



HAL
open science

Localisation du ganglion sentinelle au moyen de nanoparticules fluorescentes émettant dans le proche infrarouge : application au cancer du sein

Marion Helle

► **To cite this version:**

Marion Helle. Localisation du ganglion sentinelle au moyen de nanoparticules fluorescentes émettant dans le proche infrarouge : application au cancer du sein. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0120 . tel-01749319

HAL Id: tel-01749319

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749319v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Par Marion HELLE

Localisation du ganglion sentinelle au moyen de
nanoparticules fluorescentes émettant dans le proche infrarouge :
Application au cancer du sein

Le 14 novembre 2012

Membres du jury

| | | |
|----------------------|------------------------|--|
| Rapporteurs | Dr. André PELEGRIN | Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier |
| | Dr. Patrick POULET | Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, Université de Strasbourg |
| Examineurs | Pr. Jean-Marc CLASSE | Institut de Cancérologie de l'Ouest - Centre René Gauducheau, Nantes <i>Président du jury</i> |
| | Dr. Thomas PONS | Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux, Université Pierre et Marie Curie, Paris |
| | Pr. Frédéric MARCHAL | CRAN - UMR 7039, Université de Lorraine, CNRS, Centre Alexis Vautrin <i>Directeur de thèse</i> |
| | Dr. Lina BEZDETAYAY | CRAN - UMR 7039, Université de Lorraine, CNRS, Centre Alexis Vautrin <i>Co-directeur de thèse</i> |
| Membre invité | Pr. François GUILLEMIN | CRAN - UMR 7039, Université de Lorraine, CNRS, Centre Alexis Vautrin |

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements à Frédéric Marchal. Merci de m'avoir permis de travailler sur cette thématique de recherche et d'avoir dirigé mes travaux de thèse. Malgré votre lourde charge de travail, vous étiez toujours présent (et souriant !) aux moments importants.

Je suis extrêmement reconnaissante envers Lina Bolotine pour avoir cru en moi et pour m'avoir donné ma chance à un moment où ma confiance était au plus bas. Merci d'avoir encadré mon travail de près et de m'avoir soutenue notamment durant la période (si houleuse !) de soumission de la publication. Votre bonne humeur et vos rires ont traversé les murs de votre bureau et ont égaillé mes journées.

J'adresse toute ma sympathie et tout mon respect à François Guillemin et je le remercie de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de recherche du Centre Alexis Vautrin. Vos critiques pragmatiques lors de la soutenance m'ont permis de me poser de nouvelles questions et de comprendre les problématiques inhérentes à la chirurgie.

Je remercie vivement André Pelegrin et Patrick Poulet pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger mon travail. Les discussions au cours de la soutenance étaient pointues, intéressantes et constructives. J'adresse mes sincères remerciements à Jean-Marc Classe pour sa participation à mon jury de thèse en tant que président et pour la pertinence de ces commentaires lors de la soutenance. J'espère que vous garderez une bonne image de la région Lorraine, malgré vos déboires avec la SNCF...

Des remerciements particuliers vont à Thomas Pons pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, pour avoir répondu à mes nombreuses interrogations sur les QDs et pour m'avoir fourni tant de lots de nanoparticules.

Un grand merci également à toute l'équipe du LPEM de l'ESPCI à Paris et notamment, Benoît Dubertret, Elsa Cassette et Brice Nadal, pour les réunions très enrichissantes qui ont parsemé ces 3 années et les bons petits repas qui les suivaient. Sans les nanoparticules que vous m'avez fournies régulièrement, ma thèse n'aurait pu se dérouler dans de bonnes conditions.

Remerciements

Je tiens à adresser mes vifs remerciements à l'ensemble de l'équipe du département de chimie « G. Ciamician » de l'Université de Bologne (Italie) et en particulier à Luca Prodi et à Enrico Rampazzo pour les différents lots de nanoparticules de silice qu'ils m'ont synthétisés en un temps record et pour les discussions, par Skype ou par mail, toujours très instructives.

Je souhaite remercier également l'ensemble du laboratoire CRAN et en particulier Alain Richard et Didier Wolf pour m'avoir accueillie dans le groupe thématique IPS.

Je tiens à remercier les financeurs de cette thèse : l'ANRT, le CAV, la Région Lorraine et la Ligue contre le Cancer, sans qui ces travaux n'auraient pu voir le jour.

Les résultats n'auraient pu être complets sans l'intervention de deux services d'anatomie pathologique : celui du CAV dirigé par Agnès Leroux et celui du CHU Brabois, dirigé par François Plénat. Que ces services et leurs techniciens en soient chaleureusement remerciés ici pour le temps passé à m'apprendre les différentes techniques et, plus généralement, pour leur implication dans mon travail.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire de recherche du CAV pour leur sympathie, leur aide au quotidien et leur regard critique lors des réunions du jeudi. La vie du labo ne serait pas la même sans les pauses café/thé, les soirées « Saint-Nicolas » ou les week-ends dans les Vosges. Merci donc particulièrement à Aurélie François, Vadim Reshetov, Denise Bechet, Aurélie Rheinard, Marlène Pernot et Gaëlle Creusat pour tous ces bons moments passés, qui ont permis de mieux nous connaître et de construire notre amitié.

Je n'oublie bien évidemment pas les stagiaires qui m'ont accompagnée tout au long de ma thèse : Aurélie Salvadori, Alexis Skrzynski, David Michalski et Morgane Monchanin. J'espère vous avoir apporté autant que vous m'avez apporté durant ces quelques semaines.

Je tiens à adresser ma profonde considération à Denyse Bagrel et Cathy Fiatte. Merci pour tous les savoirs et les bons conseils que vous m'avez transmis durant mon année de master au LIMBP.

Un grand merci à Violaine et Sébastien, Hélène et Jérôme, Mél et Laurent, Séverine et Jonathan, Laurence et Yannick, Aurélie et Freddy, Ludo, Thibaut et Marie, Joke et Sab', Julie et Julien et tous les autres qui, grâce à leur amitié et aux soirées partagées, m'ont permis de m'évader et d'être transportée dans un univers très éloigné des nanoparticules.

Remerciements

Je ne peux clore ces remerciements sans penser à ma famille et ma (bientôt officielle) belle-famille. Merci pour votre présence et votre gentillesse.

Merci Cyril pour ta patience, ta tendresse et ton enthousiasme qui m'ont toujours remonté le moral dans les moments difficiles. Merci d'avoir été là pour partager mes joies et mes doutes. 2012 aura été une belle année de réussite professionnelle pour nous deux individuellement ; j'attends avec impatience 2014, qui verra se concrétiser notre bonheur en couple.

Il n'existe pas de mots assez forts pour exprimer toute la gratitude que j'éprouve envers mes parents. Votre soutien inconditionnel et vos encouragements constants m'ont permis de me dépasser et d'aller au bout de mes projets. J'espère être à la hauteur de vos espérances.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Liste des figures | 4 |
| Liste des tableaux | 6 |
| Liste des abréviations..... | 7 |
| Introduction | 9 |
| Chapitre I : Synthèse bibliographique | 11 |
| I. Cancer du sein et drainage lymphatique du sein..... | 12 |
| A. Epidémiologie et classifications du cancer du sein | 12 |
| 1. Epidémiologie et facteurs de risque associés au cancer du sein..... | 12 |
| 2. Classifications des cancers du sein | 13 |
| i. Structure du sein | 13 |
| ii. Classification de l'OMS | 13 |
| iii. Classification <i>Tumor Node Metastasis</i> (TNM) | 13 |
| B. Système lymphatique..... | 15 |
| 1. Voies de drainage lymphatique du sein..... | 15 |
| 2. Formation de la lymphe | 16 |
| 3. Structure et organisation des vaisseaux lymphatiques..... | 17 |
| 4. Structure d'un ganglion lymphatique | 18 |
| 5. Mécanismes de rétention des particules étrangères dans les ganglions..... | 19 |
| II. Traitement chirurgical des cancers du sein par biopsie du ganglion sentinelle..... | 20 |
| A. Bases théoriques de la technique du ganglion sentinelle..... | 20 |
| 1. Définition et historique du ganglion sentinelle..... | 20 |
| 2. Mécanismes de dissémination métastatique dans le ganglion sentinelle..... | 20 |
| 3. Déroulement de la technique de biopsie du ganglion sentinelle..... | 21 |
| 4. Curage axillaire et traitements post-chirurgicaux..... | 21 |
| 5. Intérêt et recommandations de la technique du ganglion sentinelle | 22 |
| B. Techniques de visualisation du ganglion sentinelle..... | 24 |
| 1. Capture des traceurs par les capillaires lymphatiques | 24 |
| 2. Traceurs utilisés pour le repérage du ganglion sentinelle..... | 24 |
| i. Colorant bleu seul | 24 |
| ii. Radiocolloïde seul | 25 |
| iii. Combinaison des deux techniques..... | 26 |
| 3. Facteurs affectant l'identification du ganglion sentinelle..... | 27 |
| i. Caractéristiques liées au patient..... | 28 |
| ii. Caractéristiques liées à l'injection | 29 |
| C. Examen anatomopathologique du ganglion sentinelle | 31 |
| 1. Différentes étapes de l'examen par coupes histologiques | 32 |
| 2. Analyse par biologie moléculaire : One Step Nucleic acid Amplification (OSNA) | 33 |
| III. Cartographie du ganglion sentinelle par imagerie de fluorescence proche infrarouge | 35 |
| A. Bases théoriques de la fluorescence | 35 |
| B. Avantages et inconvénients de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge..... | 36 |
| C. Différents systèmes d'imagerie de fluorescence infrarouge..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| D. Biodistribution des traceurs fluorescents selon leurs caractéristiques physico-chimiques..... | 41 |
| 1. Taille des particules du traceur | 41 |
| 2. Chimie de surface du traceur | 42 |
| i. Hydrophilicité | 42 |
| ii. Charge de surface | 42 |
| iii. PEGylation..... | 43 |
| IV. Nanoparticules fluorescentes utilisées dans le repérage du ganglion sentinelle..... | 46 |
| A. Quantum Dots..... | 47 |
| 1. Propriétés photophysiques de la structure cœur/coque des Quantum Dots..... | 47 |
| i. Rôle du cœur dans la fluorescence des Quantum Dots..... | 47 |
| ii. Importance de la couche inorganique recouvrant le cœur des Quantum Dots | 49 |
| iii. Avantages des Quantum Dots par rapport aux fluorophores organiques | 50 |
| 2. Solubilisation des Quantum Dots | 51 |
| 3. Toxicité des Quantum Dots et solutions pour la limiter..... | 53 |
| 4. Conception des Quantum Dots pour l'imagerie infrarouge des tissus profonds | 55 |
| B. Nanoparticules de silice renfermant un fluorophore organique..... | 69 |
| 1. Structure chimique des nanoparticules de silice..... | 69 |
| 2. Caractérisation des nanoparticules | 70 |
| 3. Avantages de l'encapsulation d'un fluorophore dans une matrice de silice..... | 71 |
| i. Solubilisation de fluorophores hydrophobes | 71 |
| ii. Amélioration des propriétés photophysiques..... | 72 |
| iii. Biocompatibilité | 73 |
| iv. Multimodalité..... | 73 |
| Chapitre II : Objectifs | 75 |
| Chapitre III : Résultats | 77 |
| I. Visualisation du ganglion sentinelle grâce aux Quantum Dots indium émettant dans le proche infrarouge dans un modèle métastatique murin de cancer mammaire..... | 78 |
| A. Résumé | 78 |
| B. Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting quantum dots in a murine metastatic breast cancer model..... | 80 |
| II. Détection du ganglion sentinelle à l'aide de nanoparticules de silice renfermant un fluorophore émettant dans le proche infrarouge | 90 |
| A. Résumé | 90 |
| B. Matériels et méthodes | 92 |
| 1. Réactifs et solvants | 92 |
| 2. Appareils de mesure | 93 |
| 3. Nanoparticules de silice..... | 93 |
| i. Principe de la synthèse des NPSi..... | 93 |
| ii. Synthèse chimique des NPSi | 95 |
| 4. Caractérisation de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice | 96 |
| i. Caractérisation photophysique..... | 96 |
| ii. Taille | 96 |
| iii. Potentiel zêta..... | 96 |
| 5. Stabilité <i>in vitro</i> de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice | 97 |
| 6. Culture cellulaire | 97 |

| | |
|---|------------|
| 7. Tests de toxicité cellulaire | 97 |
| i. Viabilité cellulaire..... | 97 |
| ii. Hémolyse | 97 |
| 8. Expérimentation animale | 98 |
| 9. Imagerie de fluorescence proche infrarouge..... | 98 |
| i. Modification du système d'imagerie de fluorescence proche infrarouge Fluobeam TM | 98 |
| ii. Etude de biodistribution sur souris saines par imagerie de fluorescence | 99 |
| iii. Traitement des images | 99 |
| 10. Détermination des propriétés optiques des tissus murins | 100 |
| i. Mesure de la transmission collimatée, la transmittance et la réflectance | 101 |
| ii. Algorithme IAD..... | 102 |
| 11. Extraction chimique de la cyanine 7..... | 102 |
| 12. Toxicité <i>in vivo</i> | 103 |
| i. Masse corporelle et rapport de masse | 103 |
| ii. Coupes histologiques de foie | 103 |
| iii. Enzymes hépatiques | 103 |
| 13. Analyses statistiques..... | 104 |
| C. Résultats..... | 105 |
| 1. Caractérisation de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice | 105 |
| 2. Stabilité <i>in vitro</i> de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice | 108 |
| i. Stabilité <i>in vitro</i> de la cyanine 7 | 108 |
| ii. Stabilité <i>in vitro</i> des nanoparticules de silice avec cyanine 7 non covalente | 109 |
| iii. Stabilité <i>in vitro</i> des nanoparticules de silice avec cyanine 7 covalente | 110 |
| 3. Tests de toxicité cellulaire de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice | 110 |
| i. Test de viabilité cellulaire..... | 110 |
| ii. Interaction de la cyanine 7 et des NPSi avec la membrane cellulaire | 112 |
| 4. Visualisation du ganglion axillaire de souris saines | 113 |
| 5. Suivi de fluorescence du GAD au cours du temps | 114 |
| i. Impact de l'encapsulation de la cyanine 7 sur la fluorescence du GAD | 114 |
| ii. Impact de la stabilité colloïdale des NPSi sur leur migration dans le GAD..... | 115 |
| 6. Analyse de la biodistribution et de l'excrétion de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice par imagerie de fluorescence | 116 |
| 7. Détermination des propriétés optiques des tissus murins | 121 |
| 8. Biodistribution des nanoparticules de silice covalente par extraction chimique..... | 122 |
| 9. Toxicité <i>in vivo</i> des NPSi covalente | 123 |
| D. Discussion..... | 126 |
| Chapitre IV : Discussion générale | 131 |
| Chapitre V : Conclusions et perspectives | 138 |
| Références bibliographiques | 141 |
| Annexes | 154 |
| A. Animal models for photodiagnosis and photodynamic therapy | 156 |
| B. Synthesis and characterization of near infrared Cu-In-Se/ZnS core/Shell Quantum Dots for <i>in vivo</i> imaging | 166 |
| C. Production scientifique | 175 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Structure du sein | 13 |
| Figure 2 : Drainage lymphatique du sein | 16 |
| Figure 3 : Schéma des pressions régulant les échanges entre le plasma, le milieu interstitiel et la lymphe | 16 |
| Figure 4 : Organisation du système lymphatique..... | 17 |
| Figure 5 : Structure d'un ganglion lymphatique | 18 |
| Figure 6 : Schéma définissant le ganglion sentinelle | 20 |
| Figure 7 : Modèle d'invasion métastatique et flux lymphatique associé..... | 28 |
| Figure 8 : Représentation schématique des différentes voies d'injection des traceurs pour la visualisation du ganglion sentinelle | 29 |
| Figure 9 : Diagramme de Jablonski simplifié | 35 |
| Figure 10 : Absorption de la lumière dans un tissu normalement oxygéné..... | 37 |
| Figure 11 : Variation de la profondeur et de la quantité de fluorophores d'une source fluorescente résultant en un signal identique en surface | 37 |
| Figure 12 : Phénomènes affectant la propagation de la lumière dans les tissus biologiques ... | 38 |
| Figure 13 : Modèle de propagation de la lumière dans un milieu absorbant et diffusant | 38 |
| Figure 14 : Représentation schématique des chaînes de PEG à la surface d'une nanoparticule | 44 |
| Figure 15 : Facteurs affectant la biocompatibilité des nanoparticules | 47 |
| Figure 16 : Structure électronique d'un matériau conducteur, semi-conducteur ou isolant | 48 |
| Figure 17 : Structure électronique des semi-conducteurs sous forme massive ou nanoparticulaire | 48 |
| Figure 18 : Longueur d'onde d'émission des QDs de composition identique en fonction de leur taille..... | 49 |
| Figure 19 : Courbes de photoblanchiment de QDs et d'un fluorophore organique au cours du temps sous les mêmes conditions d'excitation..... | 50 |
| Figure 20 : Absorption et émission des Quantum Dots | 51 |
| Figure 21 : Méthodes de solubilisation des QDs hydrophobes..... | 52 |
| Figure 22 : Schéma de la synthèse de NPSi par microémulsion inverse | 70 |
| Figure 23 : Courbes de photoblanchiment de la tétraméthylrhodamine seule ou encapsulée dans une nanoparticule suite à une irradiation continue | 72 |
| Figure 24 : Formule chimique de la cyanine 7..... | 92 |
| Figure 25 : Structure moléculaire du Pluronic® F127 | 93 |
| Figure 26 : Représentation de la synthèse des NPSi par l'intermédiaire du Pluronic® F127 .. | 93 |
| Figure 27 : Représentation schématique de l'encapsulation de la cyanine 7 dans les NPSi | 94 |
| Figure 28 : Représentation schématique de la synthèse de la liaison covalente de la cyanine 7 dans les NPSi | 94 |
| Figure 29 : Formule du carboxyethylsilanetriol..... | 95 |
| Figure 30 : Schéma du système d'imagerie <i>in vivo</i> de fluorescence proche infrarouge modifié | 99 |
| Figure 31 : Schéma optique de la sphère d'intégration, vue du dessus | 101 |
| Figure 32 : Schéma des différents trajets optiques utilisés pour la mesure de la transmission collimatée, de la transmittance et de la réflectance, vue du dessus..... | 102 |
| Figure 33 : Spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence normalisés caractéristiques des traceurs fluorescents utilisés | 105 |
| Figure 34 : Spectres de la cyanine 7 dans différents solvants..... | 106 |
| Figure 35 : Taille des NPSi par MET et DLS | 107 |

| | |
|---|-----|
| Figure 36 : Suivi du comportement de la cyanine 7 seule dans du PBS contenant des protéines (BSA) pendant 7 jours | 109 |
| Figure 37 : Suivi de l'émission de fluorescence des NPSi avec cyanine 7 liée de façon non covalente pendant 7 jours | 109 |
| Figure 38 : Suivi de l'émission de fluorescence des NPSi avec cyanine liée de façon covalente pendant 7 jours | 110 |
| Figure 39 : Viabilité des cellules MRC-5 suite à une exposition de 24 h à des concentrations croissantes de traceurs fluorescents | 111 |
| Figure 40 : Hémolyse provoquée par la cyanine 7 seule ou encapsulée dans des NPSi..... | 112 |
| Figure 41 : Imagerie de fluorescence <i>in vivo</i> du flanc droit d'une souris 5 minutes après injection sous-cutanée de traceurs fluorescents dans la patte antérieure droite | 113 |
| Figure 42 : Suivi de la fluorescence du GAD <i>in vivo</i> au cours du temps suite à l'injection de différents traceurs fluorescents..... | 114 |
| Figure 43 : Suivi de la fluorescence <i>in vivo</i> du GAD suite à l'injection sous-cutanée de 300 pmol de NPSi covalente avec différentes chimies de surface | 115 |
| Figure 44 : Fluorescence <i>ex vivo</i> d'organes 24 h et 7 jours après injection de traceurs fluorescents..... | 117 |
| Figure 45 : Excrétion fécale de la cyanine 7 par imagerie de fluorescence | 118 |
| Figure 46 : Suivi au cours du temps de la fluorescence <i>ex vivo</i> des organes des souris injectées avec 300 pmol de NPSi dont la cyanine 7 est liée de façon covalente (lot F25-4). 120 | |
| Figure 47 : Droites étalon représentant la fluorescence des organes après extraction en fonction de la concentration en NPSi cov. | 122 |
| Figure 48 : Toxicité <i>in vivo</i> des nanoparticules de silice renfermant la cyanine 7 liée de façon covalente..... | 124 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Classification TNM des cancers du sein | 14 |
| Tableau 2 : Classification par stade UICC | 15 |
| Tableau 3 : Recommandations et niveau de preuve pour une biopsie du GS | 23 |
| Tableau 4 : Systèmes d'imagerie de fluorescence infrarouge commercialisés..... | 39 |
| Tableau 5 : Variation du revêtement de surface des NPSi encapsulant la cyanine 7 de façon non covalente..... | 94 |
| Tableau 6 : Différences de revêtement de surface des NPSi de la famille F21 | 95 |
| Tableau 7 : Différences de revêtement de surface des NPSi de la famille F25 | 95 |
| Tableau 8 : Caractéristiques de la cyanine 7 et des NPSi renfermant la cyanine 7 de façon non covalente..... | 107 |
| Tableau 9 : Caractéristiques des NPSi renfermant la cyanine 7 de façon covalente de la famille F21 | 107 |
| Tableau 10 : Caractéristiques des NPSi renfermant la cyanine 7 de façon covalente de la famille F25 | 107 |
| Tableau 11 : Propriétés optiques du foie et des reins de souris..... | 121 |
| Tableau 12 : Quantité de cyanine 7 dans les organes après extraction chimique et dosage spectrofluorimétrique | 123 |

Liste des abréviations

| | |
|-------------------------------|---|
| % DI (ID) | Pourcentage de la dose injectée (<i>Injected dose</i>) |
| μ_a, μ'_s | Coefficient d'absorption, Coefficient de diffusion réduit |
| ζ | Potentiel zêta |
| ^{99m}Tc | Technetium 99 métastable |
| AFA | Alcool formolé acétique |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| As | Arsenic |
| ASCO | <i>American Society of Clinical Oncology</i> |
| BRCA | <i>Breast cancer</i> |
| BSA | Albumine sérique bovine |
| CCD | <i>Charge-coupled device</i> |
| Cd | Cadmium |
| CEST | Carboxyethylsilanetriol |
| Ci | Curie |
| CK | Cytokératine |
| Cy7 | Cyanine 7 |
| DLS | <i>Dynamic light scattering</i> |
| em. | Emission |
| EPR | <i>Enhanced permeability and retention effect</i> |
| ESM | Erreur standard à la moyenne |
| EtOH | Ethanol |
| exc. | Excitation |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| g | Facteur d'anisotropie |
| GA(D ou G) | Ganglion axillaire (droit ou gauche) |
| GLT (D ou G) | Ganglion latéral thoracique (droit ou gauche) |
| GS | Ganglion sentinelle |
| H ₂ O ₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| H&E | Hématoxyline et éosine |
| HER2 | <i>Human epidermal growth factor 2</i> |
| HES | Hématoxyline éosine safran |

| | |
|------------------|--|
| IAD | <i>Inverse adding doubling</i> |
| ICG | <i>Indocyanine green</i> (vert d'indocyanine) |
| ICP-MS | <i>Inductively coupled plasma - mass spectrometry</i> |
| IHC | Immunohistochimie |
| IMC | Indice de masse corporelle |
| In | Indium |
| IRM | Imagerie par résonance magnétique |
| iv. | Intraveineuse |
| kDa | kilodalton |
| MET | microscopie électronique à transmission |
| MPS | <i>Mononuclear phagocyte system</i> |
| NPSi | Nanoparticules de silice |
| NPSi (non) cov. | NPSi dont la cyanine 7 est liée de façon (non) covalente |
| OSNA | <i>One step nucleic acid amplification</i> |
| P | Phosphore |
| (q)PCR | <i>(quantitative) polymerase chain reaction</i> |
| PEG | Poly(éthylèneglycol) |
| PIR | Proche infrarouge |
| PL | Photoluminescence |
| pt inj | Point d'injection |
| QDs | Quantum dots |
| RT | Reverse transcriptase |
| S | Soufre |
| sc. | Sous-cutané |
| Se | Sélénium |
| SiO ₂ | Dioxyde de silicium |
| SRE | Système réticulo-endothélial |
| Te | Tellure |
| TEOS | Tetraethoxysilane monomérique |
| TNM | <i>Tumor Node Metastasis</i> |
| UA (AU) | Unité arbitraire (<i>Arbitrary Unit</i>) |
| UICC | <i>Union for International Cancer Control</i> |
| UV | Ultraviolet |
| Zn | Zinc |

Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus mortel chez la femme. Les métastases du cancer du sein touchent principalement les ganglions lymphatiques, le foie, les os et les poumons. La présence de métastases ganglionnaires est le facteur le plus important pour prédire la survie globale du patient et pour orienter les traitements post-chirurgicaux. La biopsie du ganglion sentinelle (GS), c'est-à-dire le premier ganglion de la chaîne lymphatique recevant le flux métastatique en provenance de la tumeur, est aujourd'hui la technique de référence pour le diagnostic des métastases ganglionnaires. Elle consiste en l'injection d'un colorant bleu et d'un colloïde radioactif pour cartographier le GS, suivie par son exérèse chirurgicale et son analyse anatomopathologique afin de déterminer son statut métastatique. Ces deux traceurs présentent toutefois de nombreux inconvénients : des réactions allergiques et des colorations de la peau ont été rapportées suite à l'injection du colorant bleu et la manipulation de produits radioactifs nécessite la proximité d'un service de médecine nucléaire et engendre des dépenses assez importantes.

L'imagerie de fluorescence est une alternative intéressante aux traceurs employés actuellement puisque cette technique est hautement sensible, peu coûteuse, facile d'utilisation et les images sont obtenues en temps réel. L'utilisation des longueurs d'onde infrarouge permet d'augmenter la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus par rapport aux longueurs d'onde du domaine visible. Les nanoparticules fluorescentes présentent l'avantage d'avoir une taille compatible avec une migration rapide et une bonne rétention dans les ganglions lymphatiques.

Le but de ce travail est d'étudier deux types de nanoparticules fluorescentes pour la localisation du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge : les Quantum Dots (QDs) et les nanoparticules de silice renfermant un fluorophore organique (NPSi).

La première étude est essentiellement consacrée à l'analyse de la migration des QDs à base d'indium dans un modèle orthotopique syngénique murin de carcinome mammaire, où le GS est envahi par les cellules métastatiques.

La seconde étude est principalement basée sur la toxicité et les avantages de l'encapsulation d'un fluorophore - la cyanine 7 - dans une NPSi. Dans ces deux études, la visualisation rapide du GS, la biodistribution et l'excrétion des nanoparticules ont été suivies au cours du temps.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Cancer du sein et drainage lymphatique du sein

A. *Epidémiologie et classifications du cancer du sein*

1. Epidémiologie et facteurs de risque associés au cancer du sein

Le cancer du sein est un problème majeur de santé publique puisqu'avec 53 000 nouveaux cas estimés en France en 2011, il se situe au premier rang des cancers incidents^a chez la femme et représente 33 % de l'ensemble des cancers féminins^[1]. Les risques de développer un cancer du sein avant 75 ans ont considérablement augmenté au fil des générations, passant de 4,9 % chez les femmes nées en 1910 à 12,1 % chez les femmes nées en 1950^[2]. Bien que le taux de mortalité chez la femme diminue depuis 1998, le cancer du sein représente le cancer le plus mortel avec en moyenne 11 500 décès par an sur la période 2004-2008, ce qui correspond à 18,3 % des décès féminins par cancer^[3].

La principale cause de décès des patients atteints de cancer du sein est liée à la dissémination de cellules métastatiques dans les os, les poumons, les ganglions et le foie. Cette étape du processus métastatique est facilitée en cas de surexpression par les cellules tumorales du facteur de croissance HER2^[4]. Une thérapie basée sur des anticorps monoclonaux dirigés contre HER2 (trastuzumab) a été approuvée en 1998 par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des cancers du sein métastatiques surexprimant HER2^[5]. Cependant, des résistances se développent généralement dans l'année suivant sa mise en place limitant ainsi l'efficacité du traitement^[6]. De nouvelles immunothérapies à base d'anticorps anti-idiotypiques anti-HER2 sont aujourd'hui à l'étude pour amplifier, chez les patients surexprimant HER2, l'immunité contre ce facteur de croissance et induire une réponse humorale^[7,8].

Les facteurs de risque du cancer du sein peuvent être classés en fonction de leur caractère évitable ou non. Les principaux facteurs de risque évitables sont la consommation d'alcool^[9] et la prise prolongée (supérieure à 7 ans) d'une hormonothérapie substitutive à la ménopause^[10,11]. D'autres facteurs de risque, tels que le sexe (99 % des cancers du sein touchent les femmes)^[12], l'âge, une exposition accrue aux œstrogènes naturels ou synthétiques^[10] ou des mutations germinales des gènes de susceptibilité du cancer du sein, tels que BRCA-1 ou BRCA-2^[13] ne peuvent être évités.

^a Incidence : Nombre de cas survenant durant une période (généralement, une année) et dans une population concernée.

2. Classifications des cancers du sein

i. Structure du sein

La fonction biologique du sein est de produire du lait afin de nourrir un nouveau-né. Chaque sein contient une glande mammaire et du tissu de soutien comprenant des vaisseaux, des fibres et de la graisse (Figure 1). Chaque compartiment contient des lobules, qui produisent le lait en période d'allaitement, et des canaux qui transportent le lait vers le mamelon.

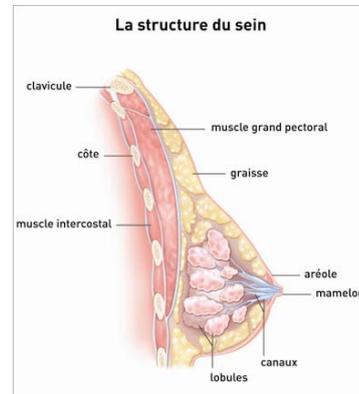


Figure 1 : Structure du sein ^[14]

ii. Classification de l'OMS

La classification des cancers du sein en fonction de leur type histologique a été établie par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1981 ^[15] et modifiée en 2003 ^[16].

Les adénocarcinomes, tumeurs se développant aux dépens du tissu épithélial glandulaire du sein, sont les tumeurs malignes les plus fréquentes (98 %). Ils se forment à partir des cellules lobulaires (cancer lobulaire) ou canaux (cancer canalaire) de la glande mammaire. Parmi les adénocarcinomes, on distingue les carcinomes non infiltrants (ou *in situ*) et les carcinomes infiltrants. Les autres tumeurs malignes du sein se composent de la maladie de Paget^b, les tumeurs phyllodes^c et les sarcomes^d ^[17]. L'examen anatomopathologique d'un prélèvement par micro- ou macrobiopsie permet de confirmer la suspicion diagnostique et de préciser le type histologique de la tumeur.

iii. Classification Tumor Node Metastasis (TNM)

L'examen clinique de la tumeur et la recherche des métastases permet de classer la tumeur selon la classification TNM, établie par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) et l'Union for International Cancer Control (UICC) 7^{ème} édition (Tableau 1). C'est aujourd'hui la classification internationale la plus utilisée.

^b Maladie de Paget : Extension intra-épidermique mamelonnaire d'un adénocarcinome galactophorique sous-jacent invasif ou non.

^c Tumeur phyllode : Néoplasme qui se forme à partir des cellules stromatiques périductales du sein.

^d Sarcome : Tumeur maligne qui se forme aux dépens du tissu conjonctif ou des tissus qui en dérivent comme le tissu musculaire.

Tableau 1 : Classification TNM des cancers du sein ^[18]

| T : Tumeur primaire | |
|---|---|
| Tx | Tumeur primaire ne pouvant être évaluée |
| T0 | Tumeur primaire non palpable |
| Tis | Carcinome <i>in situ</i> |
| Tis (CCIS) | Carcinome canalaire <i>in situ</i> |
| Tis (CLIS) | Carcinome lobulaire <i>in situ</i> |
| Tis (Paget) | Maladie de Paget du mamelon sans tumeur |
| T1 | Tumeur ≤ 20 mm dans sa plus grande dimension |
| T1mi | Tumeur ≤ 1 mm |
| T1a | 1 mm < Tumeur ≤ 5 mm |
| T1b | 5 mm < Tumeur ≤ 10 mm |
| T1c | 10 mm < Tumeur ≤ 20 mm |
| T2 | 20 mm < Tumeur ≤ 50 mm |
| T3 | Tumeur > 50 mm |
| T4 | Tumeur, quelle que soit sa taille, avec extension directe |
| T4a | Extension à la paroi thoracique |
| T4b | Ulcération et/ou œdème de la peau |
| T4c | Association de T4a et T4b |
| T4d | Carcinome inflammatoire |
| N : Ganglions lymphatiques régionaux | |
| Stade clinique pré-thérapeutique | |
| Nx | Ganglions régionaux ne pouvant être évalués |
| N0 | Pas de métastases ganglionnaires |
| N1 | Métastases ganglionnaires axillaires homolatérales mobiles |
| N2 | Métastases ganglionnaires axillaires homolatérales fixées de niveau I et II |
| N2a | Métastases ganglionnaires axillaires homolatérales fixées les unes aux autres ou à d'autres structures |
| N2b | Métastases homolatérales dans la chaîne mammaire interne en l'absence de métastases ganglionnaires axillaires homolatérales cliniques |
| N3 | Métastases homolatérales dans les ganglions de niveau III |
| N3a | Métastases homolatérales des ganglions sous-claviculaires |
| N3b | Métastases homolatérales des ganglions de la chaîne ganglionnaire mammaire interne et des ganglions axillaires |
| N3c | Métastases homolatérales des ganglions sus-claviculaires |
| Stade anatomopathologique postchirurgical (pathologique) | |
| pNx | Ganglions régionaux ne pouvant être évalués |
| pN0 | Pas de métastases ganglionnaires identifiées histologiquement |
| pN0(i-) | Pas de métastases ganglionnaires identifiées par histologie et IHC négatif |
| pN0(i+) | Cellules tumorales dans les ganglions régionaux détectées par H&E ou IHC |
| pN0(mol-) | Pas de métastases ganglionnaires identifiées par histologie et RT-PCR négatif |
| pN0(mol+) | Pas de métastases ganglionnaires identifiées par histologie ou IHC mais RT-PCR + |
| pN1 | Micrométastases ou métastases dans 1 à 3 ganglions axillaires et/ou dans la chaîne mammaire interne |
| pN1mi | 0,2 mm < Micrométastases ≤ 2 mm |
| pN1a | Métastases dans 1 à 3 ganglions axillaires, avec au moins 1 métastase > 2 mm |
| pN1b | Métastases dans les ganglions de la chaîne mammaire interne avec micrométastases ou macrométastases détectées par biopsie du ganglion sentinelle |
| pN1c | Métastases dans 1 à 3 ganglions axillaires et de la chaîne mammaire interne avec micro- ou macrométastases détectées par biopsie du ganglion sentinelle |
| pN2 | Métastases dans 4 à 9 ganglions axillaires ou de la chaîne mammaire interne |
| pN2a | Métastases dans 4 à 9 ganglions axillaires |
| pN2b | Métastases dans les ganglions de la chaîne mammaire interne en absence de métastases dans les ganglions axillaires |
| pN3 | Métastases dans 10 ou + ganglions axillaires et/ou de niveau III |
| pN3a | Métastases dans 10 ou + ganglions axillaires ou dans les ganglions sous-claviculaires |
| pN3b | Métastases dans les ganglions de la chaîne mammaire interne avec un (ou plus) ganglion axillaire positif |
| pN3c | Métastases dans les ganglions sus-claviculaires |
| M : Métastases à distance | |
| M0 | Pas de preuves cliniques de métastases à distance |
| cM0(i+) | Pas de preuves cliniques de métastases à distance mais détection moléculaire ou microscopique de cellules tumorales dans la circulation sanguine, la moelle osseuse ou les ganglions lymphatiques non régionaux |
| M1 | Métastases à distance détectables cliniquement |

A partir des trois critères T, N et M, le stade de la maladie est codé en niveaux, de I à IV, afin de prévoir l'évolution de la maladie et de prescrire une thérapie adaptée. (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification par stade UICC ^[19]

| | | | |
|-------------|-------------------------|----|----|
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| I | T1 | N0 | M0 |
| IIA | T0 | N1 | M0 |
| | T1 | N1 | M0 |
| | T2 | N0 | M0 |
| IIB | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| IIIA | T0 | N2 | M0 |
| | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| IIIB | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| | T4 | N2 | M0 |
| IIIC | Quel que soit T | N3 | M0 |
| IV | Quels que soient T et N | | M1 |

Les cancers du sein sont des cancers lymphophiles, c'est-à-dire qu'ils se disséminent préférentiellement par la voie lymphatique.

B. Système lymphatique

1. Voies de drainage lymphatique du sein

Le sein est drainé par un riche réseau de vaisseaux lymphatiques aboutissant principalement aux ganglions axillaires. Contrairement à ce qui a pu être démontré dans les premières études de drainage lymphatique du sein ^[20], le drainage axillaire n'est pas la seule voie de drainage du sein : les ganglions pectoraux, de la chaîne mammaire interne, sous-claviculaires et sus-claviculaires peuvent également recevoir le drainage lymphatique du sein (Figure 2).

Le parenchyme mammaire superficiel est drainé préférentiellement vers la région ganglionnaire lymphatique axillaire alors que le parenchyme glandulaire profond est drainé dans les chaînes mammaires (interne et externe) ^[21].

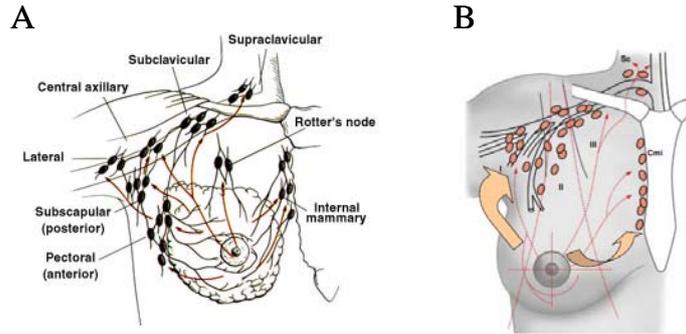


Figure 2 : Drainage lymphatique du sein

A. Dénomination des différents ganglions lymphatiques [22].

B. Etages I, II et III de Berg utilisés dans la classification TNM, Cmi : chaîne mammaire interne, Sc : sus-claviculaire [23].

2. Formation de la lymphe

La lymphe se forme à partir du liquide interstitiel, grâce aux différences de pression entre les capillaires sanguins, le milieu interstitiel et les capillaires lymphatiques (Figure 3) [24]. La pression du sang dans les capillaires (P_c) tend à faire sortir le liquide par un processus d'ultrafiltration. Les pores des capillaires étant analogues aux mailles d'un tamis, seules les petites protéines peuvent sortir des capillaires et sont entraînées par le liquide vers le milieu interstitiel. Ainsi, le liquide sortant des capillaires est semblable à du plasma dépourvu de protéines. L'ultrafiltrat présent dans le milieu interstitiel est réabsorbé par les capillaires sanguins grâce à la différence de pression oncotique (π) favorable entre le plasma et le milieu interstitiel. La sortie de liquide par ultrafiltration des capillaires sanguins étant plus importante que la réabsorption, l'excédent de liquide filtré est capté par le système lymphatique.

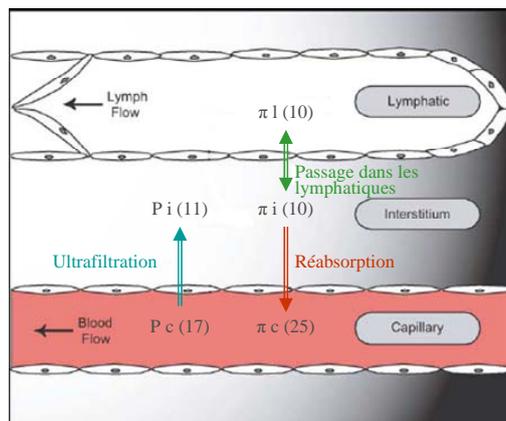


Figure 3 : Schéma des pressions régulant les échanges entre le plasma, le milieu interstitiel et la lymphe (adapté de [25])

Les mouvements d'eau sont modélisés par une double flèche. Les valeurs moyennes de pression sont précisées entre parenthèse en mm Hg, avec P_c : pression du sang dans les capillaires, P_i : pression du milieu interstitiel, π_c : pression oncotique du plasma, π_i : pression oncotique du milieu interstitiel et π_l : pression oncotique de la lymphe.

En cas de déséquilibre des forces de part et d'autre de la paroi capillaire, le liquide peut s'accumuler dans le milieu interstitiel et créer des œdèmes^e [26]. Ce déséquilibre peut être lié à une diminution de la concentration en protéines plasmatiques, une perméabilité excessive des parois capillaires ou encore, un blocage des canaux lymphatiques, en cas de geste chirurgical par exemple [24].

Le système lymphatique permet donc de récupérer l'excédent de liquide et les protéines filtrées, mais il joue aussi un rôle dans la défense de l'organisme par le transport de cellules immunitaires et dans le transport des graisses absorbées par le tube digestif.

3. Structure et organisation des vaisseaux lymphatiques

L'ensemble des vaisseaux lymphatiques est constitué par les capillaires lymphatiques, les vaisseaux lymphatiques pré- et post-ganglionnaires. Ces derniers convergent vers des vaisseaux lymphatiques plus larges puis le canal thoracique pour conduire la lymphe vers la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière (Figure 4 A) [27]. Les capillaires lymphatiques initiaux, dépourvus de valves intraluminales, sont composés par le recouvrement de cellules endothéliales qui laissent des espaces de 10 à 25 nm entre les cellules (Figure 4 B) [28]. A l'extérieur des cellules endothéliales, des fibrilles d'élastine sont attachées aux fibres de collagène de la matrice extracellulaire [29].

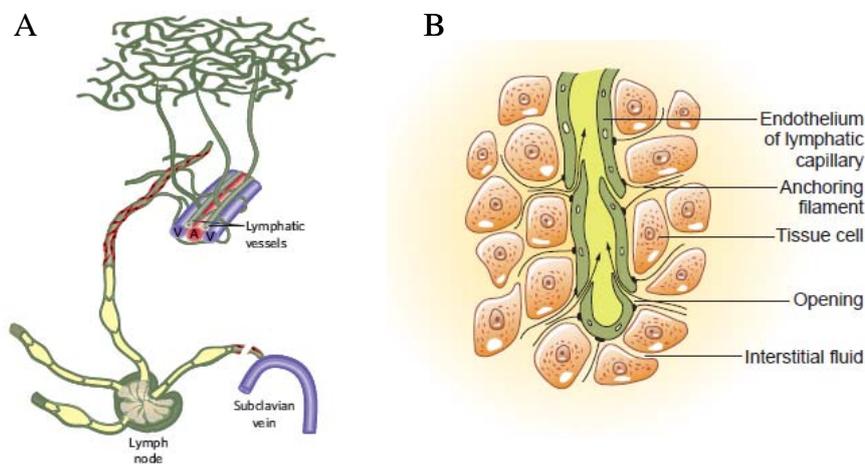


Figure 4 : Organisation du système lymphatique

A. Le liquide interstitiel, collecté par les capillaires lymphatiques, est transporté par les vaisseaux lymphatiques vers des vaisseaux collecteurs plus larges puis retourne dans la circulation sanguine par l'intermédiaire du canal thoracique dans la veine sous-clavière. Les vaisseaux collecteurs possèdent une couche musculaire lisse (rouge) et des valves intraluminales afin de propulser et de maintenir le flux lymphatique dans une seule direction. Les vaisseaux profonds courent le long des artères et des veines [30].

B. Représentation d'un capillaire lymphatique [28].

^e **Œdème** : Gonflement d'un organe ou d'un tissu dû à une accumulation ou un excès de liquides dans le milieu interstitiel.

Les fenêtres entre les cellules endothéliales peuvent donc être élargies par les mouvements, les massages ou la pression due à la présence d'un liquide, facilitant le passage de la lymphe et des protéines interstitielles ^[31]. La pression du liquide à l'intérieur des capillaires lymphatiques provoque l'accolement des cellules endothéliales et la fermeture des orifices, empêchant ainsi la fuite de lymphe ^[24].

Le flux lymphatique est généré à la fois par la formation de la lymphe depuis l'espace interstitiel, par les contractions actives des vaisseaux lymphatiques ^[32], par la pression interstitielle externe et par le péristaltisme lié au phénomène de contraction/relaxation des muscles lisses et squelettiques ^[33]. Les capillaires lymphatiques étant clos à leur extrémité (Figure 4 B), le flux lymphatique ne peut se faire que dans un sens. La gravité affecte la vitesse du flux mais n'influence pas la direction du flux lymphatique.

En réponse à des facteurs de croissance produits par une tumeur, les vaisseaux lymphatiques peuvent se dilater et se multiplier, facilitant ainsi le transport des cellules métastatiques jusqu'aux ganglions lymphatiques ^[34]. La lymphe est transportée par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions lymphatiques où une réponse immunitaire peut être initiée si des substances étrangères sont détectées.

4. Structure d'un ganglion lymphatique

Les ganglions lymphatiques sont de petites structures en forme de haricot, généralement de taille inférieure à 2,5 cm chez l'Homme (Figure 5). Ils se répartissent le long des vaisseaux lymphatiques dans tout l'organisme, à l'exception du système nerveux central et des os.

