution established from the harvested organs (Supplementary Fig. S5.b and c).

Conclusion. We introduced a novel generation of multifunctional nanoparticles that possess the ability to serve as both drug-delivery vehicle and optical imaging probe for *in vivo* applications. Based on a hybrid zinc gallate core/mesoporous silica shell architecture, these mesoporous persistent nanophosphors were shown to act as efficient drug loading/release vector for cytotoxic assay against U87MG cells. In addition to such therapeutic purpose, the inorganic core of this hybrid structure produces bright NIR persistent luminescence which allows highly sensitive detection through biological tissues. We demonstrated that the biodistribution of these drug-loaded mesoporous persistent nanophosphors could be easily monitored *in vivo* and return valuable information concerning the localization of the major drug-release area. This multifunctional breakthrough not only highlights the versatility of such persistent luminescence nanotechnology, but also gives access to a large field of promising biomedical applications in relation to both diagnostics and therapeutics.

EXPERIMENTAL PROCEDURES.

Chemicals. Doxorubicin hydrochloride (>98%), Cetyltrimethylammonium bromide (>98%) and Tetraethyl ortosilicate (TEOS, >98%) were obtained from Sigma-Aldrich. Zinc nitrate hexahydrate (>99%) was purchased from Fluka. Gallium oxide (99.999%) and chromium (III) nitrate nonahydrate (99.99%) were purchased from Alfa Aesar. Dimethylformamide (>99.9%) was purchased from SDS.

Preparation of ZGO@SiO₂ nanoparticles. ZnGa_{1.995}Cr_{0.005}O₄ (ZGO) nanoparticles were synthesized by a hydrothermal method and low-temperature sintering in air. First, gallium nitrate was formed by reacting 8.94 mmol of gallium oxide with 10 mL concentrated nitric acid (35 wt%) under hydrothermal condition at 150°C overnight. Then, a mixture of 0.04 mmol of chromium nitrate and 8.97 mmol of zinc nitrate in 10 mL of water was added to the previous solution of gallium nitrate under vigorous stirring. The resulting solution was adjusted to pH 7.5 with an ammonia solution (30 wt%), stirred for 3 hours at room temperature, and transferred into a 25 mL Teflon-lined stainless steel autoclave for 24h heat treatment at 120°C. The resulting compound was washed several times with water and ethanol before drying at 60°C for 2 hours. The dry white powder was finally sintered in air at 750°C for 5 hours.

Hydroxylation was performed by basic wet grinding of the powder (500 mg) for 15 minutes, with a mortar and pestle in 50 mL of 5 mM NaOH solution, and overnight vigorous stirring of the resulting suspension at room temperature. Nanoparticles with a diameter of 85 nm were selected from the whole polydisperse colloidal suspension by centrifugation on a SANYO MSE Mistral 1000 at 4500 rpm for 5 minutes. They were located in the supernatant (assessed by Dynamic Light Scattering). The supernatants were gathered and concentrated to a final 5 mg/mL suspension.

The core-shell structured ZGO@SiO₂ nanoparticles were elaborated via a modified Stöber sol-gel process followed by a hydrothermal treatment. In a typical procedure, 20 mg of ZGO nanoparticles and 80 mg of CTAB were dispersed in 20 mL of 5 mM NaOH solution under ultrasonication and placed under magnetic stirring at 45°C. The silica shell formation was initiated by adding 0.6 mL of a 10 % v/v solution of TEOS in methanol dropwise to the ZGO suspension. After 90 minutes, 0.6 mL of the same 10 % v/v solution of TEOS in methanol was further added to the reaction mixture. The suspension was

stirred for an additional 90 minutes, and transferred into a 25 mL Teflon-lined stainless steel autoclave for 24h heat treatment at 120°C. The resulting compound was washed several times with water and ethanol. The structure-directing agent (CTAB) was subsequently removed by several extraction steps in a 1% NaCl/methanol solution. Briefly, 10 mg of the above CTAB-containing product were dispersed in 10 mL of a 1% NaCl/methanol solution and stirred for 3 hours at room temperature. The extraction was repeated four times, until the template was completely removed.

Nanoparticles characterization. Persistent luminescence decay curves were recorded after 2 minutes excitation under either a UV light (6W mercury discharge 254 nm lamp) or an orange/red LEDs source (Bridgelux). Signal acquisition was carried out using a photon-counting system based on a cooled GaAs intensified charge-coupled device (ICCD) camera (Photon-Imager, Biospace, Paris, France).

ZGO@SiO₂ nanoparticles were characterized using transmission electron microscopy (JEOL JEM-100S), dynamic light scattering and zeta potential measurements in 20 mM NaCl, performed on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA) equipped with a 632.8 nm helium neon laser and 5-mW power, with a detection angle at 173° (non-invasive backscattering).

The N₂ adsorption/desorption isotherms were obtained on a BELSORP-max gas adsorption instrument. The cryogenic temperature of 77 K was controlled by liquid nitrogen. The initial outgassing process for the sample was carried out under a high vacuum (less than 10⁻⁶ mbar) at 120°C for 15 hours. The degassed sample and sample tube were weighed precisely and transferred to the analyzer. The pore size distribution was calculated from the adsorption branch of the N₂ adsorption/desorption isotherm and the Barret-Joyner-Halenda (BJH) method. The Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface areas were determined using the data between 0.05 and 0.375 just before the capillary condensation.

Drug storage/release study. Doxorubicin was used as a model drug to assess the drug storage and controlled release behavior of ZGO@SiO₂ nanoparticles. Typically, 1 mg of the ZGO@SiO₂ nanoparticles were dispersed in 1 mL of doxorubicin solution in PBS (1 mg/mL). The mixture was stirred for 24 h at room temperature to reach the equilibrium state. The ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles were then centrifuged and washed several times with PBS. The amount of doxorubicin adsorbed in

ZGO@SiO₂ nanoparticles was determined by measuring the absorbance of the doxorubicin solution at 480 nm on a UV-vis spectrophotometer before and after the adsorption step in PBS.

For the in vitro drug release study, 1 mg of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles was dispersed into 0.5 mL of PBS. The colloidal solution was transferred into a dialysis bag (cut off molecular weight 10 kDa), then the bag was immersed into 50 mL of either PBS (pH = 7.4) or slightly acidic aqueous solution (pH = 5) at room temperature with magnetic stirring. An amount of 1 mL of solution was withdrawn at a given time interval for the reading at 480 nm, and put back into the dialysis solution.

Cell Culture. Human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line, referred to as U87MG cells, were purchased from the ATCC and cultured in Dubecco's Modified Eagles Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin). Cells were grown at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere.

Cytotoxicity assay. U87MG cells were seeded in flat bottom 96-well at a density of 10⁵ cells/well and grown overnight in 100 µL medium. For the MTT assay, either doxorubicin alone, ZGO@SiO₂ or ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles were incubated at different concentrations for 24 hours at 37°C in DMEM culture medium. At the end of the incubation period, MTT solution (20 µL, diluted in culture medium to a final concentration of 0.5 mg/mL) was added. After incubation at 37°C in the dark for 2.5 h, 100 µL of acidified lysis buffer containing isopropanol was added to each well, and the absorbance was monitored with a microplate reader at a wavelength of 562 nm.