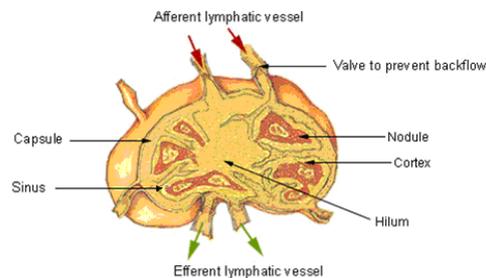


Figure 5 : Structure d'un ganglion lymphatique ^[35]

Plusieurs vaisseaux lymphatiques afférents apportent la lymphe au niveau du ganglion dans sa partie convexe. La lymphe traverse le ganglion à travers les sinus puis elle est évacuée du ganglion par les vaisseaux lymphatiques éférents, qui prennent naissance au niveau de la partie concave du ganglion, le hile (Figure 5). Le nombre de vaisseaux afférents étant supérieur au nombre de vaisseaux éférents, la vitesse d'écoulement dans le ganglion est réduite, permettant la mise en place des mécanismes de défense immunitaire.

5. Mécanismes de rétention des particules étrangères dans les ganglions

Le ganglion lymphatique ne retient pas les particules étrangères que par un simple phénomène de filtre mécanique. Les particules qui sont reconnues comme étant étrangères à l'organisme subissent un phénomène d'opsonisation, ce qui permet de les éliminer par phagocytose.

Une matrice de fibrilles de réticuline forme un maillage complexe dans les sinus du ganglion lymphatique, ce qui ralentit le mouvement des particules qui peuvent alors être phagocytées par les cellules du système réticuloendothélial (SRE)^f : les macrophages et les histiocytes résidants dans les sinus^[31]. La reconnaissance des nanoparticules nues par les macrophages du SRE est effective en quelques secondes^[36]. Les macrophages n'identifient pas directement les nanoparticules comme étant étrangères mais ils reconnaissent des protéines spécifiques (fibrinogène, albumine, protéines du complément C3, C4, C5, immunoglobulines, ...) appelées opsonines qui se lient à leurs antigènes de surface^[37]. Une fois liées à la surface des particules étrangères, les opsonines passent d'une forme inactivée à une conformation active, qui est reconnue par les récepteurs spécifiques des phagocytes^[38]. La dernière étape de l'élimination des particules étrangères est leur ingestion par endocytose. Si les particules ne sont pas biodégradables, elles ne seront pas détériorées par les enzymes libérées par les phagocytes et leur devenir est variable selon leur taille : les petites particules (de masse moléculaire inférieure à 5000 Da) pourront être filtrées par les reins tandis que les plus grosses seront séquestrées et s'accumuleront dans les organes du SRE tels que le foie ou la rate, riches en cellules phagocytaires^[38]. Cette rétention des particules étrangères non biodégradables dans ces organes peut être à l'origine d'effets indésirables liés à leur toxicité^[39].

L'étude de la physiologie du système lymphatique permet de comprendre les mécanismes et les voies de dissémination des cellules métastatiques du cancer du sein. Les ganglions lymphatiques sont les premiers organes envahis par les métastases. Leur analyse peut donc permettre de prédire l'envahissement métastatique du reste de l'organisme et d'orienter les traitements post-chirurgicaux.

^f Système réticuloendothélial : Système impliqué dans l'élimination des corps étrangers de l'organisme, composé d'éléments mobiles (monocytes) et d'éléments fixes (macrophages résidents dans les tissus tels que les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus ou encore les cellules de Küpffer du foie).

II. Traitement chirurgical des cancers du sein par biopsie du ganglion sentinelle

A. Bases théoriques de la technique du ganglion sentinelle

1. Définition et historique du ganglion sentinelle

Le concept du ganglion sentinelle (GS) est apparu pour la première fois en 1960 dans le cancer des glandes parotides ^[40]. Par la suite, l'existence d'un GS a été démontré dans le cancer du pénis ^[41], les mélanomes ^[42], les cancers du sein ^[43,44] et d'autres cancers lymphophiles.

Le GS est défini comme le premier relai lymphatique drainant la tumeur et donc pouvant être potentiellement métastatique ^[42] (Figure 6). Les autres ganglions de la chaîne sont appelés ganglions de second échelon.

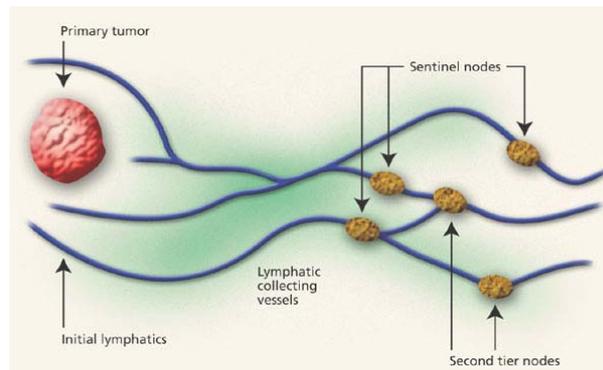


Figure 6 : Schéma définissant le ganglion sentinelle ^[45]

2. Mécanismes de dissémination métastatique dans le ganglion sentinelle

Alors que le volume de la tumeur augmente, la pression du liquide interstitiel intratumoral augmente, ce qui a pour effet de maintenir ouvertes les jonctions entre les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques et ainsi de faciliter le passage des cellules tumorales dans la lymphe ^[46]. La progression des cellules tumorales se fait donc depuis le site de la tumeur primaire vers les GS par l'intermédiaire des capillaires lymphatiques et des vaisseaux collecteurs ^[47]. Une fois que les cellules tumorales se sont établies dans les ganglions lymphatiques, elles peuvent se disséminer de façon séquentielle vers les ganglions de second échelon puis vers la circulation systémique à travers les connections lymphaticoveineuses ^[48].

Les cellules tumorales sont capables de sécréter des facteurs induisant la lymphangiogenèse^g, facilitant ainsi leur dissémination par la voie lymphatique [46,49]. La mobilité des cellules tumorales à l'intérieur de la matrice extracellulaire est possible grâce à la sécrétion par les cellules endothéliales lymphatiques d'enzymes protéolytiques, de cytokines chimioattractives et grâce à l'expression de récepteurs d'adhérence cellulaire [46].

Certains facteurs morphologiques, biochimiques, physiopathologiques ou moléculaires (volume tumoral, âge du patient, grade tumoral, ...) peuvent être prédictifs d'un envahissement ganglionnaire [46,50,51].

3. Déroulement de la technique de biopsie du ganglion sentinelle

Dans un premier temps, des traceurs (colorant bleu et/ou radiocolloïdes) sont injectés à proximité de la tumeur afin de visualiser le drainage lymphatique de la tumeur. Une lymphoscintigraphie pré-opératoire permet de repérer les GS grâce à leur radioactivité et de marquer leur position sur la peau. La biopsie du GS est réalisée dans le même temps opératoire que l'exérèse tumorale : lorsque le patient est anesthésié et prêt à subir l'intervention chirurgicale, le chirurgien ouvre le creux axillaire puis identifie les GS grâce à leur forte radioactivité et leur couleur bleue. Ces derniers sont disséqués puis analysés par le laboratoire d'anatomie pathologique afin de définir, en peropératoire, leur statut métastatique. Si les GS sont indemnes de métastases, le chirurgien ne procède qu'au retrait de la tumeur. En présence de métastases ganglionnaires, le patient subi, en plus de la tumorectomie, un curage axillaire, c'est-à-dire, le retrait d'au moins 10 ganglions axillaires.

4. Curage axillaire et traitements post-chirurgicaux

Le curage axillaire était la méthode de référence des traitements des cancers du sein jusqu'à l'avènement de la technique de biopsie du GS. Le retrait d'une grande partie de la chaîne ganglionnaire axillaire étant à l'origine de nombreux effets secondaires (lymphœdème, troubles moteurs et sensitifs, douleurs, infections postopératoires...), elle a été abandonnée en cas de GS non métastatiques afin de réduire la morbidité^h spécifique au curage axillaire et d'améliorer la qualité de vie des patients. Une étude multicentrique récente sur 985 patients a démontré que le coût d'une biopsie du GS est significativement plus faible que celui d'un curage axillaire [52].

^g Lymphangiogenèse : Développement et prolifération de nouveaux vaisseaux lymphatiques.

^h Morbidité : Dégradation de l'état de santé d'un individu.

Bien que les techniques utilisées pour la biopsie du GS soient plus onéreuses, cette procédure est plus économique que le curage axillaire puisque la durée d'hospitalisation, qui est le principal poste générateur de dépenses, est fortement réduite ^[52].

Il a été démontré des taux de récurrences axillaires ou locorégionales très faibles voire nuls lorsque le GS est négatif ^[53-55]. Pour des tumeurs de petite taille (inférieure à 2 cm), le curage axillaire est inutile dans 70 % des cas puisque les ganglions non sentinelles sont exempts d'envahissement métastatique ^[56]. En revanche, dans le cas d'une tumeur de taille supérieure à 3 cm ou en cas de multifocalité de la tumeur, le curage axillaire est fortement recommandé ^[57,58]. Si, à la suite de l'injection des traceurs, aucun GS ne peut être visualisé, le curage axillaire est systématiquement réalisé, étant donné le risque important d'envahissement des GS ^[59,60]. En cas de GS positifs, des traitements supplémentaires peuvent être associés à la chirurgie : radiothérapie de la paroi thoracique et/ou de la chaîne mammaire interne, chimiothérapie et/ou hormonothérapie. Le choix du traitement adjuvant dépend des caractéristiques histologiques de la tumeur, des facteurs prédictifs de réponse aux traitements, des traitements antérieurement reçus, ... ^[61].

5. Intérêt et recommandations de la technique du ganglion sentinelle

Plusieurs caractéristiques du flux lymphatique et des GS permettent d'expliquer l'intérêt de la biopsie du GS par rapport au curage axillaire. Le flux lymphatique est ordonné, prévisible ^[28] et les cellules métastatiques se disséminant de façon séquentielle, les skip métastasesⁱ sont rares (< 5 %) ^[23]. Ainsi, l'absence d'envahissement ganglionnaire peut être prédite si le premier relai est indemne ^[59]. Etant donné que le GS est le premier ganglion rencontré par les cellules tumorales, le statut du GS est hautement prédictif du statut lymphatique axillaire. L'intérêt de connaître le statut métastatique du GS réside dans le fait qu'il est un indice de la progression métastatique de la maladie ^[28] et le facteur pronostic le plus important ^[62,63]. La présence de métastases ganglionnaires est synonyme de récives globales, locorégionales ou métastatiques ^[64] et diminue de 40 % le taux de survie à 5 ans par rapport aux patients indemnes de métastases ^[65,66].

L'American Society of Clinical Oncology (ASCO) a émis en 2005 des recommandations pour la biopsie du GS en fonction des caractéristiques de la tumeur, du patient, d'une éventuelle chirurgie antérieure... (Tableau 3) ^[59].

ⁱ Skip métastase : Cellules métastatiques se disséminant dans les ganglions non sentinelles mais pas dans les ganglions sentinelles.

Tableau 3 : Recommandations et niveau de preuve pour une biopsie du GS ^[59]

| Situation clinique | Recommandation pour une biopsie du GS | Niveau de preuve * |
|---|---|--------------------|
| Tumeur T1 ou T2 | Acceptable | Bon |
| Tumeur T3 ou T4 | Non recommandé | Insuffisant |
| Tumeur multicentrique | Acceptable | Limité |
| Cancer du sein inflammatoire | Non recommandé | Insuffisant |
| Carcinome canalaire <i>in situ</i> avec mastectomie | Acceptable | Limité |
| Carcinome canalaire <i>in situ</i> sans mastectomie | Non recommandé, sauf dans le cas d'une taille > 5 cm ou d'une microinvasion suspectée | Insuffisant |
| Ganglions axillaires suspects, palpables | Non recommandé | Bon |
| Age avancé | Acceptable | Limité |
| Obésité | Acceptable | Limité |
| Cancer du sein chez l'homme | Acceptable | Limité |
| Grossesse | Non recommandé | Insuffisant |
| Evaluation des ganglions mammaires internes | Acceptable | Limité |
| Biopsie d'excision préliminaire | Acceptable | Limité |
| Chirurgie axillaire préalable | Non recommandé | Limité |
| Chirurgie du sein préalable, non oncologique (reconstruction mammaire, augmentation ou réduction du volume mammaire...) | Non recommandé | Insuffisant |
| Après une thérapie systémique préopératoire | Non recommandé | Insuffisant |
| Avant une thérapie systémique préopératoire | Acceptable | Limité |

*Niveau de preuve - Bon : Nombreuses études de performance de la technique de biopsie du GS basées sur des résultats de curage axillaire complet ; Limité : Quelques études de performance de la technique de biopsie du GS basées sur des résultats de curage axillaire complet ou nombreuses études rapportant un succès dans la localisation du GS sans réalisation d'un test de performance ; Insuffisant : aucune étude de performance de la technique de biopsie du GS basées sur des résultats de curage axillaire complet ou quelques, sinon aucune, études rapportant un succès dans la localisation du GS.

La connaissance du statut métastatique du GS est essentielle lors de la prise de décision thérapeutique post-chirurgicale ^[67]. Si le GS est envahi par les cellules métastatiques, une deuxième intervention chirurgicale sera prévue afin de procéder à un curage axillaire permettant ainsi de contrôler localement l'extension de la maladie et de réduire sa progression dans l'organisme avec des traitements adjuvants appropriés ^[59]. En revanche, si le GS se révèle être sain, le creux axillaire est refermé et aucun autre geste chirurgical n'est réalisé. L'exérèse des GS se fait le plus souvent avant l'excision de la tumeur primaire puisque ce geste peut provoquer une rupture du drainage lymphatique et entraîner un défaut de migration des traceurs, une contamination du champ chirurgical ou l'identification de ganglions lymphatiques qui ne sont pas de vrais GS ^[31].

B. Techniques de visualisation du ganglion sentinelle

1. Capture des traceurs par les capillaires lymphatiques

L'administration d'un certain volume de solution distend les tissus environnants, ce qui provoque l'ouverture des pores des capillaires lymphatiques permettant ainsi l'entrée du traceur [28]. Le GS le plus proche de la tumeur n'est pas forcément le premier à apparaître sur une imagerie dynamique puisque plusieurs vaisseaux lymphatiques qui drainent une même région du corps peuvent présenter différentes vitesses de flux [31].

Si les vaisseaux lymphatiques drainent différents ganglions, les premiers ganglions de chaque chaîne lymphatique seront considérés comme des GS, quel que soit le délai nécessaire à la lymphe contenant le traceur pour les atteindre. Pour s'assurer que les ganglions marqués sont effectivement des GS, il est préférable de visualiser les vaisseaux lymphatiques collecteurs depuis la tumeur jusqu'aux ganglions grâce au colorant bleu [31].

2. Traceurs utilisés pour le repérage du ganglion sentinelle

i. Colorant bleu seul

Le bleu isosulfan 1 % ou lymphazurine a été le premier colorant approuvé par la FDA pour les lymphangiographies [68]. L'identification du GS par un colorant bleu a été effectuée pour la première fois en 1994 avec une dose comprise entre 3 et 5 mL de bleu isosulfan chez des patientes atteintes de cancers mammaires. Après incision de la peau, les vaisseaux lymphatiques bleus ont pu être suivis jusqu'aux ganglions bleus, ce qui a permis d'identifier 66 % des GS. Un curage axillaire réalisé après la biopsie du GS a permis de déterminer un taux de faux-négatifs de 12 % [44]. Le bleu de méthylène a également été utilisé pour le repérage du GS, avec des taux d'identification semblables à ceux obtenus avec le bleu isosulfan [69].

En France, seul le bleu patenté V 2,5 % est autorisé pour la biopsie du GS. Cette molécule, isomère du bleu isosulfan, possède plusieurs dénominations (alphazurine 2G, sulfan blue, sulphane blue, patent blue, patent blue violet ou patent pure blue) et il a démontré une efficacité équivalente à celle du bleu de méthylène [70]. Ce colorant n'étant pas visible à travers la peau, des études se portent actuellement sur son repérage *in vivo* grâce au changement du signal d'absorption des tissus [71].

Après injection, ces colorants se lient aux protéines telles que l'albumine et sont absorbés par les lymphatiques [72]. Ces trois colorants sont cependant à l'origine d'effets secondaires non négligeables [73]. Les premiers cas de réponses anaphylactiques au bleu patenté V durant une lymphographie ont été rapportés en 1966 [74]. Depuis, des réactions allergiques (urticaire, éruptions cutanées, érythèmes, épisodes hypotensifs ou encore chocs anaphylactiques) ont régulièrement été recensées suite à l'utilisation du bleu patenté V ou du bleu isosulfan, avec des taux d'incidence compris entre 0,06 et 2,7 % [68,75,76]. Deux cas de décès liés à un choc anaphylactique au colorant bleu ont également été rapportés [77]. L'utilisation fréquente de ce colorant dans l'alimentation (E 131), les cosmétiques, les textiles et comme excipient de nombreux médicaments est responsable de l'hypersensibilisation des patients [78]. De plus, ces colorants bleus créent des interférences avec les mesures d'oxymétrie en modifiant les caractéristiques d'absorbance du plasma [79] et provoquent une coloration bleue de la peau qui peut persister jusque 1 an après l'injection [80-82].

ii. Radiocolloïde seul

En 1993, l'équipe de Krag est la première à publier des résultats de biopsie du GS avec une technique isotopique seule. L'injection de 0,4 mCi de colloïdes sulfurés marqués au technétium 99 métastable (^{99m}Tc) en péri-tumoral a permis de repérer les GS « chauds » à l'aide d'une gamma-caméra portative chez 18 patients sur 22 [43]. Par la suite, cette même équipe a dirigé une étude multicentrique de biopsie du GS par radiotraceurs avec 443 patients et 11 chirurgiens [83]. Le statut du GS a été comparé à celui du reste du bassin lymphatique grâce à un curage axillaire systématique. Les taux d'identification et de faux-négatifs étaient respectivement de 93,8 % et 11,4 % [83].

D'autres types de radiocolloïdes peuvent être injectés : aux Etats-Unis et au Japon, le repérage du GS se fait à l'aide de colloïde sulfurés, d'étain ou de phytate marqués au ^{99m}Tc [84,85] ; en Australie, le marqueur radioactif le plus utilisé est le trisulfure d'antimoine marqué au ^{99m}Tc [86] alors qu'en Europe, il s'agit des nanocolloïdes d'albumine humaine marqués au ^{99m}Tc (Nanocoll[®]) ou de sulfure de rhénium marqués au ^{99m}Tc (Nanocis[®]) [85].

Après injection, les radiotraceurs migrent dans les canaux lymphatiques puis sont phagocytés par les cellules histiomonocytaires présentes dans l'espace sinusoïdal [72]. L'administration peut se faire le jour même ou la veille de l'intervention. Dans ce dernier cas, une étape d'imagerie dynamique (lymphoscintigraphie) permet de visualiser dans le temps la capture du radiotraceur et de localiser les différents ganglions lymphatiques drainant la région d'intérêt [31].

La lymphoscintigraphie est essentielle dans la technique de biopsie du GS puisqu'elle permet d'augmenter les taux de détection et d'identifier les GS extra-axillaires^[87]. La position des ganglions drainant le sein peut être repérée sur la peau à l'aide de la lymphoscintigraphie, facilitant ainsi la détection du GS au moment de l'intervention chirurgicale et réduisant la taille de l'incision en regard de la marque^[59,88]. En l'absence de visualisation d'un GS en scintigraphie, la possibilité d'un envahissement ganglionnaire doit être suspectée.

Il est à noter que certaines études n'ont pas démontré l'intérêt de la lymphoscintigraphie préopératoire dans l'augmentation de l'identification du GS ou la réduction des taux de faux-négatifs et concluent à l'inutilité de cette technique, qui augmente de façon significative les coûts de l'intervention^[89,90].

Au moment de l'intervention, le repérage isotopique se fait à l'aide d'une sonde peropératoire d'abord à travers la peau puis dans le creux axillaire après incision^[72]. Après prélèvement des ganglions « chauds », la radioactivité de l'aire ganglionnaire est mesurée afin de s'assurer que son activité résiduelle est conforme à celle du bruit de fond ou au moins inférieure à 10 % de l'activité maximale du GS *ex vivo*^[72,91].

Les niveaux de radiations délivrés aux professionnels de la santé sont faibles : les doses les plus élevées sont reçues par le médecin nucléaire mais elles restent plus de 1 000 fois inférieures à la limite annuelle admissible pour le public^[92]. La courte demi-vie du ^{99m}Tc (6 heures) rend possible une réduction de l'activité au niveau du site d'injection d'un facteur 10 le lendemain de l'injection.

L'inconvénient de cette technique est son coût : la phase préopératoire de la technique du GS a été évaluée à 582 € en moyenne par patient^[93]. Elle nécessite également l'intervention d'un médecin nucléaire et, pour des raisons d'organisation et de gestion, il est préférable que le service de médecine nucléaire soit à proximité du centre de soin.

iii. Combinaison des deux techniques

Les défenseurs de la technique du colorant bleu seule argumentent en faveur du faible coût de cette méthode comparé à la complexité et au surcoût liés à l'utilisation des radiocolloïdes et d'une caméra de détection peropératoire. Les partisans de la technique du radiocolloïde seul soutiennent le fait que le colorant bleu peut provoquer des réactions allergiques, un marquage de la peau pendant plusieurs mois et que le taux d'identification du GS n'est pas optimal^[87].

L'utilisation de la technique combinée (colorant bleu + radiocolloïde) a été décrite pour la première fois en 1996 et a montré un taux d'identification supérieur (92 %) et un taux de faux-négatifs inférieur (0 %) à ceux retrouvés avec les techniques simples ^[94]. Depuis, des études ont démontré la supériorité de la technique de détection double sur la détection avec un seul marqueur par une sensibilité et une spécificité optimales ^[66,95].

Cette technique est aujourd'hui fortement recommandée car elle est la plus sûre, la plus confortable pour le chirurgien et elle permet de réduire la phase d'apprentissage ^[96,97]. La plupart des équipes pratiquant la biopsie du GS injectent le radiocolloïde la veille de l'intervention et réalisent une lymphoscintigraphie préopératoire entre 2 et 3 heures après l'injection ^[72]. Immédiatement après l'injection, le site est massé afin de faciliter le drainage lymphatique ^[98,99].

Bien que certaines équipes ne recommandent pas ce geste, suspectant un risque de micrométastases d'origine traumatique ^[56], le massage reste communément pratiqué. Le marquage au feutre de la peau en regard du GS est effectué avec le bras en position chirurgicale. Le jour de l'intervention, le colorant bleu physiologique est injecté en périaréolaire entre 5 et 15 minutes avant l'incision de la peau au niveau des marques. Les vaisseaux lymphatiques sont ensuite suivis jusqu'aux GS et les chirurgiens s'assurent que les vaisseaux lymphatiques bleus drainent effectivement la tumeur. L'utilisation d'une gamma-caméra portable permet de mesurer les taux de radioactivité des GS bleus repérés. Les ganglions « chauds » et bleus sont considérés comme sentinelles et sont alors disséqués.

La méthode combinée présente de nombreux avantages mais elle nécessite une coopération multidisciplinaire entre le chirurgien, le médecin nucléaire et l'anatomopathologiste qui analysera les GS. De plus, afin de faciliter l'organisation et la planification, il est souhaitable que ces trois acteurs soient sur des sites géographiquement proches ^[96].

3. Facteurs affectant l'identification du ganglion sentinelle

La technique du GS présente un très bon taux d'identification mais il arrive que, dans certains cas, le GS ne soit pas visualisé. Il est important de connaître les paramètres régissant la migration des traceurs dans le GS afin d'optimiser les conditions de visualisation du GS. Alors que certaines caractéristiques sont liées au patient et ne peuvent donc pas être modifiées, certains paramètres d'injection peuvent être corrigés afin d'obtenir de meilleurs taux d'identification.

i. Caractéristiques liées au patient

L'âge avancé des patients est associé à une diminution de la turgescence tissulaire, ce qui se traduit par une réduction de la pression hydrostatique intralymphatique, indispensable au transport des traceurs vers le GS ^[100]. De plus, le tissu lymphatique étant progressivement remplacé par de la graisse, les traceurs ont moins d'espace pour s'accumuler dans les sinus et ont tendance à diffuser dans le tissu grasseux ^[100].

Ce problème est également rencontré chez les patients présentant un fort indice de masse corporelle (IMC) ^[101,102]. En cas de réussite de la procédure chez des femmes ayant un fort IMC, le nombre moyen de GS extraits est toutefois inférieur à celui obtenu pour des femmes ayant un IMC moyen ^[101].

La localisation de la tumeur primaire influence également les taux d'identification des GS : les tumeurs situées dans le quadrant supéro-externe présentent des taux d'identification du GS supérieurs à ceux obtenus pour les autres localisations, grâce à la faible distance à parcourir par les traceurs de la tumeur jusqu'à la région axillaire ^[102].

L'essai clinique ALMANAC (Axillary Lymphatic Mapping Against Nodal Axillary Clearance) s'est intéressé, entre autres, à l'effet d'une invasion métastatique du GS sur sa visualisation ^[103]. L'obstruction des lymphatiques par les cellules tumorales ou l'invasion tumorale extra-ganglionnaire peut empêcher la migration des traceurs jusqu'au GS et générer des résultats faux-négatifs (Figure 7).

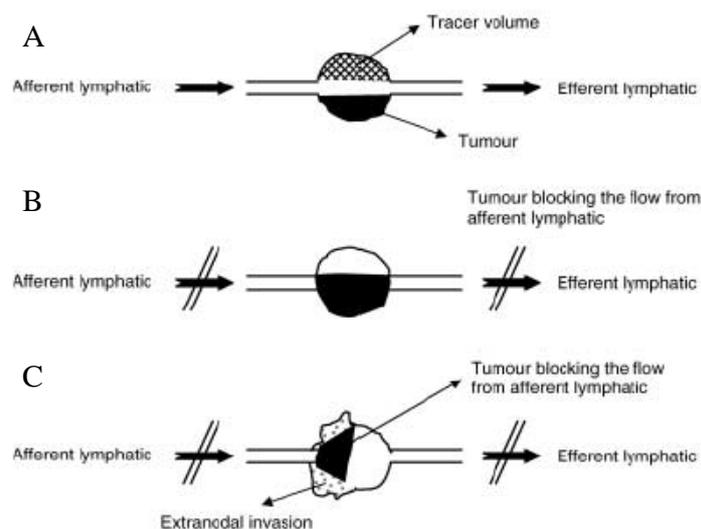


Figure 7 : Modèle d'invasion métastatique et flux lymphatique associé ^[103]

Lors de l'envahissement du ganglion lymphatique par les cellules métastatiques, le volume résiduel accessible au traceur est réduit. (A) A ce stade, l'échec de visualisation du GS n'a pas lieu. Lorsque le flux des traceurs à l'intérieur du ganglion est bloqué, par la présence de cellules métastatiques (B) ou en cas d'obstruction des vaisseaux lymphatiques afférents (C), le taux de capture des traceurs par le GS est fortement réduit.

Quand le nombre de ganglions axillaires envahis augmente (et particulièrement à partir de 4 ganglions positifs), le taux de succès de la visualisation du GS par lymphoscintigraphie diminue ^[104]. Le flux lymphatique peut être détourné vers des ganglions non sentinelles qui n'ont pas encore reçu de cellules métastatiques, occasionnant un résultat faux-négatif ^[105,106]. L'utilisation du colorant bleu se révèle être très intéressante dans ce cas puisque le chirurgien peut alors suivre le vaisseau lymphatique bleu jusqu'à un ganglion non coloré. Le blocage du colorant à l'entrée du ganglion est alors synonyme d'envahissement métastatique et ce ganglion doit être considéré comme sentinelle, malgré l'absence de coloration ^[102,107]. Il est également recommandé de palper le creux axillaire ouvert à la fin de la procédure afin de détecter toute adénopathie suspectée et de la prélever.

ii. Caractéristiques liées à l'injection

Site d'injection

Les traceurs peuvent être injectés par différentes voies (sous-cutané, intratumoral ou péri-tumoral - Figure 8) en fonction des équipes.

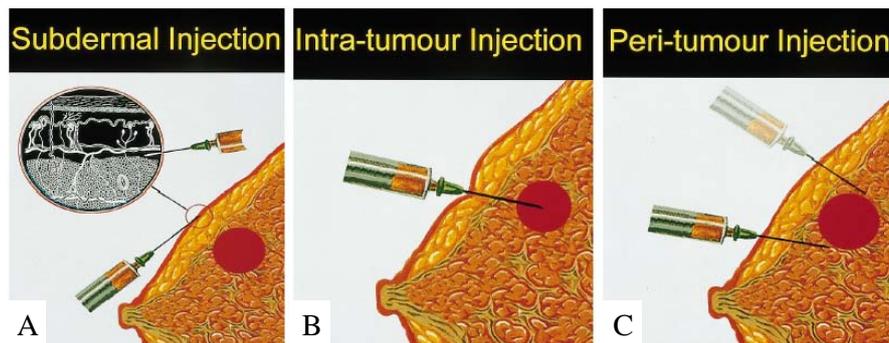


Figure 8 : Représentation schématique des différentes voies d'injection des traceurs pour la visualisation du ganglion sentinelle ^[28]

A : voie sous-cutanée, B : voie intratumorale, C : voie péri-tumorale.

Les premières équipes étudiant la visualisation du GS dans le cancer du sein ont injecté les traceurs dans le parenchyme entourant la tumeur mammaire ^[43,44]. Ce mode d'administration semble le plus judicieux afin de localiser les ganglions lymphatiques drainant la tumeur (Figure 8 C). Cependant, une étude multicentrique ultérieure a montré un taux de faux-négatifs important et variable (de 0 à 29 %) avec ce type d'injection ^[108]. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le réseau des lymphatiques profonds dans le sein est pauvre et souvent non prévisible ^[87]. Aussi, seule une faible proportion des traceurs injectés dans le parenchyme mammaire pourra atteindre le GS, rendant son identification plus difficile.

De plus, cette voie d'injection pose problème en cas de tumeur localisée dans le quadrant supéro-externe. Etant donné qu'une majeure partie des traceurs ne migre pas du point d'injection, l'injection péri-tumorale de traceurs radioactifs peut masquer le ganglion axillaire se trouvant à proximité^[109]. En cas de tumeur non palpable, l'injection péri-tumorale des colloïdes radioactifs par un médecin nucléaire est délicate et doit se faire sous échographie.

L'injection sous-cutanée des traceurs (Figure 8 A) a ensuite été envisagée étant donné l'origine embryonnaire ectodermique commune du parenchyme mammaire et de la peau sus-jacente, à l'origine d'un système lymphatique commun, le plexus de Sappey^[110]. Cette théorie a été validée par la colocalisation du bleu patenté injecté en sous-cutané et du traceur radioactif injecté en péri-tumoral^[111]. La densité des vaisseaux lymphatiques dans la peau étant supérieure à celle du parenchyme mammaire, les traceurs injectés y sont transportés plus rapidement^[110]. La voie d'administration sous-cutanée présente de nombreux avantages par rapport à l'injection péri-tumorale. Tout d'abord, le degré de radioactivité dans les GS est supérieur de 5 à 7 fois après une injection sous-cutanée comparé à une injection péri-tumorale, facilitant ainsi leur identification^[112]. La durée de transit du site d'injection vers le creux axillaire étant plus court, le temps entre l'injection sous-cutanée et la biopsie du GS est compris entre 30 et 60 min, alors qu'il est de plusieurs heures à la suite d'une injection péri-tumorale^[87]. Concernant les problèmes de masquage du GS en cas de tumeurs du quadrant supéro-externe, la peau au niveau du site d'injection peut être déplacée afin d'augmenter la distance entre le site d'injection et la région axillaire^[87]. Néanmoins, l'inconvénient de cette voie d'injection réside dans le fait que le drainage vers des ganglions non axillaires ne peut pas être mis en évidence^[87]. Afin de régler le problème d'injection lié aux tumeurs non palpables, l'injection sous-aréolaire a été fortement étudiée puisque le réseau de vaisseaux lymphatiques de la région aréolaire est très riche. Il a été montré que le drainage de colloïdes radioactifs injectés en sous-aréolaire coïncidait avec le drainage du colorant bleu injecté en péri-tumoral^[113] et c'est, à ce jour, la voie d'injection de prédilection retenue par la plupart des équipes^[114]. Cette technique simple élimine le besoin d'injection guidée par imagerie et permet d'augmenter la distance entre le site d'injection et la zone axillaire, réduisant ainsi les phénomènes de masquage du GS.

Volume de traceurs injecté

Les volumes d'injection de traceurs décrits dans la littérature varient de 0,2 à 16 mL pour les colloïdes radioactifs et de 0,5 à 7,5 mL pour les colorants bleus^[115]. L'utilisation de grands volumes d'injection permet d'augmenter les chances de visualisation du GS.

Ainsi, en passant de volumes d'injection de traceurs radioactifs inférieurs à 3 mL à des volumes supérieurs à 8 mL, les taux d'identification du GS varient de 56 % à 100 % ^[108]. Les inconvénients liés à l'utilisation de tels volumes sont des douleurs à l'injection ^[87] et une augmentation de la zone de diffusion du traceur pouvant gêner la visualisation des GS proches ^[87,115].

Les faibles volumes de solution injectés présentent l'avantage de ne pas perturber la physiologie normale des tissus environnants ^[116], de ne pas provoquer de collapsus des vaisseaux lymphatiques ^[117] et de ne pas visualiser des ganglions non sentinelles, mais les taux d'identification peuvent être assez faibles (entre 85 % et 91 %) ^[43]. Néanmoins, il semblerait que le facteur principal expliquant les différences d'identification dans l'étude citée précédemment soit l'expérience de l'équipe chirurgicale puisque les volumes injectés aux patients n'ont pas été randomisés et les taux d'identification augmentent avec le nombre d'interventions réalisées ^[115].

Période d'apprentissage de l'équipe

Avant d'abandonner la technique du curage axillaire, il est nécessaire que l'équipe soit correctement formée à la technique du GS d'un point de vue théorique et pratique. En effet, une amélioration des taux d'identification et de faux-négatifs a été démontrée lorsque l'expérience du chirurgien augmente ^[118]. Ainsi, pour les 30 à 40 premières techniques du GS effectuées par un chirurgien, il est recommandé de procéder à un curage axillaire systématique afin de valider de bons taux d'identification et de faux-négatifs ^[59,119]. Si, au bout des 30 ou 40 premiers cas, le taux d'identification est supérieur à 90 % et le taux de faux-négatifs inférieur à 5 %, le chirurgien peut s'affranchir du curage axillaire systématique. Progressivement, la technique du GS est enseignée aux internes et il n'est plus nécessaire d'imposer aux patients de subir la double intervention dans le seul but de former le chirurgien ^[120].

C. Examen anatomopathologique du ganglion sentinelle

Alors que l'intervention chirurgicale se poursuit au bloc opératoire avec la tumorectomie, les GS, après exérèse, sont acheminés au plus vite vers le service d'anatomie pathologique afin de déterminer leur statut métastatique en peropératoire. Pour cela, deux types de technique sont utilisées en association ou non : les coupes histologiques et l'analyse par biologie moléculaire.

L'avantage de la technique du GS est de ne présenter au pathologiste qu'un groupe de 1 à 3 ganglions contre 10 à 15 en cas de curage axillaire, ce qui permet une analyse plus ciblée ^[120]. La technique utilisée doit être fortement sensible afin de déterminer correctement le statut du GS, de présager du statut axillaire et d'orienter les traitements adjuvants.

1. Différentes étapes de l'examen par coupes histologiques

La méthode classique de détection des cellules métastatiques dans le ganglion repose sur l'analyse par le médecin anatomopathologiste des coupes ganglionnaires colorées par la méthode Hématoxyline – Eosine – Safran (HES). L'utilisation de coupes sériées permet d'augmenter les taux de détection des micrométastases et de diminuer les taux de faux-négatifs ^[120]. En peropératoire, l'utilisation de coupes congelées ou par apposition permet de rendre le résultat très rapidement. Si aucune cellule métastatique n'est détectée, l'opération chirurgicale est arrêtée après la tumorectomie, mais des examens complémentaires sont requis afin de confirmer le diagnostic ^[96]. Pour cela, les GS prélevés sont fixés puis inclus en paraffine et les coupes sont colorées par HES. Si le GS négatif à l'examen extemporané se révèle être positif, le curage axillaire est programmé au cours d'une seconde intervention chirurgicale. Le résultat de cet examen définitif est rendu en général entre 5 et 10 jours après la biopsie du GS, ce qui peut retarder la mise en place des traitements adjuvants et être stressant pour le patient. Si le statut du GS est incertain, un examen immunohistochimique (IHC) peut permettre de lever les doutes. L'IHC se base sur la détection d'antigènes spécifiques des cellules épithéliales en utilisant des anticorps dirigés contre des cytokératines (CK).

Les CK (20 sous-unités différentes) sont des filaments intermédiaires du cytosquelette des cellules épithéliales ^[121] et sont considérées comme de bons marqueurs de l'envahissement métastatique des ganglions lymphatiques ^[122]. Des anticorps dirigés contre différentes CK, seules ou en association, sont utilisés pour détecter la présence de cellules épithéliales dans les GS. Alors que les CK 7, 8, 18 et 19 sont exprimées par une majorité des cellules de carcinomes mammaires, la CK 20 est pratiquement absente de l'épithélium mammaire ^[123]. Comparé à la coloration HES, l'avantage majeur de cette technique réside dans sa très bonne sensibilité ^[124]. La technique IHC permet ainsi de détecter des micrométastases (de taille comprise entre 0,2 et 2 mm) ou des cellules tumorales isolées (amas cellulaire de taille inférieure à 0,2 mm) qui n'étaient pas visibles après coloration HES.

Cependant, cette sensibilité peut être un inconvénient puisque les taux élevés de détection des cellules métastatiques par la technique IHC sont à l'origine de la surestimation du stade de la maladie chez certains patients. La technique IHC n'est pas recommandée en cas de carcinomes canaux *in situ*, pour lesquels le taux de métastases axillaire est inférieur à 1 %, mais elle est préconisée dans les cas de carcinomes lobulaires où les cellules tumorales ressemblent fortement à des cellules lymphoïdes ^[59].

L'impact des micrométastases et des cellules isolées dans le GS sur les métastases à distance est très controversé. Le risque d'envahissement des ganglions non sentinelles peut atteindre 20 à 35 % en cas de micrométastases dans le GS, mais il n'est que de 10 à 15 % en cas de cellules isolées ^[125,126]. L'ASCO recommande donc un curage axillaire en cas de découverte de micrométastases dans le GS ^[59] mais pas en cas de cellules isolées. Certains auteurs préconisent une position attentiste, après validation en réunion de concertation pluridisciplinaire.

2. Analyse par biologie moléculaire : One Step Nucleic acid Amplification (OSNA)

Les analyses histopathologiques ne permettent d'examiner qu'une faible proportion du ganglion, ce qui est l'inconvénient majeur de ce type d'analyse puisque des métastases de petite taille peuvent ne pas être repérées. En diminuant l'intervalle entre les sections, on réduit le risque de faux-négatifs lié à une investigation limitée du GS mais le nombre de lames histologiques et donc le temps consacré à l'examen par le pathologiste augmente en conséquence ^[127]. L'analyse du GS par biologie moléculaire a émergé ces dernières années et pourrait avantageusement remplacer les techniques actuelles de diagnostic peropératoire du GS. Cette technique présente l'avantage d'être hautement sensible, d'analyser l'intégralité du GS et de permettre un rendu rapide du diagnostic ^[128].

La détection des métastases après solubilisation d'une partie ou du GS entier se base sur l'amplification de l'ARNm de la CK19 et présente une excellente corrélation avec les examens histopathologiques conventionnels ^[129,130]. Plusieurs études portant sur la recherche des marqueurs idéaux des métastases du cancer du sein ont été publiées ^[122,129,131]. Alors que certains articles préconisent l'utilisation de marqueurs multiples ^[122,131], pour d'autres, la sensibilité de la technique n'est pas augmentée en ajoutant un autre marqueur (mammaglobine par exemple) à la CK19 seule ^[129,130]. La positivité de CK19 sur la tumeur primitive est généralement recommandée lors de la recherche de ce marqueur dans le GS.

Pour la détection moléculaire des métastases ganglionnaires, le GS est divisé en 4 sections dont 2 seront analysées par biologie moléculaire et 2 par coupes histologiques ^[130]. Ainsi, en cas de dysfonctions techniques de l'analyseur, l'intégralité du GS ne sera pas perdue et le diagnostic pourra être posé à l'aide des coupes histologiques ^[130]. Le délai nécessaire pour le rendu du diagnostic par OSNA, de la préparation du GS à la fin de l'analyse, varie en fonction du nombre de ganglion : de 22 min pour 1 GS à 46 min pour 4 GS dans les centres familiarisés avec cette technique ^[130].

Les avantages d'un examen OSNA en peropératoire sont multiples et concernent l'ensemble des personnes impliquées dans la biopsie du GS. Dans les services d'anatomopathologie, cette technique permet de libérer du temps médecin, de réduire les erreurs humaines étant donné que le système est en grande partie automatisé et de supprimer les variations subjectives entre pathologistes par l'utilisation de caractères objectifs ^[132]. Pour les patients, l'avantage réside dans la dispense d'une deuxième opération chirurgicale en cas d'indication de curage axillaire et enfin, pour l'hôpital et les chirurgiens, ce système permet de libérer des lits et d'optimiser l'utilisation du bloc opératoire ^[129,132].

Les inconvénients de l'OSNA sont liés au fait que la RT-PCR quantitative n'est pas capable de renseigner sur la taille des foyers métastatiques ^[129]. Cependant, la technique OSNA semble être actuellement la technique la plus sensible qui donne un diagnostic sûr et rapide et elle est sujette à se développer dans les années à venir.

La technique de biopsie du GS est aujourd'hui grandement utilisée pour le diagnostic des métastases ganglionnaires du cancer du sein grâce à ses nombreux avantages sur le curage axillaire. Néanmoins, les traceurs utilisés pour le repérage des GS ne sont pas idéaux et une alternative intéressante est apportée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge.

III. Cartographie du ganglion sentinelle par imagerie de fluorescence proche infrarouge

A. Bases théoriques de la fluorescence

La fluorescence correspond à l'émission de lumière par une molécule (un fluorophore) suite à son excitation liée à l'absorption d'un photon. Le spectre d'émission d'un composé dépend de sa structure chimique et du solvant dans lequel il est dissout ^[133].

Plusieurs caractéristiques telles que le rendement quantique de fluorescence (nombre de photons émis rapporté au nombre de photons absorbés) ou le coefficient d'extinction molaire (probabilité qu'un fluorophore absorbe un photon d'une certaine longueur d'onde dans un certain solvant) permettent de définir l'émission de fluorescence d'un fluorophore. L'intensité de fluorescence émise est directement proportionnelle au rendement quantique de fluorescence et au coefficient d'extinction molaire.

Les processus de transfert d'énergie mis en jeu entre l'absorption et l'émission de lumière peuvent être illustrés par le diagramme de Jablonski (Figure 9). Les états singulets sont notés S_0 (état fondamental), S_1 et S_2 (états excités), et seul le premier état triplet excité (T_1) est représenté. Chaque niveau d'énergie est caractérisé par différents niveaux d'énergie vibrationnelle (Figure 9).

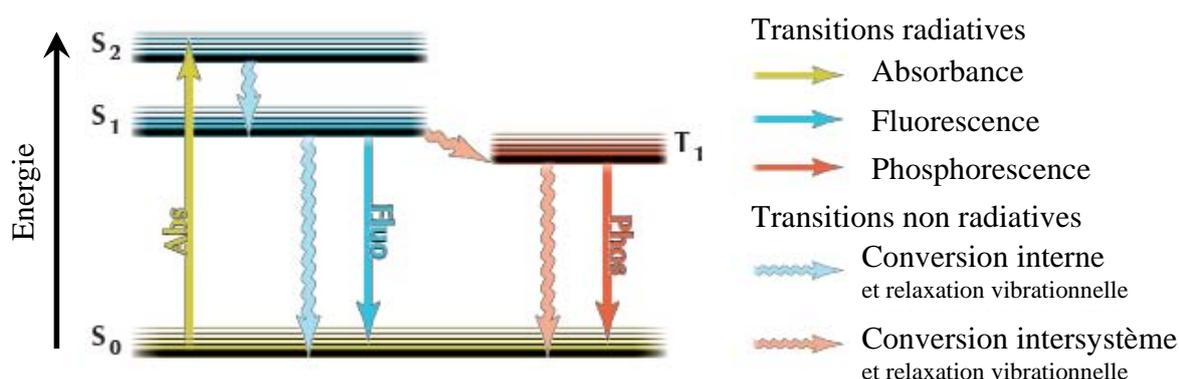


Figure 9 : Diagramme de Jablonski simplifié

A température ambiante, le fluorophore se trouve dans un état électronique stable de faible énergie : l'état fondamental (S_0). Suite à l'absorption d'une énergie lumineuse, le fluorophore occupe un état excité (S_1 ou S_2) instable de haute énergie (Figure 9). Rapidement, le fluorophore transfère l'excès d'énergie vibrationnelle aux molécules de solvant les plus proches par collision.

Le système évolue ensuite de l'état S_2 à l'état S_1 *via* des conversions internes. A partir de l'état S_1 , la molécule excitée peut retourner à son état fondamental S_0 par un mécanisme de conversion interne (émission de chaleur) ou par l'émission d'un photon (fluorescence) (Figure 9). L'énergie de ce photon correspond à l'intervalle entre l'énergie de l'état fondamental S_0 et celle de l'état excité S_1 . Les photons émis ont donc une énergie plus faible que les photons absorbés, ce qui explique que le pic d'émission de fluorescence soit décalé vers les hautes longueurs d'onde de faible énergie par rapport au pic d'absorption (effet de Stokes).

Une autre voie de relaxation des molécules contenant des atomes lourds (Br, I, ...) vers un état stable est possible par des conversions intersystèmes conduisant le système à un état triplet T_1 , responsable de l'émission de phosphorescence.