In vivo systemic injections. Five weeks old female BALB/c mice (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were anesthetized by i.p. injection of a mixture of ketamine (85.8 mg/kg, Centravet, Plancoët, France) and xylazine (3.1 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Germany) diluted in 150 mM NaCl. Systemic injections of 10¹³ ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles, dispersed in 5% sterile glucose solution were then realized to perform imaging studies.

Imaging. Signal acquisition was carried out using a photon-counting system based on a cooled GaAs intensified charge-coupled device (ICCD) camera (Photon-Imager, Biospace, Paris, France). The ICCD aperture time was set to three minutes. A suspension of 2 mg of ZGO@SiO₂ nanoparticles in 5%

glucose sterile solution, which corresponds to approximately 10^{13} nanoparticles, was first excited *ex vivo* for 2 minutes under UV light (6W mercury discharge 254 nm lamp) before the injection to mice via the caudal vein. Animals were then placed on their back under the photon-counting device, and the signal acquisitions were performed. After a 24 hours period and complete persistent luminescence extinction, the orange/red LEDs source was shined on the animal for two minutes to re-activate the persistent luminescence from ZGO nanoparticles, and the signal acquisition was resumed. Semi-quantization was achieved through the use of Biospace developed software, PhotoVision+. Experiments were conducted in agreement with a regional ethic committee for animal experimentation.

ACKNOWLEDGMENT. We thank Corinne Chanéac, Domitille Giaume, and Xavier Pétrissans for their help and advices to perform N₂ adsorption/desorption isotherm measurements and analysis. We also thank R. Lai Kuen, B. Saubaméa, and J. Seguin for their contribution and help to perform transmission electron micrographs, in vivo experiments, and image analysis with Image J software. This work has been supported by the French National Agency (ANR) in the frame of its program in Nanosciences and Nanotechnologies (NATLURIM project n°ANR-08-NANO-025).

SUPPORTING INFORMATION PARAGRAPH.

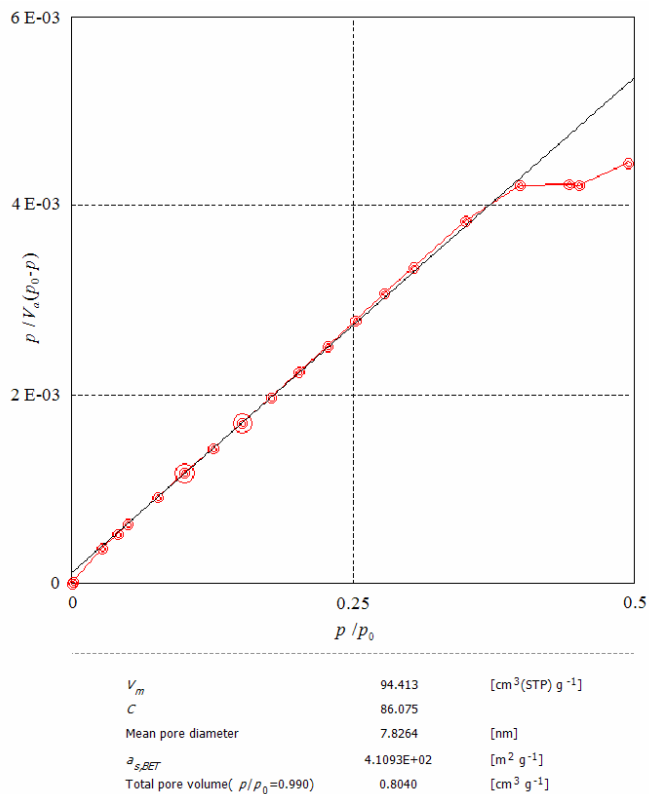


Figure S1. BET plot curve.

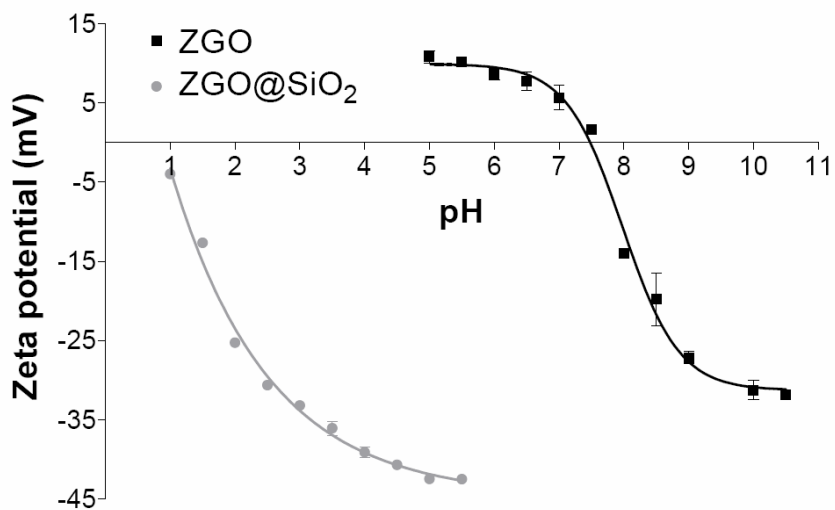


Figure S2. Evolution of ZGO and ZGO@SiO₂ zeta potential as a function of pH.

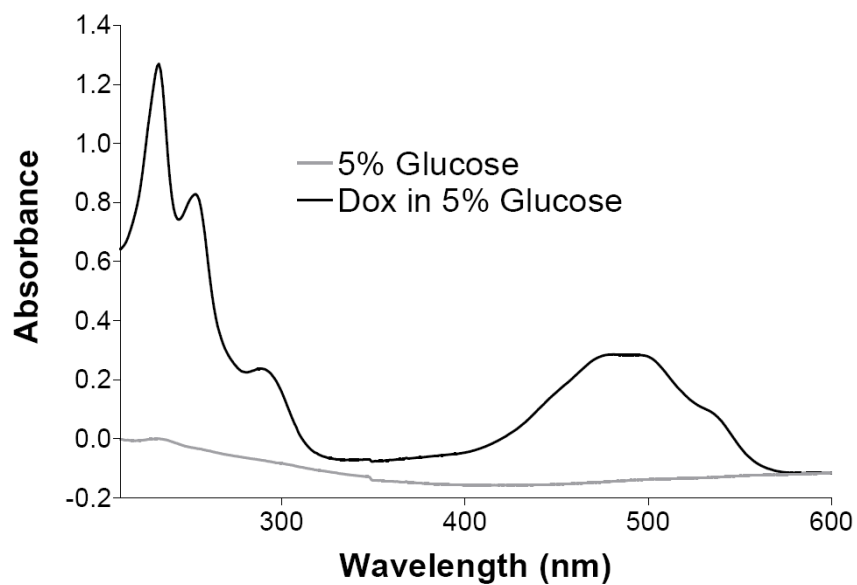


Figure S3. UV-Vis absorption spectrum of Doxorubicin in 5% Glucose solution.

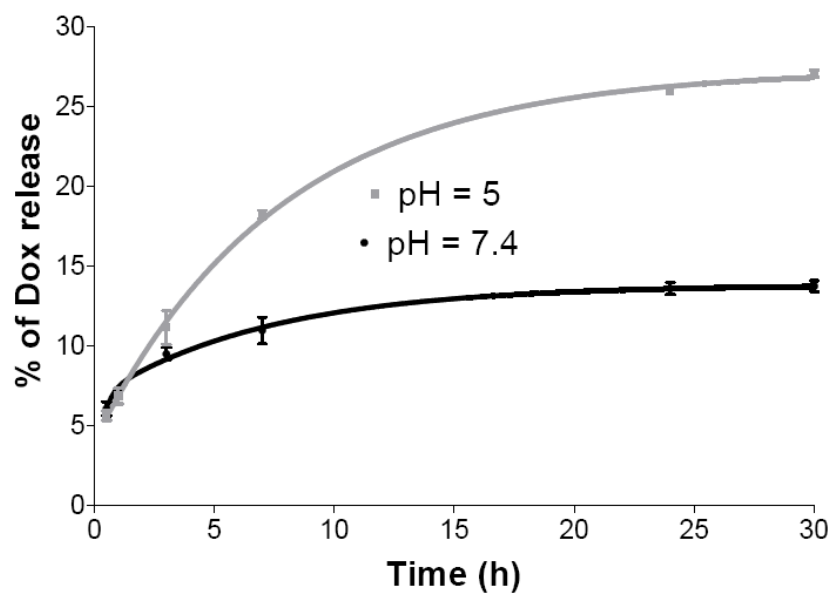


Figure S4. Doxorubicin releasing profile of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles as a function of pH.

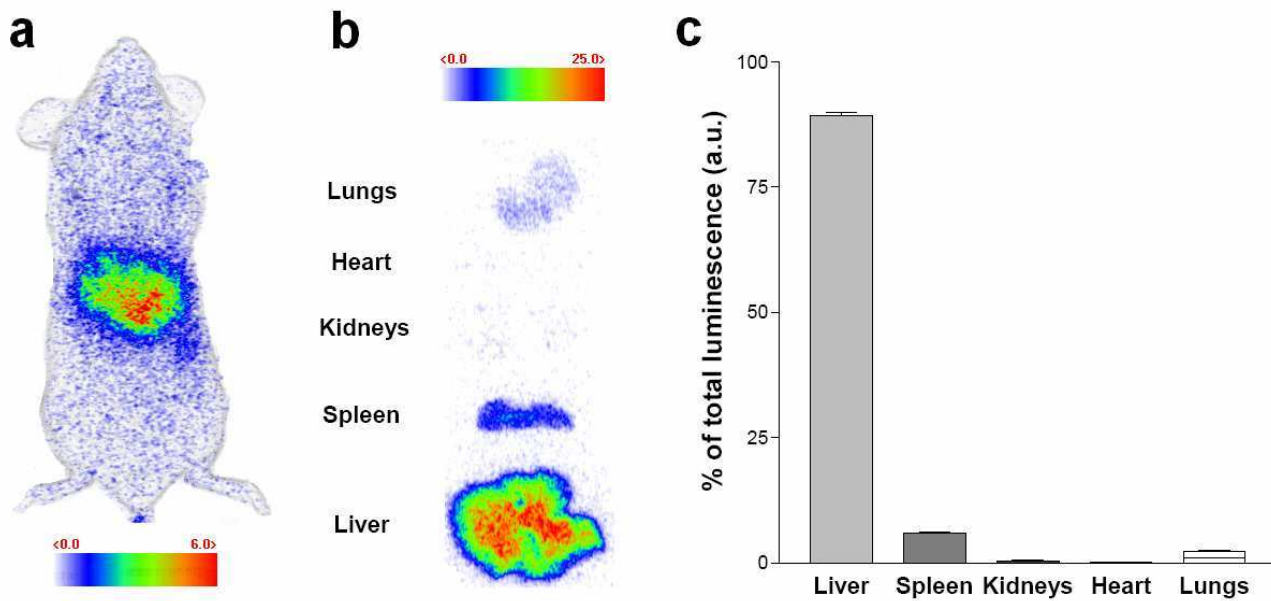


Figure S5. Biodistribution of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles, 24 h after intravenous injection. **a**, Persistent luminescence image of the whole mouse following in situ LEDs activation of persistent luminescence from ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles. **b**, *Ex vivo* persistent luminescence image of the harvested organs. **c**, Image-based semi-quantitative *ex vivo* biodistribution.

FIGURES.

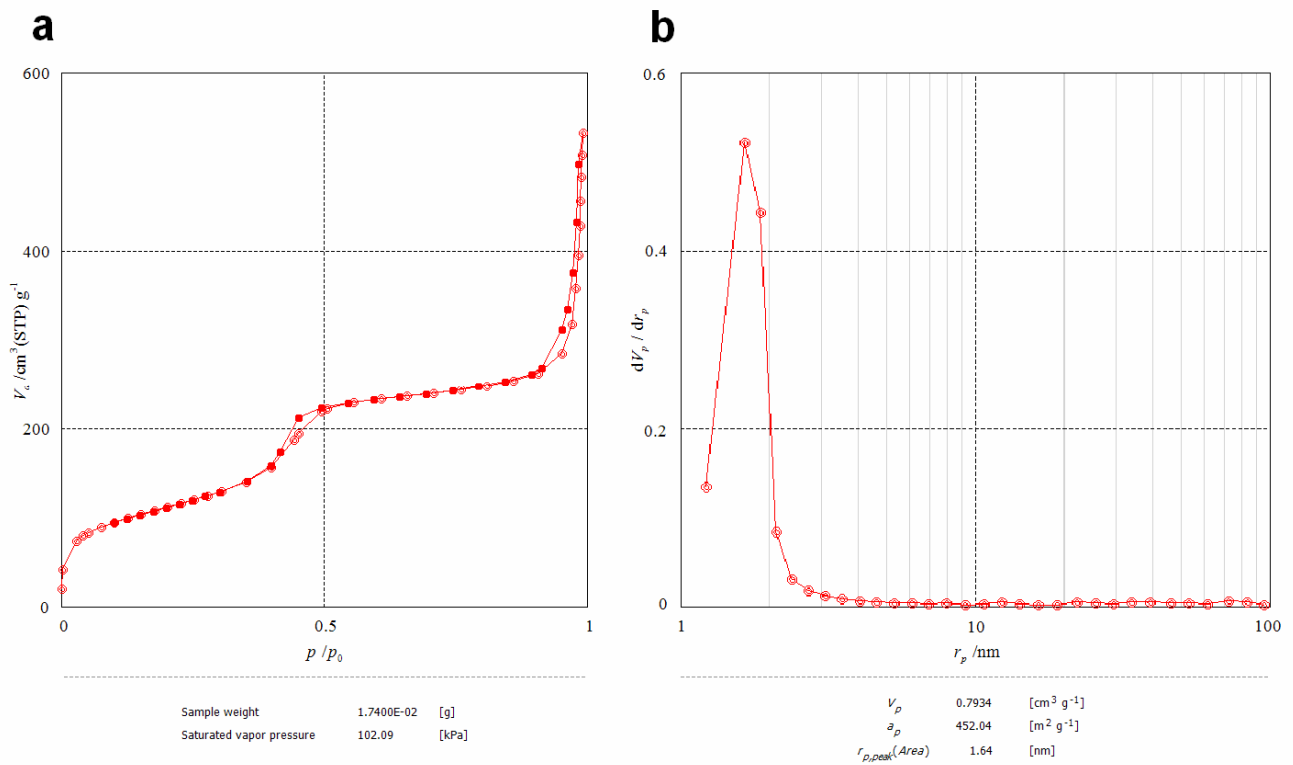


Figure 1. Porosity parameters of ZGO@SiO₂ nanoparticles. **a**, N₂ adsorption-desorption isotherms. **b**, Size pore distribution in ZGO@SiO₂ nanoparticles calculated with the BJH method.