B. Avantages et inconvénients de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge

Alors que la méthode de visualisation du GS utilisant un colorant bleu et un traceur radioactif est la seule autorisée dans la technique de biopsie du GS, d'autres types d'imagerie sont aujourd'hui à l'étude. Les avantages de l'imagerie optique sont nombreux : visualisation en temps réel, facilité d'utilisation, prix abordable et absence de radiations ionisantes, rendant cette technique non invasive et parfaitement utilisable dans un contexte clinique ^[134]. Le matériel nécessaire au recueil des données de fluorescence est simple et consiste en une source d'excitation et un détecteur sensible doté des filtres adéquats pour capter les signaux de fluorescence ^[135]. Le principal inconvénient de l'imagerie est lié à la faible profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus. Cependant, cet obstacle peut être évité en utilisant les longueurs d'onde du proche infrarouge (PIR).

Alors que les photons du domaine du visible sont absorbés par les nombreux fluorochromes présents dans les tissus, les photons du proche infrarouge (680 – 900 nm) ne sont que faiblement absorbés par les tissus biologiques, ce qui permet une profondeur de pénétration de la lumière de 1 à 2 cm (Figure 10) ^[136,137]. L'utilisation de la fluorescence dans le proche infrarouge diminue le signal de fluorescence des tissus environnants, réduisant ainsi le rapport signal / bruit de fond et permettant une meilleure visualisation du fluorophore. Un avantage certain de l'imagerie de fluorescence est dû à sa forte sensibilité : la plupart des systèmes d'imagerie optique peuvent détecter de très faibles quantités de fluorophores (de l'ordre de la picomole).

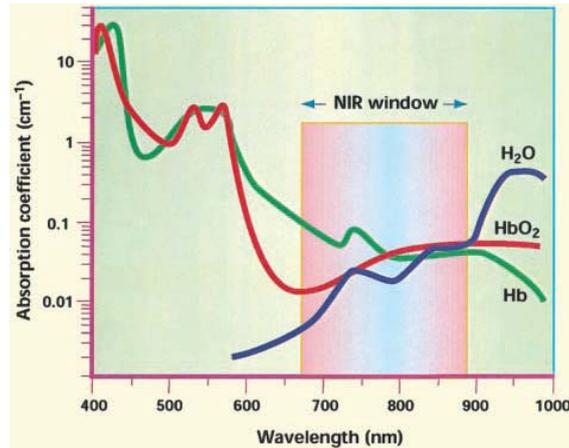


Figure 10 : Absorption de la lumière dans un tissu normalement oxygéné ^[136]
 Hb : Hémoglobine, HbO₂ : Oxyhémoglobine

Les photons de longueurs d'onde supérieures à 900 nm, quant à eux, sont fortement absorbés par l'eau tissulaire, dissipent leur énergie par de la chaleur et peuvent provoquer de nombreux dommages tissulaires. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser les longueurs d'onde du domaine de l'infrarouge dans un contexte clinique de cartographie du GS ^[134].

Les limitations de l'imagerie de fluorescence sont liées aux problèmes de propagation de la lumière dans les tissus. Pour la visualisation de structures profondes par imagerie de fluorescence, le signal détecté en surface est d'autant plus atténué que l'organe d'intérêt est profond. Plus la source de fluorescence est profonde, plus le rapport signal / bruit de fond est faible et donc plus le repérage en surface s'avère difficile ^[138].

L'imagerie de fluorescence en 2 dimensions ne permet donc pas de quantifier les concentrations en fluorophores d'un tissu en fonction de son intensité de fluorescence en surface. Une source de petite taille contenant une forte concentration en fluorophore localisée en profondeur peut donner un signal de fluorescence en surface identique à une source de grande taille contenant de faible concentration en fluorophore située à proximité de la surface (Figure 11).

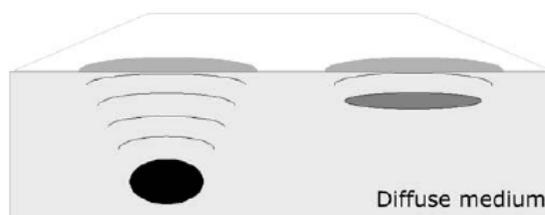


Figure 11 : Variation de la profondeur et de la quantité de fluorophores d'une source fluorescente résultant en un signal identique en surface ^[138]

Le signal de fluorescence obtenu en surface dépend donc de la profondeur de la source, de sa concentration en fluorophores et des propriétés optiques de la source et des tissus sus-jacents ^[138].

Les problèmes de quantification sont liés au fait que le transport de la lumière dans les tissus n'est pas linéaire : les photons peuvent être absorbés, diffusés, réfléchis ou réfractés (Figure 12).

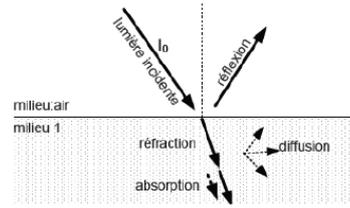


Figure 12 : Phénomènes affectant la propagation de la lumière dans les tissus biologiques

Les deux phénomènes majeurs qui régissent la propagation de la lumière dans les tissus biologiques sont la diffusion et l'absorption. Ces événements sont déterminés respectivement par le coefficient de diffusion et le coefficient d'absorption de chaque tissu ^[135]. Les principaux constituants des tissus responsables de l'absorption de la lumière sont l'hémoglobine pour les longueurs d'onde visibles et l'eau dans le domaine infrarouge. Ainsi, les tissus richement vascularisés tels que le foie, la rate ou le cœur présentent des coefficients d'absorption très élevés pour des longueurs d'onde inférieures à 600 nm ^[135].

Durant sa propagation dans les tissus, la lumière est déviée de sa trajectoire initiale de nombreuses fois à cause de la présence d'éléments diffusants. Après une courte distance (~ 1 mm), la lumière se propage dans toutes les directions de l'espace (diffusion isotropique) et rencontre de nombreuses molécules absorbantes (Figure 13).

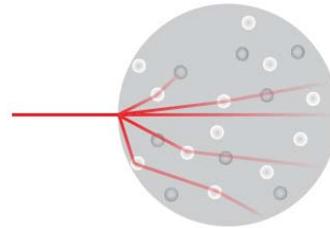


Figure 13 : Modèle de propagation de la lumière dans un milieu absorbant et diffusant ^[135]

Il s'ensuit donc une diminution rapide de l'intensité lumineuse avec l'augmentation de la distance entre la source et le détecteur de la fluorescence ^[135].

Dans le contexte clinique de repérage du GS, les données quantitatives ne sont pas nécessaires et seule la position anatomique du GS dans les tissus est importante. Une instrumentation portative et peu coûteuse d'imagerie de fluorescence permettrait de guider la chirurgie en temps réel. Etant donné que les longueurs d'onde de l'infrarouge sont invisibles à l'œil humain, il est indispensable de recourir à une instrumentation pour les visualiser.

C. Différents systèmes d'imagerie de fluorescence infrarouge

Il existe actuellement plusieurs systèmes d'imagerie de fluorescence infrarouge commercialisés permettant de visualiser en temps réel des structures d'intérêt, telles que le GS ou la perfusion d'un organe. Les caractéristiques des principaux systèmes à l'étude pour la clinique sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4 : Systèmes d'imagerie de fluorescence infrarouge commercialisés
n.m. : non mentionné

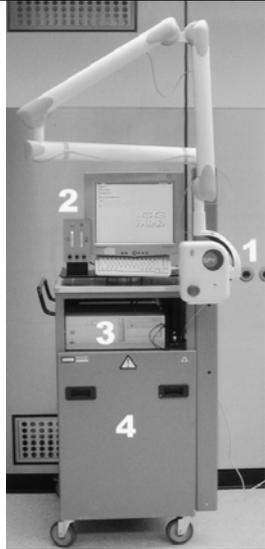
| Nom | Spy® | Photodynamic Eye | IC View |
|---------------------------------------|--|--|--|
| Fabricant, Pays | Novadaq Technologies, Canada | Hamamatsu Photonics, Japon | Pulsion Medical Systems, Allemagne |
| $\lambda_{excitation}$ | 806 nm | 760 nm | 780 nm |
| Puissance du laser | 2,0 W en sortie | n.m. | 0,16 W |
| Dimension du champ de vision | 56 cm ² | n.m. | n.m. |
| Distance tête optique/ zone d'intérêt | 30 cm | Caméra portative placée à environ 20 cm de la zone d'intérêt | Caméra portative |
| $\lambda_{émission}$ | 830 nm | < 820 nm | > 820 nm |
| Traceurs utilisés | Vert d'indocyanine | Vert d'indocyanine | Vert d'indocyanine |
| Applications | - Revascularisation des coronaires après greffe - Différenciation tissu sain / tissu tumoral | - Biopsie du GS - Perfusion périphérique des tissus et des organes - Chirurgie viscérale | - Biopsie du GS - Chirurgie viscérale - Perfusion des tissus greffés - Angiographie |
| Photo du système |  <p>1 : tête optique contenant le laser et la caméra, 2 : moniteur, 3 : unité centrale, 4 : laser</p> |  |  |
| Références | [139,140] | [141] | [142] |

Tableau 4 (suite)

| Nom | Fluobeam™ | FLARE™ | Mini-FLARE™ |
|---------------------------------------|---|---|--|
| Fabricant, Pays | Fluoptics, France | Beth Israel Deaconess Medical Center, USA | Beth Israel Deaconess Medical Center, USA |
| λ excitation | Lumière blanche + 690 nm ou 780 nm | Lumière blanche, 670 nm et 760 nm | Lumière blanche, 670 nm ou 760 nm |
| Puissance du laser | 3 mW.cm ⁻² | 4 mW.cm ⁻² (exc. 670 nm), 14 mW.cm ⁻² (exc. 760 nm) | 1 mW.cm ⁻² (exc. 670 nm), 7 mW.cm ⁻² (exc. 760 nm) |
| Dimension du champ de vision | Système portable ; champ de 6 cm de diamètre lorsque la tête est placée à 15 cm de distance | Zoom ajustable de 2,2 x 1,7 cm à 15 x 11,3 cm | 12 x 9 cm |
| Distance tête optique/ zone d'intérêt | | 45 cm | 32 cm |
| λ émission | > 700 nm ou > 800 nm | 3 filtres bande passante : 400–650 nm, 689-725 nm, 800-848 nm | |
| Traceurs utilisés | Quantum Dots, IRDye 800CW, AngioStamp® | Vert d'indocyanine, bleu de méthylène, Quantum Dots | |
| Applications | - Biopsie du GS - Visualisation des marges tumorales - Différenciation tissu sain / tissu tumoral | - Biopsie du GS - Imagerie vasculaire : perfusion cardiaque, angiographie des coronaires | |
| Photo du système |  |  |  |
| Références | [143] | [144] | [145] |

Alors que le système SPY™ de Novadaq est déjà approuvé par la FDA pour les indications de pontage coronarien, de chirurgie plastique et reconstructive ou encore de transplantations d'organes, les autres systèmes d'imageurs infrarouge sont utilisés uniquement en recherche expérimentale [145]. Ces imageurs permettent de collecter les photons émis par l'activation d'un fluorophore excitable dans le proche infrarouge. Dans la majorité des études portant sur l'imagerie infrarouge du système lymphatique, l'agent de contraste dans le proche infrarouge utilisé est le vert d'indocyanine (ICG). L'ICG possède cependant certains inconvénients comme une faible photostabilité et c'est pourquoi d'autres fluorophores, dont les propriétés peuvent être finement adaptées à l'imagerie proche infrarouge sont aujourd'hui à l'étude en recherche expérimentale.

D. Biodistribution des traceurs fluorescents selon leurs caractéristiques physico-chimiques

Outre de bonnes propriétés de fluorescence (forte brillance, faible photoblanchiment, fort rendement quantique de fluorescence, ...), les caractéristiques des traceurs utilisés dans la localisation du GS doivent être compatibles avec leur migration rapide et leur fixation au ganglion avec une haute affinité et une forte spécificité. Pour pouvoir être utilisé lors de la technique de biopsie du GS, le traceur doit migrer dans le ganglion dans un temps compatible avec la clinique (environ 30 minutes) et dans des quantités adaptées à la visualisation du GS. Le traceur doit également être retenu dans le GS suffisamment longtemps sans passer dans les ganglions non sentinelles afin de permettre la chirurgie dans un large intervalle de temps. Bien que la migration des particules dépende du flux lymphatique, qui est propre à chaque patient, les caractéristiques du traceur telles que sa taille et sa chimie de surface peuvent être modulées afin de répondre à ces critères de migration. Il est préférable également que les traceurs utilisés soient rapidement éliminés de l'organisme et ne s'accumulent pas dans un organe.

1. Taille des particules du traceur

La taille des particules est l'une des caractéristiques régissant leur capacité migratoire dans le système lymphatique. Pour pouvoir entrer dans les capillaires lymphatiques, les particules doivent être de taille inférieure à celle des pores entre les cellules endothéliales.

Les particules de très petite taille comme le colorant bleu (5 nm) ou les colloïdes d'antimoine trisulfide (3 à 12 nm) peuvent traverser les jonctions interendothéliales de 10 à 25 nm et rejoindre rapidement le GS ^[86]. L'inconvénient de ces petites particules réside dans leur diffusion rapide dans les tissus, ce qui conduit à une mauvaise définition du GS ^[146]. De plus, les cellules phagocytaires du GS ne peuvent pas toutes les capturer. Les ganglions de second échelon peuvent ainsi recevoir le flux de traceur et être marqués comme le GS ^[110].

Les particules de taille intermédiaire (20 - 50 nm) permettent de visualiser rapidement le GS, d'autant plus que leur taille se rapproche de 20 nm. Ainsi, des nanocages d'or de 30 nm migrent plus rapidement et en plus grande quantité dans le GS que les mêmes nanoparticules de 50 nm de diamètre ^[147].

Les plus grosses particules (de 100 à 1 000 nm), quant à elles, montrent des difficultés à migrer dans la matrice interstitielle ^[31] et entrent en petite quantité et plus lentement dans les vaisseaux lymphatiques ^[110].

Les vaisseaux lymphatiques collecteurs ainsi que les ganglions de second échelon sont marqués moins fréquemment qu'avec des particules de petite taille et il arrive même que ces grosses particules ne migrent pas du site d'injection ^[31,110].

Il semblerait donc que la taille optimale des particules permettant de visualiser le GS dans des durées compatibles avec la clinique soit comprise entre 10 et 100 nm ^[148]. La variation en taille des traceurs se traduit par des différences de temps de migration optimal dans le GS : entre 5 et 15 min après injection du colorant bleu, entre 21 et 60 minutes après injection de particules filtrées de radiocolloïdes (de 7 à 50 nm) et entre 61 à 240 minutes après injection de particules non filtrées (de 100 à 1 000 nm) ^[87].

La taille des nanoparticules est un facteur important influençant la biodistribution et l'excrétion du traceur. Le rein agissant comme un filtre, les nanoparticules de taille inférieure à 5,5 nm peuvent être éliminées par la voie urinaire ^[149,150]. En revanche, les plus grosses particules sont captées par le système réticuloendothélial et sont piégées par les macrophages du foie et de la rate ^[149,151-154] ou bien sont excrétées par la voie hépatobiliaire, si les nanoparticules entrent dans les hépatocytes ^[155,156]. Au delà d'une taille de 5,5 nm, aucune différence de biodistribution ou d'excrétion n'est observée avec l'augmentation de taille des nanoparticules ^[157,158].

2. Chimie de surface du traceur

i. Hydrophilicité

Une bonne solubilité ainsi qu'une stabilité dans le temps sont des prérequis essentiels avant toute injection *in vivo* des traceurs. Dans le cas d'un traceur hydrophobe, différentes stratégies peuvent être adoptées afin de rendre ce composé soluble dans les milieux aqueux. La technique la plus utilisée actuellement consiste à incorporer le composé non polaire dans une micelle de polymères amphiphiles afin de pouvoir l'utiliser dans un environnement polaire ^[159,160].

ii. Charge de surface

Des études préliminaires ont précisé que la vitesse de transport et la capture des particules dans les lymphatiques étaient intimement liées à leur charge et à leur hydrophobicité ^[161].

Ainsi, le taux de drainage des particules du point d'injection jusqu'aux ganglions et leur distribution dans le système lymphatique dépend fortement du potentiel zêta^j (ζ) des particules injectées. En ajoutant un groupement méthyle (neutre), amine (charge positive) ou carboxyle (charge négative) aux groupements de surface de nanocages d'or, la charge électrique de surface des nanoparticules s'en trouve modifiée, ce qui influence les vitesses de transport vers le GS : les nanoparticules neutres ou chargées négativement migrent plus vite vers le GS que les nanoparticules chargées positivement ^[147]. De plus, les nanoparticules chargées négativement ne s'accumulent pas seulement dans le GS mais aussi dans les vaisseaux lymphatiques adjacents, ce qui permet de suivre le vaisseau lymphatique jusqu'au GS, facilitant ainsi la biopsie ^[147]. En revanche, d'autres études n'ont montré aucune différence de migration des nanoparticules dans les ganglions lymphatiques en fonction de leur charge de surface ^[152,157].

La charge électrique de surface d'un traceur sous forme nanoparticulaire influence fortement l'opsonisation des nanoparticules, ce qui impacte leur élimination par le SRE. Les nanoparticules chargées présentent, à cause de l'augmentation de l'adsorption des protéines plasmatiques, un taux de capture plus élevé que les nanoparticules neutres ^[149,162-164].

La charge de surface permet également de prédire la stabilité des nanoparticules : un potentiel ζ inférieur à - 25 mV ou supérieur à + 25 mV rend les nanoparticules fortement chargées, ce qui assure leur stabilité colloïdale dans l'eau grâce aux forces de répulsions électrostatiques entre particules ^[163]. Dans l'intervalle [- 25 mV ; + 25 mV], la stabilité colloïdale dans l'eau n'est pas assurée.

iii. PEGylation

Afin d'échapper à la reconnaissance par le SRE, des groupements chimiques peuvent être greffés à la surface des nanoparticules afin de retarder leur opsonisation. La diminution de l'opsonisation du traceur réduit sa capture par le SRE et en particulier sa rétention dans le foie et la rate.

Le poly(éthylène glycol) (PEG) est le groupement le plus efficace et donc le plus utilisé afin de retarder l'opsonisation des particules mais d'autres groupements tels que les polysaccharides, l'alcool polyvinylique ou encore les poloxamères peuvent aussi être employés ^[38]. Le PEG est un polymère faiblement toxique, non immunogène et approuvé par la FDA pour une utilisation clinique ^[162,165].

^j Potentiel zêta : Charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent en solution.

Les groupements PEG constituent une barrière stérique réduisant les interactions non spécifiques avec les protéines et ainsi l'opsonisation ^[166]. La répulsion des protéines par les groupements PEG greffés à la surface des nanoparticules serait liée à leur conformation ^[38]. La conformation des chaînes de PEG à la surface des nanoparticules est variable en fonction de la densité de greffage des polymères : une faible densité laisse une grande amplitude de mouvement aux groupements PEG, qui se disposent en une conformation « champignon » (Figure 14 A), alors qu'à forte densité, la mobilité restreinte des PEG est responsable d'une conformation « en brosse » des chaînes de PEG (Figure 14 B) ^[167].

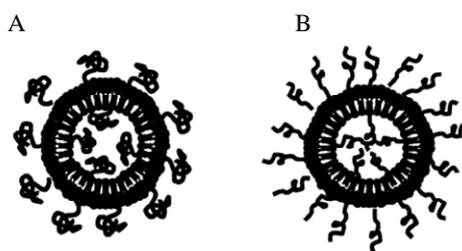


Figure 14 : Représentation schématique des chaînes de PEG à la surface d'une nanoparticule ^[167]
A : conformation "champignon" à faible densité de greffage, B : conformation en "brosse" à forte densité.

Il semblerait qu'une conformation intermédiaire entre « champignon » et « brosse » des chaînes de PEG à la surface des nanoparticules soit la plus adaptée pour éviter les trous entre les chaînes permettant l'adsorption des protéines et une conformation trop rigide empêchant sa flexibilité. La longueur des chaînes de PEG peut également être ajustée afin de réduire l'opsonisation. La quantité de protéines adsorbées sur les nanoparticules peut être réduite de moitié en augmentant la longueur de la chaîne faisant passer la masse molaire du PEG de 2 000 à 5 000 kDa. Les groupements PEG de faibles masses molaires ne seraient pas efficaces dans la répulsion des protéines à cause de la flexibilité limitée des courtes chaînes de PEG et de la faible épaisseur de la couche protectrice ^[38,168]. En revanche, au-delà de 5 000 kDa, aucune diminution de l'adsorption des protéines plasmatiques n'a pu être mise en évidence ^[166]. Comparé à des nanoparticules « nues », les nanoparticules pegylées présentent une biodistribution totalement différente : le temps de circulation des nanoparticules dans le sang est fortement augmenté et l'accumulation dans le foie est nettement ralentie pour les nanoparticules pegylées ^[168]. Cette caractéristique est particulièrement importante pour la visualisation des GS puisque l'augmentation de la rétention par le SRE réduit la capture des nanoparticules par les ganglions lymphatiques ^[151].

En augmentant la densité et la longueur des chaînes de PEG à la surface des nanoparticules, leur opsonisation peut ainsi être réduite, permettant une augmentation de leur temps de circulation dans l'organisme et une meilleure séquestration par les GS ^[151,152,168].

Cependant, l'augmentation de la longueur des chaînes de PEG accroît leur encombrement stérique, ce qui peut ralentir leur excrétion urinaire. Alors que des nanoparticules recouvertes de PEG 250 kDa sont excrétées rapidement (15 min) par la voie rénale, ces mêmes nanoparticules dotées de PEG 2 000 kDa circulent plus longtemps dans le sang et sont éliminées plus lentement (1 h) ^[163]. Néanmoins, le taux d'excrétion urinaire est toujours plus important pour les nanoparticules pegylées que pour les nanoparticules non pegylées ^[152]. Il est important de noter que la longueur des PEG joue également un rôle sur le potentiel ζ des nanoparticules : les nanoparticules pourvues de PEG 250-COOH sont chargées négativement à pH 7,4 alors qu'elles sont neutres en présence de PEG 2000-COOH ^[163].

Dans la cadre de la visualisation du GS, l'injection des traceurs se fait en sous-cutanée (sc.), afin que le traceur rejoigne les ganglions par les vaisseaux lymphatiques. Les études de biodistribution sont réalisées en majorité suite à des injections intraveineuses (iv.) de nanoparticules, ce qui ne reflète pas la biodistribution de ces nanoparticules suite à une injection sc.. La clairance sanguine des nanoparticules injectées en iv. se fait rapidement vers le foie et la rate alors que les nanoparticules injectées en sc. ne sont retrouvées dans le sang qu'au bout de 9 h ^[169] et en plus faible quantité (0,2 % de la dose injectée 24 h après administration) ^[170]. Quand les particules injectées en sc. se retrouvent dans la circulation générale, elles suivent la même distribution que les nanoparticules injectées par la voie iv., avec un ratio d'accumulation dans les organes du SRE entre 14 et 18 fois inférieur ^[169,170]. En revanche, les nanoparticules injectées en sc. s'accumulent préférentiellement dans les ganglions lymphatiques à proximité du site d'injection ^[169-171].

Après avoir détaillé les avantages de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge et les caractéristiques des nanoparticules permettant une bonne migration dans le GS, nous allons maintenant décrire les différents types de nanoparticules à l'étude dans la visualisation du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge.

IV. Nanoparticules fluorescentes utilisées dans le repérage du ganglion sentinelle

Les fluorophores utilisés dans le repérage du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge sont de 2 natures différentes : les nanoparticules inorganiques et les fluorophores organiques.

Les nanoparticules inorganiques sont composées par les Quantum Dots et les nanoparticules up-converted. Les nanoparticules up-converted absorbent dans le proche infrarouge et émettent dans le visible. Elles ne seront pas traitées dans ce manuscrit puisqu'elles n'émettent pas de fluorescence dans le proche infrarouge.

La liste des fluorophores organiques est longue mais les fluorophores les plus utilisés sont les cyanines, qui possèdent un important coefficient d'extinction molaire et un fort rendement quantique de fluorescence. Les cyanines sont composées de deux hétérocycles aromatiques azotés liés par un pont polyméthine, dont la longueur est proportionnelle à la longueur d'onde d'émission de fluorescence de la cyanine. Ainsi, la cyanine 3 (pont triméthine) émet dans le visible alors que la cyanine 7 émet dans le proche infrarouge. Cependant, ces composés comportent, entre autres, les inconvénients suivants : leur petite taille ne permet pas leur rétention dans le GS et favorise leur passage dans les ganglions de 2nd échelon, leur stabilité n'est pas toujours suffisante et certains fluorophores ne sont pas utilisables dans les milieux biologiques à cause de leur caractère hydrophobe ^[172]. Ces défauts peuvent toutefois être résolus en encapsulant les fluorophores organiques dans des nanoparticules. Les nanoparticules peuvent être constituées par des protéines (couplage de l'ICG à des nanoparticules d'albumine ^[173]), des lipides (encapsulation de l'ICG dans des Lipidots ^[174]), des polysaccharides (greffage de cyanine 5.5 à du dextran ^[175]), des polymères synthétiques (incorporation de molécules de rhodamine B à des particules de latex ^[176]), ou encore, en conjuguant un fluorophore organique à une matrice de silice ^[177]. La taille de la nanoparticule peut ainsi être adaptée pour une bonne migration dans le GS. Le fluorophore étant protégé par la nanoparticule, sa stabilité est maintenue et l'hydrophilicité de l'ensemble est assurée. Comparées aux polymères, les nanoparticules de silice présentent les avantages suivants : synthèse plus simple, nanoparticules plus stables, plus hydrophiles et biocompatibles. C'est pour ces raisons que les nanoparticules de silice suscitent actuellement un grand intérêt et ce, dans de multiples applications biologiques ^[178].

Quelles que soient les nanoparticules utilisées, leur toxicité doit rester dans des limites acceptables. Les facteurs tels que la taille, la charge de surface et la solubilité des nanoparticules sont les points majeurs à contrôler afin d’avoir la meilleure biocompatibilité possible (Figure 15) [179]. La taille des nanoparticules permet, par exemple, de prédire la voie de clairance empruntée.

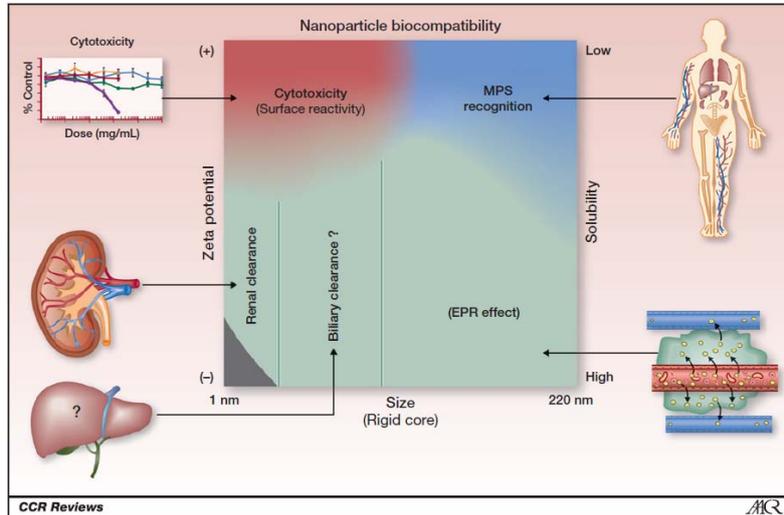


Figure 15 : Facteurs affectant la biocompatibilité des nanoparticules [179]

A. Quantum Dots

Les Quantum Dots (QDs ou points quantiques) sont des nanocristaux fluorescents sphériques de semi-conducteurs, qui présentent des propriétés photophysiques remarquables. L’hydrophilicité des QDs est assurée par la présence d’un revêtement de surface permettant leur utilisation dans les milieux biologiques.

1. Propriétés photophysiques de la structure cœur/coque des Quantum Dots

i. Rôle du cœur dans la fluorescence des Quantum Dots

Le cœur des QDs est composé de centaines voire de milliers d’atomes des groupes II - IV (ex. CdSe ou CdTe), III - V (ex. InP ou InAs) ou encore I - III - IV (ex. CuInS₂). La miniaturisation des semi-conducteurs sous la forme nanoparticulaire fait apparaître de nouvelles propriétés qui n’existaient pas dans la forme massive du semi-conducteur. En effet, à cette échelle de taille, l’association d’éléments semi-conducteurs produit une fluorescence présentant des caractéristiques très intéressantes.

A l'intérieur d'un solide, les électrons ne peuvent prendre des valeurs d'énergie comprises que dans certains intervalles, les bandes d'énergie, qui sont séparées par des bandes d'énergie interdites. La dernière bande d'énergie complètement remplie par des électrons à leur état fondamental (non excité) est appelée « bande de valence » et la bande qui la suit se nomme « bande de conduction ».

L'énergie qui sépare ces deux bandes est appelée « bande gap » ou « energy gap ». Alors que dans un matériau conducteur, la bande de valence et la bande de conduction se chevauchent, permettant le passage des électrons de l'une à l'autre, dans un matériau isolant, la bande de valence et la bande de conduction sont séparées par un large bande gap, ne permettant pas le passage d'électrons de la bande de valence vers la bande de conduction (Figure 16). Dans un semi-conducteur, le bande gap est plus faible, permettant le passage des électrons vers la bande de conduction en cas d'apport d'énergie externe, comme par exemple, lors de l'absorption d'un photon (Figure 16) ^[180].

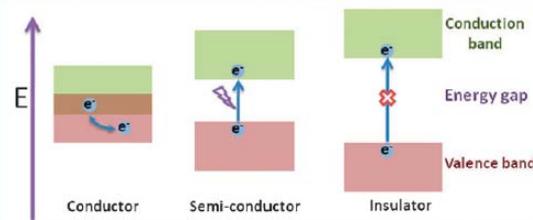


Figure 16 : Structure électronique d'un matériau conducteur, semi-conducteur ou isolant ^[180]

Les QDs sont des particules dont le diamètre du cœur est compris entre 2 et 10 nm. Cette petite taille est à l'origine du confinement quantique des électrons dans les trois dimensions. Ce confinement limite le nombre de niveaux d'énergie qu'un électron peut occuper (Figure 17). Lors de l'excitation de ce cristal par l'absorption d'un photon d'énergie équivalente à l'énergie du bande gap, un électron excité de la bande de valence peut occuper un niveau d'énergie de la bande de conduction, ce qui crée, en parallèle, un « trou » dans la bande de valence. Une telle transition est donc à l'origine d'une paire électron-trou ou exciton dans le cristal. Lorsque l'électron excité retourne à son état fondamental, il se recombine avec le « trou » de la bande de valence en émettant de l'énergie sous forme d'un photon dont l'énergie est équivalente à celle du bande gap ^[181].

En diminuant la taille du cœur du QD, le confinement des électrons augmente, ce qui accroît l'énergie du bande gap (Figure 17).

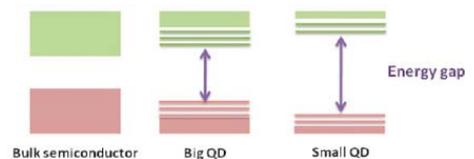


Figure 17 : Structure électronique des semi-conducteurs sous forme massive ou nanoparticulaire ^[180]

Tous les photons du spectre UV-visible ayant une énergie supérieure à celle du bande gap peuvent être absorbés par les QDs. En faisant varier la composition du cœur du QD, la bande d'énergie interdite varie également. L'énergie du photon émis étant lié à la valeur d'énergie du bande gap, une variation de la taille du bande gap est synonyme d'une modification de la longueur d'onde du photon émis.

Pour les petits QDs dont le bande gap est important, l'énergie du photon émis est élevée, ce qui signifie que sa longueur d'onde est faible. A l'inverse, les gros QDs présentent un faible bande gap et émettent des photons de faible énergie et donc de grande longueur d'onde (Figure 18).

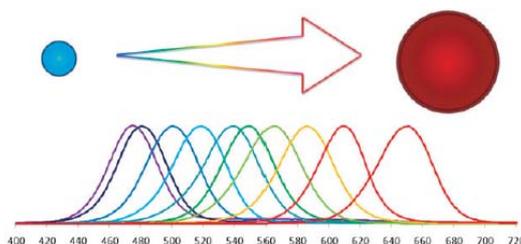


Figure 18 : Longueur d'onde d'émission des QDs de composition identique en fonction de leur taille ^[180]

ii. Importance de la couche inorganique recouvrant le cœur des Quantum Dots

Les QDs composés uniquement d'un cœur de semi-conducteurs sont instables et peuvent rapidement être dégradés par photooxydation, engendrant une toxicité liée à la libération d'ions de métaux lourds ^[182]. Le rendement quantique de tels QDs étant faible, leur utilité reste minime. Ces deux problèmes sont liés à la structure même du QD combinant un très grand nombre d'atomes en surface à un faible volume de nanoparticule. A l'échelle nanométrique, les atomes de surface jouent un rôle majeur dans les propriétés catalytiques, électroniques et optiques. Lorsque le diamètre d'une nanoparticule sphérique diminue, le ratio de sa surface sur son volume augmente rapidement, plaçant un grand nombre d'atomes en surface. Ces atomes de surface, ne pouvant pas établir de liaisons chimiques avec des molécules voisines, se retrouvent avec des orbitales électroniques inoccupées. Ces orbitales peuvent piéger les porteurs de charges que sont les électrons excités de la bande de conduction, empêchant ainsi la recombinaison de la paire électron-trou à l'origine de l'émission d'un photon, et diminuant donc le rendement quantique de fluorescence des QDs ^[180]. Ces atomes de surface présentent une forte réactivité chimique vis-à-vis de l'environnement proche du QD et sont à l'origine de l'instabilité chimique de la nanoparticule. Afin de prévenir ces effets indésirables, les liaisons chimiques libres de surface peuvent être saturées par la présence d'une couche inorganique.

La couche inorganique est, de façon générale, composée d'une association d'atomes de Cd, Zn, S ou Se. Cette couche présente un bande gap de haute énergie, confinant de façon efficace les électrons à l'intérieur du cœur du QD et augmentant ainsi son rendement quantique de fluorescence ^[180]. Cependant, l'épaisseur de cette coque doit être optimisée afin de protéger le cœur du QD de la photooxydation et de la dégradation sans altérer ses propriétés photophysiques.

iii. Avantages des Quantum Dots par rapport aux fluorophores organiques

Les QDs présentent de forts coefficients d'extinction molaire (de l'ordre de 0,5 à $5.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), ce qui, associé à un bon rendement quantique de fluorescence, les rend très brillants, même dans les conditions *in vivo* où les intensités lumineuses sont fortement atténuées par les phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière ^[183]. Avec des rendements quantiques de fluorescence équivalents mais des coefficients d'extinction molaire plus faibles (de l'ordre de 5 à $10.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), les fluorophores organiques sont beaucoup moins brillants que les QDs ^[183].

Une structure cœur / coque produit des QDs avec une photostabilité exceptionnelle, plusieurs milliers de fois supérieure à celle obtenue avec les fluorophores organiques. Ainsi, un QD peut être illuminé de façon continue pendant plus de 30 minutes sans perdre en intensité de fluorescence alors qu'un fluorophore organique subira un photoblanchiment en quelques secondes (Figure 19) ^[183].

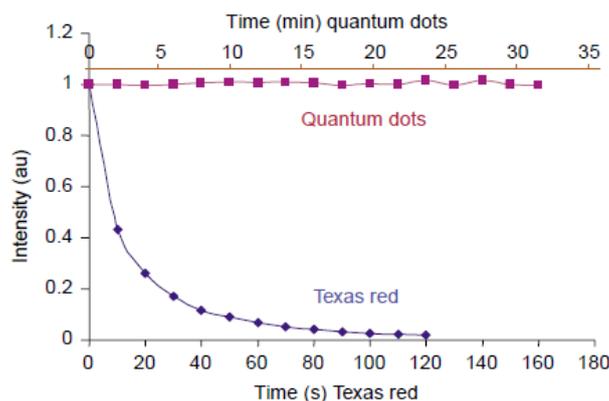


Figure 19 : Courbes de photoblanchiment de QDs et d'un fluorophore organique au cours du temps sous les mêmes conditions d'excitation ^[183]

A la différence des fluorophores organiques, l'absorbance des QDs augmente vers les faibles longueurs d'onde (Figure 20 A). Cette caractéristique des QDs est particulièrement intéressante puisqu'elle permet d'utiliser une seule source lumineuse pour exciter des QDs de différentes tailles et donc émettant à différentes longueurs d'onde (Figure 20 B) ^[180].

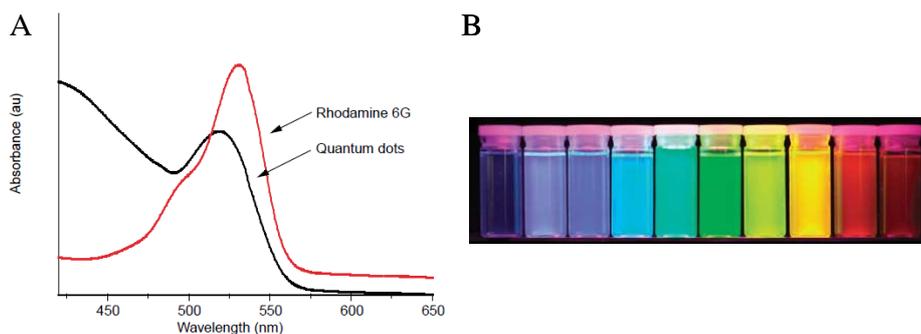


Figure 20 : Absorption et émission des Quantum Dots

A. Comparaison des spectres d'absorption d'un QD (noir) et d'un fluorophore organique (rouge) ^[184].
 B. Emission de QDs de taille variable suite à une excitation par une lampe UV ^[180].

L'intervalle entre le pic d'excitation et le pic d'émission de fluorescence d'une molécule est appelé le décalage de Stokes. Pour les QDs, qui sont excitables sur un large intervalle de longueur d'onde, le décalage de Stokes peut atteindre 300 à 400 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation choisie ^[183]. En revanche, les fluorophores organiques présentent un faible décalage de Stokes, ce qui peut nuire à la séparation entre le signal d'excitation et le signal d'émission ^[172].

En fonction de la distribution en taille des QDs, la largeur du pic d'émission peut être finement réglée. Pour des échantillons de QDs monodisperses, le pic d'émission est relativement symétrique avec une faible largeur à mi-hauteur alors que le pic d'émission des fluorophores organiques est souvent asymétrique, présentant une queue du côté des grandes longueurs d'onde et une importante largeur à mi-hauteur ^[172].

L'avantage des QDs par rapport aux fluorophores organiques réside donc dans le fait qu'ils présentent des caractéristiques de fluorescence mieux adaptées à l'imagerie *in vivo*.

2. Solubilisation des Quantum Dots

La synthèse en phase organique aboutit à la production de QDs hydrophobes solubles uniquement dans des solvants organiques non polaires, comme le chloroforme ou l'hexane. Cependant, pour être utilisables dans les milieux biologiques, les QDs doivent être solubles dans l'eau. La procédure permettant d'obtenir des nanocristaux hydrosolubles et stables dans les milieux biologiques doit préserver les propriétés photophysiques originales et la petite taille des QDs, tout en fournissant des groupements réactifs pour une éventuelle conjugaison avec des biomolécules ^[180].

Deux approches sont aujourd'hui largement utilisées : l'échange de ligands (Figure 21 A) et l'encapsulation en micelle (Figure 21 B).

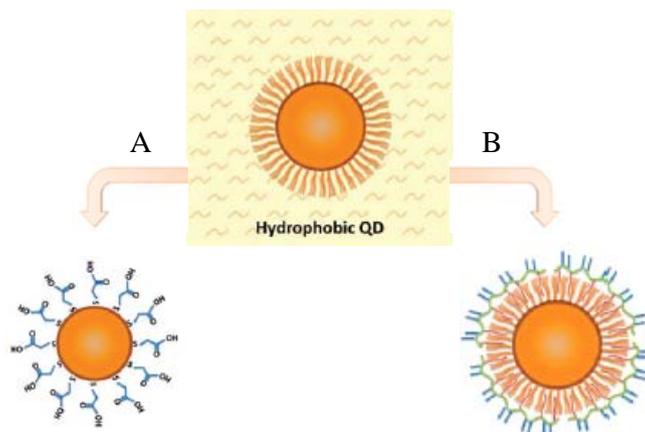


Figure 21 : Méthodes de solubilisation des QDs hydrophobes ^[180]

A : Echange des ligands hydrophobes par des groupements acide mercaptopropionique hydrophiles.

B : Encapsulation avec des polymères amphiphiles.

La méthode d'échange de ligands consiste à remplacer les groupements hydrophobes de surface par des groupements hydrophiles (Figure 21 A). Les groupements hydrophobes (TOPO pour trioctyl phosphine oxyde) sont substitués par des ligands bi-fonctionnels (acide mercaptoacétique, cystéine, ...) avec une partie permettant l'ancrage à la surface du QD et une partie hydrophile. Cette méthode présente l'avantage d'engendrer des QDs hautement hydrosolubles et de petite taille (diamètre hydrodynamique inférieur à 6 nm), avec des possibilités de liaison *via* les groupements hydrophiles avec des molécules d'intérêt ^[180]. Cependant, le départ des ligands hydrophobes peut provoquer une agrégation des nanoparticules. La méthode d'échange de ligands altère donc souvent l'efficacité de fluorescence et la stabilité photochimique des QDs ^[180].

La deuxième méthode permettant de rendre les QDs hydrosolubles consiste à encapsuler les ligands hydrophobes natifs dans une micelle de molécules amphiphiles telles que les phospholipides (Figure 21 B). La partie hydrophobe de ces molécules s'intercale entre les chaînes alkyles des ligands de surface alors que la partie hydrophile interagit avec le solvant aqueux ^[180]. Cette méthode produit des QDs hydrosolubles très stables et dont les propriétés optiques sont conservées puisque ce revêtement de surface n'interfère pas avec la structure cœur / coque du QD. Cependant, l'ajout d'une couche de ligands organiques augmente la taille de la nanoparticule ce qui peut entraver sa pénétration cellulaire ^[180].

La chimie de surface des QDs peut ensuite être fonctionnalisée (avec des anticorps ^[185], des acides nucléiques ^[186], ...) en vue d'une application spécifique des QDs, combinant ainsi les bonnes propriétés photophysiques du QD et les fonctions biologiques du ligand attaché.

3. Toxicité des Quantum Dots et solutions pour la limiter

Pour pouvoir utiliser des nanoparticules dans un but diagnostique, il est important de s'assurer de leur faible toxicité. Les QDs, à cause de leur contenu en métaux lourds, sont souvent considérés comme trop toxiques pour une utilisation clinique ^[187]. De récentes études ont pourtant montré que des solutions existent afin de limiter leur impact néfaste sur l'organisme ^[188].

La toxicité intrinsèque des nanoparticules dépend de plusieurs paramètres tels que la taille ^[189], la forme ^[190,191], la composition ^[192,193], la charge ^[189], la dose ^[160,194] ou les caractéristiques du revêtement de surface ^[195].

La majorité des QDs dont la toxicité a été étudiée ont un cœur composé de cadmium, dont la demi-vie biologique chez l'Homme est de 15 à 20 ans. Les ions Cd^{2+} sont connus pour être associés à des lésions du foie et des reins, des problèmes neurologiques et des cancers ^[187,196]. La toxicité des QDs composés exclusivement d'un cœur à base de cadmium (CdTe ou CdSe) est liée au relargage d'ions Cd^{2+} dans les cellules, à cause de l'oxydation des QDs par l'oxygène de l'air et les rayons UV. Il en résulte la formation d'espèces réactives de l'oxygène, affectant la mitochondrie et l'ADN et conduisant à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose ^[197-199]. Plus la taille des QDs diminue, plus le ratio du nombre d'atomes en surface sur le nombre total d'atomes est élevé donc plus la réactivité chimique des QDs avec leur environnement est importante et plus les QDs sont toxiques ^[198]. La petite taille des QDs leur permet également de pénétrer plus facilement dans le noyau des cellules ^[189,200]. Pour réduire l'oxydation du cœur des QDs, il est possible d'ajouter une couche de ligands (ZnS ^[201], DHLA ^[202], BSA ^[189,197,203], polyacrylate ^[204]) autour du cœur afin de limiter l'arrivée de l'oxygène jusqu'à la surface des QDs. L'ajout d'une couche protectrice limite fortement mais n'empêche pas complètement le relargage *in vitro* d'ions Cd^{2+} ^[197].

La toxicité des QDs peut être également liée à leur précipitation à la surface des cellules, due à la présence d'un revêtement de surface polymérique ^[198] ou bien à leur agrégation si les ligands de surface sont dégradés dans l'organisme ^[199]. La chimie de surface des QDs doit donc être optimisée afin de s'assurer de la stabilité des nanoparticules. Il a également été montré que la toxicité des QDs pouvait être attribuée à la présence de résidus de revêtement de surface dans les solutions de QDs.

Il est donc important d'éliminer toute trace de précurseurs de synthèse avant l'administration des QDs [195]. En revanche, certaines études *in vitro* n'ont pas relaté de cytotoxicité des QDs [205,206].

Alors que la toxicité *in vitro* des QDs a été étudiée par de nombreuses équipes, leur toxicité *in vivo*, qui dépend de la dose, de la voie d'administration, du métabolisme et de la réponse immunitaire des animaux, n'a été que faiblement explorée. Les résultats des études de biodistribution permettent d'identifier les organes et les cellules cibles et ainsi d'orienter les tests de toxicité.

In vivo, les QDs sont phagocytés par les macrophages du SRE, ce qui les expose à un environnement très oxydant (H₂O₂). Les phénomènes inflammatoires ayant lieu sur le site d'injection peuvent également être responsables de leur oxydation. Cette oxydation peut conduire à une toxicité aigüe et engendrer des séquelles chroniques [197]. Cependant, plusieurs études *in vivo* montrent que, suite à leur injection iv., les QDs ne semblent pas être dégradés et les taux de cadmium endogènes sont négligeables. De plus, aucun changement dans le comportement des animaux, leur masse corporelle, l'histologie des tissus ou les marqueurs biochimiques et hématologiques n'ont pu être enregistrés [151,207-210]. Les QDs, à faibles doses, ne semblent pas impacter le développement embryonnaire puisque, suite à leur injection dans les blastomères de Xénope, les embryons présentent un phénotype normal [160].