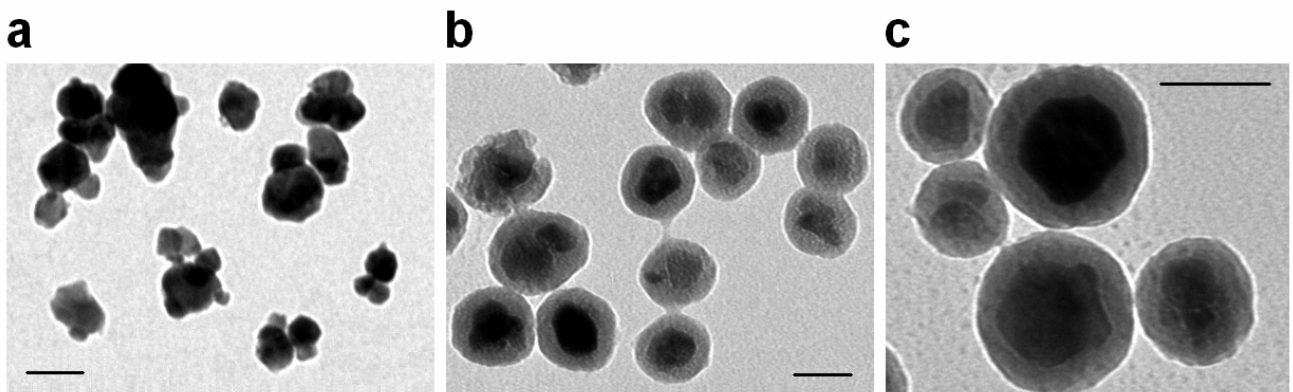


Figure 2. Transmission electron micrographs (TEM) of ZGO and ZGO@SiO₂ nanoparticles. **a**, TEM of ZGO nanoparticles (x 20000). **b**, TEM of ZGO@SiO₂ nanoparticles (x 20000). **c**, TEM of ZGO@SiO₂ nanoparticles (x 30000). Scale bars represent 50 nm.

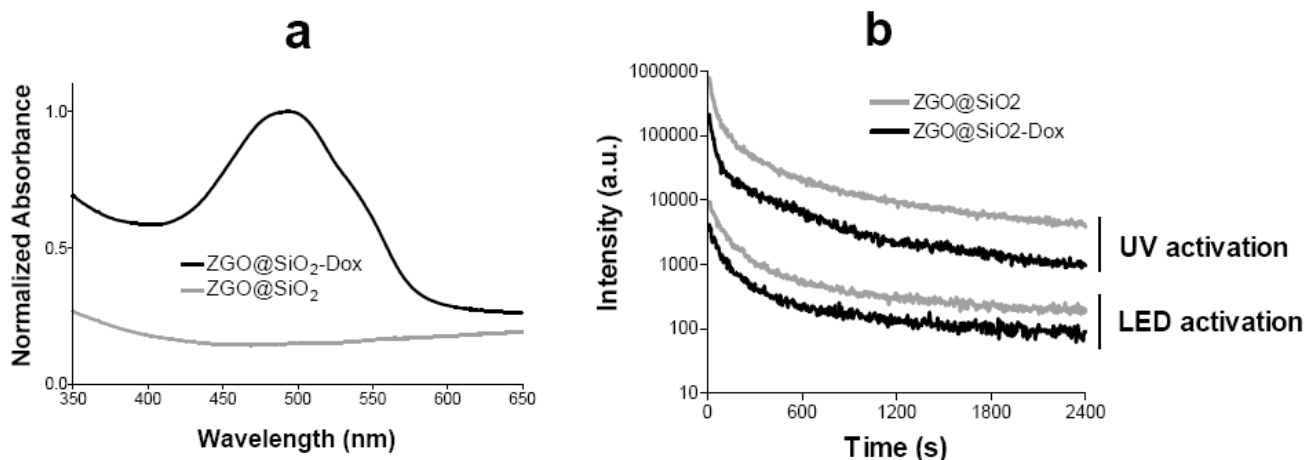


Figure 3. Optical properties of ZGO@SiO₂ and ZGO@SiO₂-Dox. **a**, Influence of doxorubicin loading on the absorbance of ZGO@SiO₂ nanoparticles. **b**, Persistent luminescence decay curves of ZGO@SiO₂ and ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles after UV or LED excitation.

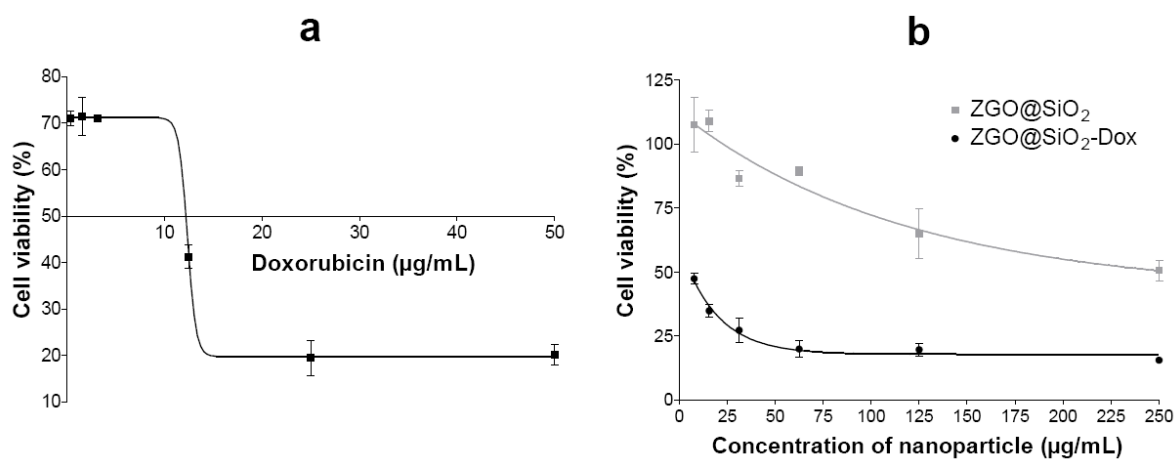


Figure 4. Relative cell viability of U87MG cells. **a**, After a 24 hours incubation period with free doxorubicin. **b**, After a 24 hours incubation period with either ZGO@SiO₂ or ZGO@SiO₂-Dox.

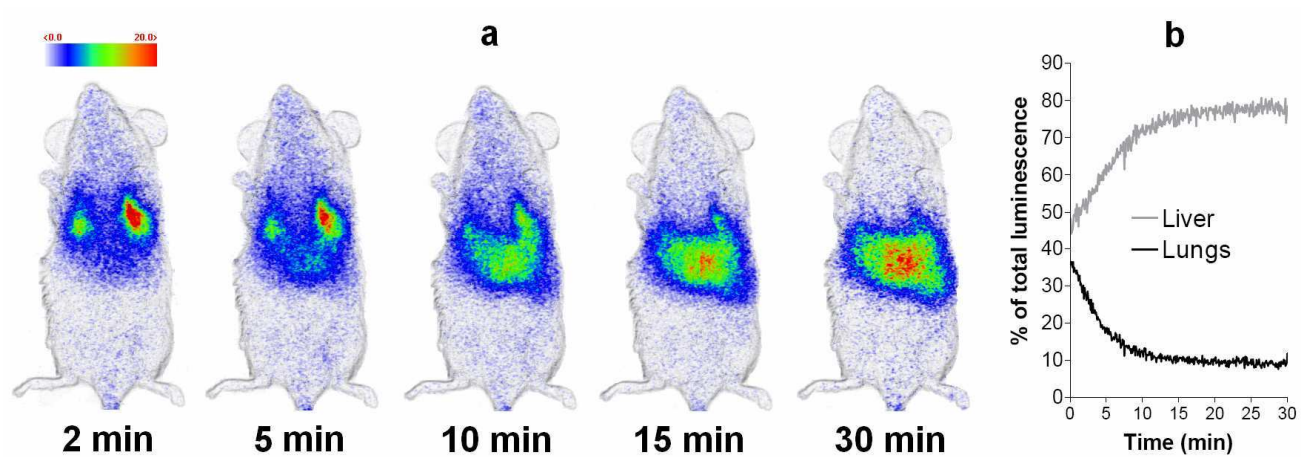
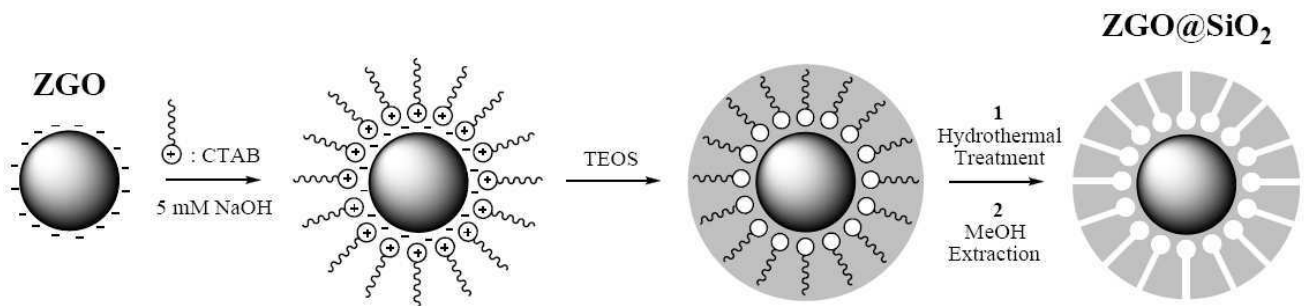


Figure 5. In vivo biodistribution of ZGO@SiO₂-Dox nanoparticles in mouse after intravenous injection. **a**, Persistent luminescence images up to 30 minutes after systemic injection. **b**, Image-based semi-quantitation and time-dependent biodistribution within liver and lungs.

SCHEMES.



Scheme 1. Schematic representation of ZGO@SiO₂ synthesis.

TABLES.

	BET specific surface area (m ² /g)	BJH specific surface area (m ² /g)	Average pore size (nm)
ZGO	28	28	6.95
ZGO@SiO ₂ + 3 MeOH/NaCl extractions	171	159	1.64
ZGO@SiO ₂ + 6 MeOH/NaCl extractions	411	452	1.64

Table 1. Porosity parameters following different steps of ZGO@SiO₂ synthesis.

	Hydrodynamic diameter (nm)	Zeta potential (mV)
ZGO	83,98 ± 0,61	22,2 ± 1,32
ZGO@SiO ₂	162,7 ± 1,38	-27,1 ± 3,66
ZGO@SiO ₂ -DOX	184,9 ± 0,35	13,1 ± 0,56

Table 2. Physico-chemical characteristics of mesoporous persistent luminescence nanoparticles.

REFERENCES.

- ¹ Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751-60.
- ² Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615-27.
- ³ Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem.* 2011;22(10):1879-903.
- ⁴ Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007;25(10):1165-70.
- ⁵ Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2011;6(4):715-28.
- ⁶ Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(11):653-64.
- ⁷ Xie J, Lee S, Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(11):1064-79.
- ⁸ Kim J, Kim HS, Lee N, Kim T, Kim H, Yu T, Song IC, Moon WK, Hyeon T. Multifunctional uniform nanoparticles composed of a magnetite nanocrystal core and a mesoporous silica shell for magnetic resonance and fluorescence imaging and for drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(44):8438-41.
- ⁹ Lee JE, Lee N, Kim T, Kim J, Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications. *Acc Chem Res.* 2011;44(10):893-902.
- ¹⁰ Kim T, Momin E, Choi J, Yuan K, Zaidi H, Kim J, Park M, Lee N, McMahon MT, Quinones-Hinojosa A, Bulte JW, Hyeon T, Gilad AA. Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T1 contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Am Chem Soc.* 2011;133(9):2955-61.
- ¹¹ Kim J, Lee JE, Lee J, Yu JH, Kim BC, An K, Hwang Y, Shin CH, Park JG, Kim J, Hyeon T. Magnetic fluorescent delivery vehicle using uniform mesoporous silica spheres embedded with monodisperse magnetic and semiconductor nanocrystals. *J Am Chem Soc.* 2006;128(3):688-9.
- ¹² Xu Z, Gao Y, Huang S, Ma P, Lin J, Fang J. A luminescent and mesoporous core-shell structured $Gd_2O_3:Eu^{3+}@nSiO_2@mSiO_2$ nanocomposite as a drug carrier. *Dalton Trans.* 2011;40(18):4846-54.
- ¹³ Hu X, Zrazhevskiy P, Gao X. Encapsulation of single quantum dots with mesoporous silica. *Ann Biomed Eng.* 2009;37(10):1960-6.
- ¹⁴ Kryza D, Taleb J, Janier M, Marmuse L, Miladi I, Bonazza P, Louis C, Perriat P, Roux S, Tillement O, Billotey C. Biodistribution study of nanometric hybrid gadolinium oxide particles as a multimodal SPECT/MR/optical imaging and theragnostic agent. *Bioconjug Chem.* 2011;22(6):1145-52.
- ¹⁵ Xu Z, Li C, Ma P, Hou Z, Yang D, Kang X, Lin J. Facile synthesis of an up-conversion luminescent and mesoporous $Gd_2O_3:Er^{3+}@nSiO_2@mSiO_2$ nanocomposite as a drug carrier. *Nanoscale.* 2011;3(2):661-7.