Etant donné les formidables caractéristiques photophysiques des QDs, les doses injectées aux animaux reste relativement faibles (de l'ordre de la picomole), ce qui limite leur toxicité. Cependant, il est important de s'assurer de la stabilité, de la biocompatibilité et de la sécurité à long terme des QDs avant toute utilisation *in vivo*. Dans le cadre de la visualisation du GS, les QDs seraient injectés en sc. à proximité de la tumeur, ce qui restreint grandement leur passage dans la circulation sanguine. Au moment de l'exérèse tumorale, la majorité des QDs, présents au site d'injection, serait retiré, limitant ainsi leur migration dans l'organisme. Des QDs dépourvus de cadmium sont maintenant à l'étude pour l'imagerie de fluorescence proche infrarouge puisque depuis peu, la synthèse de ces QDs a fourni des nanoparticules stables et présentant des caractéristiques photophysiques adaptées. Exemptés d'éléments toxiques, ces QDs sont supposés être moins délétères que les QDs-cadmium, mais ce point reste à confirmer.

4. Conception des Quantum Dots pour l'imagerie infrarouge des tissus profonds

Les développements récents dans la synthèse de nouveaux QDs et leurs différentes applications dans l'imagerie *in vivo* telles que la localisation du GS, l'imagerie du système vasculaire, la localisation de tumeurs ainsi que le suivi de cellules dans l'organisme ont fait l'objet d'une revue de la littérature rédigée par notre équipe, en collaboration avec le laboratoire de physique et d'étude des matériaux de l'ESPCI (Paris).

Design of new Quantum Dot Materials for Deep Tissue Infrared Imaging

*E. Cassette**, ***M. Helle****, *L. Bezdetnaya*, *F. Marchal*, *B. Dubertret*, *T. Pons*

Advanced Drug Delivery Reviews

Article accepté sous presse

ARTICLE IN PRESS

ADR-12362; No of Pages 13

Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Advanced Drug Delivery Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/addrDesign of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging[☆]Elsa Cassette^{a,1}, Marion Helle^{b,c,d,1}, Lina Bezdetsnaya^{b,c,d}, Frédéric Marchal^{b,c,d,*},
Benoit Dubertret^{a,*}, Thomas Pons^{a,*}^a LPEM, ESPCI/CNRS/UPMC UMR 8213, 10, Rue Vauquelin, 75005 Paris, France^b Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Campus Sciences, BP 70239, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France^c CNRS, CRAN, UMR 7039, France^d Centre Alexis Vautrin, CRLCC, avenue de Bourgogne, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54511, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2011

Accepted 24 August 2012

Available online xxxxx

Keywords:

Near infrared fluorescence

In vivo imaging

Quantum dots

Nanocrystals

ABSTRACT

Near infrared fluorescence offers several advantages for tissue and *in vivo* imaging thanks to deeper photon penetration. In this article, we review a promising class of near infrared emitting probes based on semiconductor quantum dots (QDs), which have the potential to considerably improve *in vivo* fluorescence imaging thanks to their high brightness and stability. We discuss in particular the different criteria to optimize the design of near infrared QDs. We present the recent developments in the synthesis of novel QD materials and their different *in vivo* imaging applications, including lymph node localization, vasculature imaging, tumor localization, as well as cell tracking and QD-based multimodal probes.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

| | |
|--|---|
| 1. Introduction | 0 |
| 2. QD synthesis | 0 |
| 2.1. Group IV (Si, Ge, C) | 0 |
| 2.2. Group I–VI (Ag ₂ S, Ag ₂ Se, Ag ₂ Te) | 0 |
| 2.3. Groups II–VI and II ₃ –V ₂ | 0 |
| 2.4. Group IV–VI (PbS, PbSe) | 0 |
| 2.5. Group III–V (InP, InAs) | 0 |
| 2.6. Group I–III–VI ₂ (CuInS ₂ , CuInSe ₂ , AgInSe ₂) | 0 |
| 2.7. NIR emitting doped nanocrystals | 0 |
| 2.8. Quick overview of QD surface chemistry | 0 |
| 3. <i>In vivo</i> imaging applications | 0 |
| 3.1. Lymph node imaging | 0 |
| 3.2. Vasculature imaging; renal elimination vs. sequestration | 0 |
| 3.3. Tumor imaging | 0 |
| 3.4. Cell tracking | 0 |
| 3.5. Multimodal QDs | 0 |
| 4. Conclusion and perspectives | 0 |
| References | 0 |

1. Introduction

The field of biomedical optics has matured rapidly during the last ten years, and is expected to continue its maturation even further in the next few years. The use of photons as a source of information to diagnose or to treat is as old as medicine. Together with the touch, photon detection, first performed with the eye, provides a rapid, immediate and cheap

[☆] This review is part of the *Advanced Drug Delivery Reviews* theme issue on "Inorganic nanoparticle platforms".

* Corresponding authors.

E-mail addresses: f.marchal@nancy.fnclcc.fr (F. Marchal), benoit.dubertret@espci.fr (B. Dubertret), thomas.pons@espci.fr (T. Pons).

¹ These authors contributed equally to this work.

ARTICLE IN PRESS

2

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

method for diagnosis and patient treatment. In spite of these great advantages, biomedical optics is strongly limited because photons are scattered and absorbed very efficiently by the tissues. The penetration depth of photons inside a tissue depends strongly on the type of tissue [1], but most importantly, it depends on the wavelength, λ , of the photon used. Scattering decreases proportionally to λ^{-2} , where λ depends on the tissue composition. Absorption is minimal between 700 nm and 1300 nm. Before 700 nm various proteins such as hemoglobin absorb strongly, while after 1300 nm water absorption becomes dominant. This spectral range is usually separated into two distinct NIR windows [1,2]. The first and most commonly used near infrared (NIR) optical window of optimal transparency lies in the range of 700–950 nm. The other NIR window extends from 1000 nm to 1300 nm and is often referred to as the second optical window for *in vivo* imaging. However, there have been so far few biocompatible fluorophores emitting in this region. In these NIR regions, the photons can be detected at much greater tissue thicknesses, and observation can be performed at greater depth. Excitation and/or emission in the NIR window result in lower background fluorescence, lower signal loss and thus greater signal/background ratio. Unfortunately, the eye sensibility decreases abruptly after 700 nm, so that NIR photons are badly—if at all—detected by the human eye in the NIR window.

Recent technological developments have helped triggered a renewed interest in biomedical optics. These developments include cheap NIR photon sources such as laser diodes in the NIR, cheaper and efficient NIR detector, as well as novel NIR probes.

The review we present here is dedicated to the recent development of NIR emitting semiconductor nano-particles known as quantum dots (QDs), and their applications in biomedical imaging, with an emphasis on the design of optimal NIR emitting QDs. Because biomedical optics is rapid, portable and cheap, we expect that it will expand greatly in the next few years, especially if bright, stable, NIR emitting probes with low toxicity can be synthesized.

We can distinguish two classes of NIR emitting probes: organic and inorganic ones [3]. The NIR organic probes are the oldest and some of them (indocyanine green, methylene blue) have been validated by the US Food and Drug Administration (FDA) for use *in vivo*. NIR organic dyes suffer however from important limitations in terms of optical properties: their fluorescence quantum yield is low, they photobleach rapidly, and the possible emission wavelengths are limited to the high energy range of the NIR window (700–900 nm). Recently, certain of these limitations have been circumvented thanks to the encapsulation of the organic dyes in small beads such as lipoproteins nanoparticles [4], calcium phosphate nanoparticles [5–7], or dye doped silica nanoparticles [8–10].

Inorganic NIR emitting probes include QDs and up-converted nanoparticles. Metallic nanoparticles [11] and nanoshells [12] can be good NIR absorbing probes but, except from few recent examples [13], are usually not fluorescent in the NIR and will not be discussed here.

QDs are semiconductor particles with sizes that range from 2 nm to ~10 nm. As in the case of QDs emitting in the visible, the emission wavelength of the NIR QDs can easily be tuned between 650 nm and 1250 nm by changing their size or their composition. The notable optical properties of the NIR QDs are: i) good resistance to photobleaching (this is especially true when core/shell structures can be synthesized), ii) large absorption cross section, iii) Gaussian emission profiles with full widths at half maximum (FWHM) that can be as narrow as 40 nm [14], iv) fluorescence lifetime in general larger than 100 ns, v) good quantum yield that can be as large as 50%, and v) fluorescence emission with a large Stokes shift. These properties make the NIR QDs attractive compared to organic NIR probes [15].

In general, QDs are excited using one photon excitation, but they can also be excited using two photon (2P) absorption, a process with the simultaneous absorption of two photons exciting a transition at twice the energy of the incident photons. Their large two photon absorption cross section, compared to organic dyes, makes them very interesting

probes for 2P excitation [16]. This type of excitation is interesting because it can be done in the NIR window and because it provides intrinsic three-dimensional confinement of the excitation inside a micrometer volume. It is thus well adapted to depths smaller than typically 400–500 μm [17].

Recently, another type of multi-photon absorbing probes has been evidenced with the lanthanide doped nanoparticles that can upconvert low energy NIR radiation into higher energy visible luminescence [18]. The luminescence of these up-converted nanoparticles is based on sequential energy transfers between lanthanide dopants or excited state absorption involving their metastable-excited states with lifetimes as long as several milliseconds. This process is orders of magnitude more efficient than the 2-photon absorption process typically used in 2P microscopy.

In depth fluorescence detection with greater signal/background ratio can also be performed using fluorescent probes that do not need to be excited with light when they are in the tissue. These probes can be excited by luciferase [19] through energy transfer, or when they have long fluorescence lifetime, they can be first excited *in vitro*, injected, and detected at later time [20].

2. QD synthesis

Several recent comprehensive reviews have already discussed the synthesis and the applications of NIR QDs [21–24], and the reader is encouraged to read these references for detailed discussion of the various synthesis protocols used. In the present review, we have chosen to focus on the design issues necessary to obtain the ideal NIR emitting QDs as well as the strategies currently available to fulfill them.

The main parameters that have to be taken into consideration when designing a NIR emitting QD are: i) the excitation and the emission wavelengths, ii) the toxicity of the elements the QD is made of, iii) the ability to transfer the probe into water, and to modify its surface chemistry without losing the QD fluorescence, iv) the brightness of the probe, i.e. its quantum yield, its absorption cross-section, its lifetime, its resistance to photobleaching, and v) the QD size.

Ideally, a NIR QD has an emission wavelength in the NIR window, where they may also be efficiently excited. It should be non toxic. However, the QD toxicity is a complex issue, as it strongly depends on its composition and on its surface chemistry, which determines its biodistribution. While QDs based on heavy metals may be used for short term imaging in the small animal, long term studies should use less toxic QD compositions to avoid possible side effects. This requirement naturally becomes a non sufficient, but absolutely necessary condition for eventual future clinical applications.

It should also be bright, although this notion is not easy to optimize and depends strongly on the type of excitation and detection that is performed. For continuous excitation, a shorter fluorescence lifetime is preferable since it ultimately limits the rate of fluorescence photons from the QD when excited at its saturation level. In contrast, a longer fluorescence lifetime is more advantageous in pulsed excitation/time-gated detection schemes, where the fluorescence is recorded during a specific time window after each excitation pulse. This allows the selective detection of late fluorescence photons emitted by long lifetime (hundreds of nanoseconds) QDs while rejecting early photons emitted by short lifetime (few ns) endogenous fluorophores. The QD size should be as small as possible since small sizes are optimal for renal clearance [25], although for some applications, larger sizes are desirable (see below).

Another important point yet needs to be considered in the design of a NIR emitting QD for bio-imaging. It is the robustness of its fluorescence emission in time, when excited (resistance to photobleaching), or when its surface chemistry is altered. Surface chemistry modifications can simply result from aging of the QDs under ambient conditions. Water and/or oxygen can bind to the QD surface and modify its fluorescence [26]. Further, to make the QD water soluble, surface chemical

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

3

modifications need to be performed. These modifications often degrade the fluorescence quantum yield of the QDs. The most efficient strategy found so far to preserve a good fluorescence is to grow a shell on the QD [27]. Such a shell needs to have a large bandgap to prevent the electron and the hole to reach the surface (type I). Ideally, this shell should be grown epitaxially to prevent cracks and charge leaks. While shell thickness is not critical, few monolayers are usually necessary to preserve a good fluorescence after ligand exchange.

It is however not easy to grow epitaxially a shell on a nanostructure. There are two major issues. The first one is the difference of the lattice constant parameters between the core and the shell. Lattice mismatch between the core and the shell results in pressure that can reach 4 GPa [28]. Such high pressure can induce crystal structure change, or defect formations in the core, the shell or both. When the lattice mismatch is too high, gradient composition between the core and the shell can be designed so that the constraints can be slightly relaxed and shells grown with fewer defects. The second major issue when growing a shell on a QD core is to prevent diffusion of the anion and/or the cation into the core during the shell growth that is usually performed at high temperature (>200 °C). Such diffusion can change drastically the emission wavelength of the QDs, and its surface can fail to be correctly passivated by the shell. ZnS represents the archetypical shell material, due to its good resistance to oxidation and to the position of its bandgap conveniently enclosing that of most NIR emitting QDs.

The emission wavelengths of a NIR QDs can be easily tuned by changing their composition (Table 1).

2.1. Group IV (Si, Ge, C)

Group IV nanocrystal quantum dots are composed of only one element, Si, Ge or C. These semiconductors play a major role in electronics, and the synthesis of the corresponding QDs has been attracting increasing interest and effort [42,43]. Their PL emission may originate from either band edge or defect states.

Various synthetic routes have been developed to obtain Si QDs, such as electrochemical etching, laser ablation, mechanical milling and plasma synthesis [42]. Recent synthesis schemes reported 800 nm-emitting Si QDs with quantum yields up to 60–70% in organic solvents however these QDs were unstable in water [44,45]. The surface of Si QDs is usually stabilized with appropriate covalently bound organic ligands, and the resulting NIR-emitting QDs reach a quantum yield of 5–20% after solubilization in water [30,46,47]. Alternatively, luminescent porous Si nanoparticles, with overall diameters of ~130 nm and inner pores ~5–10 nm, were prepared by electrochemical etching [48]. These particles emitted in the 700–900 nm window with 10% quantum yields. Interestingly, the authors demonstrated that these porous particles

could be loaded with drugs, and that they progressively degraded and dissolved *in vivo* into soluble silicic acid, followed by fast excretion (see Fig. 1). However these QDs could only be excited in the visible region, which could limit the available imaging depth [46].

Germanium QDs have been synthesized in solution [49,50] or by dissolution of processed sol-gel glasses [51], with peak emission wavelengths ranging from ~800 to ~1200 nm and quantum yields varying from 0.05% to 8% depending on the size and the synthetic scheme. They therefore offer a broader NIR emission range but no core/shell structure has been reported on Ge QDs yet and they remain very sensitive to oxidation. These QDs have thus not been transferred into water for biological imaging purposes.

Finally, diamond nanoparticles have a very wide bandgap, however defect states may fluorescence in the visible or the NIR region. For example, Si and Ni-N defects provide PL emission lines in the 700–800 nm region [52,53]. However these nanodiamonds cannot be excited in the near infrared region and their surface functionalization for biological imaging raises challenges that delay their application for bioimaging.

NIR QDs containing two elements are so far the most widely synthesized. We will review rapidly their properties according to the cation they contain: Ag, Cd, Pb or In.

2.2. Group I–VI (Ag_2S , Ag_2Se , Ag_2Te)

Ag_2S , Ag_2Se , and Ag_2Te QDs have only recently been synthesized. The group of D. Norris has shown that these nanoparticles can be easily synthesized using classical methods, but their study does not report on the photoluminescence properties of these nanoparticles [54]. Another study used a silylamide promoted synthesis to obtain Ag_2E (E = S, Se, Te) QDs. These QDs have detectable fluorescence emission, but their quantum yield remains low (few %) even after the growth of ZnSe shells. The emission wavelength of these nanoparticles can be tuned across the NIR window [55], but the FWHM of their emission spectra is very large (>200 nm). The lifetimes reported so far are a bit longer than 100 ns. Finally, matchstick-shaped Ag_2S -ZnS heteronanostructures have recently been synthesized with both UV and NIR emission at 1155 nm, however no fluorescence quantum yield was measured [56].

2.3. Groups II–VI and II_3-V_2

CdSe and CdTe nanoparticles are limited to the high energy part of the NIR window (up to ~700 nm for CdSe [57] and ~800 nm for CdTe [58]). These nanoparticles can have an emission spectra with narrow FWHM (30 nm), short lifetime (few tens of ns), and quantum yield that strongly depend on their surface state. Even though their syntheses are well documented [59], cadmium based NIR nanoparticles are still the subject of active research.

The synthesis of core/shell structures with CdSe or CdTe cores requires some special care. An ideal shell material for these two types of core in terms of band alignment and resistance to photobleaching would be ZnS. However, the lattice mismatch between CdSe (14%) and CdTe (17%) prevents the formation of thick shells (more than 2 monolayers), and strategies usually based on the use of composition gradient, or intermediate materials, between the core and the shell, are used to build adapted core shell structures as in the case of CdSeTe/CdZnS [31].

Wave function engineering can be used to obtain core/shell NIR emitting QDs. The idea here is to use semiconductor materials for the core and the shell such that the electron and the hole are mostly localized in different parts of the nanoparticle. These QDs are called type II QDs. The first example of such NIR emitting QDs is the CdTe/CdSe QD, where the electron is mostly localized in the shell while the hole is mostly confined in the core [34]. This wave function engineering with the charges localized in different parts of the QD results in reduced confinement of the charge carriers, and thus

Table 1

Water soluble NIR emitting quantum dots of various materials with their emission range and their quantum yield. We limited this table to NIR emitting QDs that have been solubilized in water. Only one or two representative examples for each material are given.

| | Emission range | Full width half maximum | Quantum yield in water |
|---------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------|
| C [29] | 650–700 nm | ~100 nm | N.A. |
| Si [30] | 650–700 nm | > 100 nm | 5% |
| CdSeTe/CdZnS [31] | 650–800 nm | < 100 nm | 25–30% |
| CdTe/CdSe/ZnSe [32] | 900–1000 nm | > 100 nm | 50% |
| CdTe/CdS [33] | 650–800 nm | < 100 nm | up to 70% |
| CdTe/CdSe [34] | 840–860 nm | 90 nm | 13% |
| CuInS ₂ /ZnS [35,36] | 650–820 nm | ~100 nm | ~30% |
| CuInSe ₂ /ZnS [37] | 700–1050 nm | > 100 nm | ~20% |
| InAs/ZnCdS [38] | 700–800 nm | 80 nm | 25% |
| InAs/ZnS [39] | 750 nm | < 100 nm | 10–20% |
| InP/ZnS [40] | 650–740 nm | 150 nm | 15% |
| PbS/CdS [41] | 1250 nm | ~150 nm | 30% |

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

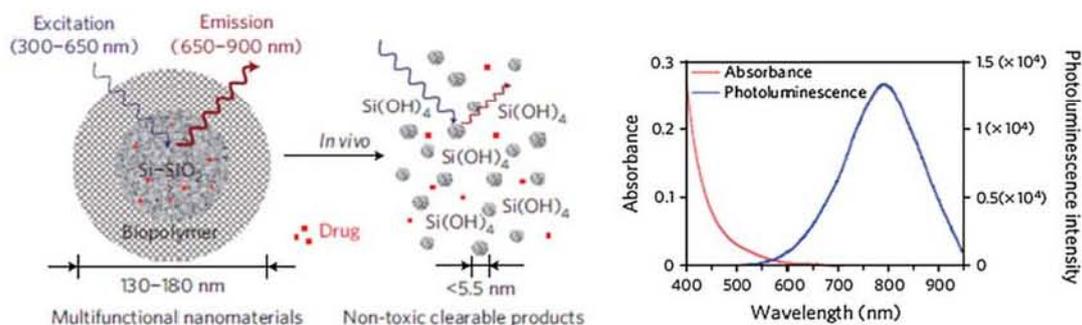


Fig. 1. Structure, degradation process and optical spectra of NIR emitting porous silicon nanoparticles. Reproduced with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Materials [48] copyright (2009).

longer emission wavelengths. The reduction of the wave-function overlap also results in longer fluorescence lifetimes. Several core/shell structures with bandgap alignment resulting in longer emission wavelength have been synthesized since [60], and core/shell structures of type II/type I QDs that can be transferred into water have been synthesized [32]. A refinement of type II QDs is the use of lattice strain to fine tune the band alignment between the core and the shell. The epitaxial growth of a compressive shell onto a soft nano-crystalline core could induce a switch between a standard type-I QD and a type-II QD [14]. This method has the advantage to give NIR emitting QDs with high quantum yield, and emissions with a narrow (~ 40 nm) full width half maximum.

An extension of the type II QDs is the nanoparticle, composed of a gradient in the QD itself, usually at the interface between the core and the shell. Such composition gradient gives access to various core/shell structures that would be hard to grow otherwise because of the often large lattice mismatch between the core and the shell [31]. Composition gradient can also be obtained after synthesis using cation exchanges [61].

Recently, Cd_3P_2 [62,63] and Cd_3As_2 [64] QDs with emission in the full NIR window have been synthesized. These QDs can have quantum yields higher than 30% after the synthesis but, as most NIR QDs, this value drops dramatically after few days in ambient conditions [64]. The FWHM of these QDs increases with particle size from 80 nm to 150 nm. These materials would benefit from the addition of a shell so that they can be used for biomedical imaging.

2.4. Group IV–VI (PbS, PbSe)

PbS, PbSe and PbTe nanoparticles are probably the oldest NIR absorbing QDs synthesized [65]. These materials have very small bandgaps <0.5 eV, but large Bohr radii, 20 nm for PbS, 46 nm for PbSe [66]. As a consequence, their emission spectra can be easily tuned in the middle and the low energy part (infrared) of the NIR window. The quantum yield of these QDs varies greatly according to their synthesis. Recent synthesis optimization has led to air stable PbS nanoparticles with excellent quantum yields (up to 90%) [67]. The FWHM of these QDs depends on their size but is in general very large (>100 nm). Their fluorescence lifetime is long, and often close to the microsecond [68]. The fluorescence stability of PbS and PbSe nanoparticles can be greatly enhanced using core/shell structures such as PbSe/CdSe/ZnS and PbS/CdS [69]. The quantum yield of these structures remains high (~ 20 – 30%) even after transfer into water [41]. The FWHM of their emission is still large (>200 nm).

2.5. Group III–V (InP, InAs)

As for the QDs containing indium, they have first been synthesized more than 15 years ago both as InP [70,71] and as InAs QDs [72]. InP QDs have triggered a great deal of attention since the InP bandgap is

1.35 eV (~ 920 nm), so that large InP QDs can reach the high energy part of the NIR window, but more importantly, the compounds these QDs are made of are expected to be less toxic than other heavy metals. Core/shell InP/ZnS nanoparticles have been synthesized [73] and recent optimization yielded stable water soluble InP/ZnS NCs with quantum yield around 15% [40]. Longer wavelength can be reached with InAs QDs. The InAs bandgap is 0.53 eV (>3 μm), and the first InAs QDs synthesized [70] cover the whole NIR window. Different kinds of shell have been grown on InAs cores. The first shells were based on the selenides, specifically ZnSe and CdSe [74–76], but selenium is prone to oxidation, and air stable sulfides have subsequently been used. ZnS [39,77] has a high lattice mismatch (10.7%) with InAs and ZnS shells are thus difficult to grow. Recently, CdS and ZnCdS shells have been synthesized on InAs cores yielding QDs that are stable in air and can be transferred into water using ligand exchange. These QDs retain high quantum yield (25%) once in water [38]. They have been synthesized only for the high energy part of the NIR window (700–800 nm), but longer wavelength should easily be accessible with larger core sizes. The FWHM of these samples is quite narrow (<100 nm).

2.6. Group I–III–VI₂ (CuInS₂, CuInSe₂, AgInSe₂)

Ternary QDs have recently emerged as a new class of NIR emitters. As for the QDs containing Ag, the development of these materials was motivated by the need to synthesize NIR QDs with elements that are available in large quantities and with reduced toxicity [35]. Examples of ternary NIR QDs are CuInS₂, CuInSe₂, and AgInSe₂. We discuss below the properties of these QDs since they have only been recently applied to biological imaging and have therefore not been covered by previous reviews.

The recent renewed interest for the synthesis I–III–VI₂ nanoparticles comes from the fields of both photovoltaics and biomedical imaging. NCs with a wide range of sizes have been synthesized for both CuInS₂ and CuInSe₂ [35–37,78–83]. The Bohr radii of CuInS₂ and CuInSe₂ are respectively 3.9–4.1 nm and 5.43 nm, and the bandgap energies are respectively 1.45–1.53 eV and 1.04 eV. In CuInS₂ and CuInSe₂ structure, the ratio In/Cu is one, on average, and the negative charges of the S or Se ($-II$) anions compensate the positive charges of the cations In ($+III$) and Cu ($+I$). However, the Cu–In–S/Se materials are well known to present a large variety of Cu/In ratios [37,78,84,85], because of the stability of various pairs of defects [85]. For example, indium-rich nanocrystals are obtained when 2 copper vacancies are combined with the substitution of one indium on a copper site ($\text{In}_{\text{Cu}}^{2+} + 2V_{\text{Cu}}^-$) and copper-rich NCs are obtained when one indium is substituted with two coppers, and one copper is substituted with one indium ($2\text{Cu}_{\text{In}}^{2+} + \text{In}_{\text{Cu}}^{2+}$). Thus, stable In- or Cu-rich Cu–In–S/Se NCs can be synthesized. Nanoparticles that have higher In/Cu ratio have larger bandgap energy and all wavelengths from green–yellow to NIR (~ 810 nm for CuInS₂ and ~ 1190 nm for CuInSe₂) can be obtained using various NC

ARTICLE IN PRESS

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

5

sizes and compositions (Fig. 2) [35–37,78,80,81,83,84,86]. It is interesting to note that bigger particles (>5 nm) are less fluorescent than smaller ones, because the number of internal defects scales with the volume of the particles. As a consequence, for a given emission wavelength, it can be preferable to use smaller Cu–In–Se particles than larger Cu–In–S [37].

When the In and Cu cations alternate periodically in the crystal lattice, CuInS₂ and CuInSe₂ NCs have a chalcopyrite crystal structure. In contrast, when the cations are randomly positioned in the crystal, the structure is sphalerite (zinc blende). The I–III–VI₂ NCs have usually tetrahedral or spherical shape, depending on the synthesis used, although other shapes have been synthesized but no fluorescence emission was reported for these NCs. Prasad et al. [87] have reported the synthesis of fluorescent Cu–In–S/ZnS NCs in the anisotropic wurtzite structure. This paves the way to the design of QDs with anisotropic shapes (rods, plates...) and special optical properties (e.g. polarized emission).

The absorption spectra of I–III–VI₂ NCs do not display excitonic structure (Fig. 2e) because the NC dispersion in size and composition is too important. The PL spectra are broad (full width at half maximum: 100–150 nm). This width was attributed to the large NC dispersion in size and composition along with the recombination of the exciton with defect levels inside the nanoparticles [37,79,84,88]. Exciton recombination at defect sites also results in emission at lower energy, which can result in emission at wavelengths higher than for the bulk material, see Fig. 2a, and longer fluorescence lifetime (few hundred nanoseconds).

To improve the robustness of the optical properties of the I–III–VI₂ NCs, core/shell structures have been synthesized with shells of zinc sulfide [35–37,84,87–89]. Zinc sulfide has a large bandgap (3.61 eV) that provides a type I-alignment with CuInS₂ and CuInSe₂ cores, does not contain heavy metals, is stable against oxidation and has a small lattice mismatch with the core material (2% with CuInS₂ and 7% with CuInSe₂), so that epitaxial growth of several monolayers is possible.

Although very favorable in principle, the growth of a ZnS shell on I–III–VI cores turns out to be difficult in large part because of the easy diffusion of the small Zn²⁺ cation into the core against its reactivity. ZnS shells can eventually be grown if more reactive precursors are used and if the shell is grown at lower temperatures (≤ 200 °C). However, at this time, only few monolayers of pure ZnS shell have been reported in the literature. After the growth of a ZnS shell, the NC fluorescence quantum yield (QY) increases to a maximum of 60% in the visible range and $\sim 30\%$ in the NIR [35–37,84,87–89]. This increase is accompanied by the disappearance of the fast lifetime component, related to exciton non radiative decay on a surface defect [36,86]. Long (few hundred ns) mono-exponential fluorescence lifetime can then be obtained (Fig. 2d).

Other NIR I–III–VI materials have recently emerged, such as AgInSe₂ but no fluorescent core/shell nanostructures have been reported yet.

I–III–VI₂ core/shell NCs have comparable or higher QY than NIR organic dyes one, but their photo-stability and their absorption cross section are much larger. Despite their complexity (ternary composition and presence of defects), these NCs represent promising materials for *in vivo* imaging, as recently reported [35–37,87,89].

2.7. NIR emitting doped nanocrystals

The previous section shows that the whole NIR window can be explored when the composition and/or the size of the nanoparticles is changed. Another method yet to tune the emission wavelength of QDs is to dope them. Doping has been studied in details for QDs emitting in the visible [90]. Doped NIR emitting QDs have recently been synthesized [91], and their emission wavelength can be tuned continuously almost in the entire NIR window. These QDs could offer an interesting alternative to existing NIR QDs in terms of toxicity.

When we combine the possibility to change the QD composition with the ability to grow core/shell structures, a large variety of water soluble, NIR emitting QDs can be synthesized, with emission wavelengths tuning

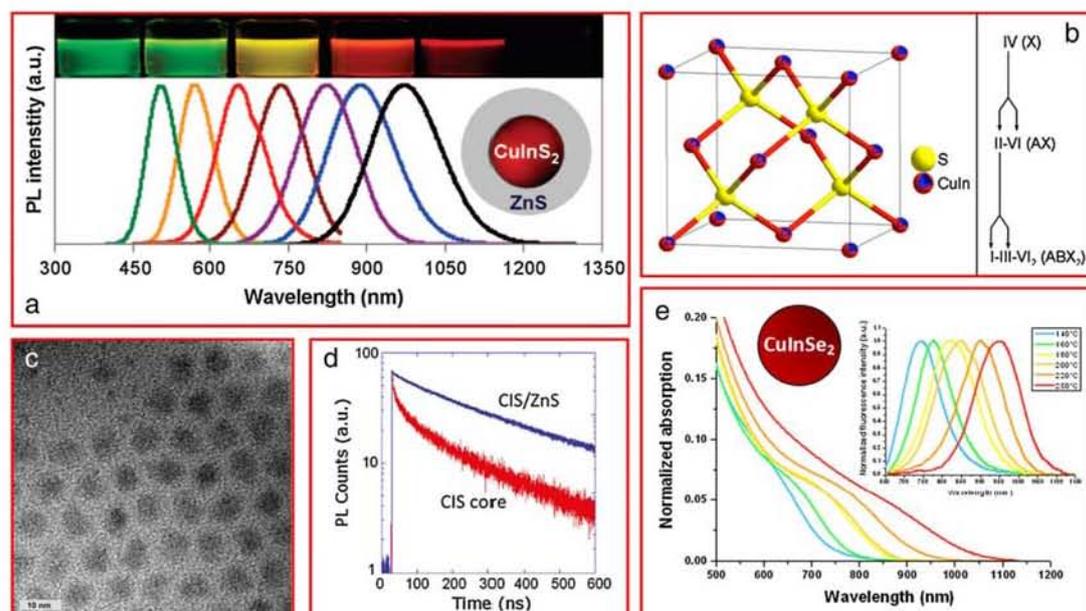


Fig. 2. a) Photoluminescence properties of CuInS₂/ZnS core/shell NCs [80]; b) Left: Crystal structure of zinc blende CuInS₂ NCs; right: schematic relationship among group IV, II–VI and I–III–VI₂ semiconductor materials [85,167]; c) TEM image of CuInS₂/ZnS NCs [36]; d) PL decay of CuInS₂ core and CuInS₂/ZnS core/shell NCs [88]; e) Absorption (inset: PL) spectra of Cu–In–Se core NCs [37].

Reprinted with permission from American Chemical Society copyright (2008, 2009, 2010, 2011) and American Institute of Physics copyright (2009).

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

6

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

the whole NIR window, good quantum yields (>30%), size below 10 nm, and lifetimes in the range of few hundreds of ns. Recent works tend to focus on the synthesis of NIR QDs that do not contain toxic compounds. This effort is necessary if such probes are to be used *in vivo*, and has to be combined with the effort to fine tune the QD surface chemistry with various organic molecules so that QDs can be as furtive as possible, reach their target efficiently, and/or be excreted.

2.8. Quick overview of QD surface chemistry

Most QD synthesis schemes are performed in organic solvents. QDs are then capped with hydrophobic ligands usually consisting of an anchoring group and one or more aliphatic chains. These QDs must therefore be modified to become soluble in water and compatible with the biological environment. The QD surface chemistry determines its final size, colloidal stability, charge, non specific adsorption and specific affinity and as such has a strong influence on its interaction with its environment and, *in fine*, on its *in vivo* biodistribution. The aim of this paragraph is not to present a comprehensive review of the different QD surface chemistry used for *in vivo* imaging, but to give a quick and general overview of the main strategies used to solubilize QDs in water. The reader may refer to several excellent reviews for more detailed information on QD solubilization and conjugation with biomolecules [92–94]. Most solubilization techniques can be classified into two general schemes applicable to many types of nanoparticles: encapsulation and cap-exchange. Encapsulation consists in keeping the initial hydrophobic ligands and surrounding the QD with amphiphilic molecules, with hydrophobic chains interdigitating with the QD ligands and hydrophilic groups for water solubilization. Popular examples of amphiphilic molecules are phospholipid micelles or amphiphilic copolymers [93,95,96]. In contrast, cap-exchange consists in replacing the hydrophobic ligands with new ligands presenting anchoring groups to bind to the nanocrystal surface and hydrophilic solubilizing groups. Anchoring groups may be composed of phosphines [97], amines, carboxylates, and most commonly thiols or di-thiols [98–101]. Hydrophilic groups used in these two strategies may be composed of charged moieties (carboxylic acids, amines...), however these present limited stability and high non specific adsorption of biomolecules on their surface. Polyethylene glycol (PEG) chains are more common for *in vivo* applications as it decreases considerably this non specific adsorption, at the cost of an increased size [95,96,98,99]. Zwitterions present an interesting alternative to PEG, as they also allow a low non specific adsorption level while maintaining a small overall hydrodynamic size [100,101]. Finally, other strategies include growth of (<20 nm) silica shells [102,103] and encapsulation in or deposition at the surface of larger (100 nm– μm) colloids (polymer or silica beads, liposomes...) [104,105]. Every *in vivo* imaging application presents different requirements in terms of size, charge, specific and non specific adsorption levels... As a consequence, the universal optimal surface chemistry does not exist. Instead, the QD surface chemistry should be tailored according to the specific criteria of each imaging application, as will be discussed in the next sections.

3. *In vivo* imaging applications

Visible emitting QDs have initially been used for cellular imaging, to label and track specific molecular targets in live or fixed cultured cell samples [92,95,106]. They have then been used as *in vivo* markers in small organisms, for example to study cell lineage in early stage *Xenopus* embryos [96]. Visible emitting QDs are well adapted to these thin and transparent samples. They however provide poor signal-to-background ratio in thicker tissue sections and when imaging targets in small animals due to the tissue absorption and diffusion, and to the strong auto-fluorescence background from endogenous chromophores in the visible region. Near infrared emitting QDs thus allow much more sensitive detection of deeper targets, up to several centimeters

below the surface. These characteristics triggered the development of many *in vivo* imaging applications. We will briefly describe some of these in the following sections and discuss the influence of QD design on each specific application, including lymph and blood vasculature imaging and tumor detection. We will then describe other developments of NIR emitting QDs associated with cell tracking and multimodal probes that combine the QD fluorescence with a whole body imaging contrast, such as magnetic resonance imaging (MRI) or positron emission tomography (PET).

3.1. Lymph node imaging

The sentinel lymph node (SLN) is the first regional step of lymphatic drainage and metastasis of the primary tumor. In the treatment of breast cancer, the axillary lymph node status is the major prognostic factor and a determinant predictor of recurrence and survival [107]. As the current method for the detection of SLN presents some disadvantages such as allergic reaction to blue dye, the use of radioactive tracers and long hospitalization, the use of fluorescence to localize the SLN has been developed since several years.

The first near-infrared emitting fluorophore used in the detection of the SLN was indocyanine green (ICG). First *in vivo* reports [108] demonstrated the aggregation of ICG and its release from SLN, both effects related to the small size of the molecule. Fast photobleaching is another critical issue that considerably diminishes the feasibility of ICG-based fluorescence imaging of organs. QDs, due to their resistance to photobleaching and their hydrodynamic diameter, which may be tuned in function of core size and surface chemistry, offer interesting opportunities for SLN infrared imaging.

Several studies on the detection of SLN using near infrared emitting QD have been reported and are summarized in Table S1. The initial papers studying the SLN mapping *in vivo* using NIR emitting QDs have been reported by Frangioni's team. The authors have used CdTe/CdSe core/shell QDs to visualize axillary lymph nodes as deep as 1 cm from the skin surface either after a subcutaneous injection in the paw of healthy mice, or after intradermal injection on the thigh of pig [109] or in the model of spontaneous melanoma of Sinclair mini-swine [110]. The superficial lymph node could be detected through the skin but to map deeper SLN like those from pleural space [111], esophagus [112] or gastrointestinal tract [113], the rib cage or the abdominal cavity of the Yorkshire pigs was opened. Another formulation of QDs with a core composed of indium and arsenic has shown a good SLN mapping in mice and rats [114] but the size of QDs should be controlled so that QDs do not migrate to the surrounding tissue or further into the lymphatic system.

Indeed, the size of the nanoparticles is crucial to SLN mapping because nanoparticles too small (<10 nm) can flow through the SLN and diffuse in surrounding tissue or in other lymph nodes in the chain whereas nanoparticles too large do not migrate and stay at the injection point [115]. Charge and nature of the QD surface chemistry do not seem to directly influence the capture of intra-tumorally or subcutaneously injected QDs by the SLNs, even though charge plays a crucial role for serum protein adsorption, which may increase the size of QD-protein corona assembly and therefore its retention in the SLN. SLN mapping, in that respect, is much easier than tumor or organ targeting after intravenous injection (see below) [116,117].

The major obstacle to the QDs clinical translation is their toxicity. The QD core is often composed of heavy metals (Cd, Te, Se or As), which could be released in the body due to the QD degradation and oxidation. In our recent studies [35,118], we have compared the detection of SLN and the toxicity of two types of QDs in a model of healthy mice. Both QD types, CdTeSe/CdZnS and CuInS₂/ZnS QDs, allow the localization of the axillary lymph node in few minutes after subcutaneous injection (20 pmol) (Fig. 3). Unlike cadmium-QDs, which demonstrated the clear features of local toxicity, such as an increased lymph node weight with several inflammatory areas, the indium-based QDs

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

7

did not show any signs of toxicity upon the same experimental conditions. Moreover, the inflammation threshold corresponded to a fifty time higher concentration of CuInS₂/ZnS compared to CdTeSe/CdZnS QDs.

Silicon QDs are also of particular interest because of their biocompatible composition and tunable emission properties in function of particle size. These Si QDs, whose hydrodynamic diameter is 20 nm, migrate to the SLN after subcutaneous injection in mice and no sign of toxicity (mice behavior, histopathology analysis of major organs and blood parameters) has been observed, clearly indicating the biocompatibility of these nanoparticles [46]. However, the inability to excite these QDs in the NIR range strongly limits the attainable imaging depth.

SLN detection using most of these QDs only takes a few minutes after injection, which greatly simplifies surgical procedures. The QDs then slowly leak from the injection point and the SLN into the rest of the organism via blood and lymph circulation [118]. This provides a window of a few hours for the surgeon to resect both the SLN and the injection point, removing at the same time the large majority of the injected QDs from the body and limiting toxicity issues. Ideally, the small amount of QDs remaining in the body after the operation should be ultimately eliminated, either via the kidneys into the urine or via the hepatobiliary pathway. The mechanisms for complete clearance are however not well understood yet.

3.2. Vasculature imaging: renal elimination vs. sequestration

The biodistribution of QDs after intravenous injection is strongly dependent on their surface chemistry. In general, QDs distribute rapidly in the entire bloodstream, allowing direct visualization of blood vasculature. Naturally, small capillaries are only spatially resolved close to the surface due to diffusion of light by the surrounding tissues, while larger vessels may be imaged deeper. Larson et al. used two-photon excitation microscopy to image blood circulation in the ear of a mouse with final QD concentration in the blood on the order of 1 μ M [16]. In this concentration regime, erythrocytes can be detected as dark volumes flowing through an otherwise uniformly fluorescent blood vessel. They were thus able to measure changes in local flow velocities. Smith et al. demonstrated the use of QDs to image chick embryo chorioallantoic membrane vasculature, a model test system for blood vessel formation and development [119]. While visible emitting QDs offered a poor contrast, NIR QDs led to a drastic improvement of signal-to-noise ratio due to the low auto-fluorescence background in this spectral region. Blood vessels could be imaged on

multiple scales, from large vessels at the whole embryo level to small capillaries. In both studies, QDs were beneficial compared to fluorescein-labeled dextrans, a common angiogenic imaging probe, due to their higher brightness and to their emission in the more favorable NIR region.

After some time in the bloodstream, QDs are eliminated from the body or sequestered in one or several organs. Elimination via the kidneys into the bladder requires very small hydrodynamic sizes. A threshold of 5.5 nm in hydrodynamic diameter was for example found for cysteine-capped QDs [25]. Since NIR emitting QDs are usually larger than this, they tend to remain in the body. Their biodistribution kinetics and final repartition strongly depend on their surface chemistry. Most types of QDs become opsonized in the circulation and are captured by macrophages in organs of the reticuloendothelial system (RES) (liver, spleen, bone marrow, lymph nodes...) [120–122]. QD circulation times are thus determined by how long they are able to evade opsonization. Functionalizing QDs with larger PEG (molecular weight larger than 2000 g/mol) chains thus prolongs circulation times, as has been shown with a variety of nanoparticles [123] but do not avoid final capture by the RES [120,124]. On the other hand, QDs capped with smaller PEG ligands seem to display a strongly size-dependent biodistribution. Choi et al. tested small InAs/ZnS QDs capped with smaller PEG ligands (MW ranging from 100 to 1000 g/mol) [39]. While very short (<100 g/mol) PEG chains proved inefficient in evading opsonization, short (typ. 200 g/mol) PEG chains allowed QD elimination into the urine. Functionalization with longer PEG chains led to an increase in hydrodynamic size, preventing filtration by the kidneys and finally leading to accumulation in RES and other organs in a size-dependent manner. PEG length is however probably not the only determinant of QD biodistribution, but certainly PEG density and stability of the surface chemistry on the QD surface must also strongly influence the fate of QD after intravenous injection. The mechanism and optimal conditions for final excretion of QDs via the hepatobiliary pathway remain unclear. In particular, most QDs seem to remain sequestered in the liver for long periods of time, up to two years after injection [125]. In contrast, a recent study provided evidence for renal and hepatobiliary excretion of silica-coated CdSe QDs, for which elimination was completed by 120 h [126].

3.3. Tumor imaging

In vivo fluorescence imaging of tumors using NIR QDs is a very active area of research as it may provide tools to locate tumors and metastases or map tumor margins during surgery. Indeed, surgical removal of a tumor is often the best method of cure for cancer. Incomplete resection of a neoplasm is a major factor that compromises the long-term survival rate of cancer patients. Adequate assessment of the extent of the disease is limited during surgery because it relies on palpation and visual inspection. The effect is in a 40–80% recurrence rate, like in retroperitoneal sarcoma, brain or breast neoplasms [127,128]. Surgeons are required to remove large surgical margins around what they perceive as a neoplastic tissue because of the microscopic tumoral dissemination in the surrounding healthy tissues. It is therefore important to develop new technologies that will help achieve precise delineation of tumor margins and improved visibility of small tumors that are difficult to distinguish from normal tissues. Fluorescence-guided surgery using NIR emitting nanoparticles is an emerging technology that holds potential to provide a viable solution to this problem, and as a consequence several strategies are being developed to target QDs to tumoral cells *in vivo*.

Many types of circulating nanoparticles have been shown to accumulate in the tumor due to leaky blood vessels and inefficient lymphatic drainage [129,130]. This effect is known as enhanced permeation and retention (EPR) effect, and was also verified with QDs in several studies (Fig. 4a,b) [131,132]. The shape and size of the nanoprobe play a crucial role in this process, since smaller particles seem to penetrate deeper

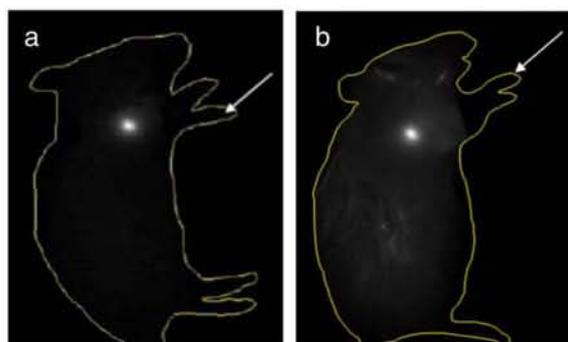


Fig. 3. *In vivo* fluorescence imaging of the right axillary lymph node of mice with Fluobeam® 5 min after subcutaneous injection of 20 pmol of CdTeSe/CdZnS (a) or CuInS₂/ZnS (b) QDs in the right anterior paw. The exposure time is 10 ms (a) or 50 ms (b) and the injection point (white arrow) was hidden.

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

8

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

into the tumor interstitial medium [133]. Similarly, for a given nanoparticle volume, rod-shaped QDs seem to provide more efficient labeling than spherical ones [134]. On the other hand, small particles are more likely to be washed out of the tumor [135], and the optimal nanoparticle size likely depends on the imaging parameters (e.g. delay between injection and imaging) and the type of tumor. However the level of EPR-mediated QD tumor capture is often low, and is unlikely to allow efficient detection of micrometastases.