-
- ¹⁶ le Masne de Chermont Q, Chanéac C, Seguin J, Pellé F, Maîtrejean S, Jolivet JP, Gourier D, Bessodes M, Scherman D. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(22):9266-71.
- ¹⁷ Maldiney T, Sraiki G, Viana B, Gourier D, Richard C, Scherman D, Bessodes M, Van den Eeckhout K, Poelman D, Smet PF. In vivo optical imaging with rare earth doped $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ persistent luminescence nanoparticles. *Optical Materials Express*. 2012;2(3):261-268.
- ¹⁸ Maldiney T, Richard C, Seguin J, Wattier N, Bessodes M, Scherman D. Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano*. 2011;5(2):854-62.
- ¹⁹ Maldiney T, Byk G, Wattier N, Seguin J, Khandadash R, Bessodes M, Richard C, Scherman D. Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability. *Int J Pharm*. 2012;423(1):102-7.
- ²⁰ Maldiney T, Kaikkonen MU, Seguin J, le Masne de Chermont Q, Bessodes M, Airene KJ, Ylä-Herttuala S, Scherman D, Richard C. In vitro targeting of avidin-expressing glioma cells with biotinylated persistent luminescence nanoparticles. *Bioconjug Chem*. 2012;23(3):472-8.
- ²¹ Maldiney T, Lecointre A, Viana B, Bessière A, Bessodes M, Gourier D, Richard C, Scherman D. Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for in vivo imaging. *J Am Chem Soc*. 2011;133(30):11810-5.
- ²² Maldiney T, Richard C, Scherman D, Gourier D, Viana B, Bessiere A. Nanoparticules excitables in situ pour l'imagerie optique in vivo, l'imagerie multimodale optique-IRM in vivo, et la théranostique. French Patent (2012) CNRS, FR1250846.
- ²³ Wu SH, Hung Y, Mou CY. Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers. *Chem Commun (Camb)*. 2011;47(36):9972-85.
- ²⁴ Li X, Zhang J, Gu H. Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Langmuir*. 2011;27(10):6099-106.
- ²⁵ Joo SH, Park JY, Tsung CK, Yamada Y, Yang P, Somorjai GA. Thermally stable Pt/mesoporous silica core-shell nanocatalysts for high-temperature reactions. *Nat Mater*. 2009;8(2):126-31.
- ²⁶ Kosmulski M. Pristine Points of Zero Charge of Gallium and Indium Oxides. *J Colloid Interface Sci*. 2001;238(1):225-227.
- ²⁷ Kosmulski M. The pH-dependent surface charging and points of zero charge: V. Update. *J Colloid Interface Sci*. 2011;353(1):1-15.
- ²⁸ Yuan L, Tang Q, Yang D, Zhang JZ, Zhang F and Hu J. Preparation of pH-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles and Their Application in Controlled Drug Delivery. *J. Phys. Chem. C*. 2011;115(20):9926-9932.
- ²⁹ Nair K L, Jagadeeshan S, Nair SA, Kumar GS. Evaluation of triblock copolymeric micelles of δ -valerolactone and poly (ethylene glycol) as a competent vector for doxorubicin delivery against cancer. *J Nanobiotechnology*. 2011;9(1):42.

10.2 La luminescence persistante en théranostique

Les résultats de cet article confirment la possibilité d'encapsuler les nanoparticules à luminescence persistante dans une coquille de silice mésoporeuse. Le système hybride obtenu conserve les propriétés optiques du cœur de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+}), et peut également servir de cargo nanoparticulaire pour la vectorisation de principes actifs.

Nous avons prouvé que la doxorubicine pouvait être chargée au sein de la structure mésoporeuse, par simple interaction électrostatique avec la surface accessible dans les pores du système cœur-coquille, puis relarguée de manière pH-dépendante dans un milieu physiologique. L'ajout de doxorubicine est responsable d'une légère diminution du signal de luminescence persistante, après excitation UV ou visible, mais la preuve de concept *in vivo* rapporte que ce signal est tout à fait suffisant pour une détection/excitation de la sonde à travers le corps de l'animal. Il devient ainsi possible de suivre la biodistribution de ce vecteur hybride, cela avec la sensibilité remarquable de la détection optique du signal de luminescence persistante.

Cette première preuve de concept *in vivo* ne rapporte aucune fonctionnalisation de surface. Dans une perspective d'utilisation chez le petit animal, il est pourtant nécessaire de bien comprendre l'influence d'une modification chimique de la surface accessible sur les paramètres de porosité du complexe cœur-coquille, et son comportement *in vivo*. Les mésopores étant accessibles à toute molécule dont la taille est inférieure à leur diamètre moyen, il serait utile de mettre au point une méthode de fonctionnalisation sélective de la surface extérieure au volume de la particule. Cette optimisation de la chimie de surface aurait ainsi une fonction double :

- permettre deux fonctionnalisations différentes pores/surface externe
- mieux contrôler le relargage des molécules d'intérêt par optimisation du pKa des fonctions qui recouvrent les mésopores.

Enfin nous remarquerons que l'espace accessible dans la coquille mésoporeuse ne doit pas nécessairement être dédié à l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique. D'autres fonctions peuvent trouver leur place dans ce volume supplémentaire, modalité en sus ou agent pour un FRET/*quench*, et largement étendre le champ d'applications de ce nouvel outil à luminescence persistante.

L'ensemble des travaux qui exploitent le principe d'excitation de la luminescence à travers les tissus vivants a donné lieu au dépôt d'un brevet le 30 janvier 2012¹²⁵.

125. Maldiney T, Richard C, Scherman D, Bessière A, Viana B, Gourier D. Nanoparticules à luminescence persistante excitables *in situ* pour l'imagerie optique *in vivo*, l'imagerie multimodale optique-IRM *in vivo*, et la théranostique. Déposé le 30 janvier 2012 par le Centre National de la Recherche Scientifique sous la référence FR1250846

Sixième partie

Conclusion

Chapitre 11

Bilan général et perspectives

Ce travail de doctorat s'appuyait sur des résultats originaux, rapportés dans la thèse de Quentin le Masne de Chermont, concernant le développement de nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique *in vivo* du petit animal. Comparables à des condensateurs optiques, ces nanoparticules pouvaient être excitées avant l'injection au petit animal, se charger, puis émettre un signal de luminescence persistante dans la zone de faible absorption des tissus. Il était ainsi possible de suivre la biodistribution de ces sondes en temps réel, sans source d'excitation continue à travers les tissus biologiques, pendant environ une heure. Le phénomène de luminescence persistante permettait ainsi de se débarrasser du signal parasite d'autofluorescence *in vivo* et d'améliorer la détection des sondes chez le petit animal, notamment par une nette augmentation du rapport signal à bruit.

Malgré les nombreux avantages de cette nanotechnologie et le succès des premiers essais chez le petit animal, il restait encore un certain nombre de contraintes associées à l'utilisation de cette première génération de nanoparticules à luminescence persistante pour des applications en diagnostic *in vitro* et *in vivo* :

- Aucune preuve de ciblage ne rapportait la possibilité de diriger ces nanoparticules de manière spécifique vers une cible d'intérêt.
- Les fonctionnalisations de surface ont montré que la biodistribution des nanoparticules pouvait être contrôlée chez la souris. En revanche, la fixation covalente de polyéthylène glycol ne montrait pas de réelle amélioration du comportement des nanocristaux *in vivo*, après injection systémique dans la veine caudale de la queue. Il résultait de cette injection de nanoparticules "furtives" une rapide capture au niveau des deux principaux organes du système monocyte-macrophage : le foie et la rate.
- La plupart des sondes d'imagerie optique destinées au diagnostic *in vivo* accessibles sur le marché permettent une observation prolongée à travers le corps de l'animal, sans contrainte de temps. Il est ainsi possible de faire des observations plusieurs heures après l'injection des sondes. Du fait du signal de luminescence persistante et de l'excitabilité des nanoparticules dans l'UV, les nanoparticules de $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+} , Mn^{2+} , Dy^{3+}) ne permettaient une observation *in vivo* que la première heure suivant l'excitation/injection. Ce dernier point limitait de manière critique le type d'application envisagé avec ces nanoparticules *in vivo*.