Several methods have thus been proposed to design targeted QDs and increase their specific uptake efficiency. In general, intravenously injected QDs must meet several criteria to efficiently label their target: long circulation times for prolonged exposure to the target, slow clearance from the bloodstream by the RES and strong affinity for their target for fast binding and minimal release back into the blood or lymph circulation. Most of these QDs are therefore coated with long chain PEG for minimization of non specific adsorption and prolonged circulation and further conjugated with targeting moieties. While functional QDs have been successfully targeted to different tissues, such as blood or lymphatic vessel [136–138] liver, [139] or lung [136], there is an important effort toward the design of efficient tumor-targeting QDs. QDs conjugated with antibodies against tumor-specific antigens were for example shown to label tumors xenografted in mice much more efficiently than non-targeted QDs [131,140–142]. Tada et al. have tracked the path and kinetics of diffusion of single QDs targeted to the human endothelial growth factor 2 (HER2) into the targeted tumor (Fig. 4c) [141]. They were able to show that the QD first circulates into blood vessels, then extravasates from the vessel into the tumor extracellular space and binds its HER2 target at a tumoral cell membrane before getting internalized and transported to the perinuclear region. QDs conjugated to the endothelial growth factor (EGF) have also been shown to efficiently target HER2 both *in vitro* [143] on cultured cells and *in vivo* to label tumors [144]. Another popular strategy relies on the RGD peptide sequence to target QDs to integrin $\alpha_v\beta_3$, a receptor involved in angiogenesis, proliferation and metastasis, which is upregulated in certain tumor types [46,145–147]. Again, targeted QDs showed higher uptake

efficiency compared to non-targeted ones in tumor-bearing mice. The small size of RGD sequences allowed binding of multiple targeting peptides to the QDs and increased their global affinity for integrins. Imaging of tumor frozen sections and real-time intravital RGD-QDs tracking showed that these QDs did not extravasate but indeed bound to the tumor vessel walls [145,146]. Interestingly, the authors observed that RGD-QDs bound to their specific integrin targets majoritarily as small aggregates and not as single nanoparticles [146]. These aggregates were also able to transiently bind to vessel walls in non-tumoral tissues but were rapidly washed back into the bloodstream. This effect is not completely understood yet but was tentatively attributed to the laminar flow in blood vessels and to polyvalent binding of QD aggregates to several molecular targets on the cell surface.

This emphasizes the influence of the nanoparticle size on its biodistribution and its targeting efficiency. Larger particles (100 nm–few μm) may therefore be preferable for specific imaging or drug delivery applications. QDs have thus been incorporated into immunoliposomes, silica beads or polymer nanoparticles to provide them with a good NIR fluorescence contrast [133,148–150]. For example Weng et al. have used 100 nm diameter liposomes as a nano-platform with drugs inside and NIR fluorescent QDs and tumor-targeting antibody fragments on the surface [149]. QDs allowed visualization of the liposome uptake into tumors xenografted in mice. Similar constructs could be used to combine diagnostics and therapeutic abilities, for example to follow where drugs are being delivered during the treatment.

3.4. Cell tracking

Cell tracking using NIR fluorescent QDs is also a very active and promising area of research. The ability to track tumoral, stem, or immune cells *in vivo* after injection is central to many biological studies. QDs have thus been used to label these cells *in vitro*, either by labeling specific membrane receptors or by endocytosis. QD-labeled cells are then injected *in vivo* and their biodistribution can be mapped using the QD fluorescence signal (Fig. 5) [151–156]. For these studies,

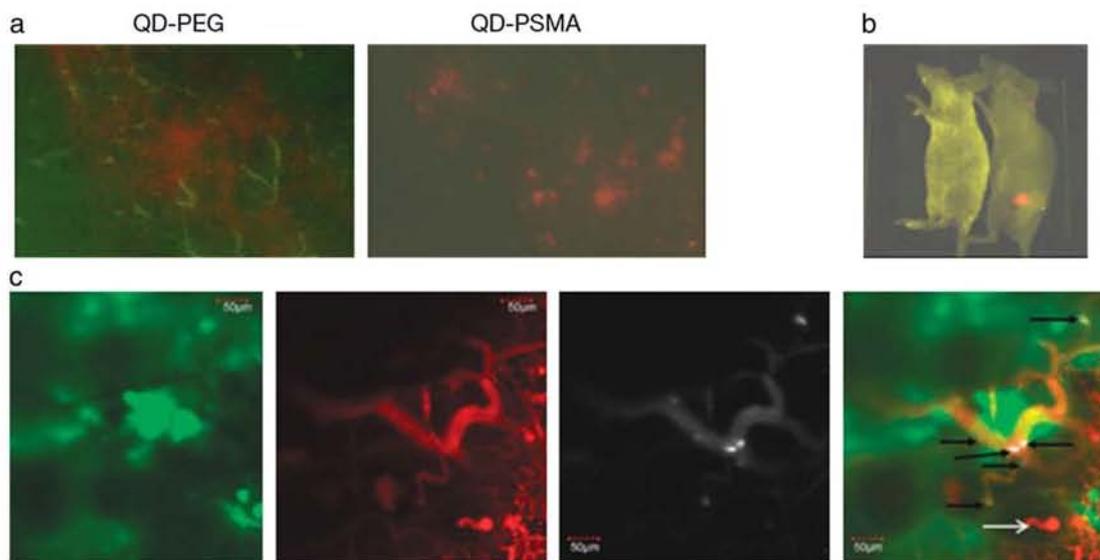


Fig. 4. a) Histological examination of QD uptake in C4-2 tumor xenografts maintained in athymic nude mice by EPR effect (QD PEG) or active antibody-mediated targeting (QD PSMA). b) *In vivo* tumor imaging of in live mice using antibody-targeted QDs. Colors correspond to spectrally unmixed fluorescence signals from the autofluorescence (yellow) and QDs (red) [131]. c) Direct visualization of binding of RGD-QD to tumor vessel endothelium. From left to right: green channel shows EGFP-expressing cancer cells, while the red channel outlines the tumor's vasculature via injection of Angiosense dye. The NIR channel shows intravascularly administered QDs which remain in the vessels and do not extravasate. QD binding events are marked by black arrows in the merge image [146]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Reprinted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Biotechnology copyright (2004) and with permission from American Chemical Society copyright (2008).

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

9

suitable QDs should be able to efficiently label target cells *in vitro* and more importantly they should not leave these cells after the *in vivo* injection, to maintain a perfect correspondence between the injected cell biodistribution and the QD fluorescence signal. In several studies, QDs were shown to remain inside their initial cells during the experiment, from a few hours up to four weeks *in vivo* [153]. The ability to easily separate fluorescence from different QD populations allows imaging the migration of several cell types simultaneously and studying their interactions *in vivo* [152]. Near infrared QDs enhance the imaging sensitivity over visible emitting fluorophores, enabling detection of only 5000 cells subcutaneously [155].

3.5. Multimodal QDs

Near infrared fluorescence imaging is flexible, cheap, easy to use and sensitive; however it is limited to depths of a few centimeters below the skin. In contrast, magnetic resonance imaging (MRI), scintigraphy, single photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET) give access to whole-body images, with smaller spatial resolution. There is therefore a large interest in combining fluorescence with another imaging modality to benefit from the advantages of the two techniques. Quantum dots constitute in this regard promising platforms to assemble different contrast agents to form multimodal nanoprobe. Several examples of QD-based multimodal probes have been described in the literature, including MRI/fluorescence and PET/fluorescence probes [157]. One of the most common strategy used to build these probes consists in coating the QDs or conjugating them with paramagnetic (for MRI) or radioactive (for PET) ion chelates or molecules. For example, Mulder et al. incorporated a Gd-chelating lipid into QD phospholipid micelles [158,159]. The micelle was further functionalized by conjugation with targeting RGD-peptides. This probe enabled visualization of angiogenesis regions by MRI and visualization of the tumor blood vessels with a higher resolution using fluorescence. In another application, Duconge et al. designed ^{18}F -labeled QD micelles; this dual PET-fluorescence probe was injected

in the tail vein of a mouse [121]. These enabled to quantitatively measure the whole-body QD biodistribution in real-time using PET and pharmacokinetic parameters such as blood circulation time. Fluorescence images were then obtained by fluorescence confocal endoscopy to image the QD distribution at the intracellular level.

Another strategy to build multimodal probe is the doping of QDs with paramagnetic ions such as Mn. This has been demonstrated using different types of QDs, including CdSe, CdS, CdTe, or Si-based nanocrystals [157]. Wang et al. synthesized visible emitting CdSe/Zn_(1-x)Mn_xS water soluble QDs and internalized them into cultured cells [160]. These QDs produced sufficient contrast to allow visualization of the cells using both MRI and fluorescence microscopy. The same strategy was used with NIR emitting CdTeSe/CdS QDs however bimodal imaging has not been demonstrated *in vivo* yet [161]. Finally, a third strategy consists in assembling QDs with Fe₃O₄ or FePt magnetic nanoparticles in silica beads, micelles, polymer particles, or within nano-heterostructures (nanoparticles composed of a magnetic part and a semiconducting part) [162–165].

4. Conclusion and perspectives

Recent years have witnessed the development of bright near infrared emitting QDs of different sizes, compositions and properties. This allows tailoring the choice of the NIR probe depending on the application and the desired properties. The available NIR QDs offer a wide range of emission wavelengths spanning the optical window for deep tissue imaging, lifetimes ranging from a few tens to a few hundred nanoseconds, compositions presenting limited toxicity... The type of surface chemistry may also be chosen from a variety of different solubilization strategies, some of which enable renal elimination of small QDs, other long circulation times and further conjugation of targeting molecules. This has permitted the development of several *in vivo* imaging applications, relying on simple QD diffusion (lymph node mapping, vasculature imaging...) or more complex targeted imaging of tumoral cells. Currently available near infrared QDs therefore represent a powerful tool for *in*

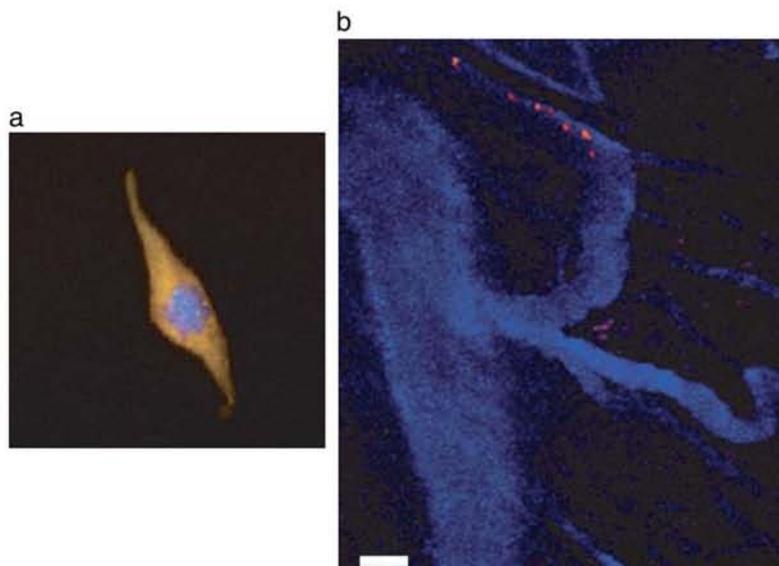


Fig. 5. Cell labeling and tracking using endocytosed QDs. a) Single cell labeled with QDs before *in vivo* injection. b) Seven images superimposed in time as a single bone marrow lineage-negative cell labeled with QD590-TAT (orange) navigated the tumor vessels highlighted with QD470 micelles (blue) *in vivo*. Scale bar is 50 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.) Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Medicine, [156] copyright (2005).

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

10

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews* xxx (2012) xxx–xxx

vivo biological studies, and we expect that they will become increasingly used in many studies such as cell tracking, tumor imaging, drug screening...

Fluorescence imaging holds great promises to assist oncological surgery due to simple incorporation to surgical inspection to delineate tumor margins or map sentinel lymph nodes [166]. The detection sensitivity of these techniques suffers from the lack of high brightness/high stability organic fluorophores emitting in the NIR. In that respect, QDs have the potential to significantly improve the performance of near infrared fluorescence imaging for optically assisted surgery thanks to their superior optical characteristics compared to organic dyes. However two main challenges still need to be resolved before this technique can reach the clinical field. First, efficient targeting strategies must be developed to ensure sensitive labeling of very small metastases. *In vivo* targeting is a more global scientific and biotechnological problem that is shared with many other biotechnological fields, in imaging and drug delivery. Steady progress in targeting efficiency is being made, and we can expect satisfying results in the near to mid future. Second, if QDs are to be used in clinical applications, there should be no reasonable doubt about short and long term toxicity. This implies the development of QDs with minimal toxicity, which has already begun but can certainly progress further, and the elimination of injected QDs from the body, which is currently less advanced. While some sufficiently small particles with specific surface chemistries may present a certain degree of renal elimination, complete elimination will probably require either degradation into smaller atomic components and/or nanoparticles that are efficiently eliminated from RES organs into the bile and the intestines.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>.

References

- Y.T. Lim, S. Kim, A. Nakayama, N.E. Stott, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Selection of quantum dot wavelength for biomedical assays and imaging, *Mol. Imaging* 2 (2003) 50–64.
- A.M. Smith, M.C. Mancini, S.M. Nie, Second window for *in vivo* imaging, *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 710–711.
- V.J. Pansare, S. Hejazi, W.J. Faenza, R.K. Prud'homme, Review of long-wavelength optical and NIR imaging materials: contrast agents, fluorophores, and multifunctional nano carriers, *Chem. Mater.* 24 (2012) 812–827.
- P.C.N. Rensen, R.L.A. de Vrueth, J. Kuiper, M.K. Bijsterbosch, E.A.L. Biessen, T.J.C. van Berkel, Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 251–276.
- B.M. Barth, E.I. Altinoglu, S.S. Shanmugavelandy, J.M. Kaiser, D. Crespo-Gonzalez, N.A. DiVittore, C. McGovern, T.M. Goff, N.R. Keasey, J.H. Adair, T.P. Loughran, D.F. Claxton, M. Kester, Targeted indocyanine-green-loaded calcium phosphosilicate nanoparticles for *in vivo* photodynamic therapy of leukemia, *ACS Nano* 5 (2011) 5325–5337.
- M. Kester, Y. Heakal, T. Fox, A. Sharma, G.P. Robertson, T.T. Morgan, E.I. Altinoglu, A. Tabakovic, M.R. Parette, S.M. Rouse, V. Ruiz-Velasco, J.H. Adair, Calcium phosphate nanocomposite particles for *in vitro* imaging and encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer cells, *Nano Lett.* 8 (2008) 4116–4121.
- H.S. Muddana, T.T. Morgan, J.H. Adair, P.J. Butler, Photophysics of Cy3-encapsulated calcium phosphate nanoparticles, *Nano Lett.* 9 (2009) 1559–1566.
- J.F. Bringley, T.L. Penner, R.Z. Wang, J.F. Harder, W.J. Harrison, L. Buonemani, Silica nanoparticles encapsulating near-infrared emissive cyanine dyes, *J. Colloid Interface Sci.* 320 (2008) 132–139.
- D. Knopp, D.P. Tang, R. Niessner, Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles, *Anal. Chim. Acta* 647 (2009) 14–30.
- X.H. Wang, A.R. Morales, T. Urakami, L.F. Zhang, M.V. Bondar, M. Komatsu, K.D. Belfield, Folate receptor-targeted aggregation-enhanced near-IR emitting silica nanoprobe for one-photon *in vivo* and two-photon *ex vivo* fluorescence bioimaging, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 1438–1450.
- M. Pelton, J. Aizpurua, G. Bryant, Metal-nanoparticle plasmonics, *Laser Photonics Rev.* 2 (2008) 136–159.
- L.R. Hirsch, A.M. Gobin, A.R. Lowery, F. Tam, R.A. Drezek, N.J. Halas, J.L. West, Metal nanoshells, *Ann. Biomed. Eng.* 34 (2006) 15–22.
- X. Yuan, Z. Luo, Q. Zhang, X. Zhang, Y. Zheng, J.Y. Lee, J. Xie, Synthesis of Highly Fluorescent Metal (Ag, Au, Pt, and Cu) Nanoclusters by Electrostatically Induced Reversible Phase Transfer, *ACS Nano* 5 (2011) 8800–8808.
- A.M. Smith, A.M. Mohs, S. Nie, Tuning the optical and electronic properties of colloidal nanocrystals by lattice strain, *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 56–63.
- H. Mattoussi, G. Palui, H.B. Na, Luminescent quantum dots as platforms for probing *in vitro* and *in vivo* biological processes, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 138–166.
- D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise, W.W. Webb, Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo*, *Science* 300 (2003) 1434–1436.
- F. Helmchen, W. Denk, Deep tissue two-photon microscopy, *Nat. Methods* 2 (2005) 932–940.
- S.W. Wu, G. Han, D.J. Milliron, S. Aloni, V. Altoe, D.V. Talapin, B.E. Cohen, P.J. Schuck, Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 10917–10921.
- M.K. So, C.J. Xu, A.M. Loening, S.S. Gambhir, J.H. Rao, Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 339–343.
- Q.L. de Chermont, C. Chaneac, J. Seguin, F. Pelle, S. Maitrejean, J.P. Jolivet, D. Gourier, M. Bessodes, D. Scherman, Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 9266–9271.
- E.I. Altinoglu, J.H. Adair, Near infrared imaging with nanoparticles, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2 (2010) 461–477.
- R.G. Aswathy, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1417–1435.
- XX. He, K.M. Wang, Z. Cheng, *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of cancer with nanoparticle-based probes, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2 (2010) 349–366.
- Q.A. Ma, X.G. Su, Near-infrared quantum dots: synthesis, functionalization and analytical applications, *Analyst* 135 (2010) 1867–1877.
- H.S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B.I. Ipe, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1165–1170.
- D.E. Gomez, J. van Embden, P. Mulvaney, M.J. Fernee, H. Rubinsztein-Dunlop, Exciton-trion transitions in single CdSe–CdS core-shell nanocrystals, *ACS Nano* 3 (2009) 2281–2287.
- M.A. Hines, P. Guyot-Sionnest, Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 468–471.
- S. Ithurria, P. Guyot-Sionnest, B. Mahler, B. Dubertret, Mn(2+) as a radial pressure gauge in colloidal core/shell nanocrystals, *Phys. Rev. Lett.* 99 (2007).
- O. Faklaris, V. Joshi, T. Irinopoulou, P. Tauc, M. Sennour, H. Girard, C. Gesset, J.C. Arnault, A. Thorel, J.P. Boudou, P.A. Curmi, F. Treussart, Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: study of the uptake mechanism in mammalian cells, *ACS Nano* 3 (2009) 3955–3962.
- F. Erogobbo, C.A. Tien, C.W. Chang, K.T. Yong, W.C. Law, H. Ding, I. Roy, M.T. Swihart, P.N. Prasad, Bioconjugation of luminescent silicon quantum dots for selective uptake by cancer cells, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 1081–1088.
- T. Pons, N. Lequeux, B. Mahler, S. Sasnouski, A. Fragola, B. Dubertret, Synthesis of near-infrared-emitting, water-soluble CdTe/CdZnS core/shell quantum dots, *Chem. Mater.* 21 (2009) 1418–1424.
- B. Blackman, D. Battaglia, X.G. Peng, Bright and water-soluble near IR-emitting CdSe/CdTe/ZnSe Type-II/Type-I nanocrystals, tuning the efficiency and stability by growth, *Chem. Mater.* 20 (2008) 4847–4853.
- Z. Deng, O. Schulz, S. Lin, B. Ding, X. Liu, X. Wei, R. Ros, H. Yan, Y. Liu, Aqueous synthesis of zinc blende CdTe/CdS magic-core/thick-shell tetrahedral-shaped nanocrystals with emission tunable to near-infrared, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 5592–5593.
- S. Kim, B. Fisher, H.J. Eisler, M. Bawendi, Type-II quantum dots: CdTe/CdSe (core/shell) and CdSe/ZnTe (core/shell) heterostructures, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11466–11467.
- T. Pons, E. Pic, N. Lequeux, E. Cassette, L. Bezdetnaya, F. Guillemin, F. Marchal, B. Dubertret, Cadmium-free CuInS(2)/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity, *ACS Nano* 4 (2010) 2531–2538.
- L. Li, T.J. Daou, I. Texier, T.T. Kim Chi, N.Q. Liem, P. Reiss, Highly luminescent CuInS₂/ZnS core/shell nanocrystals: cadmium-free quantum dots for *in vivo* imaging, *Chem. Mater.* 21 (2009) 2422–2429.
- E. Cassette, T. Pons, C. Bouet, M. Helle, L. Bezdetnaya, F. Marchal, B. Dubertret, Synthesis and characterization of near-infrared Cu–In–Se/ZnS core/shell quantum dots for *in vivo* imaging, *Chem. Mater.* 22 (2010) 6117–6124.
- P.M. Allen, W.H. Liu, V.P. Chauhan, J. Lee, A.Y. Ting, D. Fukumura, R.K. Jain, M.G. Bawendi, InAs (ZnCdS) quantum dots optimized for biological imaging in the near-infrared, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 470–471.
- H.S. Choi, B.I. Ipe, P. Misra, J.H. Lee, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Tissue- and organ-selective biodistribution of NIR fluorescent quantum dots, *Nano Lett.* 9 (2009) 2354–2359.
- S. Tamang, G. Beaune, I. Texier, P. Reiss, Aqueous Phase Transfer of InP/ZnS Nanocrystals Conserving Fluorescence and High Colloidal Stability, *ACS Nano* 5 (2011) 9392–9402.
- H.G. Zhao, D.F. Wang, T. Zhang, M. Chaker, D.L. Ma, Two-step synthesis of high-quality water-soluble near-infrared emitting quantum dots via amphiphilic polymers, *Chem. Commun.* 46 (2010) 5301–5303.
- J.Y. Fan, P.K. Chu, Group IV nanoparticles: synthesis, properties, and biological applications, *Small* 6 (2010) 2080–2098.
- E.H. Sargent, Infrared quantum dots, *Adv. Mater.* 17 (2005) 515–522.
- L. Mangolini, D. Jurbergs, E. Rogojina, U. Kortshagen, High efficiency photoluminescence from silicon nanocrystals prepared by plasma synthesis and organic surface passivation, *Phys. Status Solidi C* 3 (2006) 3975–3978.
- L. Mangolini, E. Thimsen, U. Kortshagen, High-yield plasma synthesis of luminescent silicon nanocrystals, *Nano Lett.* 5 (2005) 655–659.
- F. Erogobbo, K.T. Yong, I. Roy, R. Hu, W.C. Law, W.W. Zhao, H. Ding, F. Wu, R. Kumar, M.T. Swihart, P.N. Prasad, *In vivo* targeted cancer imaging, sentinel lymph node mapping and multi-channel imaging with biocompatible silicon nanocrystals, *ACS Nano* 5 (2011) 413–423.
- Y. He, Y.L. Zhong, F. Peng, X.P. Wei, Y.Y. Su, Y.M. Lu, S. Su, W. Gu, L.S. Liao, S.T. Lee, One-pot microwave synthesis of water-dispersible, ultraphoto- and pH-stable, and highly fluorescent silicon quantum dots, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 14192–14195.

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

11

- [48] J.H. Park, L. Gu, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, M.J. Sailor, Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications, *Nat. Mater.* 8 (2009) 331–336.
- [49] D.C. Lee, J.M. Pietryga, I. Robel, D.J. Werder, R.D. Schaller, V.I. Klimov, Colloidal synthesis of infrared-emitting germanium nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 3436–3437.
- [50] D.A. Ruddy, J.C. Johnson, E.R. Smith, N.R. Neale, Size and bandgap control in the solution-phase synthesis of near-infrared-emitting germanium nanocrystals, *ACS Nano* 4 (2010) 7459–7466.
- [51] E.J. Henderson, M. Seino, D.P. Puzzo, G.A. Ozin, Colloidally stable germanium nanocrystals for photonic applications, *ACS Nano* 4 (2010) 7683–7691.
- [52] J.R. Rabeau, Y.L. Chin, S. Praver, F. Jelezko, T. Gaebel, J. Wrachtrup, Fabrication of single nickel-nitrogen defects in diamond by chemical vapor deposition, *Appl. Phys. Lett.* 86 (2005).
- [53] I.I. Vlasov, A.S. Barnard, V.G. Ralchenko, O.I. Lebedev, M.V. Kanzyuba, A.V. Saveliev, V.I. Konov, E. Goovaerts, Nanodiamond photoemitters based on strong narrow-band luminescence from silicon-vacancy defects, *Adv. Mater.* 21 (2009) 808–812.
- [54] A. Sahu, L.J. Qi, M.S. Kang, D.N. Deng, D.J. Norris, Facile synthesis of silver chalcogenide (Ag₂E; E = Se, Te) semiconductor nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 6509–6512.
- [55] M. Yarema, S. Pichler, M. Sytnyk, R. Seyrkammer, R.T. Lechner, G. Fritz-Popovski, D. Jarzab, K. Szendrei, R. Resel, O. Korovyanko, M.A. Loi, O. Paris, G. Hesser, W. Heiss, Infrared emitting and photoconducting colloidal silver chalcogenide nanocrystal quantum dots from a silylamide-promoted synthesis, *ACS Nano* 5 (2011) 3758–3765.
- [56] S.L. Shen, Y.J. Zhang, L. Peng, Y.P. Du, Q.B. Wang, Matchstick-shaped Ag₂S–ZnS heteronanostructures preserving both UV/blue and near-infrared photoluminescence, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 7115–7118.
- [57] B. Mahler, N. Lequeux, B. Dubertret, Ligand-controlled polytypism of thick-shell CdSe/CdS nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 953–959.
- [58] A.L. Rogach, T. Franzl, T.A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmuller, Y.P. Rakovich, J.F. Donegan, Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: state-of-the-art, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 14628–14637.
- [59] Y.A. Yang, H.M. Wu, K.R. Williams, Y.C. Cao, Synthesis of CdSe and CdTe nanocrystals without precursor injection, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 6712–6715.
- [60] S.A. Ivanov, A. Piryatinski, J. Nanda, S. Tretiak, K.R. Zavadil, W.O. Wallace, D. Werder, V.I. Klimov, Type-II core/shell CdS/ZnSe nanocrystals: synthesis, electronic structures, and spectroscopic properties, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 11708–11719.
- [61] A.M. Smith, S.M. Nie, Bright and compact alloyed quantum dots with broadly tunable near-infrared absorption and fluorescence spectra through mercury cation exchange, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 24–26.
- [62] S.D. Miao, S.G. Hickey, B. Rellinghaus, C. Waurisch, A. Eychmuller, Synthesis and characterization of cadmium phosphide quantum dots emitting in the visible red to near-infrared, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 5613–5615.
- [63] R.G. Xie, J.X. Zhang, F. Zhao, W.S. Yang, X.G. Peng, Synthesis of monodisperse, highly emissive, and size-tunable Cd(3)P(2) nanocrystals, *Chem. Mater.* 22 (2010) 3820–3822.
- [64] D.K. Harris, P.M. Allen, H.S. Han, B.J. Walker, J.M. Lee, M.G. Bawendi, Synthesis of cadmium arsenide quantum dots luminescent in the infrared, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 4676–4679.
- [65] I. Kang, F.W. Wise, Electronic structure and optical properties of PbS and PbSe quantum dots, *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* 14 (1997) 1632–1646.
- [66] F.W. Wise, Lead salt quantum dots: the limit of strong quantum confinement, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 773–780.
- [67] I. Moreels, Y. Justo, B. De Geyter, K. Hausraete, J.C. Martins, Z. Hens, Size-tunable, bright, and stable PbS quantum dots: a surface chemistry study, *ACS Nano* 5 (2011) 2004–2012.
- [68] B.L. Wehrenberg, C.J. Wang, P. Guyot-Sionnest, Interband and intraband optical studies of PbSe colloidal quantum dots, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 10634–10640.
- [69] J.M. Pietryga, D.J. Werder, D.J. Williams, J.L. Casson, R.D. Schaller, V.I. Klimov, J.A. Hollingsworth, Utilizing the lability of lead selenide to produce heterostructured nanocrystals with bright, stable infrared emission, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 4879–4885.
- [70] A.A. Guzelian, J.E.B. Katari, A.V. Kadavanich, U. Banin, K. Hamad, E. Juban, A.P. Alivisatos, R.H. Wolters, C.C. Arnold, J.R. Heath, Synthesis of size-selected, surface-passivated InP nanocrystals, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 7212–7219.
- [71] O.I. Micic, A.J. Nozik, Synthesis and characterization of binary and ternary III–V quantum dots, *J. Lumin.* 70 (1996) 95–107.
- [72] A.A. Guzelian, U. Banin, A.V. Kadavanich, X. Peng, A.P. Alivisatos, Colloidal synthesis and characterization of InAs nanocrystal quantum dots, *Appl. Phys. Lett.* 69 (1996) 1432–1434.
- [73] R. Xie, D. Battaglia, X. Peng, Colloidal InP nanocrystals as efficient emitters covering blue to near-infrared, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 15432–15433.
- [74] A. Aharoni, T. Mokari, I. Popov, U. Banin, Synthesis of InAs/CdSe/ZnSe core/shell1/shell2 structures with bright and stable near-infrared fluorescence, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 257–264.
- [75] R.G. Xie, X.G. Peng, Synthetic scheme for high-quality InAs nanocrystals based on self-focusing and one-pot synthesis of InAs-based core–shell nanocrystals, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 7677–7680.
- [76] J.P. Zimmer, S.W. Kim, S. Ohnishi, E. Tanaka, J.V. Frangioni, M.G. Bawendi, Size series of small indium arsenide–zinc selenide core–shell nanocrystals and their application to in vivo imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2526–2527.
- [77] Y.W. Cao, U. Banin, Growth and properties of semiconductor core/shell nanocrystals with InAs cores, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 9692–9702.
- [78] P.M. Allen, M.G. Bawendi, Ternary I–III–VI quantum dots luminescent in the red to near-infrared, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 9240–9241.
- [79] K. Nose, T. Omata, S. Otsuka-Yao-Matsuo, Colloidal synthesis of ternary copper indium diselenide quantum dots and their optical properties, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 3455–3460.
- [80] R.G. Xie, M. Rutherford, X.G. Peng, Formation of high-quality I–III–VI semiconductor nanocrystals by tuning relative reactivity of cationic precursors, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 5691–5697.
- [81] H.Z. Zhong, Y. Zhou, M.F. Ye, Y.J. He, J.P. Ye, C. He, C.H. Yang, Y.F. Li, Controlled synthesis and optical properties of colloidal ternary chalcogenide CuInS₂ nanocrystals, *Chem. Mater.* 20 (2008) 6434–6443.
- [82] H. Zhong, S.S. Lo, T. Mirkovic, Y. Li, Y. Ding, Y. Li, G.D. Scholes, Noninjection gram-scale synthesis of monodisperse pyramidal CuInS₂(2) nanocrystals and their size-dependent properties, *ACS Nano* 4 (2010) 5253–5262.
- [83] H. Zhong, Z. Wang, E. Bovero, Z. Lu, F.C.J.M. van Veggel, G.D. Scholes, Colloidal CuInS₂(2) nanocrystals in the quantum confinement regime: synthesis, optical properties, and electroluminescence, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 12396–12402.
- [84] D.E. Nam, W.S. Song, H. Yang, Noninjection, one-pot synthesis of Cu-deficient CuInS₂(2)/ZnS core/shell quantum dots and their fluorescent properties, *J. Colloid Interface Sci.* 361 (2011) 491–496.
- [85] T. Omata, K. Nose, S. Otsuka-Yao-Matsuo, Size dependent optical band gap of ternary I–III–VI(2) semiconductor nanocrystals, *J. Appl. Phys.* 105 (2009).
- [86] X.S. Tang, W.L. Cheng, E.S.G. Choo, J.M. Xue, Synthesis of CuInS₂(2)–ZnS alloyed nanocubes with high luminescence, *Chem. Commun.* 47 (2011) 5217–5219.
- [87] K.T. Yong, I. Roy, R. Hu, H. Ding, H.X. Cai, J. Zhu, X.H. Zhang, E.J. Bergey, P.N. Prasad, Synthesis of ternary CuInS₂(2)/ZnS quantum dot bioconjugates and their applications for targeted cancer bioimaging, *Integr. Biol. UK* 2 (2010) 121–129.
- [88] L.A. Li, A. Pandey, D.J. Werder, B.P. Khanal, J.M. Pietryga, V.I. Klimov, Efficient synthesis of highly luminescent copper indium sulfide-based core/shell nanocrystals with surprisingly long-lived emission, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 1176–1179.
- [89] J. Park, C. Dvoracek, K.H. Lee, J.F. Galloway, H.-E.C. Bhang, M.G. Pomper, P.C. Seanson, CuInSe/ZnS core/shell NIR quantum dots for biomedical imaging, *Small* 7 (2011) 3148–3152.
- [90] D.J. Norris, A.L. Efros, S.C. Erwin, Doped nanocrystals, *Science* 319 (2008) 1776–1779.
- [91] R.G. Xie, X.G. Peng, Synthesis of Cu-doped InP nanocrystals (d-dots) with ZnSe diffusion barrier as efficient and color-tunable NIR emitters, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 10645–10651.
- [92] L.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nat. Mater.* 4 (2005) 435–446.
- [93] F. Zhang, E. Lees, F. Amin, P. Rivera Gil, F. Yang, P. Mulvaney, W.J. Parak, Polymer-coated nanoparticles: a universal tool for biolabelling experiments, *Small* 7 (2011) 3113–3127.
- [94] W.R. Algar, D.E. Prasuhn, M.H. Stewart, T.L. Jennings, J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, L.L. Medintz, The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 825–858.
- [95] X.Y. Wu, H.J. Liu, J.Q. Liu, K.N. Haley, J.A. Treadway, J.P. Larson, N.F. Ge, F. Peale, M.P. Bruchez, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 41–46.
- [96] B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science* 298 (2002) 1759–1762.
- [97] S. Kim, M.G. Bawendi, Oligomeric ligands for luminescent and stable nanocrystal quantum dots, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14652–14653.
- [98] K. Susumu, H.T. Uyeda, L.L. Medintz, T. Pons, J.B. Delehanty, H. Mattoussi, Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 13987–13996.
- [99] W. Liu, M. Howarth, A.B. Greytak, Y. Zheng, D.G. Nocera, A.Y. Ting, M.G. Bawendi, Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 1274–1284.
- [100] E. Muro, T. Pons, N. Lequeux, A. Fragola, N. Sanson, Z. Lenkei, B. Dubertret, Small and stable sulfobetaine zwitterionic quantum dots for functional live-cell imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 4556–4557.
- [101] K. Susumu, E. Oh, J.B. Delehanty, J.B. Blanco-Canosa, B.J. Johnson, V. Jain, W.J. Hervey, W.R. Algar, K. Boeneman, P.E. Dawson, L.L. Medintz, Multifunctional compact zwitterionic ligands for preparing robust biocompatible semiconductor quantum dots and gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 9480–9496.
- [102] M. Darbandi, R. Thomann, T. Nann, Single quantum dots in silica spheres by microemulsion synthesis, *Chem. Mater.* 17 (2005) 5720–5725.
- [103] D. Gerion, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A.P. Alivisatos, Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 8861–8871.
- [104] Y. Chan, J.P. Zimmer, M. Stroh, J.S. Steckel, R.K. Jain, M.G. Bawendi, Incorporation of luminescent nanocrystals into monodisperse core–shell silica microspheres, *Adv. Mater.* 16 (2004) 2092–2097.
- [105] W.T. Al-Jamal, K.T. Al-Jamal, P.H. Bomans, P.M. Frederik, K. Kostarelos, Functionalized-quantum-dot-liposome hybrids as multimodal nanoparticles for cancer, *Small* 4 (2008) 1406–1415.
- [106] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, *Science* 307 (2005) 538–544.
- [107] S. Zurrada, A. Morabito, V. Galimberti, A. Luini, M. Greco, C. Bartoli, R. Raselli, N. Rossi, G. Vessecchia, N. Cascinelli, U. Veronesi, Importance of the level of axillary involvement in relation to traditional variables in the prognosis of breast cancer, *Int. J. Oncol.* 15 (1999) 475–480.

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

12

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews xxx (2012) xxx–xxx*

- [108] S. Ohnishi, S.J. Lomnes, R.G. Laurence, A. Gogbashian, G. Mariani, J.V. Frangioni, Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping, *Mol. Imaging* 4 (2005) 172–181.
- [109] S. Kim, Y.T. Lim, E.G. Soltesz, A.M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J.A. Parker, T. Mihajljevic, R.G. Laurence, D.M. Dor, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 93–97.
- [110] E. Tanaka, H.S. Choi, H. Fujii, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping, *Ann. Surg. Oncol.* 13 (2006) 1671–1681.
- [111] C.P. Parungo, Y.L. Colson, S.W. Kim, S. Kim, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Sentinel lymph node mapping of the pleural space, *Chest* 127 (2005) 1799–1804.
- [112] C.P. Parungo, S. Ohnishi, S.W. Kim, S. Kim, R.G. Laurence, E.G. Soltesz, F.Y. Chen, Y.L. Colson, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129 (2005) 844–850.
- [113] E.G. Soltesz, S. Kim, S.W. Kim, R.G. Laurence, A.M. De Grand, C.P. Parungo, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Sentinel lymph node mapping of the gastrointestinal tract by using invisible light, *Ann. Surg. Oncol.* 13 (2006) 386–396.
- [114] S.W. Kim, J.P. Zimmer, S. Ohnishi, J.B. Tracy, J.V. Frangioni, M.G. Bawendi, Engineering $\text{InAs}(\text{x})\text{P}(1-\text{x})/\text{InP}/\text{ZnSe}$ III–V alloyed core/shell quantum dots for the near-infrared, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 10526–10532.
- [115] R.F. Uren, R. Howman-Giles, J.F. Thompson, Patterns of lymphatic drainage from the skin in patients with melanoma, *J. Nucl. Med.* 44 (2003) 570–582.
- [116] B. Ballou, Quantum dot surfaces for use in vivo and in vitro, *Curr. Top. Dev. Biol.* 70 (2005) 103–120.
- [117] B. Ballou, L.A. Ernst, S. Andreko, T. Harper, J.A. Fitzpatrick, A.S. Waggoner, M.P. Bruchez, Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 389–396.
- [118] E. Pic, T. Pons, L. Bezdetnaya, A. Leroux, F. Guillemin, B. Dubertret, F. Marchal, Fluorescence imaging and whole-body biodistribution of near-infrared-emitting quantum dots after subcutaneous injection for regional lymph node mapping in mice, *Mol. Imaging Biol.* 12 (2009) 394–405.
- [119] J.D. Smith, G.W. Fisher, A.S. Waggoner, P.G. Campbell, The use of quantum dots for analysis of chick CAM vasculature, *Microvasc. Res.* 73 (2007) 75–83.
- [120] B. Ballou, B.C. Lagerholm, L.A. Ernst, M.P. Bruchez, A.S. Waggoner, Noninvasive imaging of quantum dots in mice, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004) 79–86.
- [121] F. Duong, T. Pons, C. Pestourie, L. Herin, B. Theze, K. Gombert, B. Mahler, F. Hinnen, B. Kuhnast, F. Dolle, B. Dubertret, B. Tavitian, Fluorine-18-labeled phospholipid quantum dot micelles for in vivo multimodal imaging from whole body to cellular scales, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 1921–1926.
- [122] M.L. Schipper, Z. Cheng, S.W. Lee, L.A. Bentolila, G. Iyer, J. Rao, X. Chen, A.M. Wu, S. Weiss, S.S. Gambhir, microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice, *J. Nucl. Med.* 48 (2007) 1511–1518.
- [123] D.E. Owens 3rd, N.A. Peppas, Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93–102.
- [124] T.J. Daou, L. Li, P. Reiss, V. Jossierand, I. Texier, Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots, *Langmuir* 25 (2009) 3040–3044.
- [125] J.A.J. Fitzpatrick, S.K. Andreko, L.A. Ernst, A.S. Waggoner, B. Ballou, M.P. Bruchez, Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo, *Nano Lett.* 9 (2009) 2736–2741.
- [126] M. Vubin, R. Vinayakan, A. John, V. Raji, C.S. Rejiya, A. Abraham, Biokinetics and in vivo distribution behaviours of silica-coated cadmium selenide quantum dots, *Biol. Trace Elem. Res.* 142 (2011) 213–222.
- [127] S. Bonvalot, R. Miceli, M. Berselli, S. Causseret, C. Colombo, L. Mariani, H. Bouzaiane, C. Le Pechoux, P.G. Casali, A. Le Cesne, M. Fiore, A. Gronchi, Aggressive surgery in retroperitoneal soft tissue sarcoma carried out at high-volume centers is safe and is associated with improved local control, *Ann. Surg. Oncol.* 17 (2010) 1507–1514.
- [128] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O.D. Wiestler, F. Zanella, R. Hans-Jürgen, A.-G.S. Grp, Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol.* 7 (2006) 392–401.
- [129] Y. Matsumura, H. Maeda, A New concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy – mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387–6392.
- [130] R.K. Jain, Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 1 (1999) 241–263.
- [131] X.H. Gao, Y.Y. Cui, R.M. Levenson, L.W.K. Chung, S.M. Nie, In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 969–976.
- [132] A. Papagiannaros, T. Levchenko, W. Hartner, D. Mongayt, V. Torchilin, Quantum dots encapsulated in phospholipid micelles for imaging and quantification of tumors in the near-infrared region, *Nanomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 216–224.
- [133] Z. Popovic, W.H. Liu, V.P. Chauhan, J. Lee, C. Wong, A.B. Greytak, N. Insin, D.G. Nocera, D. Fukumura, R.K. Jain, M.G. Bawendi, A nanoparticle size series for in vivo fluorescence imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 8649–8652.
- [134] V.P. Chauhan, Z. Popović, O. Chen, J. Cui, D. Fukumura, M.G. Bawendi, R.K. Jain, Fluorescent nanorods and nanospheres for real-time in vivo probing of nanoparticle shape-dependent tumor penetration, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 11417–11420.
- [135] S.D. Perrault, C. Walkey, T. Jennings, H.C. Fischer, W.C.W. Chan, Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design, *Nano Lett.* 9 (2009) 1909–1915.
- [136] M.E. Akerman, W.C.W. Chan, P. Laakkonen, S.N. Bhatia, E. Ruoslahti, Nanocrystal targeting in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 12617–12621.
- [137] S.H. Bhang, N. Won, T.J. Lee, H. Jin, J. Nam, J. Park, H. Chung, H.S. Park, Y.E. Sung, S.K. Hahn, B.S. Kim, S. Kim, Hyaluronic acid-quantum dot conjugates for in vivo lymphatic vessel imaging, *ACS Nano* 3 (2009) 1389–1398.
- [138] A. Jayagopal, P.K. Russ, F.R. Haselton, Surface engineering of quantum dots for in vivo vascular imaging, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1424–1433.
- [139] R. Kikkeri, B. Lepenies, A. Adibekian, P. Laurino, P.H. Seeberger, In vitro imaging and in vivo liver targeting with carbohydrate capped quantum dots, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 2110–2112.
- [140] X.F. Yu, L.D. Chen, K.Y. Li, Y. Li, S. Xiao, X. Luo, J. Liu, L. Zhou, Y.L. Deng, D.W. Pang, Q.Q. Wang, Immunofluorescence detection with quantum dot bioconjugates for hepatoma in vivo, *J. Biomed. Opt.* 12 (2007).
- [141] H. Tada, H. Higuchi, T.M. Wanatabe, N. Ohuchi, In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice, *Cancer Res.* 67 (2007) 1138–1144.
- [142] L.L. Yang, H. Mao, Y.A. Wang, Z.H. Cao, X.H. Peng, X.X. Wang, H.W. Duan, C.C. Ni, Q.G. Yuan, G. Adams, M.Q. Smith, W.C. Wood, X.H. Gao, S.M. Nie, Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging, *Small* 5 (2009) 235–243.
- [143] D.S. Lidke, P. Nagy, R. Heintzmann, D.J. Arndt-Jovin, J.N. Post, H.E. Grecco, E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 198–203.
- [144] P. Diagaradjane, J.M. Orenstein-Cardona, N.E. Colon-Casasnovas, A. Deorukhkar, S. Shentu, N. Kuno, D.L. Schwartz, J.G. Gelovani, S. Krishnan, Imaging epidermal growth factor receptor expression in vivo: Pharmacokinetic and biodistribution characterization of a bioconjugated quantum dot nanoprobe, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 731–741.
- [145] W.B. Cai, D.W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q.Z. Cao, S.X. Wang, S.S. Gambhir, X.Y. Chen, Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects, *Nano Lett.* 6 (2006) 669–676.
- [146] B.R. Smith, Z. Cheng, A. De, A.L. Koh, R. Sinclair, S.S. Gambhir, Real-time intravital imaging of RGD-quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature, *Nano Lett.* 8 (2008) 2599–2606.
- [147] H.S. Choi, W.H. Liu, F.B. Liu, K. Nasr, P. Misra, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Design considerations for tumour-targeted nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 42–47.
- [148] X.L. Gao, J. Chen, J.Y. Chen, B.X. Wu, H.Z. Chen, X.G. Jiang, Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 2189–2195.
- [149] K.C. Weng, C.O. Noble, B. Papahadjopoulos-Sternberg, F.F. Chen, D.C. Drummond, D.B. Kirpotin, D.H. Wang, Y.K. Hom, B. Hann, J.W. Park, Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo, *Nano Lett.* 8 (2008) 2851–2857.
- [150] J. Nicolas, D. Brambilla, O. Carion, T. Pons, I. Maksimovic, E. Larquet, B. Le Droumaguet, K. Andrieux, B. Dubertret, P. Couvreur, Quantum dot-loaded PEGylated poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for in vitro and in vivo imaging, *Soft Matter* 7 (2011) 6187–6193.
- [151] Y. Lei, H. Tang, L. Yao, R. Yu, M. Feng, B. Zou, Applications of mesenchymal stem cells labeled with Tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 421–427.
- [152] E.B. Vouira, J.K. Jaiswal, H. Mattoussi, S.M. Simon, Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy, *Nat. Med.* 10 (2004) 993–998.
- [153] A. Jayagopal, Y.R. Su, J.L. Blakemore, M.F. Linton, S. Fazio, F.R. Haselton, Quantum dot mediated imaging of atherosclerosis, *Nanotechnology* 20 (2009).
- [154] A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuki, K. Yamamoto, Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 46–53.
- [155] C.M. Shi, Y. Zhu, Z.H. Xie, W.P. Qian, C.L. Hsieh, S.M. Nie, Y.P. Su, H.E. Zhou, L.W.K. Chung, Visualizing human prostate cancer cells in mouse skeleton using bioconjugated near-infrared fluorescent quantum dots, *Urology* 74 (2009) 446–451.
- [156] M. Stroh, J.P. Zimmer, D.G. Duda, T.S. Levchenko, K.S. Cohen, E.B. Brown, D.T. Scadden, V.P. Torchilin, M.G. Bawendi, D. Fukumura, R.K. Jain, Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo, *Nat. Med.* 11 (2005) 678–682.
- [157] A.Y. Louie, Multimodality imaging probes: design and challenges, *Chem. Rev.* 110 (2010) 3146–3195.
- [158] W.J.M. Mulder, R. Koole, R.J. Brandwijk, G. Storm, P.T.K. Chin, G.J. Strijkers, C.D. Donega, K. Nicolay, A.W. Griffioen, Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe, *Nano Lett.* 6 (2006) 1–6.
- [159] W.J.M. Mulder, K. Castermans, J.R. van Beijnum, M.G.A.O. Egbrink, P.T.K. Chin, Z.A. Fayad, C.W.G.M. Lowik, E.L. Kaijzel, I. Que, G. Storm, G.J. Strijkers, A.W. Griffioen, K. Nicolay, Molecular imaging of tumor angiogenesis using alpha v beta 3-integrin targeted multimodal quantum dots, *Angiogenesis* 12 (2009) 17–24.
- [160] S. Wang, B.R. Jarrett, S.M. Kauzlarich, A.Y. Louie, Core/shell quantum dots with high relaxivity and photoluminescence for multimodality imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 3848–3856.
- [161] K.T. Yong, Mn-doped near-infrared quantum dots as multimodal targeted probes for pancreatic cancer imaging, *Nanotechnology* 20 (2009).
- [162] L. Li, E.S.G. Choo, Z. Liu, J. Ding, J. Xue, Double-layer silica core-shell nanospheres with superparamagnetic and fluorescent functionalities, *Chem. Phys. Lett.* 461 (2008) 114–117.