Nous avons essayé de répondre à l'ensemble des limitations auxquelles se heurtait la première génération de nanoparticules à luminescence persistante, tout en conservant les propriétés optiques qui faisaient leur force et leur singularité pour l'imagerie du petit animal. Nous pouvons découper cette période de travail en trois segments équivalents, correspondant chacun à un changement d'orientation du projet et à une évolution radicale de ses perspectives :

1. Travail sur les propriétés physico-chimiques de la nanoparticule. Un colloïde a cela de particulier qu'il peut être défini à tout moment comme un système métastable. Suivant un léger changement de son état de charge, de sa taille, ou de son environnement chimique, sa stabilité peut rapidement évoluer d'un extrême à un autre. La capacité à prévoir ou contrôler le comportement de ces colloïdes *in vitro* et *in vivo* est nécessairement tributaire d'une compréhension sérieuse des paramètres physico-chimiques qui influencent sa stabilité. La taille et l'état de surface constituent deux de ces paramètres essentiels ; nous les avons étudiés *in vitro* et *in vivo*.
2. Travail sur la composition des matériaux. Assez vite au cours de ce travail, nous avons réalisé

qu'il était difficile d'adapter la sonde à certaines applications, sans passer par une réelle optimisation de ses propriétés optiques. Cette modification de la composition des nanoparticules constitue un volet double physique/chimie inorganique nécessaire à l'obtention de caractéristiques optiques plus adaptées aux applications recherchées. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Chimie ParisTech (LCMCP).

3. Travail sur les nouveaux concepts. Les développements et résultats obtenus au cours de cette thèse nous ont finalement permis d'envisager plusieurs nouveaux outils originaux destinés à d'autres applications que celles imaginées au départ pour ces nanoparticules à luminescence persistante. Ces recherches ont finalement abouti à plusieurs nouveaux concepts permettant d'élargir le champ d'application de la luminescence persistante, mais aussi d'étendre les perspectives associées à ce projet initial.

La première partie de ce travail a donc été consacrée à une étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur le comportement des nanoparticules *in vitro* et *in vivo*. Nous avons montré que le greffage de petites molécules, que ce soit le Rak-2 ou la biotine, en surface de nanoparticules à luminescence persistante permettait d'obtenir un ciblage spécifique de certaines lignées cancéreuses *in vitro*. Plusieurs paramètres tels que la concentration en nanoparticules, la température ou le temps d'incubation ont démontré avoir une influence sur l'efficacité de l'interaction entre la sonde et sa cible. Ces premiers résultats de ciblage nous ont poussé à entreprendre une série d'expérience chez le petit animal pour valider un ciblage spécifique *in vivo*.

A la lumière des observations ayant trait à la faible propension des premières nanoparticules "furtives" à circuler après injection chez le petit animal, nous avons tout d'abord orienté notre approche de travail vers une étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur le comportement de nanoparticules à luminescence persistante *in vivo*. L'obtention d'une sonde d'imagerie susceptible de circuler constitue en effet le pré-requis essentiel à un éventuel ciblage de tumeur solide *in vivo*. Nous avons montré que la taille et la charge de surface déterminaient le comportement des nanoparticules dans la circulation sanguine. Considérant les trois distributions en taille étudiées (80, 120 et 180 nm), les nanoparticules "furtives" de faible diamètre affichent un temps de circulation plus élevé que leurs homologues de plus gros diamètres *in vivo*. Ce résultat est associé à un net retard du processus de reconnaissance-capture par le système monocyte-macrophage. Nous pouvons également signaler que la longueur de chaîne de polyéthylène glycol n'a pas semblé avoir d'influence sur le comportement final des nanoparticules. Cette dernière information est toutefois à prendre avec précaution. En toute rigueur, ce paramètre devrait être étudié à densités de chaînes identiques par particule. En pratique, il ne nous a pas été possible de contrôler la densité de groupes fonctionnels avec précision. Il serait intéressant de reprendre cette étude en fixant la densité de polyéthylène glycol, ainsi d'obtenir une information supplémentaire, manquante dans l'article.

Ces premiers résultats *in vivo*, notamment le constat d'une diminution significative du signal de luminescence persistante avec le diamètre des particules, nous ont poussé à reconsidérer l'utilisation de cette première génération de nanoparticules à luminescence persistante pour d'autres applications *in vivo*. Nous avons choisi ce moment pour orienter nos efforts vers la recherche de compositions plus efficaces permettant de suivre le signal de luminescence persistante plus longtemps à travers les tissus biologiques. Après un passage peu concluant par le nitrilosilicate et la preuve qu'il pouvait être détecté *in vivo*, une collaboration fructueuse avec le LCMCP nous a permis d'exploiter la récente compréhension du mécanisme de luminescence persistante dans les silicates pour finalement découvrir cette composition optimisée sur la base d'une matrice plus simple, la diopside $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ (Eu^{2+} , Mn^{2+} , Pr^{3+}). Nous avons prouvé que ce matériau amélioré permettait une détection des nanoparticules jusqu'à cinq fois plus longue qu'avec la précédente composition. Malheureusement, les contraintes associées à la première génération de nanoparticules demeuraient. L'impossibilité d'activer la luminescence persistante à travers les tissus imposait une échéance temporelle à l'observation des sondes et limitait toujours les perspectives d'utilisation de ces matrices *in vivo*.

La réponse à ce problème fut finalement le fait de ZnGa_2O_4 (Cr^{3+}) dont nous avons prouvé que la luminescence persistante pouvait être activée *in vivo*, à travers les tissus de l'animal. Cette découverte

a rendu possibles les observations de la luminescence persistante sur le long terme, sans contrainte de temps. En plus de leurs propriétés d'excitabilité dans le visible, les nanoparticules obtenues à partir du gallate de zinc présentent un signal de luminescence persistante supérieur à celui de la première génération d'environ un ordre de grandeur. Ces nouvelles propriétés optiques ont notamment permis de réaliser la première preuve de ciblage passif *in vivo* en exploitant l'effet de perméabilité et de rétention augmentées. Une telle accumulation de nanoparticules "furtives" au niveau de la tumeur a également été rendu possible par une nette augmentation de leur temps de circulation *in vivo*. Il serait maintenant intéressant de comparer ces résultats de ciblage passif à des résultats de ciblage obtenu au moyen d'un ligand spécifique de l'environnement tumoral, autrement appelé ciblage actif.