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

ARTICLE IN PRESS

E. Cassette et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews* xxx (2012) xxx–xxx

13

- [163] B. Zhang, J. Cheng, X. Gong, X. Dong, X. Liu, G. Ma, J. Chang, Facile fabrication of multi-colors high fluorescent/superparamagnetic nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 322 (2008) 485–490.
- [164] R. Wilson, D.G. Spiller, I.A. Prior, R. Bhatt, A. Hutchinson, Magnetic microspheres encoded with photoluminescent quantum dots for multiplexed detection, *J. Mater. Chem.* 17 (2007) 4400–4406.
- [165] J.-S. Choi, Y.-W. Jun, S.-I. Yeon, H.C. Kim, J.-S. Shin, J. Cheon, Biocompatible heterostructured nanoparticles for multimodal biological detection, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 15982–15983.
- [166] G. van Dam, G. Themelis, L. Crane, N. Harlaar, R. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. de Jong, H. Arts, A. van der Zee, J. Bart, P. Low, V. Ntziachristos, Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results, *Nat. Med.* 17 (2011) 1315–1319.
- [167] D. Pan, L. An, Z. Sun, W. Hou, Y. Yang, Z. Yang, Y. Lu, Synthesis of Cu–In–S ternary nanocrystals with tunable structure and composition, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 5620–5621.

Please cite this article as: E. Cassette, et al., Design of new quantum dot materials for deep tissue infrared imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.016>

B. Nanoparticules de silice renfermant un fluorophore organique

1. Structure chimique des nanoparticules de silice

Il existe trois sortes de silice (ou dioxyde de silicium, SiO_2) : la silice cristalline, la silice amorphe naturelle et la silice amorphe synthétique ^[211]. La différence entre la silice cristalline et la silice amorphe porte sur les connections entre les unités de SiO_2 . Alors que l'organisation des tétraèdres de silice est régulière dans la silice cristalline, la silice amorphe consiste en un réseau non répétitif de tétraèdres ^[211]. Les nanoparticules de silice (NPSi) utilisées dans les applications biologiques sont formées par de la silice amorphe synthétique, parmi laquelle, on peut distinguer les gels de silice, la silice précipitée, la silice pyrogénique ou la silice colloïdale. Les trois premières formes de silice amorphe synthétique étant composé d'agrégats et d'agglomérats de particules primaires, leur taille est bien souvent supérieure à 100 nm. Les nanoparticules utilisées dans le repérage du GS se doivent d'avoir une taille plus petite ; elles sont donc formées de particules sphériques de silice colloïdale en suspension, dont la stabilité est assurée par les interactions électrostatiques entre nanoparticules. Les suspensions de NPSi synthétisées sont généralement monodisperses, avec une taille de particules pouvant varier de 5 à 100 nm. Les groupements silanol (Si-OH) de surface rendent les NPSi non modifiées hydrophiles ^[211].

Alors que la méthode de synthèse de microparticules de silice a été établie en 1968 ^[212], l'incorporation d'un fluorophore organique dans une matrice de silice a été rapportée pour la première fois en 1992, avec une taille de nanoparticule de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres ^[213]. Par la suite, les travaux de synthèse se sont portés sur la diminution de la taille de ces nanoparticules de 10 à 100 nm ^[214,215]. Le premier processus d'encapsulation décrit implique tout d'abord la liaison covalente du fluorophore à un précurseur de la silice (le tetraethoxysilane monomérique ou TEOS) puis son hydrolyse et sa condensation pour former le cœur de la nanoparticule. La coque est ensuite synthétisée par la condensation de précurseurs dépourvus de fluorophores et la taille de la nanoparticule est déterminée par l'épaisseur de la coque. L'avantage d'une telle synthèse réside dans le fait que le fluorophore ne peut pas se détacher de la matrice de silice, réduisant ainsi les risques de relargage dans le milieu ^[215].

D'autres stratégies de synthèse, basées sur des microémulsions inverses ^[216] ou des micelles ^[217] ont également été développées et diffèrent par les milieux de réaction utilisés lors de la synthèse. Le choix de la méthode de synthèse est guidé par la nature du fluorophore à encapsuler : si le fluorophore est hydrosoluble, la microémulsion inverse est à privilégier mais si le fluorophore est hydrophobe, les micelles sont préférables ^[218]. Un complexe peut cependant être formé entre un fluorophore organique hydrophobe et une molécule hydrophile telle que le dextran afin d'utiliser la synthèse en microémulsion inverse. Le dextran est une molécule hautement hydrophile présentant une faible toxicité et qui est utilisée dans de nombreuses applications biologiques ^[219]. La synthèse des NPSi par la méthode de microémulsion inverse consiste en l'addition de TEOS dans une solution de nanogouttes d'eau, stabilisées par des molécules de surfactant et dispersées dans une phase lipidique (Figure 22). En utilisant cette stratégie, les fluorophores organiques rendus hydrosolubles par l'ajout de dextran sont encapsulés à l'intérieur de la matrice de silice pendant la polymérisation du TEOS ^[216].

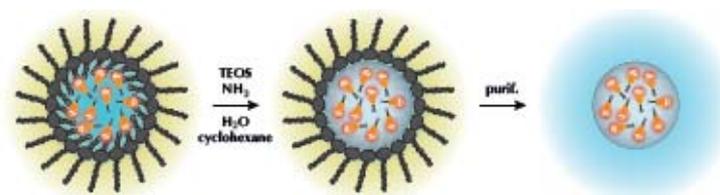


Figure 22 : Schéma de la synthèse de NPSi par microémulsion inverse ^[220]

La structure cœur / coque des NPSi permet de fonctionnaliser leur surface avec des groupements tels que des oligopeptides, des protéines, des anticorps ou des résidus PEG ^[217]. La condensation du TEOS forme un cœur de silice contenant le fluorophore lié covalamment ou physiquement piégé à l'intérieur du cœur, surmonté d'une coque formée par les groupements PEG du surfactant ^[218].

2. Caractérisation des nanoparticules

Afin de valider la synthèse des NPSi, il est important de les caractériser correctement. Pour cela, les propriétés telles que la stabilité, la chimie de surface, la taille et la morphologie des NPSi doivent être déterminées.

Actuellement, plusieurs méthodes permettent de mesurer la taille des nanoparticules. Les techniques basées sur la microscopie (microscopie électronique à transmission ou MET, microscopie à force atomique) renseignent sur la taille et la forme mais ne donnent aucune information quantitative quant à la dispersité en taille des NPSi.

En revanche, les techniques basées sur la diffusion de la lumière (statique ou dynamique : DLS pour *dynamic light scattering*) permettent de mesurer la taille et la dispersion des NPSi ^[213]. Généralement, le rayon moyen des particules mesuré par MET est légèrement inférieur à celui obtenu par DLS. Cette différence s'explique par la contraction des particules résultant du faisceau d'électrons en MET. Pour les nanoparticules de grande taille, cette diminution de rayon reste relativement petite par rapport au rayon de la particule, mais pour les particules de petite taille, cette variation est proportionnellement importante ^[213].

La charge électrique de surface des NPSi est caractérisée par le potentiel zêta (ζ), qui représente la charge globale d'une particule dans un milieu donné. La valeur de ζ donne une indication sur les forces de répulsion entre nanoparticules et permet donc de prédire la stabilité à long terme d'une solution de nanoparticules dans un solvant particulier. Si les particules ont un ζ très négatif ou très positif (valeur absolue supérieure à 30 mV), elles se repoussent et n'ont pas tendance à s'agréger ^[178]. Les groupements silanol (Si-O⁻) présents à la surface des NPSi sont ionisés en solution, empêchant ainsi l'agrégation des particules grâce à leur forte charge négative. Cependant, le pH ou la concentration en sels des tampons biologiques peuvent être à l'origine de l'agrégation des particules ou de l'adsorption de molécules biologiques à leur surface. La valeur de ζ peut également servir à vérifier le couplage des NPSi avec des molécules masquant les charges de surface ou des molécules chargées par elle-même ^[178].

3. Avantages de l'encapsulation d'un fluorophore dans une matrice de silice

i. Solubilisation de fluorophores hydrophobes

En attachant une molécule polaire de dextran à un fluorophore hydrophobe, la molécule de fluorophore devient alors hydrosoluble. La synthèse de microémulsion inverse en conditions acides crée une interaction électrostatique entre le fluorophore et la matrice de silice chargée négativement, contraignant le fluorophore à rester à l'intérieur de la matrice de silice ^[216]. Cette méthode de synthèse permet donc d'encapsuler de 10 à 100 molécules de fluorophore très hydrophobes dans les NPSi ^[218]. La plupart des fluorophores existants peuvent être encapsulés dans une matrice de silice, ce qui permet une diversité de l'émission de fluorescence en fonction des applications.

ii. Amélioration des propriétés photophysiques

La silice est un matériau hydrophile photophysiquement inerte, c'est-à-dire qu'il est transparent à la lumière visible et qu'il n'est pas impliqué dans les processus de transfert d'énergie ou d'électrons. Les propriétés photophysiques des NPSi sont donc uniquement dues au fluorophore encapsulé ^[218]. A l'inverse, les matrices photoactives telles que celles rencontrées dans les nanoparticules d'or ou de titane peuvent être à l'origine de la photodécomposition ou de l'extinction de la fluorescence du chromophore ^[221].

La fluorescence de l'ensemble cœur / coque des nanoparticules par rapport au fluorophore libre est fortement améliorée grâce à la présence de la coque de silice qui protège le fluorophore d'une interaction avec le solvant ^[222]. Pour les équipes utilisant l'ajout de dextran au fluorophore, le ratio de fluorescence entre le fluorophore libre et le fluorophore lié au dextran et intégré dans une NPSi peut atteindre 10^4 ^[216]. Cette augmentation de fluorescence s'explique par le fait que le dextran permet de stabiliser le fluorophore à l'intérieur de la matrice de silice et, en s'intercalant entre les molécules de fluorophores, réduit les phénomènes de quenching de fluorescence ^[216]. Cet avantage permet de réduire considérablement la limite de détection dans les échantillons biologiques.

La coque de silice réduit également le processus de photoblanchiment, à l'origine de la perte de fluorescence des fluorophores organiques (Figure 23) ^[222]. Suite à une irradiation lumineuse, le fluorophore interagit avec les molécules de dioxygène présentes dans le milieu, ce qui conduit à la création d'espèces réactives de l'oxygène qui le transforment ou le détruisent ^[223,224]. Ces phénomènes de modification ou de destruction du fluorophore sont responsables de la diminution irréversible de la fluorescence ^[224]. La présence d'une coque de silice empêche les réactions entre l'oxygène du milieu et le fluorophore localisé dans le cœur de la nanoparticule, réduisant ainsi le photoblanchiment ^[216].

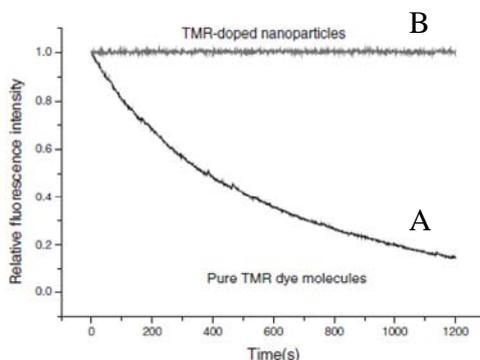


Figure 23 : Courbes de photoblanchiment de la tétraméthylrhodamine seule ou encapsulée dans une nanoparticule suite à une irradiation continue ^[216]

A : molécule de tétraméthylrhodamine (TMR) seule.

B : molécule TMR associée au dextran et incorporée dans une nanoparticule.

L'utilisation de NPSi évite le recours à des systèmes d'amplification de signal. Lorsqu'une NPSi est présente dans un organe d'intérêt, ce sont les centaines de molécules de fluorophore incluses dans la matrice de silice qui seront excitées par la longueur d'onde incidente. Le signal de fluorescence est ainsi fortement augmenté, ce qui facilite la détection de faibles quantités de NPSi [178].

iii. Biocompatibilité

Bien que des investigations plus approfondies doivent être menées afin de vérifier l'absence de toxicité des NPSi due à leur petite taille, il est admis que la silice n'est pas toxique par elle-même [218]. Les premiers résultats prouvant la biocompatibilité des NPSi ont été réalisées *in vitro* sur des cellules en culture avec des tests basés sur leur activité mitochondriale [225-228]. La libération dans le milieu de culture de la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme normalement présente dans le cytoplasme des cellules vivantes, est un indice de la lésion des membranes cellulaires et a été également utilisé comme test de cytotoxicité des nanoparticules [229,230].

La toxicité d'un composé étant dépendante de la dose administrée, du temps d'exposition et de la voie d'administration, il est important d'étudier la toxicité *in vivo* des NPSi dans les conditions réelles d'exposition.

La plupart des études portant sur les NPSi étudient leur toxicité *in vitro* et supposent que les NPSi sont biocompatibles, non toxiques et non antigéniques [153,228] mais il n'existe que peu de données relatives à leur toxicité *in vivo*. Cependant, les résultats des tests de toxicité *in vitro* sont parfois différents d'un test à l'autre et les modèles *in vitro* ne reflètent pas toujours correctement la toxicité *in vivo*. Il est donc important d'identifier les organes cibles des NPSi par une étude de biodistribution afin d'orienter les tests de toxicité *in vitro* et *in vivo* [193].

iv. Multimodalité

La matrice de silice peut servir de plate-forme pour le greffage d'agents de ciblage tels que des anticorps, des peptides ou des petites molécules [231].

En plus de l'incorporation d'un fluorophore émettant dans le proche infrarouge, les nanoparticules de silice peuvent porter des agents pour d'autres modalités d'imagerie permettant de combiner leurs avantages. Ainsi, l'utilisation de gadolinium permet de repérer les nanoparticules grâce à l'imagerie par résonance magnétique [232], le gallium 68 par une gamma caméra [233] ou l'iode 124 par tomographie à émission de positons [150].

Enfin, les nanoparticules de silice peuvent être fonctionnalisées par l'ajout d'agents anticancéreux comme un photosensibilisateur ^[234] ou la doxorubicine ^[235] afin d'ajouter une composante thérapeutique à leur utilité diagnostique. De telles nanoparticules combinant des propriétés diagnostiques et thérapeutiques dans une seule et même particule portent l'adjectif « théranostique ».

Les QDs et les NPSi sont des nanoparticules fluorescentes dont les propriétés physico-chimiques (taille, revêtement de surface, longueur d'onde d'émission, ...) semblent bien adaptées pour le repérage du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge.

Chapitre II : Objectifs

L'objectif principal de ces travaux est de démontrer que les nanoparticules fluorescentes émettant dans le proche infrarouge (QDs et nanoparticules de silice) peuvent être une alternative intéressante aux méthodes actuelles (colorant bleu et radiocolloïde) de repérage du GS.

Dans ce but, plusieurs types de nanoparticules fluorescentes, dont les **Quantum Dots** (QDs) et les **nanoparticules de silice** (NPSi), ont été étudiés pour la cartographie du GS.

Les **QDs** présentent des caractéristiques photophysiques exceptionnelles (forte brillance et photostabilité, longueur d'onde d'émission de fluorescence ajustable en fonction de la taille et de la composition du cœur, ...) qui les rendent très attractifs ^[180,183]. De récentes études ont démontré le fort pouvoir de visualisation du GS par les QDs mais leur contenu en cadmium, élément très toxique, exclut leur utilisation en clinique ^[187,197,236,237]. Les résultats présentés ici concernent des QDs à base d'indium. D'après de précédents travaux, les QDs-indium possèdent de bonnes propriétés de fluorescence et une toxicité aiguë locale réduite par rapport aux QDs-cadmium ^[238]. Il a été prouvé que la migration des traceurs actuellement utilisés est affectée par la présence de foyers métastatiques dans le GS ^[103]. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a vérifié que la visualisation du GS par imagerie de fluorescence est possible en cas d'envahissement métastatique du ganglion. Dans la première partie de cette thèse, nous avons donc étudié la cartographie des GS métastatiques dans un modèle orthotopique syngénique de carcinome mammaire murin par imagerie de fluorescence à l'aide de QDs-indium. La biodistribution et la toxicité de ces QDs ont également été analysées.

Les **NPSi** font partie des traceurs fluorescents intensément étudiés dans le repérage du GS puisqu'elles présentent l'avantage d'être biocompatibles. La cyanine 7 est un fluorophore émettant dans le proche infrarouge qui peut être intégré dans des NPSi. Une précédente étude a démontré que les NPSi encapsulant la cyanine 7 peuvent être utilisées pour l'imagerie intravitale de tumeurs ^[239], mais le repérage du GS et la biocompatibilité de ces NPSi n'ont jamais été analysés. Dans la seconde partie de ce manuscrit, les avantages de l'encapsulation de la cyanine 7 dans une NPSi ont été évalués. Pour cela, les capacités de migration dans le GS, la biodistribution, l'excrétion et la toxicité de la cyanine 7 seule ont été comparées à celles des NPSi. Pour cela, deux types de NPSi ont été étudiés : des NPSi renfermant de la cyanine 7 de façon non covalente et de façon covalente.

Chapitre III : Résultats

I. Visualisation du ganglion sentinelle grâce aux Quantum Dots indium émettant dans le proche infrarouge dans un modèle métastatique murin de cancer mammaire

A. Résumé

Des Quantum Dots (QDs) à base de cadmium émettant dans le proche infrarouge peuvent être utilisés afin de repérer le GS par imagerie de fluorescence, mais leur toxicité, due à la présence de métaux lourds dans leur cœur limite leurs applications. Nos précédents travaux ont démontrés que les QDs à base d'indium présentent une plus faible toxicité aigüe locale *in vivo* que les QDs à base de cadmium.

Cette étude a pour but de démontrer les bonnes capacités migratoires des QDs-indium dans les ganglions lymphatiques même en cas d'envahissement métastatique, d'établir leur biodistribution et de comparer la toxicité des QDs-cadmium avec celle des QDs-indium.

Nous avons confirmé la faible toxicité des QDs-indium par différents tests *in vitro*. Les QDs-indium présentent une cytotoxicité plus faible que les QDs-cadmium sur des fibroblastes humains (test MTT) et une absence d'hémolyse. Les études *in vivo* ont permis de démontrer que le GS peut être visualisé quelques minutes après l'injection de QDs-indium, avec une augmentation progressive de la fluorescence jusque 8 h. Pour confirmer ces résultats, la quantité d'indium dans les organes a été déterminée par spectrométrie de masse (ICP-MS) à différents temps après injection. La quantité de QDs diminue rapidement au point d'injection dans les premières heures suivant l'administration, avec une augmentation en parallèle dans les ganglions régionaux, et dans une plus faible mesure, dans le foie et la rate. Les souris étant hébergées dans des cages à métabolisme, les excréments (urines et fèces) ont été recueillies quotidiennement et analysées par ICP-MS. L'excrétion des QDs se fait exclusivement par la voie fécale, avec des valeurs atteignant 3,5 % de la dose injectée excrétée au bout de 4 jours alors que les quantités dans les urines ne sont pas détectables.

L'envahissement du GS peut être un obstacle à sa visualisation en raison de l'obstruction des vaisseaux et des ganglions lymphatiques par les cellules métastatiques. La visualisation du GS dans un modèle métastatique a été effectuée suite à l'injection de QDs-indium chez des souris porteuses de tumeurs.

Le modèle syngénique orthotopique utilisé est la greffe sous-cutanée de cellules 4T1 (cellules de carcinome mammaire de souris) dans la mamelle antérieure de souris Balb/C. Le statut métastatique des ganglions a été apprécié par la présence de la cytokératine 19 par immunohistochimie et par une technique de biologie moléculaire. Cette protéine du cytosquelette est présente dans les cellules épithéliales, notamment dans les cellules de carcinomes mammaires, mais est absente des tissus lymphoïdes des ganglions. Elle est donc un bon marqueur de l'envahissement métastatique des GS. Tous les ganglions envahis ont pu être détectés par imagerie de fluorescence proche infrarouge et aucune différence d'intensité de fluorescence n'a été mise en évidence entre les ganglions sains et les ganglions envahis, démontrant que la migration des QDs dans le GS n'est pas bloquée par les cellules métastatiques.

Les QDs dépourvus de cadmium et émettant dans le proche infrarouge sont donc de bons marqueurs du GS.

B. Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting quantum dots in a murine metastatic breast cancer model

Helle M., Cassette E., Bezdetnaya L., Pons T., Leroux A., Plénat F., Guillemin F., Dubertret B., Marchal F.

Plos One 7 (8): e44433

DOI : 10.1371/journal.pone.0044433

Visualisation of Sentinel Lymph Node with Indium-Based near Infrared Emitting Quantum Dots in a Murine Metastatic Breast Cancer Model

Marion Helle^{1,2,3}, Elsa Cassette⁴, Lina Bezdetnaya^{1,2,3*}, Thomas Pons⁴, Agnès Leroux⁵, François Plénat⁵, François Guillemin^{1,2,3}, Benoît Dubertret⁴, Frédéric Marchal^{1,2,3}

1 Université de Lorraine, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR 7039, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **2** CNRS, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR 7039, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **3** Centre Alexis Vautrin, Research Unit, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **4** Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, UMR 8213, Paris, France, **5** EA4421 Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SIGReTO), Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Abstract

Due to its non-invasiveness, high temporal resolution and lower cost, fluorescence imaging is an interesting alternative to the current method (blue dye and radiocolloid) of sentinel lymph node (SLN) mapping in breast cancer. Near-infrared (NIR) emitting cadmium-based Quantum Dots (QDs) could be used for this purpose; however, their wide application is limited because of the toxicity of heavy metals composing the core. Our recent work demonstrated that indium-based QDs exhibit a weak acute local toxicity *in vivo* compared to their cadmium-based counterparts. In the present study we confirmed the weak toxicity of CuInS₂/ZnS QDs in different *in vitro* models. Further *in vivo* studies in healthy mice showed that In-based QDs could be visualised in SLN in a few minutes after administration with a progressive increase in fluorescence until 8 h. The quantity of indium was assessed in selected organs and tissues by inductively coupled plasma – mass spectroscopy (ICP-MS) as a function of post-injection time. QD levels decrease rapidly at the injection point in the first hours after administration with a parallel increase in the lymph nodes and to a lesser extent in the liver and spleen. In addition, we observed that 3.5% of the injected indium dose was excreted in faeces in the first 4 days, with only trace quantities in the urine. Metastatic spread to the lymph nodes may hamper its visualisation. Therefore, we further performed non-invasive fluorescence measurement of QDs in SLN in tumour-bearing mice. Metastatic status was assessed by immunohistology and molecular techniques and revealed the utmost metastatic invasion of 36% of SLN. Fluorescence signal was the same irrespective of SLN status. Thus, near-infrared emitting cadmium-free QDs could be an excellent SLN tracer.

Citation: Helle M, Cassette E, Bezdetnaya L, Pons T, Leroux A, et al. (2012) Visualisation of Sentinel Lymph Node with Indium-Based near Infrared Emitting Quantum Dots in a Murine Metastatic Breast Cancer Model. PLoS ONE 7(8): e44433. doi:10.1371/journal.pone.0044433

Editor: Martin W Brechbiel, National Institute of Health, United States of America

Received: March 1, 2012; **Accepted:** August 3, 2012; **Published:** August 30, 2012

Copyright: © 2012 Helle et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Institut National du Cancer (INCa), the Ligue Nationale contre le cancer, the Lorraine Region and the Centre Alexis Vautrin. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: l.bolotine@nancy.unicancer.fr

Introduction

The metastatic status of the sentinel lymph node (SLN) is a determinant predictor of recurrence and survival [1] and directs treatment modality [2]. The current method for localising the SLN consists of an injection of a blue dye and a radiolabelled colloid [3]. However, both procedures present some disadvantages, such as the use of radioactivity and allergic reactions [4]. The ideal time for injection of the radiocolloid is also not well established, thus requiring interdepartmental scheduling for this two-step procedure. New methods based on near-infrared (NIR) fluorescence imaging are now under consideration. NIR imaging offers multiple advantages such as deep tissue penetration and high temporal resolution. An additional benefit is related to reduced hospitalisation, since the SLN could be detected just few minutes after NIR tracer injection.

Indocyanine green (ICG) is the first NIR emitting tracer that has been used for the detection of the SLN. ICG coupled to human serum albumine (HSA), thus reaching a hydrodynamic

diameter of 7 nm, has been successfully tested for the detection of SLN in an animal model of spontaneous melanoma [5]. Likewise, clinical studies have already proven the good detection rate of SLN with this technique in various tumour types [6–11]. Nevertheless some problems related to ICG-HSA size and fluorescence stability upon irradiation persist. Fast photobleaching has been observed and the small size of ICG-HSA results in a rapid migration from SLN to adjacent nodes a few minutes after injection [7]. Recently, the cyanine dyes, including ICG have been embedded into lipid nanoparticles (Lipidots) and demonstrated a fast NIR fluorescence-based detection of SLN in healthy mice [12]. However, the biodistribution and *in vivo* toxicity related to cyanine dyes release was not assessed [12]. Quantum dots (QD) could also be considered as a valuable alternative marker with regard to their high fluorescence quantum yield, resistance to photobleaching and adaptable size [13,14]. Several extensive reviews address the remarkable photochemical and photophysical properties of QDs [14–16].

The first QD studies have shown the possibility of SLN mapping through the skin after an intradermal or subcutaneous injection of cadmium-based QDs in healthy mice or pigs [17,18], spontaneous melanoma in mini-swine [5] or xenografted mice [19]. However, the metastatic status of SLN has never been addressed in these tumour-bearing animals [5,19]. The visualisation of the SLN in a metastatic model of cancer is of key importance, since a distal obstruction of lymphatic channels and nodes by tumour metastases could prevent the migration of tracers to SLN, affecting its identification [20].

A major concern with the *in vivo* applications of QDs is their toxicity, since the surrounding inorganic shell is degraded *in vivo*, releasing heavy metal ions and as such inducing oxidative stress and cell death [21,22]. The storage of QDs in the reticulo-endothelial system and absence of renal elimination for QDs >5.5 nm are also problematic [23,24]. Toxicity could be significantly reduced using cadmium-free QDs. Metals, like copper and sulphur in combination with indium, could be more attractive for NIR fluorescence-guided SLN imaging. As we have recently shown, CuInS₂/ZnS QDs possess all requisites for SLN NIR-imaging, given their emission wavelength in the NIR window (650–800 nm), their hydrodynamic diameter (~20 nm) and significantly reduced acute local toxicity compared to CdTeSe/CdZnS QDs [25].

Therefore, we undertook further investigations of CuInS₂/ZnS QDs biodistribution with inductively coupled plasma – mass spectroscopy (ICP-MS) up to 7 days after subcutaneous injection in healthy mice. Selected organs were followed until 3 months after injection. We further evaluated the QDs-based NIR SLN visualisation *in vivo* in a metastatic model of orthotopic syngenic murine breast cancer.

Materials and Methods

Ethics Statement

The animals received care in accordance with established guidelines of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Animal procedures were performed in compliance with national guidelines and with approval of regional ethics committee in animal experiment “Nancy-Lorraine – Nord-Est”. All surgery was performed under ketamine/xylazine or isoflurane gaseous anesthesia, and all efforts were made to minimise suffering.

Quantum Dots Characteristics

The synthesis and physico-chemical characteristics of Cd- and In-based QDs were reported earlier [17,25]. Briefly, batches of QDs were composed of CdTeSe/CdZnS or CuInS₂/ZnS core/shell with a maximum fluorescence emission at 680 nm and 780 nm respectively. QDs were then encapsulated in 33% PEG2000-COOH/66% PEG2000 lipid micelles and purified by ultracentrifugation.

Cell Culture

4T1 cell line (ATCC, Manassas, VA, USA) derived from a Balb/c spontaneous mammary carcinoma was cultivated in RPMI medium containing 9% inactivated foetal calf serum, 1% penicillin (10,000 UI)-streptomycin (10,000 µg/mL) and 2 mM glutamine. MRC-5 cell line (ATCC, Manassas, VA, USA) derived from a normal lung tissue was cultivated in Minimum Essential Medium (MEM) containing 9% inactivated foetal calf serum, 1% penicillin-streptomycin, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate. All culture flasks were kept in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂.

Cell Toxicity Tests

Viability assay. Effects of QDs on the viability of MRC-5 cells were evaluated using the MTT assay [21]. Briefly, MRC-5 cells were plated into 96-well plates and after 24 h the culture medium was replaced by 200 µL QDs suspension at concentrations of 0–200 nM. After the end of incubation (24 h or 48 h), cells were washed, 50 µL MTT (2 mg/ml) was added to each well and incubated at 37°C for 3 h. The water-insoluble formazan crystals were solubilised with dimethyl sulfoxide (DMSO) and optical density was read on a microplate photometer (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Finland) at 540 nm. The results were expressed as the concentration of QDs inducing 50% of cell death (IC₅₀) compared to the untreated controls.

Haemolysis test. The method used was reported elsewhere [26]. Briefly, mice blood stabilised with EDTA was obtained by intracardiac puncture before sacrifice. Red blood cells were suspended in phosphate buffered saline (PBS) (negative control), deionised water (positive control) or different QDs dilutions in PBS, ranging from 0 to 200 nM. The solutions were incubated for 2 h at 37°C, before centrifugation. The absorbance spectra of the supernatants at 541 nm were measured with a spectrophotometer (Lambda 35, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). The percentage of haemolysis of each sample was calculated by subtracting the absorption of the negative control from the absorption of the sample, divided by the difference in absorption between positive and negative controls.

Animals

Ten-week-old female Balb/cOlaAnN mice (Harlan, Gannat, France) were kept in a 12 h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. A specific purified diet (TD.94045, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) was used to reduce tissue autofluorescence in the NIR region. The model of lymphatic metastasis in mice grafted with 4T1 mouse mammary carcinoma cells was reported earlier [27,28]. Under anaesthesia, mice (n = 53) were injected subcutaneously in the first right fat pad with 40 µL of 10⁶ 4T1 cells in water solution supplemented with 5% glucose. Mice were sacrificed when the tumour reached the ethical volume of 1,000 mm³ (about 21 days) and the tumour and the axillary lymph nodes (ALNs) were removed. Mice were divided into two groups: in the first group (n = 25), tumours and right axillary lymph nodes (RALNs) were fixed in acetic formalin alcohol (AFA) for immunohistochemical (IHC) analysis and in the other group (n = 28), tumours and RALNs were rapidly frozen at –80°C for molecular biology analysis.

Biodistribution Study

Seven groups of animals (n = 3 per group) were used for biodistribution study: one control group received PBS and was sacrificed 7 days after injection and six experimental groups, where animals were injected with 20 pmol CuInS₂/ZnS QDs and sacrificed at 1 h, 4 h, 8 h, 72 h, 7 days and 3 months after injection. Mice were injected subcutaneously (s.c.) in the distal part of the right anterior paw with 20 µL of PBS or 20 µL of a 1 µM-QD solution. The right paw was kneaded to improve product migration and the RALN were imaged *in vivo* 5 minutes after injection. After sacrifice, organs (ALNs, lateral thoracic lymph nodes (LTLNs), brain, bladder, intestine, spleen, pancreas, stomach, kidneys, liver, heart, lungs and injection point) were removed, weighed and stored at –20°C prior to analysis. Blood samples were collected through cardiac puncture in heparinised tubes before sacrifice.

Near-infrared Fluorescence Imaging

In vivo optical imaging of QDs was performed using a Fluobeam™700 NIR imaging system (Fluoptics, Grenoble, France) described previously [17]. This system is composed of a 690 nm-emitting laser and a highly sensitive charge-coupled device camera with a 750-nm long-pass emission filter. Semi-quantitative data can be obtained from the fluorescence images using the ImageJ 1.44 software. A segmentation protocol (Max Entropy method) was applied to threshold the image for each organ. Fluorescent signals were expressed in arbitrary units (A.U.) as the mean intensity of pixels of the threshold organ.

Inductively Coupled Plasma – Mass Spectroscopy (ICP-MS)

A Varian 820 MS instrument (Varian, Les Ulis, France) was used to perform ICP-MS analyses [17]. Briefly, all samples (organs, blood and excretions) were dissolved with 70% HNO₃ and heated to 90°C until total mineralisation. Each mineralised sample was solubilised in 25 mL milli-q water and analysed by ICP-MS. The limit of indium quantification was 0.05 µg/L. Five samples of 1 mL QD solutions at 20 nM (20 pmol) were analysed to correlate for indium concentration.

Immunohistochemistry Staining of Lymph Node Section

Immunohistochemistry was carried out on 5 µm-thick AFA-fixed paraffin-embedded sections. After rehydration and antigen retrieval a primary rabbit monoclonal antibody against mouse cytokeratin 19 (CK19, Epitomics, Burlingame, CA, USA) diluted at 1:200 was applied. After overnight incubation at 4°C, the endogenous peroxidases were inactivated and a polymer detection system anti-rabbit Histofine (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) was applied for 30 min. Peroxydase activity was revealed with the Novared kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) in accordance with the supplier's instructions. Sections were finally counterstained with Mayer's Hematoxylin (Dako, Trappes, France).

RT-qPCR

RNAs from lymph nodes were purified using an AllPrep DNA/RNA MiniKit (Qiagen, Courtaboeuf, France) in accordance with the supplier's instructions. cDNA was synthesised using an iScript™ Reverse Transcription kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) in accordance with the manufacturer's recommendations. A real-time qPCR was performed in iCycler iQ™ (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The reaction mixture contained 12.5 µL of iQ™ SYBR® Green Supermix, 1.5 µL of 5 µM forward primer, 1.5 µL of 5 µM reverse primer, 4.5 µL of DNase RNase free water and 5 µL of cDNA. The PCR program was 95°C for 5 min, 50 cycles of 95°C for 10 s, 65°C for 30 s, 95°C for 10 s and 60°C for 30 s with a final extension at 60°C for 5 min. The list of the primers is summarised in Table 1 [29,30]. The housekeeping gene β-actin was used as an internal control for the quantity of cDNA and results were expressed as the ratio CK19/β-actin. The maximum ratio CK19/β-actin (6.43×10^{-3}) of ALN from healthy mice (n = 21) was used as a threshold: SLN with CK19/β-actin ratio below this value were considered as non-metastatic, whereas those with greater ratios were considered to be metastatic.

Statistical Analysis

Means and standard errors (SD) were determined using standard software, whereas statistical significance between groups (Mann-Whitney test) was calculated with StatView software (SAS

Table 1. Sequence of primers used for real-time qPCR of cytokeratin 19 and β-actin.

| Primer | 5c → 3c | Reference | |
|---------|---------|------------------------|------|
| CK19 | Forward | TGATCGTCTCGCCTCTACT | [29] |
| | Reverse | CAAGGCGTGTCTGTCTCAA | |
| β-actin | Forward | CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA | [30] |
| | Reverse | TTGCCCTTAGGGTTCAGGGGGG | |

doi:10.1371/journal.pone.0044433.t001

Institute Inc, Cary, NC, USA); *p* values <.05 were considered statistically significant.

Results

Toxicity Tests

Normal MRC-5 human fibroblasts were exposed to increasing concentrations of CdTeSe/CdZnS- or CuInS₂/ZnS-based QDs during 24 h or 48 h. MTT-assessed cytotoxicity depended on the core element and time of contact with cells (Table 2). For Cd-based QDs, the IC₅₀ values vary from 21 nM to 8 nM depending on incubation time, whereas the same toxicity was achieved for In-based QD at concentrations of 108 nM and 76 nM (Table 2). IC₅₀ values were thus approximately five times lower with CdTeSe/CdZnS QDs than for In-based QDs.

We further measured QDs-induced haemolysis of red blood cells (RBC). RBC were incubated for 2 h with increasing concentrations of QDs and the haemoglobin release was assessed by measuring the absorbance of the supernatant (Fig. 1). Already 25 nM of Cd-based QDs induced 28% haemolysis with a rapid increase in haemolytic activity up to 75% at 100 nM and further stabilisation. No haemolysis was detected for In-based QDs, irrespective of concentration up to 150 nM (Fig. 1).

Detection of the Regional Lymph Node

After s.c. injection of 20 pmol of CuInS₂/ZnS QDs in the paw, RALN could be visualised already after 5 min (Fig. 2b, c). For better visualisation, the injection point of QDs was hidden, thus enabling a precise localisation of RALN (Fig. 2b). Figure 3 displays the intensity of QDs fluorescence in RALN *in vivo* during seven days after injection along with the quantification of indium content in the same mice at the same time intervals. Fluorescence signals and In content in RALN demonstrate similar increase (*r* = 0.88) from 1 to 8 hours post-injection, followed by a rapid drop of fluorescence intensity from 8 to 72 h and a slow decrease until the end of observation (168 h) (Fig. 3). The In content however

Table 2. Cytotoxicity of CdTeSe/ZnS or CuInS₂/ZnS QDs on normal fibroblasts.

| IC ₅₀ (nM) | 24 h | 48 h |
|----------------------------|----------------|--------------|
| QD CdTeSe/CdZnS | 21.40 ± 4.42 | 8.41 ± 3.29 |
| QD CuInS ₂ /ZnS | 108.29 ± 23.66 | 75.68 ± 6.28 |

MRC-5 cells viability was assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Concentration of QDs causing 50% of cell death (IC₅₀) was measured 24 h or 48 h after exposure. Data are mean ± SD (n = 6 per condition). doi:10.1371/journal.pone.0044433.t002

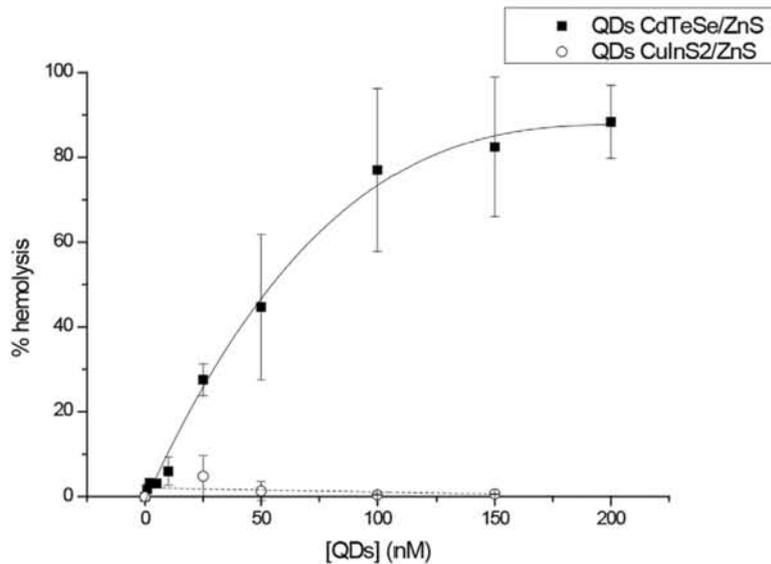


Figure 1. Haemolysis of red blood cells after a 2 h-exposure to CdTeSe/ZnS or CuInS₂/ZnS QDs. Red blood cells were incubated for 2 h at 37°C in buffer containing increasing concentrations of CdTeSe/ZnS (close square) or CuInS₂/ZnS QDs (open circle) and the absorbance of the supernatant was measured at 541 nm. Percentage of haemolysis is expressed as the amount of haemoglobin release induced by QDs compared to that induced by deionised water. Data are mean \pm SD (n=3). doi:10.1371/journal.pone.0044433.g001

remains stable (\sim 9% injected dose-ID) from 8 h until 168 h (Fig. 3).

Biodistribution and Excretion

As shown in Figure 4, the In concentration is similar in right lymph nodes (RLNs) and injection point 1 h after injection (\sim 40 μ g In/g tissue) whereas no indium could be detected in liver and spleen. At 4 h after injection, the In concentration decreases

at the injection point (14.16 ± 0.71 μ g In/g tissue), with a simultaneous considerable increase in the RLNs (147.08 ± 31.42 μ g In/g tissue and 132.18 ± 15.77 μ g In/g tissue for RALN and RLTLN respectively) and a slight increase of In concentration in both liver (2.46 ± 0.60 μ g In/g tissue) and spleen (3.36 ± 0.56 μ g In/g tissue). No variations were found for indicated organs until 7 days; however, a 2 times decrease of In was observed 3 months after injection. We also demonstrated the presence of indium in the

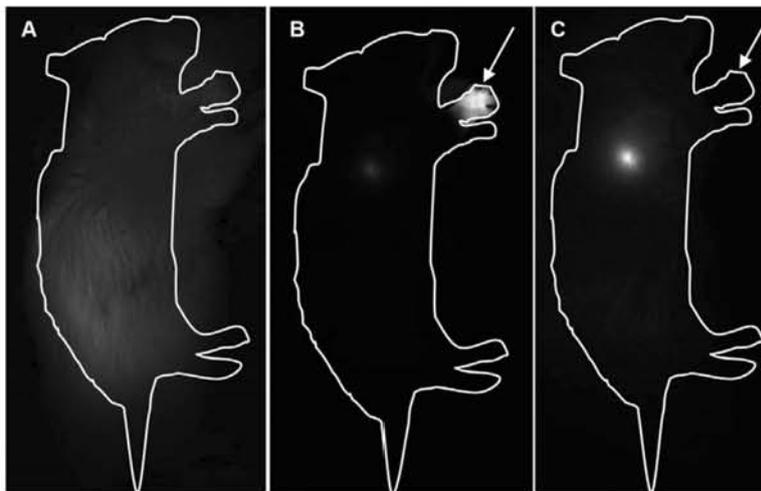


Figure 2. *In vivo* non-invasive fluorescence imaging of mice before or after QDs injection. Mice were subcutaneously injected with 20 pmol of CuInS₂/ZnS QDs in the right anterior paw and imaging was performed before (a) or 5 minutes after (b, c) administration. b, injection point (arrow) was not hidden; c, injection point was hidden for a better RALN visualisation. Near-infrared imaging was performed with Fluobeam™ system (exc. 690 nm, em. 700–850 nm). Exposure times were 100 ms (a), 5 ms (b) and 10 ms (c). doi:10.1371/journal.pone.0044433.g002

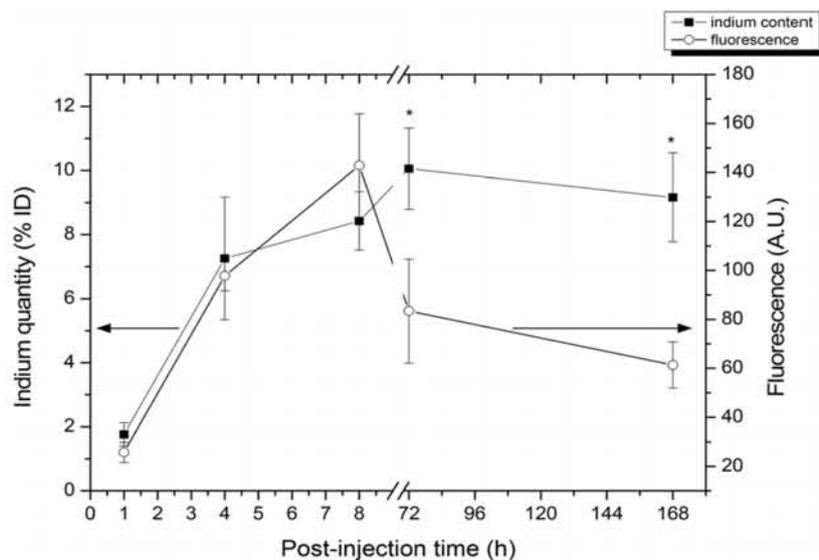


Figure 3. Assessment of QDs fluorescence intensity and indium content at different post-administration times. Kinetics of QDs fluorescence (open circle) and In content (close square) in the RALN after s.c. administration of 20 pmol of CuInS₂/ZnS QDs in mice. The indium quantity was measured by inductively coupled plasma – mass spectroscopy (ICP-MS) and expressed in percentage of injected dose (% ID). Data are mean ± SD (n = 3 per group) and indium quantity values marked with an asterisk were significantly different from corresponding fluorescence values (p < .05).

doi:10.1371/journal.pone.0044433.g003

plasma samples (0.54 ± 0.10 µg In/g tissue) 1 h post-injection with only traces quantities of In at all other observation times. The clearance of QDs was assessed in the measurement of the cumulative doses of In in urine and faeces during the first 4 days after injection. Negligible quantities of indium (0.34 ± 0.04% ID) were detected in urine, whereas In excretion with faeces reached 2.97 ± 0.95% ID during the first 4 days (Fig. 5).

Mapping of SLN in Metastatic Model with In-based QDs

Fifty-three mice bearing 4T1 tumours were subjected to RALN *in vivo* fluorescence measurements before their sacrifice. CK19 detection in extracted lymph nodes was performed by immunohistochemical analysis (n = 25) and by RT-qPCR (n = 28).

Of 25 lymph nodes analysed by immunohistochemistry, 20 were metastasis free, whereas isolated tumour cells and metastatic nodules were detected in respectively three and two mice. Figure 6 displays an example of immunohistological section of metastatic lymph node. The metastasis detection by RT-qPCR performed in 28 lymph nodes demonstrated the presence of metastasis in 36% of SLN (Table 3).

All lymph nodes, which revealed CK19 expression, were pooled and referred as positive SLN (Table 3). The fluorescence intensity from each SLN was correlated to its metastatic status. As follows from Table 3, no statistical difference in fluorescence intensity was detected between positive and negative SLN (p = 0.1733). The mean fluorescence intensity in non-metastatic lymph nodes was averaged to 17.71 ± 7.38 (n = 38), whereas positive SLN yielded 20.15 ± 7.10 (n = 15) (Table 3).

Discussion

NIR imaging could be an interesting alternative to the current method using blue dye and radioactive colloid for the visualisation of SLN in breast cancer surgery. Despite the excellent *in vivo*

fluorescence properties of Cd-containing QDs [15], their toxicity, due to the release of Cd²⁺ ions in the biological environment is a serious drawback for clinical applications [31]. We have recently considered indium-based QDs, which are characterised by a bright fluorescence and a reduced acute local toxicity in lymph node [25]. Indeed, the onset of inflammation occurred at a 10 times higher concentration for CuInS₂/ZnS QDs than for their Cd-containing counterparts [25].

In the present paper we extended the comparative study of toxicity between two types of QDs. Haemolytic capacity is regarded as a reference test to study nanoparticles interaction with blood [32–34]. Whereas CdTeSe/CdZnS QDs induce 50% haemolysis at a concentration of 56 nM, no haemolysis was found at all applied concentrations of CuInS₂/ZnS QDs (Fig. 1). Mitochondrial activity of fibroblasts subjected to QDs demonstrated 5 to 10 times reduced toxicity of CuInS₂/ZnS compared to cadmium-based QDs (Table 2). These results are similar to the cytotoxicity of fibroblasts subjected to cyanine (Cy5)-loaded Lipidots (IC₅₀ > 75 nM) [12]. They are also in agreement with previous studies which suggest that indium-based QDs are less toxic than their cadmium-based counterparts and are thus more suitable for biomedical applications [35,36]. A weak *in vivo* and *in vitro* toxicity of In-based QDs encouraged us to further test these nanoparticles in healthy and tumour-bearing mice.

QD-induced fluorescence in the RALN could be detected as early as 5 min after s.c. injection of 20 pmol of CuInS₂/ZnS QDs in the paw (Fig. 2). The presence of QDs in the RALN has been confirmed by the measurement of indium content by ICP-MS (Fig. 3). An increase in both parameters was noted in the first hours post-injection indicating the integrity of the QDs. While the In content, as observed by mass spectrometry, remained stable with time, we observed a decrease in fluorescence intensity starting at 8 h post-injection. This could be related to the bio-degradation of QDs in an oxidative environment, despite capping of the QD

Mapping of Metastatic Lymph Node with Quantum Dots

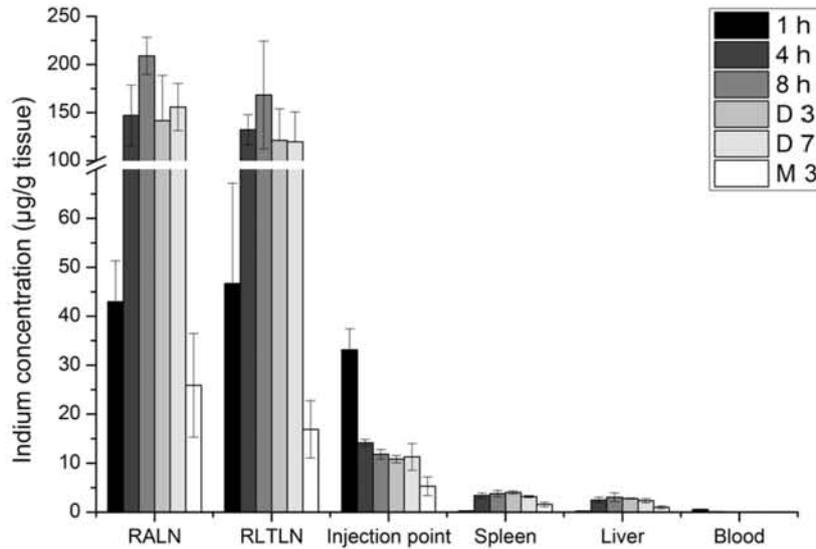


Figure 4. Biodistribution of QDs in selected organs and tissues in function of time after injection. Mice were subcutaneously injected with 20 pmol of CuInS₂/ZnS QDs in the right anterior paw. Blood samples were collected through cardiac puncture. Mice were then sacrificed at 1 h, 4 h, 8 h, 3 days, 7 days and 3 months after injection and organs were subjected to mass spectroscopy (ICP-MS). The indium concentrations in RALN, RLTLN, injection point, spleen, liver and blood were expressed as the quantity of indium (in µg) per gram of tissue or per milliliter of blood. Data are mean ± SD (n = 3 per group). doi:10.1371/journal.pone.0044433.g004

cores by ZnS. It is possible that the ZnS capping loses a sulphur atom, leaving the core vulnerable to oxidation with the formation of oxides and eventually loss of QD fluorescence [21].

Potential sites of QD toxicity and elimination can be deduced from our biodistribution study. After s.c. injection in the paw, QDs strongly accumulate in the RLN (Fig. 4). QD retention is confined to regional lymph nodes only since no fluorescence was visible in other lymph nodes (cervical, inguinal, etc) pointing out that QDs

do not migrate further into the lymphatic system. This observation could be advantageous in clinical settings since one of the pitfalls of SLN biopsy consists of the false positive samples related to the fast migration of the dye across the lymphatic chain. A fast increase in In concentration in lymph nodes from 1 h to 4 h after injection is consistent with the decrease of In concentration at the injection point in the same time span. Despite the fact that a major part of In was retained in the lymph nodes, no signs of toxicity could be

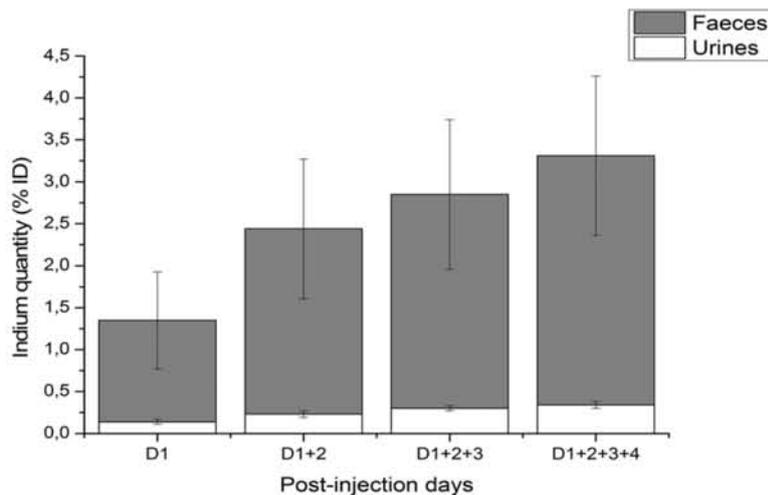


Figure 5. Cumulative indium content in excretions of mice after subcutaneous QDs administration. Mice were subcutaneously injected with 20 pmol of CuInS₂/ZnS QDs, urine (white) and faeces (gray) were collected daily and subjected to mass spectroscopy (ICP-MS). The indium contents were cumulated every day and were expressed as percentage of injected dose (% ID). Data are mean ± SD (n = 3 per group). doi:10.1371/journal.pone.0044433.g005

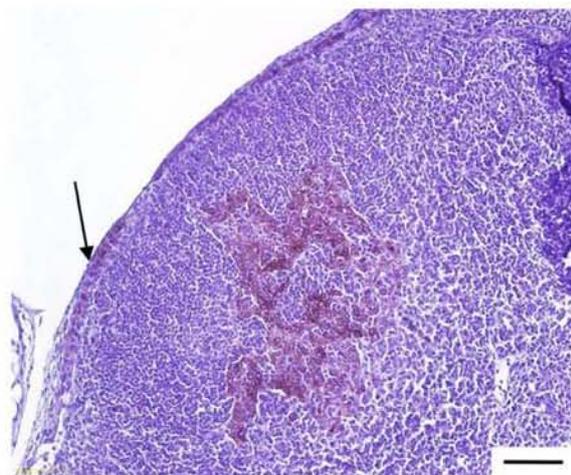


Figure 6. Histology of sentinel lymph node sections of tumour-bearing mice. Sections were subjected to CK19 immunohistochemistry and hematoxylin staining. Black scale corresponds to 100 μ m, the arrow indicates the metastatic invasion of the cortical sinus. doi:10.1371/journal.pone.0044433.g006

detected in these organs [25]; also the mice did not present any signs of abnormal behaviour or weight loss for up to 7 days after injection (data not shown). Similarly, Castronovo *et al.* observed that intravenous injection of hydrated indium comparable concentrations (0.4 mg In/kg body weight) yielded only a diffuse and mild inflammation in the liver, without noticeable damage to the kidneys [37].

In the clinical context, the resection of the injection site, which is the original source of QDs migration, can be performed within the first 15 min following injection, thus minimising QD accumulation in non-lymphatic sites.

The cumulative dose of In was 10 times higher in faeces (~3% ID) compared to urine (~0.3% ID) (Fig. 5). Faecal excretion of In after intratracheal or oral instillation of InP in rats was demonstrated earlier [38] and was suggested as a major route of elimination. The size of our nanoparticles is also in favour of hepatobiliary excretion. For renal excretion, the nanoparticles must have a hydrodynamic diameter smaller than 5.5 nm in order to be filtered by the kidney [24], whereas that of CuInS₂/ZnS QDs used in our study reaches ~20 nm [25]. Conflicting data were reported on heavy metal elimination in pre-clinical models. A high recovery of In was observed in faeces (73% ID) of rats after intratracheal administration of InP [38], while CdSe/ZnS QDs

were sequestered in the liver of rats (36.4%ID) after i.v. injection and were not detected in the excretions during several weeks [39]. At three months after In-based QD injection, the quantity of indium in the liver was reduced by more than 50% (3.0±0.9 vs. 1.0±0.3 μ g In/g tissue, Fig. 4), thus further supporting hepatobiliary elimination. However, in order to translate these findings to humans, long-term experiments are required in pre-clinical models.

It seems interesting to make an approximation of the remaining quantity of QDs in clinical setting. A good visualisation of the SLN with Cd-based QDs was reported after an injection of 400 pmol in 35 kg of Yorkshire pigs [18]. Considering that SLN were located at the depth of 1 cm in pigs, whereas the depth of SLN localisation in humans is of 3–6 cm, the dose of 2.4 nmol CuInS₂/ZnS QDs could be required for SLN visualisation, i.e. 900 μ g indium. A large part of QDs will be eliminated during the excision of both SLN and tumour burden at 1 h post-administration. Our present study demonstrated that the remaining quantity of In in the body of mice at 1 h after injection is about 17% (*ca.* 157 μ g). The daily In consumption in humans is about 8 μ g/day/person according to the National Toxicology Program [40]. Thus, compared to the annual In consumption (2920 μ g), the remaining quantity of In in the body after QDs injection represents 5%. Except of occupational exposure to inhaled indium [41,42], toxicology studies of indium in human body are sparse. Indium and indium oxide are not listed as human carcinogens by different official organisations (US Occupational Safety and Health Administration, Canadian Centre for Occupational health and safety, European Economic Community, etc). It may be therefore supposed, that such a small increase in In concentration in the body is not harmful. Further, given the extremely low rate of photobleaching of QDs, the fluence rate of the imaging system may be increased at least one order, resulting in a significantly reduced QDs injected dose and a decreased remaining In concentration.

Metastatic invasion of lymph nodes may modify the uptake of tracers [20,43,44]. Therefore, the possibility of fluorescence mapping of lymph nodes upon their distal obstruction by tumour metastases is of major importance. The metastatic status of lymph nodes was assessed by CK19 detection using immunohistochemistry and molecular biology approaches. CK19 is a member of the intermediate filaments found in the intracytoplasmic cytoskeleton of epithelial tissues [45] and is considered as a good marker for metastatic involvement of lymph nodes [46]. The qRT-PCT technique, which is more sensitive than immunohistochemistry, showed 35.7% of positive nodes *vs.* 20.0% detected by IHC (Table 3). The observed level of metastatic invasion is similar to that reported in the clinical study, conducted in 274 breast cancer patients where 36.4% positive and 63.5% negative lymph nodes were detected [47]. Fluorescence measurements demonstrated that

Table 3. Mapping of sentinel lymph node (SLN) of tumour-bearing mice 15 min after sc. injection of 20 pmol of CuInS₂/ZnS QDs in the right anterior paw.

| Techniques of CK19 detection | Nodal status | Node affected | <i>In vivo</i> SLN fluorescence (A.U.) |
|------------------------------|--------------|----------------|--|
| IHC | + | 20.00% (5/25) | 21.90±7.20 |
| | - | 80.00% (20/25) | 15.73±4.19 |
| RT-qPCR | + | 35.71% (10/28) | 19.17±7.28 |
| | - | 64.29% (18/28) | 19.90±9.45 |

Metastatic cells were detected in lymph node by CK19 expression using immunohistochemistry (IHC, n = 25) or molecular biology analysis (RT-qPCR, n = 28). Data are mean ± SD.

doi:10.1371/journal.pone.0044433.t003

all positive nodes could be visualised with NIR emitting QDs and no statistical difference in fluorescence intensity was established between positive and negative nodes (Table 3). Thus, the migration of QDs into the lymphatic system is not affected by the presence of metastatic cells, even when they are in the cortical sinus (Fig. 6).

In summary, indium-based QDs presenting a reduced *in vitro* and *in vivo* toxicity, are good tracers for SLN NIR fluorescence mapping in a metastatic murine breast cancer model. Further improvements of surface chemistry are nevertheless required to achieve faster body elimination of CuInS₂/ZnS QDs.

References

- Zurrida S, Morabito A, Galimberti V, Luini A, Greco M, et al. (1999) Importance of the level of axillary involvement in relation to traditional variables in the prognosis of breast cancer. *Int J Oncol* 15 (3): 475–480.
- Bonnema J, van de Velde CJ (2002) Sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Ann Oncol* 13 (10): 1531–1537.
- McMasters KM, Tuttle TM, Carlson DJ, Brown CM, Noyes RD, et al. (2000) Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used. *J Clin Oncol* 18 (13): 2560–2566.
- Barthelme L, Goyal A, Newcombe RG, McNeill F, Mansel RE (2010) Adverse reactions to patent blue V dye - The NEW START and ALMANAC experience. *Eur J Surg Oncol* 36 (4): 399–403.
- Tanaka E, Choi HS, Fujii H, Bawendi MG, Frangioni JV (2006) Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol* 13 (12): 1671–1681.
- Mieog JS, Troyan SL, Hutteman M, Donohoe KJ, van der Vorst JR, et al. (2011) Toward optimization of imaging system and lymphatic tracer for near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 18 (9): 2483–2491.
- Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, Gioux S, Matsui A, et al. (2009) The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol* 16 (10): 2943–2952.
- Hirche C, Dresel S, Krempien R, Hunerbein M (2010) Sentinel node biopsy by indocyanine green retention fluorescence detection for inguinal lymph node staging of anal cancer: preliminary experience. *Ann Surg Oncol* 17 (9): 2357–2362.
- Hirche C, Murawa D, Mohr Z, Kneif S, Hunerbein M (2010) ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 121 (2): 373–378.
- Hirche C, Mohr Z, Kneif S, Doniga S, Murawa D, et al. (2012) Ultrastaging of colon cancer by sentinel node biopsy using fluorescence navigation with indocyanine green. *Int J Colorectal Dis* 27 (3): 319–324.
- Crane LM, Themelis G, Arts HJ, Buddingh KT, Brouwers AH, et al. (2011) Intraoperative near-infrared fluorescence imaging for sentinel lymph node detection in vulvar cancer: first clinical results. *Gynecol Oncol* 120 (2): 291–295.
- Gravier J, Navarro FP, Delmas T, Mitter F, Couffin AC, et al. (2011) Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for *in vivo* fluorescence imaging. *J Biomed Opt* 16 (9): 096013.
- Murray CB, Norris DG, Bawendi MG (1993) Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J Am Chem Soc* 115: 8706–8715.
- Bruchez M, Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281 (5385): 2013–2016.
- Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, Pockock R, Imani M, et al. (2007) Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* 28 (31): 4717–4732.
- Chan WC, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE, Han M, et al. (2002) Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol* 13 (1): 40–46.
- Pic E, Pons T, Bezdetsnaya L, Leroux A, Guillemin F, et al. (2009) Fluorescence Imaging and Whole-Body Biodistribution of Near-Infrared-Emitting Quantum Dots after Subcutaneous Injection for Regional Lymph Node Mapping in Mice. *Mol Imaging Biol*.
- Kim S, Lim YT, Soltész EG, De Grand AM, Lee J, et al. (2004) Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol* 22 (1): 93–97.
- Ballou B, Ernst LA, Andreko S, Harper T, Fitzpatrick JA, et al. (2007) Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. *Bioconjug Chem* 18 (2): 389–396.
- Wong SL, Edwards MJ, Chao C, Simpson D, McMasters KM (2002) The effect of lymphatic tumor burden on sentinel lymph node biopsy results. *Breast J* 8 (4): 192–198.
- Derfus A, Chan WCW, Bhatia S (2004) Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification. *Nano Letters*, 4 (1): 11–18.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Pr JL Merlin and Mrs C Ramacci for their help in molecular biology analysis. The authors are grateful to Dr A MacRobert (UCL, London, UK) for the critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LB FG BD FM. Performed the experiments: MH EC TP. Analyzed the data: MH LB FM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AL FP FG BD. Wrote the paper: MH LB TP FM.

- Hardman R (2006) A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect* 114 (2): 165–172.
- Riviere JE (2009) Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1 (1): 26–34.
- Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, et al. (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 25 (10): 1165–1170.
- Pons T, Pic E, Lequeux N, Cassette E, Bezdetsnaya L, et al. (2010) Cadmium-free CuInS₂/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. *ACS Nano* 4 (5): 2531–2538.
- Liu YF, Yu JS (2010) In situ synthesis of highly luminescent glutathione-capped CdTe/ZnS quantum dots with biocompatibility. *J Colloid Interface Sci* 351 (1): 1–9.
- Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, et al. (1999) A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 17 (2): 163–170.
- Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, et al. (2005) Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 3 (1): 1–13.
- Dreud D, Karaa A, Culbertson C, Wyan H, McKillop IH, et al. (2006) Bosentan inhibits tumor vascularization and bone metastasis in an immunocompetent skin-fold chamber model of breast carcinoma cell metastasis. *Clin Exp Metastasis* 23 (1): 41–53.
- Hunter F, Xie J, Trimble C, Bur M, Li KC (2006) Rhodamine-RCA *in vivo* labeling guided laser capture microdissection of cancer functional angiogenic vessels in a murine squamous cell carcinoma mouse model. *Mol Cancer* 5: 5.
- Tsay JM, Michalet X (2005) New light on quantum dot cytotoxicity. *Chem Biol* 12 (11): 1159–1161.
- Chouly C, Bordenave L, Bareille R, Guerin V, Baquay A, et al. (1994) *In vitro* study of the hemocompatibility of superparamagnetic contrast agent for magnetic resonance imaging. *Clin Mater* 15 (4): 293–301.
- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem* 15 (4): 897–900.
- Slowing I, Wu CW, Vivero-Escoto JL, Lin VS (2009) Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small* 5 (1): 57–62.
- Male KB, Lachance B, Hrapovic S, Sunahara G, Luong JH (2008) Assessment of cytotoxicity of quantum dots and gold nanoparticles using cell-based impedance spectroscopy. *Anal Chem* 80 (14): 5487–5493.
- Yong KT, Roy I, Hu R, Ding H, Cai H, et al. (2010) Synthesis of ternary CuInS₂/ZnS quantum dot bioconjugates and their applications for targeted cancer bioimaging. *Integr Biol (Camb)* 2 (2–3): 121–129.
- Castronovo FP, Wagner HN (1971) Factors affecting the toxicity of the element indium. *Br J Exp Pathol* 52 (5): 543–559.
- Zheng W, Winter SM, Kattig MJ, Carter DE, Sipes IG (1994) Tissue distribution and elimination of indium in male Fischer 344 rats following oral and intratracheal administration of indium phosphide. *J Toxicol Environ Health* 43 (4): 483–494.
- Fischer H, Liu L, Pang K, Chan W (2006) Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots *In Vivo* Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat. *Advanced Functional Materials* 16: 1299–1305.
- NTP (2001) Toxicology and carcinogenesis studies of indium phosphide in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). U.S. department of Health and Human Services.
- Chen HW (2007) Exposure and health risk of gallium, indium, and arsenic from semiconductor manufacturing industry workers. *Bull Environ Contam Toxicol* 78 (1): 5–9.
- Hoet P, De Graef E, Swennen B, Seminc T, Yakoub Y, et al. (2011) Occupational exposure to indium: what does biomonitoring tell us? *Toxicol Lett*.
- Estourgie SH, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Rutgers EJ, Peterse JL, et al. (2003) Eight false negative sentinel node procedures in breast cancer: what went wrong? *Eur J Surg Oncol* 29 (4): 336–340.

Mapping of Metastatic Lymph Node with Quantum Dots

44. Goyal A, Douglas-Jones AG, Newcombe RG, Mansel RE (2005) Effect of lymphatic tumor burden on sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Breast J* 11 (3): 188-194.
45. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31 (1): 11-24.
46. Backus J, Laughlin T, Wang Y, Belly R, White R, et al. (2005) Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn* 7 (3): 327-336.
47. Vincent-Salomon A, Caly M, De Rycke Y, Freneaux P, Klijanienko J, et al. (2009) Lobular phenotype related to occult-metastatic spread in axillary sentinel node and/or bone marrow in breast carcinoma. *Eur J Cancer* 45 (11): 1979-1986.

II. Détection du ganglion sentinelle à l'aide de nanoparticules de silice renfermant un fluorophore émettant dans le proche infrarouge

A. Résumé

Les précédents travaux du laboratoire se sont portés sur la visualisation du GS par imagerie de fluorescence à l'aide de Quantum Dots (QDs). La composition du cœur des QDs (cadmium ou indium) est un facteur influençant fortement leur toxicité. Bien que de récentes études démontrent la faible toxicité des QDs, les travaux doivent cependant être poursuivis sur le long terme afin de s'assurer de l'innocuité des QDs. Une alternative aux QDs serait l'utilisation de nanoparticules fluorescentes composées d'éléments non toxiques, comme le sont les nanoparticules de silice (NPSi). L'incorporation d'un fluorophore - la cyanine 7 - émettant dans le proche infrarouge rendrait ces NPSi utilisable dans le contexte clinique de repérage du GS.

Le but de cette étude est de démontrer que les caractéristiques des NPSi sont compatibles avec leur utilisation dans la visualisation du GS par imagerie de fluorescence, de mettre en évidence l'intérêt de l'encapsulation covalente du fluorophore dans la matrice de silice, d'étudier la biodistribution des NPSi et de confirmer leur faible toxicité *in vitro* et *in vivo*.

L'utilisation de NPSi hydrophiles permet tout d'abord de s'affranchir de l'utilisation de solvants toxiques nécessaires à la solubilisation de la cyanine 7 hydrophobe. La cyanine 7 étant une petite molécule, elle diffuse rapidement dans les tissus, ce qui nuit à la bonne visualisation du GS. L'encapsulation du fluorophore dans la matrice de silice permet d'obtenir une taille (environ 30 nm) suffisante et compatible avec une bonne rétention dans le GS. Lorsque la cyanine 7 est liée de façon non covalente à la matrice de silice, elle peut en être libérée au cours du temps. La cyanine 7 adopte alors le même comportement que lorsqu'elle est injectée seule, avec une diffusion dans les tissus environnants et une certaine toxicité. Par des tests MTT, nous avons en effet démontré que la cyanine 7 seule ou liée de façon non covalente à la silice est toxique lorsqu'elle est mise en contact avec des fibroblastes. En revanche, lorsque la cyanine 7 est liée de façon covalente, aucune toxicité n'a pu être mise en évidence jusque $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cyanine 7.

Des différences de migration dans le ganglion axillaire droit (GAD) en fonction de la méthode de synthèse des NPSi ont été révélées et le lot de NPSi présentant la plus forte intensité de fluorescence et migrant dans le GAD le plus rapidement a été choisi pour les études ultérieures de biodistribution et de toxicité *in vivo*. L'étude de biodistribution par imagerie de fluorescence a montré que les NPSi se localisent préférentiellement au point d'injection, dans les ganglions lymphatiques régionaux droits, dans le foie et sont excrétées par la voie hépatobiliaire *via* les fèces. Dans un but clinique de biopsie du GS, le point d'injection et les ganglions lymphatiques seront retirés chirurgicalement et le foie serait alors le principal organe de stockage des NPSi. Les tests de toxicité *in vivo* ont donc été ciblés sur le foie. Aucune différence de masse relative du foie, de libération d'enzymes hépatiques (phosphatase alcaline) dans le plasma ou de morphologie des tissus n'ont pu être décelées entre les souris « témoin » et les souris injectées avec les NPSi jusque 3 mois après l'injection.

L'utilisation de NPSi renfermant de façon covalente la cyanine 7 (émission dans le proche infrarouge) est bien adaptée à la visualisation du GS par imagerie de fluorescence et ces nanoparticules ne semblent pas être toxiques à long terme (3 mois).

B. Matériels et méthodes

1. Réactifs et solvants

Le cresyl violet perchlorate, le TEOS et la cyanine 7 (IR-813, dont la formule chimique est donnée en Figure 24) proviennent de la société Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

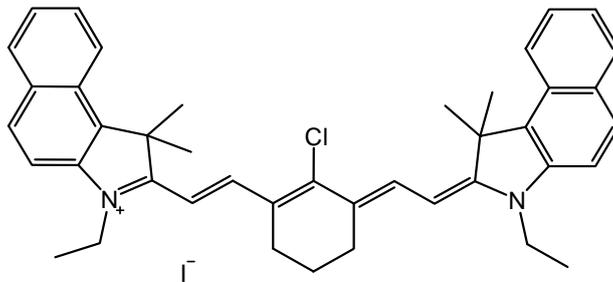


Figure 24 : Formule chimique de la cyanine 7

La rhodamine 6G et la rhodamine B viennent de chez Sigma (Saint-Louis, MO, USA). Le Pluronic[®] F127 et le (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). L'albumine sérique bovine (BSA), le méthanol LC-MS CHROMASOLV[®], le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium) et le Triton X-100 proviennent de la filiale France de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Le vert d'indocyanine vient de chez Acros Organics (Geel, Belgique), le carboxyethylsilanetriol (CEST) de chez Gelest (Maidstone, UK) et les billes de polystyrène de chez Bangs Laboratories (Fishers, In, USA). Le tampon phosphate (PBS), le pyruvate de sodium, la glutamine et la pénicilline - streptomycine proviennent de chez Gibco (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). L'éthanol provient de VWR (Fontenay sous Bois, France), le diméthylsulfoxyde (DMSO) de chez Merck Chemicals (Darmstadt, Allemagne), le NaF de Alfa Aesar (Schiltigheim, France) et le kit SensoLyte[®] pNPP Alkaline Phosphatase Assay kit *Colorimetric* de la société Anaspec (Fremont, CA, USA).

L'isoflurane (Forène[®]) vient de chez Abbott (Paris, France), la kétamine (Ketalar[®]) de chez Panpharma (Fougères, France) et la xylazine (Rompun[®]) de chez Bayer Pharma (Puteaux, France).

2. Appareils de mesure

L'absorbance des solutions a été déterminée avec un spectrophotomètre (Lambda 35, Perkin Elmer, Courtabœuf, France) ou avec un lecteur de microplaque (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Courtabœuf, France) et les spectres de fluorescence avec un spectrofluorimètre (LS 55, Perkin Elmer, Courtabœuf, France). La sphère d'intégration (Labsphere RSA-PE-20) provient de Perkin Elmer (Courtabœuf, France).

Les mesures de taille et de potentiel ζ ont été déterminées par DLS (pour *Dynamic light scattering*) à l'aide d'un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). Le microscope électronique en transmission à 80 kV utilisé est le CM100 (Philips/FEI Corporation, Eindhoven, Holland).

3. Nanoparticules de silice

i. Principe de la synthèse des NPSi

La synthèse de ces NPSi est basée sur la formation directe de micelles de Pluronic® F127 dans l'eau. Le Pluronic® F127 est un surfactant composé d'un groupement hydrophobe poly(propylène) oxyde (PPO) sur lequel sont attachées deux chaînes de PEG hydrophiles (Figure 25), qui forme des micelles en conditions acides.

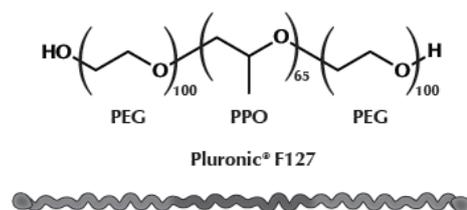


Figure 25 : Structure moléculaire du Pluronic® F127

Le TEOS est un précurseur apolaire de silice. En présence d'une solution micellaire, il diffuse et s'accumule spontanément dans le cœur hydrophobe, où les réactions d'hydrolyse et de condensation conduisent à la formation de la NPSi (Figure 26).



Figure 26 : Représentation de la synthèse des NPSi par l'intermédiaire du Pluronic® F127 [220]

Le fluorophore choisi pour être encapsulé dans les NPSi est la cyanine 7 puisque ces propriétés d'absorption et d'émission se situent dans le proche infrarouge. De plus, ce fluorophore peut être fonctionnalisé facilement en conditions douces, ce qui permet de conserver ces caractéristiques spectrales et son rendement quantique de fluorescence.

Il existe deux façons de placer un fluorophore à l'intérieur des NPSi : par une encapsulation spontanée (liaison non covalente) ou en l'attachant de façon permanente (liaison covalente).

Cyanine 7 liée de façon non covalente à la matrice de silice

En ajoutant de la cyanine 7 au moment de la formation des micelles de Pluronic® F127, celle-ci, étant hautement hydrophobe, se retrouve piégée dans le cœur des micelles. Une étape de purification permet d'éliminer toutes les molécules de fluorophores qui n'ont pas été insérées dans la matrice de silice (Figure 27).

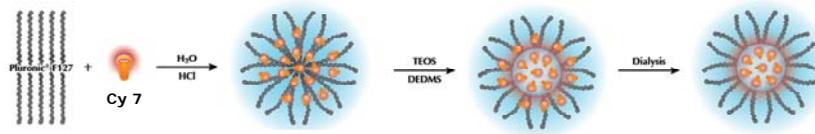


Figure 27 : Représentation schématique de l'encapsulation de la cyanine 7 dans les NPSi

Afin d'ajouter des charges négatives aux NPSi, des groupements -COOH peuvent être greffés sur le Pluronic® F127 avant l'étape de formation des micelles. Dans les lots de NPSi utilisés, le pourcentage de surfactant modifié par des groupements carboxyliques varie de 10 % à 40 % (Tableau 5).

Tableau 5 : Variation du revêtement de surface des NPSi encapsulant la cyanine 7 de façon non covalente

| Lot de NPSi | R289(1)DIA | R289(2)DIA | R289(3)DIA | R289(3)DIA |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| Pourcentage de -COOH | 10 % | 20 % | 30 % | 40 % |

Cyanine 7 liée de façon covalente à la matrice de silice

Afin de limiter l'éventuelle libération du fluorophore encapsulé dans la matrice de silice et d'augmenter le pourcentage d'incorporation, la cyanine 7 a été liée de façon covalente à l'APTES. En introduisant un motif triéthoxysilane sur le fluorophore, la molécule peut subir les processus d'hydrolyse et de co-condensation avec le TEOS pendant la formation de la nanoparticule, résultant en une liaison covalente entre le fluorophore et la matrice de silice (Figure 28).

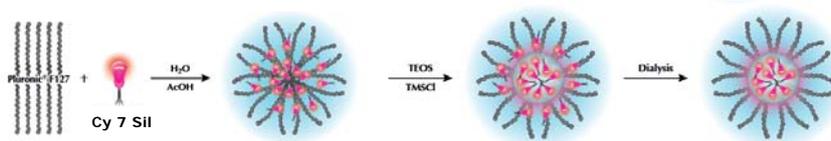


Figure 28 : Représentation schématique de la synthèse de la liaison covalente de la cyanine 7 dans les NPSi

Différents lots de NPSi ont été synthétisés par ce processus, avec un pourcentage de surfactant modifié par des groupements carboxyliques variant de 15 à 60 %, et ont été appelé F21.

Tableau 6 : Différences de revêtement de surface des NPSi de la famille F21

| Lot de NPSi | F21-1 | F21-2 | F21-3 | F21-4 | F21-5 |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pourcentage de -COOH | 0 % | 15 % | 30 % | 45 % | 60 % |

Une autre méthode de synthèse a été utilisée afin d'apporter des charges négatives aux NPSi cov.

A partir du lot F21-1 (contenant 0 % de groupements -COOH), le cœur de silice a subi une étape de passivation avec différentes quantités (de 0,05 % à 0,4 % par rapport à la quantité de précurseur de silice) de carboxyethylsilanetriol (CEST) chargés négativement. Cette famille de NPSi cov. a été nommée F25.

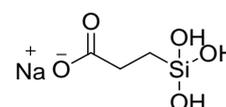


Figure 29 : Formule du carboxyethylsilanetriol

Tableau 7 : Différences de revêtement de surface des NPSi de la famille F25

| Lot de NPSi | F25-2 | F25-3 | F25-4 | F25-5 |
|---------------------|--------|-------|-------|-------|
| Pourcentage de CEST | 0,05 % | 0,1 % | 0,2 % | 0,4 % |

ii. Synthèse chimique des NPSi

Les nanoparticules de silice (NPSi) ont été synthétisées par le Dr. Enrico Rampazzo appartenant à l'équipe du Pr. Luca Prodi du département de chimie "G. Ciamician" de l'Université de Bologne (Italie).

La synthèse des NPSi encapsulant la cyanine 7 de façon non covalente a été décrite récemment dans l'article de Rampazzo *et al.* [239]. La synthèse des NPSi dont la cyanine 7 est liée de façon covalente à la matrice de silice nécessite une étape supplémentaire de fonctionnalisation du fluorophore avec un dérivé de silicium (APTES).

La famille F21 a été synthétisée à partir de solutions contenant différents pourcentages de Pluronic® F127 - COOH (Tableau 6). La famille F25 a été synthétisée à partir du lot F21-1 (contenant 0 % de groupements -COOH) et avec des quantités variables de CEST (Tableau 7). Avant toute utilisation, les NPSi ont été dialysées et la concentration en NPSi a été déterminée par la mesure de la diffusion statique de la lumière [240], permettant ainsi de déterminer leur coefficient d'absorption. La concentration en cyanine 7 dans les NPSi a ainsi pu être calculée en supposant que l'inclusion dans la matrice de silice ne modifie pas le coefficient d'absorption de la cyanine 7.

4. Caractérisation de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice

i. Caractérisation photophysique

Les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence (excitation fixée à 760 nm) des NPSi ont été écrits après dilution en méthanol pour la cyanine 7 et en PBS pour les NPSi.

Le rendement quantique de fluorescence des NPSi a été mesuré par les chimistes à l'aide des spectres de fluorescence (absorbance < 0,1 sur l'ensemble du spectre) selon l'équation suivante :

$$\Phi_X = \Phi_{ST} \frac{F_X}{F_{ST}} \left(\frac{n_X}{n_{ST}} \right)^2$$

Équation 1 : Formule utilisé pour le calcul du rendement quantique de fluorescence des NPSi

avec ST et X indiquant le standard et le test, respectivement, Φ , le rendement quantique de fluorescence, F, l'aire intégrée sous le spectre de fluorescence modifié et n, l'indice de réfraction du solvant.

Les standards utilisés sont la rhodamine 6G en éthanol ($\Phi = 0,53$), la rhodamine B en éthanol ($\Phi = 0,49$), le cresyl violet perchlorate en méthanol ($\Phi = 0,54$) et le vert d'indocyanine en DMSO ($\Phi = 0,13$).

ii. Taille

Le diamètre hydrodynamique des NPSi a été établi par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) grâce à une diode laser à 633 nm. Les échantillons sont dilués dans du PBS (pH = 7,4) puis placés dans des cuvettes en quartz dont le trajet optique est de 1 cm. Le caractère monodisperse des NPSi est donné par l'indice de polydispersité (PdI).

La taille géométrique du cœur des NPSi a été déterminée par microscopie électronique à transmission (MET) à 80 kV. Une solution de NPSi (0,40 μ M) est déposée sur une grille de cuivre conventionnelle recouverte d'un film de carbone fin. La taille des NPSi est obtenue en analysant les images comprenant plusieurs centaines de nanoparticules. Les valeurs de taille obtenues par MET sont toujours inférieures à celles obtenues par DLS puisque la technique MET ne permet d'observer que le cœur de silice : les chaînes de PEG du Pluronic[®] F127 ne peuvent pas être détectées par contraste.

iii. Potentiel zêta

Le potentiel zêta (ζ) des différents lots de NPSi a été déterminé grâce au Zetasizer NanoZS. Tous les échantillons ont été placés dans les conditions suivantes : [NPSi] = 2 μ M, [PBS] = 1 mM, [KCl] = 1 mM, pH = 7,0.

5. Stabilité *in vitro* de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice

Afin de vérifier la stabilité *in vitro* des nanoparticules de silice dans un environnement proche de celui retrouvé *in vivo*, les nanoparticules de silice ont été incubées à l'obscurité pendant 7 jours à 37°C dans du PBS contenant 2 mg.mL⁻¹ de protéines (BSA).

Des spectres d'émission de fluorescence sont réalisés avec un spectrofluorimètre après différents temps d'incubation (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 1 j, 2 j, 3 j, 4 j et 7 j) et 50 µL de Triton X-100 dilué 10 fois (masse : masse) dans de l'eau distillé sont ajoutés après la mesure de chaque spectre afin de vérifier l'état d'agrégation des nanoparticules.

6. Culture cellulaire

La lignée cellulaire MRC-5, fibroblastes dérivant d'un poumon humain sain, a été cultivée dans du milieu MEM complété avec 9 % de sérum de veau fœtal inactivé, 1 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de glutamine et 1 % de pénicilline (10 000 UI) - streptomycine (10 000 µg.mL⁻¹). Les cellules ont été cultivées en monocouche dans un incubateur humide à 37°C contenant 5 % de CO₂ et ont été repiquées une fois par semaine lorsque le taux de confluence atteignait 80 %.

7. Tests de toxicité cellulaire

i. Viabilité cellulaire

L'effet des NPSi sur la viabilité des cellules MRC-5 a été évalué grâce au test MTT [241]. Brièvement, les cellules MRC-5 sont cultivées en plaque 96 puits pendant 24 h puis le milieu de culture est remplacé par 200 µL d'une suspension de NPSi dont la concentration varie de 0 à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules sont lavées et 50 µL de MTT à 2 mg.mL⁻¹ sont ajoutés à chaque puits. Les cristaux de formazan se forment pendant l'incubation de 3 h à 37 °C puis ils sont solubilisés par l'ajout de DMSO. La densité optique à 540 nm de chaque puits est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque et les résultats sont exprimés selon la concentration de nanoparticules induisant 50 % de mort cellulaire (IC₅₀) par rapport aux cellules non traitées.

ii. Hémolysse

Le test d'hémolysse permet de mettre en évidence les interactions des nanoparticules avec les membranes cellulaires et il est actuellement utilisé comme un test standard de biocompatibilité [242-244].

La déstabilisation de la membrane des globules rouges (GR) est facilement visualisable par la libération de l'hémoglobine dans le milieu. Avant le sacrifice d'une souris saine, le sang total est prélevé par une ponction intracardiaque dans un tube stabilisé avec de l'EDTA. Les GR sont lavés puis mis en contact avec du PBS (témoin -), de l'eau distillée (témoin +) ou différentes concentrations de nanoparticules (de 5 nM à 1 µM). Les solutions sont ensuite incubées 2 h à 37°C avant centrifugation. Les spectres d'absorbance du surnageant sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre et le pourcentage d'hémolyse de chaque échantillon est calculé à partir de l'absorbance à 541 nm, selon l'équation suivante :

$$\frac{A_s - A_{t-}}{A_{t+} - A_{t-}} \times 100$$

Équation 2 : Calcul du pourcentage d'hémolyse de chaque échantillon

A indique l'absorbance des solutions à 541 nm, S l'échantillon, T⁻ le témoin négatif et T⁺ le témoin positif.

8. Expérimentation animale

Des souris Balb/cOlaAnN (Harlan, Gannat, France) âgées de 10 semaines sont maintenues dans un cycle jour/nuit de 12 h et ont eu accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Une nourriture spéciale purifiée et dépourvue d'éléments fluorescents (TD 94045, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) a été utilisée pour réduire l'autofluorescence des tissus dans le proche infrarouge. Les animaux ont été manipulés avec soin en accord avec les instructions nationales vis-à-vis de l'expérimentation animale. Toutes les expériences ont été réalisées sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane à l'aide de l'Univentor 400[®] (Genestil, Royaucourt, France) ou suite à une injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (90 mg.kg⁻¹ masse corporelle de souris) / xylazine (9 mg.kg⁻¹ masse corporelle de souris).

9. Imagerie de fluorescence proche infrarouge

i. Modification du système d'imagerie de fluorescence proche infrarouge Fluobeam[™]

L'imagerie optique *in vivo* des nanoparticules de silice a été réalisée en modifiant l'imageur de fluorescence Fluobeam[™] 700 (Fluoptics, Grenoble, France). Ce système doté une seule longueur d'onde d'excitation (laser à 690 nm) et d'un filtre d'émission passe-haut à 750 nm n'est pas idéal pour l'excitation des nanoparticules de silice, dont le pic d'excitation se situe au-delà de 750 nm.

Une diode laser à 739 nm (Biolitec AG, Jena, Allemagne) a été utilisée pour une meilleure excitation des nanoparticules et des filtres à l'émission ont été ajoutés afin d'empêcher le recueil de la longueur d'onde d'excitation (Figure 30).

La puissance de la diode a été fixée à 100 mW, ce qui correspond à une puissance à la surface de l'échantillon, à 15 cm de la fibre, d'environ 3,5 mW.

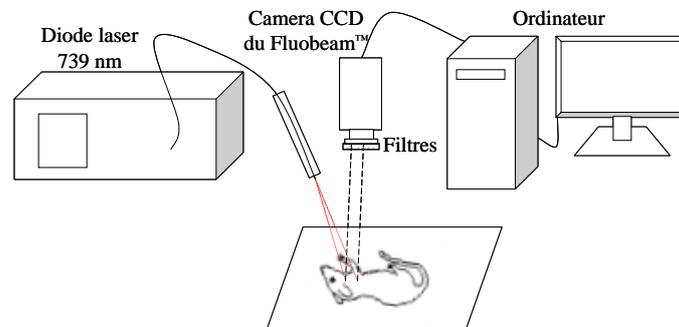


Figure 30 : Schéma du système d'imagerie *in vivo* de fluorescence proche infrarouge modifié

ii. Etude de biodistribution sur souris saines par imagerie de fluorescence

Les souris ont reçu une injection sous-cutanée dans la patte antérieure droite de 20 μ L de PBS (témoin) ou de 20 μ L d'une solution de nanoparticules à 15 μ M (groupes expérimentaux). La patte a ensuite été massée afin de faciliter la capture des nanoparticules par le système lymphatique et leur migration jusqu'aux ganglions. La région axillaire des souris a été dépilée avec une crème dépilatoire commerciale afin de limiter l'autofluorescence de la zone d'intérêt due aux poils.

La caméra CCD du Fluobeam[™] ajustant l'intensité de fluorescence de l'image entière sur le pixel le plus brillant, le point d'injection a été masqué pour permettre une meilleure visualisation de la région d'intérêt pour les images *in vivo*. Après sacrifice par dislocation cervicale, les organes ont été disséqués puis visualisés *ex vivo* par le système d'imagerie de fluorescence infrarouge modifié décrit précédemment. Les souris ont été hébergées dans des cages à métabolisme, afin de recueillir et d'imager les excréments quotidiennement.

iii. Traitement des images

La réponse de la caméra étant linéaire en fonction du temps d'exposition, les images ont été prises à des temps d'exposition permettant la meilleure visualisation des organes d'intérêt possible sans saturation du signal. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ImageJ 1.44 (NIH, USA).

Les différentes étapes de traitement des images permettant d'obtenir des valeurs chiffrées de fluorescence sont décrites ci-après. L'image du bruit de fond est tout d'abord soustraite à l'image d'intérêt puis un filtrage médian permet de supprimer certains pixels bruyant l'image.