Nous remarquerons avoir peu évoqué les problèmes de toxicité associés à l'utilisation de ces nouveaux matériaux chez le petit animal. Des études de toxicités cellulaire et systémique sont actuellement en cours pour évaluer les effets de ces cristaux de gallate de zinc sur la souris, en particulier au niveau des principaux organes du système monocyte-macrophage, i.e le foie et la rate. Nous pouvons également citer les travaux prometteurs de Céline Rosticher, actuellement en thèse sous la direction scientifique de Corinne Chanéac au Collège de France, sur le développement d'une structure biocompatible pour la formation de nanoparticules à luminescence persistante.

Enfin cette dernière génération de nanocristaux a permis d'envisager une nouvelle application de la luminescence persistante au suivi cellulaire *in vivo*. Nous avons montré sur une lignée de macrophages murins que le signal de luminescence persistante pouvait être utilisé pour la marquage et le suivi cellulaire chez le petit animal. Il a ainsi été possible de sonder en temps réel la biodistribution de cellules marquées *in vivo*. Ces premières preuves de concept, obtenues chez la souris, permettent d'imaginer une future application de ces sondes optiques à d'autres disciplines du vivant. C'est le cas de la thérapie cellulaire, à laquelle la luminescence persistante pourrait apporter un outil sensible pour un suivi en temps réel de la biodistribution de cellules modifiées *in vivo*. Nous pouvons toutefois remarquer que ce type d'application nécessite une sensibilité de détection particulièrement élevée. Les quelques cas rapportés en bioluminescence démontraient la possibilité de détecter une cellule unique *in vivo*. Nous sommes bien entendu encore très loin de ce résultat, et une optimisation de la composition sera très certainement nécessaire avant de sérieusement considérer l'emploi de la luminescence persistante pour la détection de cellules uniques *in vivo*.

Pour finir, nous avons présenté deux nouveaux concepts dérivés de nanocristaux à luminescence persistante :

1. Les nanoparticules magnétiques à luminescence persistante pour l'imagerie bimodale optique-IRM.
2. Les nanoparticules mésoporeuses à luminescence persistante comme vecteur photonique pour la théranostique.

Ces extensions multifonctionnelles ont non seulement démontré le caractère adaptatif de cette nanotechnologie, initialement purement optique, mais également rappelé ses limites. L'exemple du couplage de l'imagerie photonique à l'imagerie par résonance magnétique est particulièrement probant du point de vue de la résolution spatiale. Nous l'avons vu à plusieurs reprises dans l'introduction, si les sondes d'imagerie optique apportent des sensibilités remarquables au moment de la détection *in vivo*, les phénomènes de diffusion et le trajet chaotique des photons dans les tissus biologiques lui confèrent une bien mauvaise résolution spatiale. Ainsi un point d'injection localisé dans un volume de l'ordre de 0.1 mm^3 pourra apparaître comme une tache de plusieurs millimètres de diamètre au moment de la détection optique. Cette observation justifie amplement la recherche de nouveaux outils offrant la possibilité de réunir la sensibilité des techniques optiques et la résolution spatiale de l'imagerie par résonance magnétique.

Chapitre 12

Publications

Articles 2012

Red-excitable magnetic nanophosphors as versatile tool for multimodal in vivo imaging

Thomas Maldiney, Bich-Thuy Doan, Michel Bessodes, Daniel Scherman, Cyrille Richard

En attente de soumission

Mesoporous persistent nanophosphors for theranostic applications

Thomas Maldiney, Benoit Ballet, Michel Bessodes, Daniel Scherman, Cyrille Richard

En attente de soumission

Controlling aminosilane layer thickness to extend plasma half-life of stealth persistent luminescence nanoparticles in vivo

Thomas Maldiney, Michel Bessodes, Daniel Scherman, Cyrille Richard

En attente de soumission

Persistent nanophosphors activated in vivo for the optical imaging of vascularization, tumors and grafted cells

Thomas Maldiney, Johanne Seguin, Aurélie Bessière, Bruno Viana, Didier Gourier, Michel Bessodes, Daniel Scherman, Cyrille Richard

Manuscrit en révision, Nature Materials

In vitro targeting of avidin-expressing glioma cells with biotinylated persistent luminescence nanoparticles

Thomas Maldiney, Minna Kaikkonen, Johanne Seguin, Quentin le Masne de Chermont, Michel Bessodes, Kari J. Airene, Seppo Ylä-Herttuala, Daniel Scherman, Cyrille Richard

Bioconjugate Chemistry 23 (3) p. 472–478 (2012)

In vivo optical imaging with rare earth doped $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ persistent luminescence nanoparticles

Thomas Maldiney, Guillaume Sraiki, Bruno Viana, Didier Gourier, Cyrille Richard, Daniel Scherman, Michel Bessodes, Koen Van den Eeckhout, Dirk Poelman, Philippe F. Smet

Optical Materials Express 2 (3) p. 261-268 (2012)

Trap depth optimization to improve optical properties of diopside-based nanophosphors for medical imaging

Thomas Maldiney, Aurélie Lecointre, Bruno Viana, Aurélie Bessière, Didier Gourier, Michel Bessodes, Cyrille Richard, Daniel Scherman

Proc. SPIE 8263, 826318 (2012)

- Brevet 2012 | **Nanoparticules à luminescence persistante excitables *in situ* pour l'imagerie optique *in vivo*, l'imagerie multimodale optique-IRM *in vivo*, et la théranostique**
 Thomas Maldiney, Cyrille Richard, Daniel Scherman, Aurélie Bessière, Bruno Viana, Didier Gourier
Déposé le 30 janvier 2012 par le Centre National de la Recherche Scientifique
 FR1250846
- Revue 2012 | **Persistent luminescence nanoparticles for diagnostics and imaging**
 Thomas Maldiney, Daniel Scherman, Cyrille Richard
Invited contribution to the ACS book : Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine and Bioelectronic Devices (2012)
- Persistent luminescence nanoparticles for bioimaging**
 Cyrille Richard, Thomas Maldiney, Quentin le Masne de Chermont, Johanne Seguin, Nicolas Wattier, Gabriel Courties, Florence Apparailly, Michel Bessodes, Daniel Scherman
Advances in Bio-Imaging : From Physics to Signal Understanding Issues State-of-the-Art and Challenges (Advances in Intelligent and Soft Computing) 2012, Volume 120/2012, 37-53
- Persistent luminescence nanoparticles for in vivo imaging : characteristics and targeting**
 Thomas Maldiney, Daniel Scherman, Cyrille Richard
Clinibook, EDK, Paris - Network of Excellence CLINIGENE LSHB-CT-2006-018933 (2012)
- Articles 2011 | **Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for in vivo imaging**
 Thomas Maldiney, Aurélie Lecointre, Bruno Viana, Aurélie Bessière, Michel Bessodes, Didier Gourier, Cyrille Richard, Daniel Scherman
Journal of the American Chemical Society 133 (30) p. 11810-11815 (2011)
- Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the bio-distribution of persistent luminescence nanoparticles in mice**
 Thomas Maldiney, Cyrille Richard, Johanne Seguin, Nicolas Wattier, Michel Bessodes, Daniel Scherman
ACS Nano 5 (2) p. 854-862 (2011)
- Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability**
 Thomas Maldiney, Gerardo Byk, Nicolas Wattier, Johanne Seguin, Raz Khandadash, Michel Bessodes, Cyrille Richard, Daniel Scherman
International Journal of Pharmaceutics 423 (1) p. 102-107 (2011)