Une étape de seuillage par la méthode MaxEntropy conduit à la délimitation de l'organe d'intérêt puis la moyenne de l'intensité de chaque pixel de la zone d'intérêt est mesurée. Afin de comparer les images d'un même organe entre elles, cette valeur de fluorescence est divisée par le temps d'exposition de l'image. La fonction «lookup table 16 colors» du logiciel ImageJ a permis de convertir l'image en niveaux de gris du Fluobeam™ en une image présentant un dégradé de couleur en fonction de l'intensité de fluorescence des pixels. Cette représentation facilite la lecture et l'analyse des images.

10. Détermination des propriétés optiques des tissus murins

L'imagerie de fluorescence en deux dimensions n'est pas quantitative puisque la présence de molécules absorbantes et diffusantes dans les tissus provoque une atténuation du signal de fluorescence obtenu en surface. La quantité de nanoparticules dans un organe ne peut donc pas être déterminée à partir de l'intensité de fluorescence observée en surface de l'organe d'intérêt. Les différences de propriétés optiques entre deux organes sont liées à leurs variations de composition, de structure et de fonctionnement. Les deux paramètres majeurs régissant l'atténuation de la lumière dans les tissus sont l'absorption et la diffusion.

L'absorption d'un photon par une molécule est possible lorsque son énergie correspond à une transition d'énergie électronique ou vibrationnelle de cette molécule. L'énergie du photon absorbé peut être réémise sous forme d'un photon de fluorescence, être transformée en chaleur ou servir à la conversion de la molécule dans un état triplet. La variation d'intensité d'un faisceau lumineux dans un milieu absorbant non diffusant est donnée par l'expression suivante : $\frac{dI}{I} = -\mu_a dx$, avec μ_a le coefficient d'absorption, qui représente la probabilité qu'un photon soit absorbé par unité de longueur de chemin dx et dI , l'intensité du faisceau collimaté. De cette équation, découle la loi de Beer-Lambert qui décrit l'atténuation de flux lumineux dans un milieu absorbant d'épaisseur x : $I(x) = I_0 \exp(-\mu_a x)$, où $I(x)$ est l'intensité transmise et I_0 , l'intensité incidente.

La diffusion de la lumière se produit lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec une particule d'indice de réfraction différent de celui du milieu environnant. La particule se comporte alors comme une source de lumière secondaire avec une distribution angulaire d'intensité qui lui est propre, et qui dépend de la taille de la particule et de la longueur d'onde d'illumination. Dans un milieu diffusant non absorbant, l'intensité de la lumière diffusée varie avec l'épaisseur de tissu traversé selon l'équation : $\frac{dI}{I} = -\mu_s dx$ où μ_s représente le coefficient de diffusion.

Le facteur d'anisotropie g est défini comme le cosinus de l'angle moyen de diffusion. A partir de μ_s et g , le coefficient de diffusion réduit μ'_s est déterminé par l'équation : $\mu'_s = \mu_s (1 - g)$. L'atténuation globale de la lumière dans un milieu diffusant et absorbant est caractérisée par le coefficient d'extinction μ_{eff} , qui se calcule selon l'équation suivante : $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}$. Dans le proche infrarouge, le coefficient de diffusion étant très grand devant le coefficient d'absorption, l'équation devient : $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a\mu'_s}$.

Afin de déterminer l'importance de la diffusion et de l'absorption de la lumière en fonction des organes, les coefficients d'absorption (μ_a), de diffusion réduit (μ'_s), d'extinction effectif (μ_{eff}) de la lumière et le coefficient d'anisotropie (g) ont été calculés sur les organes (foie et reins) de souris saines ($n = 10$) à deux longueurs d'onde : 740 nm, qui correspond à la longueur d'onde d'excitation des NPSi et 840 nm qui représente la longueur d'onde d'émission de fluorescence.

i. Mesure de la transmission collimatée, la transmittance et la réflectance

La transmission balistique ou collimatée correspond au pourcentage d'intensité lumineuse traversant un échantillon sans être diffusée ou absorbée. La transmittance correspond à la quantité de lumière transmise par (c'est-à-dire passant au travers) l'échantillon, normalisée par l'énergie incidente. La réflectance correspond à la quantité de lumière réfléchiée par l'échantillon, normalisée par la quantité d'énergie du faisceau entrant.

Ces trois caractéristiques d'un échantillon sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre, muni, pour les mesures de la réflectance et de la transmittance, d'une sphère d'intégration de diamètre 50 mm (Figure 31).

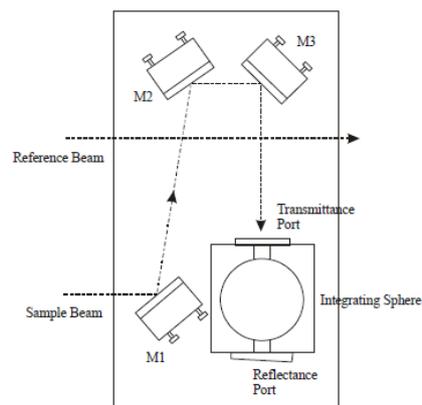


Figure 31 : Schéma optique de la sphère d'intégration, vue du dessus

Le trajet optique de la lumière incidente est matérialisé par les flèches, le port d'entrée de la sphère est appelé port de transmittance, le port de sortie, port de réflectance et les miroirs sont précisés en M. L'intérieur de la sphère qui contient les détecteurs est constitué de Spectralon, un matériau garantissant une réflectivité de 99 %.

Les valeurs de transmission collimatée (M_A), de transmittance (M_T) et de réflectance (M_R) pour un échantillon se calculent avec les équations suivantes, grâce au schéma de mesures précisé dans la Figure 32 :

$$M_A = \frac{A_{\text{éché}} - A_{\text{noir}}}{A_{\text{blanc}} - A_{\text{noir}}} \quad M_T = \frac{T_{\text{éché}} - T_{\text{noir}}}{T_{\text{blanc}} - T_{\text{noir}}} \quad M_R = \frac{R_{\text{éché}} - R_{\text{noir}}}{R_{\text{blanc}} - R_{\text{noir}}}$$

Équations 3, 4 et 5 : Formules utilisées pour le calcul de la transmission collimatée (M_A), de la transmittance (M_T) et de la réflectance (M_R) d'un échantillon

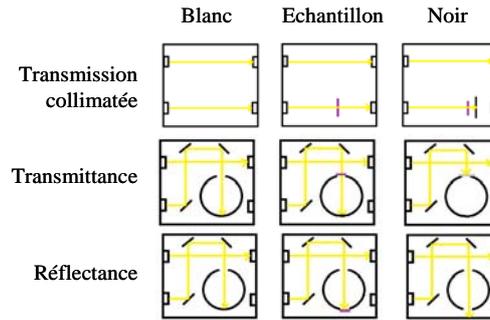


Figure 32 : Schéma des différents trajets optiques utilisés pour la mesure de la transmission collimatée, de la transmittance et de la réflectance, vue du dessus

Le blanc correspond à la mesure du bruit de l'appareil sans échantillon et le noir, à la mesure lorsque le faisceau lumineux incident (en jaune) est bloqué.

ii. Algorithme IAD

L'algorithme Inverse Adding Doubling (IAD) permet de calculer les propriétés optiques d'un échantillon telles que le coefficient d'absorption μ_a , le coefficient de diffusion réduit μ'_s et le facteur d'anisotropie g à partir de la mesure de la transmission collimatée, de la transmittance et de la réflectance ^[245,246]. Le coefficient d'extinction effectif μ_{eff} a été calculé

selon la formule suivante : $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a\mu'_s}$

Cette méthode a été préalablement validée avec des billes de polystyrène en comparant les résultats obtenus en appliquant la méthode IAD avec ceux obtenus avec un calculateur de Mie ^[247]. La faisabilité de la méthode sur des tissus a ensuite été vérifiée à l'aide de fantômes de tissus mammaires dont les propriétés optiques sont connues ^[248].

11. Extraction chimique de la cyanine 7

Après dissection, les organes et excréments des souris (point d'injection, GAD, foie et fèces) ont subi une extraction chimique afin de libérer leur contenu en cyanine 7 et de le doser par spectrofluorimétrie. Pour cela, 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ de tissu d'une solution d'extraction (EtOH:DMSO:acide acétique 80:20:1) et 2 μL de NaF à 36 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ont été ajoutés aux organes. L'échantillon a ensuite été broyé mécaniquement puis soniqué 15 min.

Après une centrifugation de 5 min à 12 000 g, la fluorescence du surnageant a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. La concentration en Cy7 des échantillons a été déterminée à l'aide d'une droite étalon. Les organes de souris non injectées ont été mis en présence de concentrations connues de NPSi cov. et ont subi le même protocole d'extraction que les échantillons. Les droites représentant la fluorescence du surnageant en fonction de la concentration en NPSi ont été tracées pour chaque organe et ont permis de déterminer la concentration en NPSi des organes des souris à différents temps après injection de NPSi.

12. Toxicité *in vivo*

Le foie est impliqué dans de nombreux processus physiologiques vitaux (métabolisme des lipides, des glucides, des protéines, épuration, stockage, ...) et un dysfonctionnement de cet organe peut être néfaste à l'organisme entier.

Le foie étant l'organe principal de stockage des nanoparticules, l'étude de la toxicité *in vivo* se porte essentiellement sur cet organe.

i. Masse corporelle et rapport de masse

La masse corporelle des animaux des deux groupes expérimentaux (souris « témoin » et injectées avec 300 pmol de NPSi) a été suivie tous les jours. Après sacrifice, les organes ont été immédiatement pesés. Le rapport de la masse du foie frais sur la masse corporelle (masse relative du foie) a été calculé dans le but d'évaluer la toxicité hépatique des nanoparticules.

ii. Coupes histologiques de foie

Après sacrifice des souris, les foies ont été fixés pendant une nuit dans de l'AFA (alcool formolé acétique) puis inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm ont été réalisées puis colorées par HES (Hématoxyline Eosine Safran). Les lames ont ensuite été lues par le Dr. D'Hallewin à la recherche de changements morphologiques entre les foies des souris « témoin » et ceux des souris ayant reçu une injection de nanoparticules.

iii. Enzymes hépatiques

Certaines enzymes hépatiques sont libérées dans le sang en cas de dommages hépatiques et sont donc de bons indicateurs de toxicité hépatique. La famille des phosphatases alcalines (PAL) reflète en particulier une réduction pathologique du flux de bile. La quantité de PAL dans le sérum est déterminée par la quantité de substrat (*p*-nitrophenyl phosphate, *p*NPP) déphosphorylé en *p*-nitrophénol (*p*NP).

Après déphosphorylation et en condition basique, ce produit prend une couleur jaune qui peut être détectée par la mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 405 nm. L'intensité de la coloration est donc proportionnelle à l'activité phosphatase du sérum.

Avant sacrifice, le sang total des souris est prélevé par ponction intracardiaque dans un tube collecteur BD Vacutainer[®] SST[™] II Advance avec séparateur acrylique de sérum (Becton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France) permettant une séparation efficace du sérum et des cellules sanguines. La quantité de PAL dans le sérum est mesurée grâce au kit commercial SensoLyte[®], conformément aux instructions fournies. Brièvement, une droite étalon représentant l'absorbance à 405 nm en fonction de la quantité d'enzyme a été établie à partir d'une solution de phosphatase alcaline de concentrations connues et variables. Les échantillons ayant subi le même traitement que la gamme étalon, leur absorbance à 405 nm a été reportée sur la courbe afin de connaître la quantité d'enzymes présentes dans le sérum.

13. Analyses statistiques

Les moyennes, les valeurs d'erreur standard à la moyenne (ESM) et les coefficients de détermination ont été calculés par le logiciel Excel (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA). La significativité entre les groupes a été calculée avec le logiciel StatView (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) et une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

C. Résultats

1. Caractérisation de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice

Les NPSi ont tout d'abord été caractérisées par leurs spectres d'absorption et d'émission de fluorescence. La cyanine 7 étant un fluorophore hydrophobe, ses spectres ne peuvent être obtenus que dans une solution apolaire telle que le méthanol (Figure 33 A). En revanche, les spectres des NPSi hydrophiles ont été mesurés dans un tampon phosphate (Figure 33 B et C).

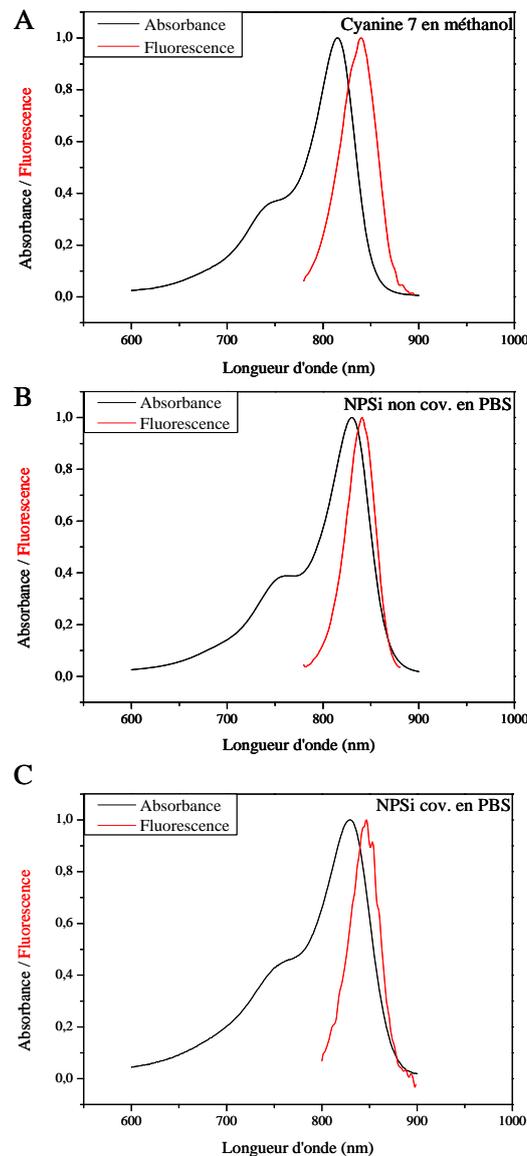


Figure 33 : Spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence normalisés caractéristiques des traceurs fluorescents utilisés

Les spectres d'absorbance sont représentés en noir et les spectres d'émission de fluorescence en rouge.

A. Cyanine 7 en méthanol.

B. Nanoparticules de silice avec la cyanine 7 liée de façon non covalente en PBS.

C. Nanoparticules de silice avec la cyanine 7 liée de façon covalente en PBS.

Les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence sont différents lorsque la cyanine 7 est intégrée dans les NPSi ou non. La différence de longueur d'onde du pic d'absorbance entre la cyanine 7 seule (815 nm) et intégrée dans les NPSi (830 nm) s'explique par la différence de polarité du solvant utilisé pour la mesure (méthanol pour la cyanine 7 seule et tampon phosphate pour les NPSi).

Dans un milieu aqueux, la fluorescence de la cyanine 7 s'éteint complètement (Figure 34 B, courbe noire), ce qui laisse supposer son agrégation. Lorsque la cyanine 7 est encapsulée dans une NPSi, elle émet de la fluorescence en milieu aqueux (Figure 33 B et C) L'encapsulation de la cyanine 7 permet donc de la rendre hydrophile. Ce fluorophore peut ainsi être utilisé dans les milieux biologiques en évitant l'utilisation de solvants nocifs. En présence de protéines (Figure 34, courbes vertes), la cyanine 7 retrouve des spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence caractéristiques, avec un déplacement bathochromique de l'absorbance. Ce décalage du pic d'absorption vers les grandes longueurs d'onde est typique d'une modification de l'environnement de la cyanine 7, à savoir un changement de solvant et une possible liaison de la cyanine 7 avec la BSA.

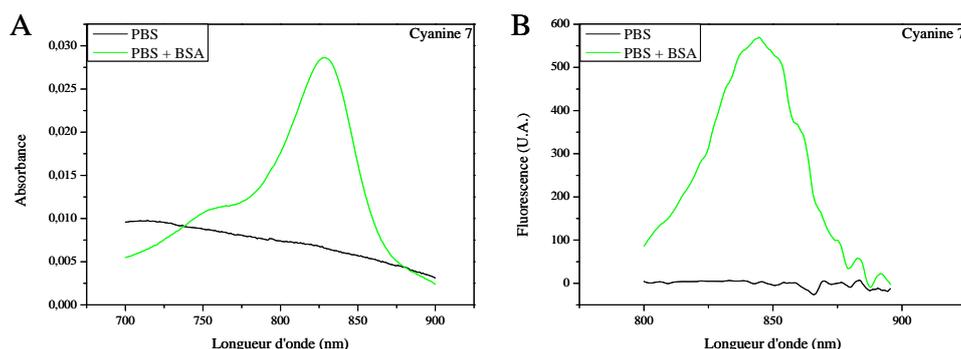
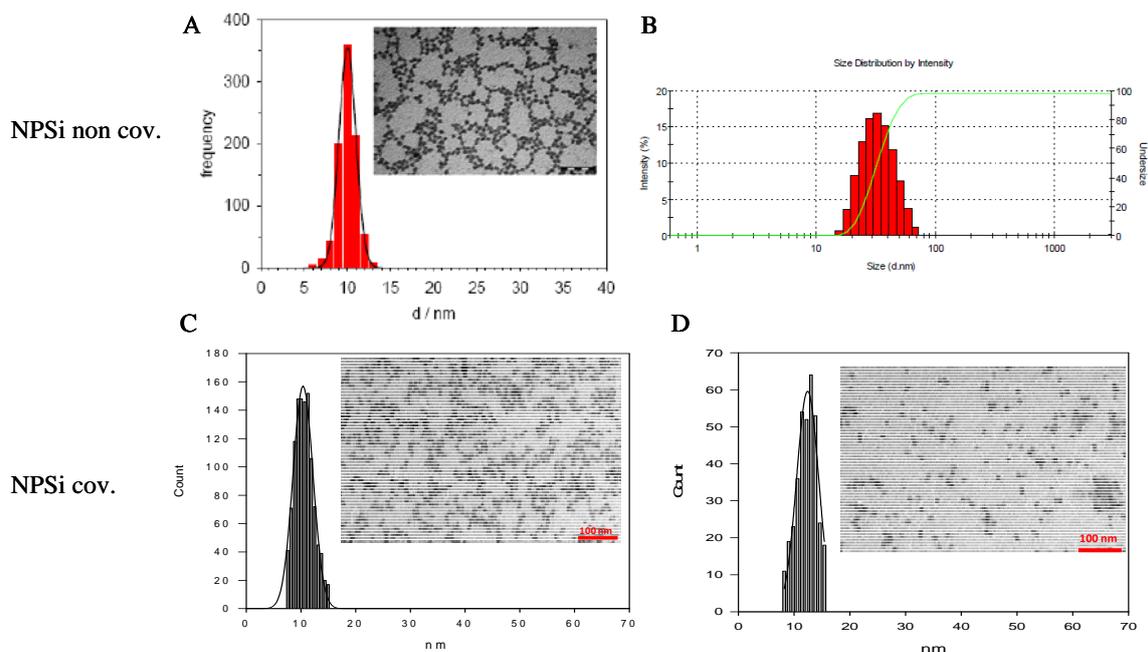


Figure 34 : Spectres de la cyanine 7 dans différents solvants

Spectres d'absorbance (A) et d'émission de fluorescence (B) de la cyanine 7 dans du PBS (courbes noires) ou dans du PBS contenant 2 mg.mL^{-1} de BSA (courbes vertes).

Les concentrations de cyanine 7 dans les solutions de NPSi à $15 \mu\text{M}$ ont été déterminées à $0,173 \text{ mg Cy7.mL}^{-1}$, $0,20 \text{ mg Cy7.mL}^{-1}$ et $0,120 \text{ mg Cy7.mL}^{-1}$ pour la cyanine 7 liée de façon non covalente, les familles F21 et F25, respectivement. D'autres caractéristiques, telles que le coefficient d'extinction molaire, le rendement quantique de fluorescence, la taille du cœur des NPSi (Figure 35 A, C et D), le diamètre hydrodynamique (Figure 35 B) et le potentiel ζ ont été mesurées afin de comparer les lots de NPSi. Les résultats sont donnés dans les Tableau 8, Tableau 9, Tableau 10. Etant donné la faible sensibilité de l'instrumentation utilisée pour la mesure du rendement quantique de fluorescence dans le proche infrarouge, une erreur d'environ 20 % est possible et les résultats obtenus doivent être considérés avec prudence.


Figure 35 : Taille des NPSi par MET et DLS

Analyse de la taille de l'échantillon R289(4)DIA par MET (A) et par DLS (B), analyses MET et images représentatives des échantillons F21-2 (C) et F25-2 (D), insert : images représentatives, échelle 100 nm.

Tableau 8 : Caractéristiques de la cyanine 7 et des NPSi renfermant la cyanine 7 de façon non covalente

| Echantillon | % COOH | [Cy7] ^a | ϵ^b | λ_{abs}^c | λ_{em}^c | SS ^d | QY ^e | D _C ^f | D _H ^g |
|-------------|--------|--------------------|----------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Cyanine 7 | - | - | $1,3 \cdot 10^5$ | 815 | 840 | 25 | 0,03 | - | - |
| R289(1)DIA | 10 | 0,173 | $2 - 2,5 \cdot 10^5$ | 830 | 841 | 11 | 0,11 | $10 \pm 1,0$ | 28 |
| R289(2)DIA | 20 | | | | | | | | 28 |
| R289(3)DIA | 30 | | | | | | | | 29 |
| R289(4)DIA | 40 | | | | | | | | 32 |

^a mg Cy7.mL⁻¹; ^b coefficient d'extinction molaire, M⁻¹.cm⁻¹; ^c nm, ^d Stokes shift, nm; ^e rendement quantique de fluorescence; ^f taille du cœur (MET), nm; ^g diamètre hydrodynamique (DLS), nm.

Tableau 9 : Caractéristiques des NPSi renfermant la cyanine 7 de façon covalente de la famille F21

| NPSi | % COOH | Potentiel ζ^a | [Cy7] _b | ϵ^c | λ_{abs}^d | λ_{em}^d | SS ^e | QY ^f | D _C ^g | D _H ^h (PdI) ⁱ |
|-------|--------|---------------------|--------------------|--------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|--|
| F21-1 | 0 | $-4,9 \pm 2,0$ | 0,20 | 8 300 | 830 | 847 | 17 | 0,025 | $10 \pm 2,0$ | 30 (0,30) |
| F21-2 | 15 | $-6,5 \pm 1,1$ | | 8 000 | | | | 0,030 | $10 \pm 2,0$ | 33 (0,18) |
| F21-3 | 30 | $-7,0 \pm 1,9$ | | 6 700 | | | | 0,025 | $11 \pm 2,5$ | 39 (0,17) |
| F21-4 | 45 | $-8,8 \pm 2,0$ | | 6 100 | | | | 0,020 | ND ^j | 68 (0,12) |

^a mV; ^b mg Cy7.mL⁻¹; ^c coefficient d'extinction molaire, M⁻¹.cm⁻¹; ^d nm, ^e Stokes shift, nm; ^f rendement quantique de fluorescence; ^g taille du cœur (MET), nm; ^h diamètre hydrodynamique (DLS), nm; ⁱ indice de polydispersité; ^j non déterminé.

Tableau 10 : Caractéristiques des NPSi renfermant la cyanine 7 de façon covalente de la famille F25

| NPSi | % CEST | Potentiel ζ^a | [Cy7] _b | ϵ^c | λ_{abs}^d | λ_{em}^d | SS ^e | QY ^f | D _C ^g | D _H ^h (PdI) ⁱ |
|-------|--------|---------------------|--------------------|--------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|--|
| F25-2 | 0,05 | $-7,8 \pm 0,8$ | 0,12 | 12 000 | 830 | 847 | 17 | 0,03 | $12 \pm 2,3$ | 37 (0,16) |
| F25-3 | 0,10 | $-10,8 \pm 0,6$ | | 12 000 | | | | 0,03 | $12 \pm 2,3$ | 32 (0,21) |
| F25-4 | 0,20 | $-14,3 \pm 0,8$ | | 13 300 | | | | 0,04 | $11 \pm 3,7$ | 45 (0,37) |

^a mV; ^b mg Cy7.mL⁻¹; ^c coefficient d'extinction molaire, M⁻¹.cm⁻¹; ^d nm, ^e Stokes shift, nm; ^f rendement quantique de fluorescence; ^g taille du cœur (MET), nm; ^h diamètre hydrodynamique (DLS), nm; ⁱ indice de polydispersité.

La taille géométrique du cœur des NPSi ne varie pas, quels que soient la méthode d'encapsulation de la cyanine 7 ou les procédés de synthèse, avec une valeur proche de 11 nm. Le diamètre hydrodynamique des NPSi, déterminé par DLS, augmente avec le nombre de groupements -COOH et CEST et varie de 28 nm à 68 nm. Les lots de NPSi synthétisés sont tous relativement homogènes, avec un indice de polydispersité proche de 0 (PdI max à 0,37) (Tableau 8, Tableau 9 et Tableau 10).

En l'absence de groupements -COOH, le potentiel ζ du lot F21-1 est plus élevé que celui des autres lots de la famille F21. En augmentant le pourcentage de groupements -COOH à la surface des NPSi, le potentiel ζ des NPSi diminue légèrement, passant de -6,5 mV à -8,8 mV quand le pourcentage de -COOH augmente de 15 % à 45 %. Cependant, les mesures de potentiel ζ indiquent la présence de 2 populations de NPSi (résultats non montrés) : une population avec un potentiel ζ très négatif, semblable à celui obtenu avec les nanoparticules de silice « nues » et une population avec un potentiel ζ moins négatif (résultats du Tableau 9). En augmentant le pourcentage de groupements CEST introduits pendant la synthèse des NPSi, la valeur du potentiel ζ diminue ($\zeta \approx -8$ mV et -14 mV avec 0,05 % et 0,2 % de CEST respectivement) et une seule population est enregistrée. D'après ces mesures de potentiel ζ , il semblerait donc que les NPSi de la famille F25 soient plus stables d'un point de vue colloïdal que les NPSi de la famille F21.

2. Stabilité *in vitro* de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice

La stabilité de la cyanine 7 et des NPSi a été testée *in vitro* par la mesure de l'absorbance et l'émission de fluorescence de la cyanine 7 et des NPSi pendant 7 jours suite à une incubation à 37°C dans du PBS ou dans du PBS contenant 2 mg.mL⁻¹ de protéines.

i. Stabilité *in vitro* de la cyanine 7

Le suivi au cours du temps de l'absorbance de la cyanine 7 dans du tampon contenant des protéines ne montre pas de grandes variations (Figure 36 A). L'émission de fluorescence de la cyanine 7 augmente au cours du temps, ce qui laisse supposer un meilleur rendement quantique et une possible désagrégation progressive de la cyanine 7 au cours du temps en présence de protéines (Figure 36 B).

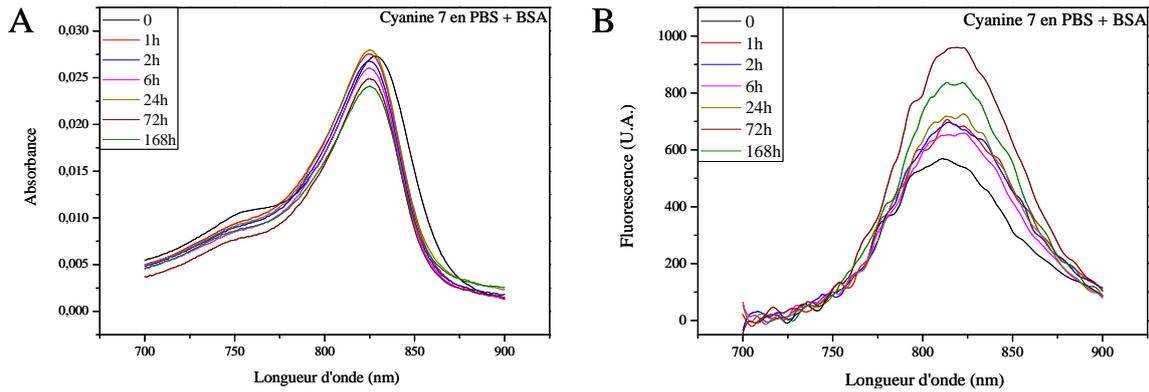


Figure 36 : Suivi du comportement de la cyanine 7 seule dans du PBS contenant des protéines (BSA) pendant 7 jours
 Les spectres d'absorbance sont représentés en A et les spectres d'émission de fluorescence en B.

ii. Stabilité *in vitro* des nanoparticules de silice avec cyanine 7 non covalente

L'émission de fluorescence des NPSi dont la cyanine 7 n'est pas liée de façon covalente dans du PBS diminue au cours du temps (Figure 37 B, courbe noire), dans les mêmes proportions que la diminution de l'absorbance (données non présentées).

En revanche, en présence de protéines, la diminution de fluorescence est moins prononcée (Figure 37 A et B courbe rouge) et le pic d'émission de fluorescence est décalé vers les faibles longueurs d'onde (effet hypsochrome) (Figure 37 A).

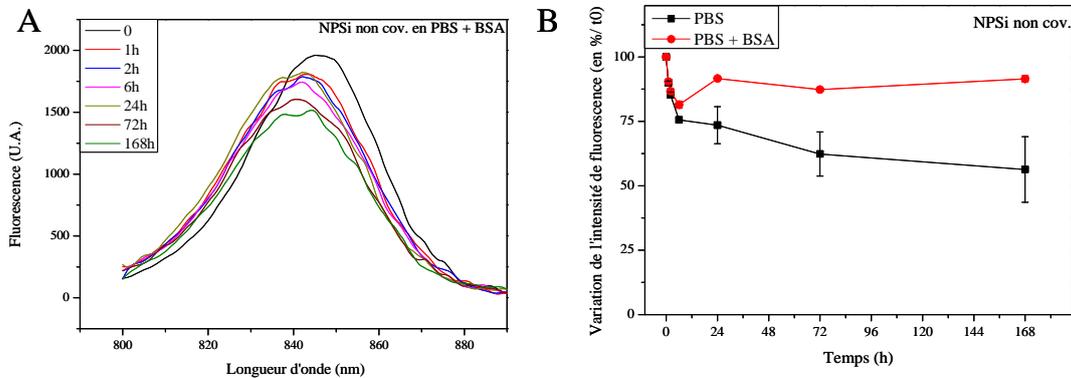


Figure 37 : Suivi de l'émission de fluorescence des NPSi avec cyanine 7 liée de façon non covalente pendant 7 jours
 A. Spectres d'émission de fluorescence des NPSi avec cyanine 7 non covalente dans du PBS contenant des protéines au cours du temps.
 B. Variation de l'intensité du pic de fluorescence des NPSi avec cyanine 7 non covalente dans du PBS seul (noir) ou contenant des protéines (rouge) au cours du temps. Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM, $n = 3$.

Ces résultats permettent de poser l'hypothèse suivante : la cyanine 7, n'étant pas liée de façon covalente à la matrice de silice, est libérée dans le milieu au cours du temps et s'agrège dans le PBS (d'où la diminution de fluorescence observée). En présence de protéines, la cyanine 7 peut s'adsorber sur l'albumine, ce qui limite la perte de fluorescence et provoque un décalage du pic d'émission de fluorescence.

iii. Stabilité *in vitro* des nanoparticules de silice avec cyanine 7 covalente

La fluorescence de la cyanine 7 liée de façon covalente à la silice (lot F25-4) diminue progressivement au cours du temps, avec une baisse réduite en présence de protéines (Figure 38). Après 7 jours d'incubation dans un milieu contenant des protéines, la fluorescence des NPSi est réduite d'environ 40 % par rapport à leur intensité de fluorescence initiale.

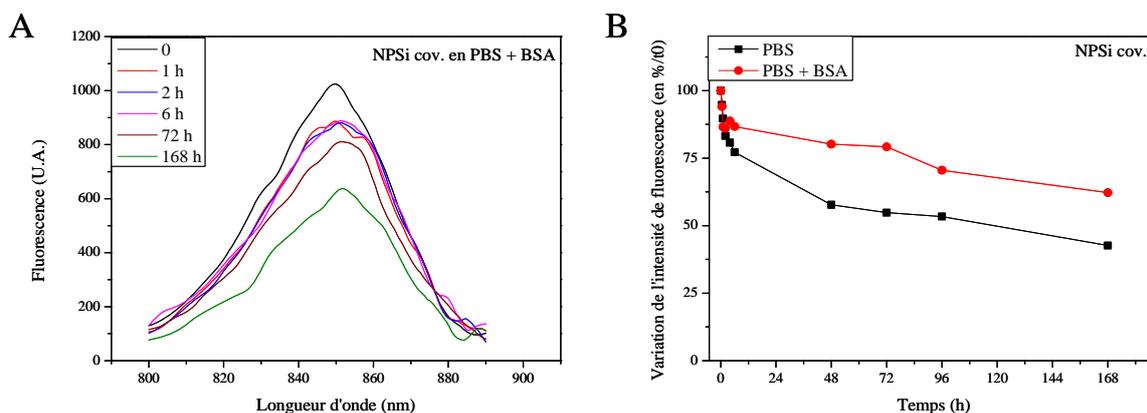


Figure 38 : Suivi de l'émission de fluorescence des NPSi avec cyanine liée de façon covalente pendant 7 jours

A. Spectres d'émission de fluorescence des NPSi avec cyanine 7 non covalente dans du PBS au cours du temps.
B. Variation de l'intensité du pic de fluorescence des NPSi avec cyanine 7 covalente dans du PBS seul (noir) ou contenant des protéines (rouge) au cours du temps

Aucun effet hypsochrome n'est observé dans ce cas (Figure 38 A), à la différence des NPSi dont la cyanine 7 liée de façon non covalente, ce qui laisse supposer que la cyanine 7 n'est pas libérée de la matrice de silice et ne s'adsorbe pas à la BSA. La diminution de la fluorescence dans le PBS seul peut être expliquée par l'agrégation des NPSi, puisque la fluorescence peut être partiellement restaurée par l'ajout de détergent (résultats non montrés). En présence de protéines, le détergent ne modifie pas l'intensité de fluorescence des NPSi (résultats non montrés), ce qui laisse supposer un phénomène de photoblanchiment ou de dégradation des nanoparticules.

3. Tests de toxicité cellulaire de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice

i. Test de viabilité cellulaire

Les fibroblastes humains MRC-5 ont été exposés à des concentrations croissantes de cyanine 7 seule ou encapsulée de façon covalente (lot F25-4) ou non (lot R289(4)DIA) dans des NPSi et la viabilité cellulaire a été mesurée par l'activité mitochondriale des cellules MRC-5 (test MTT).

Les concentrations de nanoparticules ont été exprimées par rapport à leur concentration en cyanine 7 et la toxicité a été calculée selon la concentration de cyanine 7 induisant 50 % de mort cellulaire (IC₅₀).

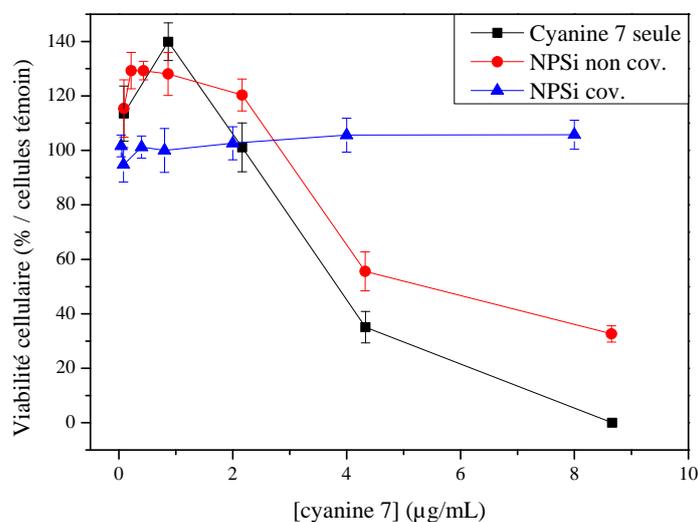


Figure 39 : Viabilité des cellules MRC-5 suite à une exposition de 24 h à des concentrations croissantes de traceurs fluorescents

Les fibroblastes ont été exposés à des concentrations croissantes de cyanine 7 libre (noir), liée de façon covalente (bleu) ou non (rouge) aux NPSi. Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM, $n = 3$.

Après 24 h de contact, l'IC₅₀ de la cyanine 7 libre sur les fibroblastes MRC-5 est de 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Elle est d'environ 5,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ lorsque la cyanine 7 est liée de façon non covalente à la matrice de silice et elle est supérieure à 8,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ lorsque la cyanine 7 y est liée de façon covalente (Figure 39). La cyanine 7 est donc toxique pour les cellules fibroblastiques aux concentrations testées et l'encapsulation dans la matrice de silice permet de limiter cette toxicité. La cyanine 7 étant libérée dans le milieu lorsqu'elle est liée de façon non covalente à la silice, sa toxicité sur les cellules MRC-5 est proche de celle obtenue avec la cyanine 7 libre. En revanche, la toxicité de la cyanine 7 est totalement abolie lorsqu'elle est liée de façon covalente à la matrice de silice. Ces résultats permettent de confirmer l'hypothèse selon laquelle la cyanine 7 n'est pas libérée par la matrice de silice lorsqu'elle y est liée de façon covalente.

D'après la Figure 39, il semblerait qu'une faible concentration de cyanine 7 soit responsable d'une stimulation de la croissance cellulaire. Ce phénomène de stimulation de la croissance cellulaire à faible dose et de mort cellulaire à forte dose porte le nom d'hormèse. L'hormèse est un phénomène connu mais peu caractérisé. Les mécanismes sous-jacents seraient liés à un stress de bas niveau engendré par l'exposition à de faibles doses de produits toxiques, responsable de l'augmentation des défenses antioxydantes intracellulaires et donc de l'augmentation de la croissance cellulaire [249].

ii. Interaction de la cyanine 7 et des NPSi avec la membrane cellulaire

Le test d'hémolyse est un test de référence pour étudier les interactions entre les nanoparticules et la membrane cellulaire [242-244]. Les dommages sur la membrane cytoplasmique des GR sont visibles très facilement par la libération de l'hémoglobine après 2 h d'incubation à 37 °C. Les GR ont donc été mis en présence de concentrations croissantes de cyanine 7 seule ou encapsulée de façon covalente (lot F25-4) ou non (lot R289(4)DIA) dans des NPSi. L'oxyhémoglobine possède deux pics d'absorbance spécifiques à 541 nm et 578 nm (Figure 40 A). La quantification du pourcentage d'hémolyse de chaque échantillon s'effectue à partir du pic à 541 nm, le maximum d'hémolyse étant obtenu avec l'eau (témoin +). En présence de tampon phosphate (témoin -), une faible proportion de GR hémolysés est responsable d'une absorption à 541 nm et celle-ci est prise en compte dans le calcul de l'hémolyse des échantillons.

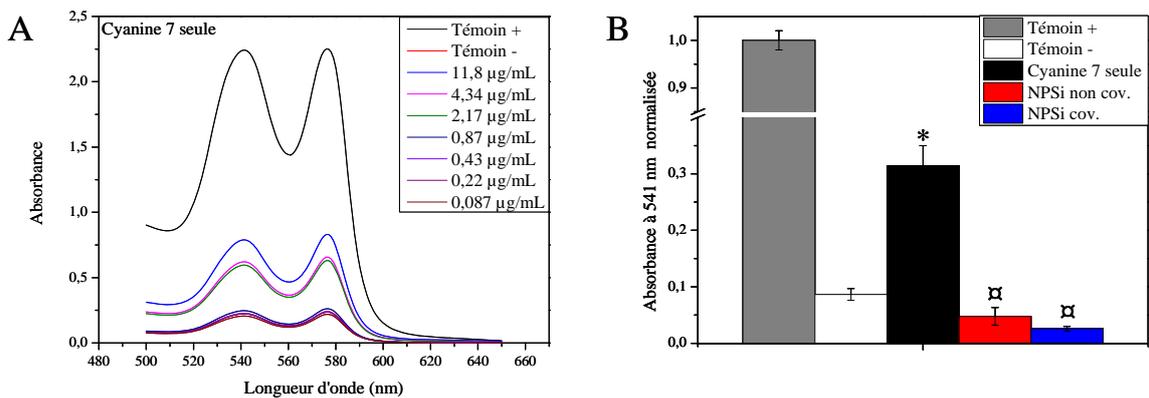


Figure 40 : Hémolyse provoquée par la cyanine 7 seule ou encapsulée dans des NPSi.

A. Spectres d'absorbance obtenus lors du test d'hémolyse avec la cyanine 7 seule.

B. Comparaison des valeurs d'absorbance à 541 nm normalisées (par rapport aux valeurs des témoins positifs) des plus fortes concentrations en cyanine 7 seule (11,8 µg.mL⁻¹, noir), en NPSi non cov. (750 nM, rouge) ou en NPSi cov. (500 nM, bleu). Les résultats sont présentés en moyenne ± ESM, n = 3 par groupe, * : résultat significativement supérieur au témoin négatif (p < 0,05) et □ : résultat significativement inférieur au témoin négatif (p < 0,05).

D'après la Figure 40 A, une hémolyse des GR est obtenue pour des concentrations en cyanine 7 libre supérieures à 0,87 µg.mL⁻¹. Le maximum d'hémolyse des échantillons (23,13 ± 2,55 %) a été obtenu pour la plus forte concentration en cyanine 7 testée, c'est-à-dire 11,8 µg.mL⁻¹. En revanche, les valeurs d'absorbance à 541 nm des NPSi (cov. ou non) sont toujours inférieures à celles obtenues avec le témoin négatif (PBS), quelle que soit la concentration en NPSi testée (jusqu'à 750 nM pour les NPSi non cov. et 500 nM pour les NPSi cov., ce qui correspond à des concentrations en cyanine 7 de 5,8 et 4,0 µg.mL⁻¹, respectivement) (Figure 40 B).

Les concentrations testées de nanoparticules n'interfèrent donc pas négativement avec la membrane plasmique des cellules durant les 2 heures d'incubation. Alors que la cyanine 7 libre provoque une déstabilisation de la membrane plasmique, les NPSi sont biocompatibles vis-à-vis des globules rouges.

4. Visualisation du ganglion axillaire de souris saines

Les souris ont reçu une injection de 20 μL d'une solution de NPSi, covalente (lot F25-4) ou non (lot R289(4)DIA), à la concentration de 15 μM ou l'équivalent en cyanine 7 libre, à savoir 3,44 μg .

Après l'injection de traceurs fluorescents en sous-cutané dans la patte antérieure droite, le GAD peut être visualisé dès 5 minutes après injection (Figure 41). Le point d'injection étant très fluorescent et la caméra CCD du FluobeamTM ajustant le contraste de l'image sur le pixel le plus fluorescent, le point d'injection a été caché afin d'améliorer la visualisation du GAD (Figure 41 A, B, C vs. D).

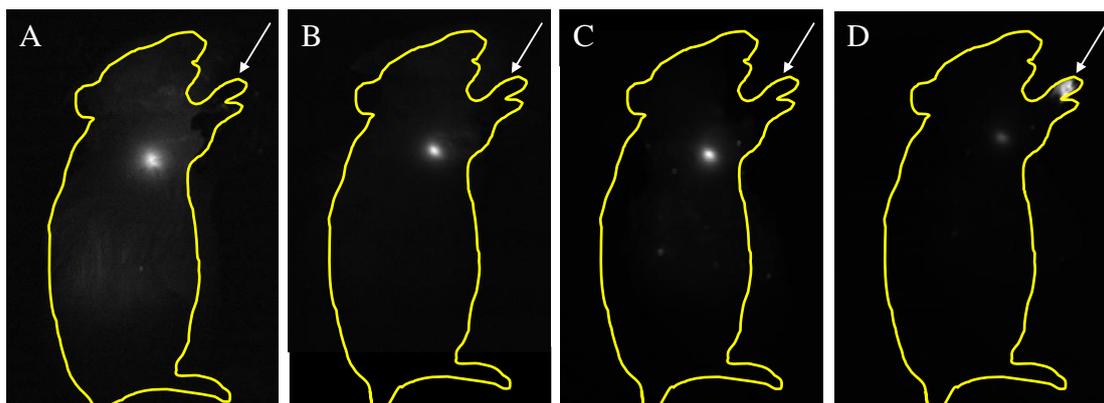


Figure 41 : Imagerie de fluorescence *in vivo* du flanc droit d'une souris 5 minutes après injection sous-cutanée de traceurs fluorescents dans la patte antérieure droite

Les souris ont été injectées avec 3,44 μg de cyanine 7 dilué dans 20 μL d'une solution de PEG:EtOH:eau (A), 300 pmol de nanoparticules de silice dont la cyanine 7 est liée de façon non covalente (B) ou covalente (C et D). En C, le point d'injection (flèche) est caché pour permettre une meilleure visualisation du ganglion axillaire droit. En D, le point d'injection n'est pas caché.

Les images A et B ont été obtenues suite à l'excitation par le FluobeamTM (690 nm) alors que les images C et D ont été obtenues suite à une excitation à 739 nm par une diode laser et le recueil de fluorescence grâce au système FluobeamTM modifié (em. 780 – 850 nm). Les temps d'exposition sont de 10 ms (A et B), 300 ms (C) et 50 ms (D).

Alors que le GAD est bien défini suite à l'injection de NPSi (Figure 41 B et C), il apparaît plus flou suite à une injection de cyanine 7 libre (Figure 41 A). La cyanine 7 étant une molécule très petite, sa diffusion dans les tissus est rapide, ce qui provoque le marquage des tissus environnants et ainsi une définition médiocre du GAD.

5. Suivi de fluorescence du GAD au cours du temps

i. Impact de l'encapsulation de la cyanine 7 sur la fluorescence du GAD

Afin de mesurer l'impact de l'encapsulation de la cyanine 7 dans une matrice de silice, la fluorescence *in vivo* dans le GAD a été suivie pendant 7 jours suite à une injection de cyanine 7 libre, liée à la silice de façon covalente ou non.

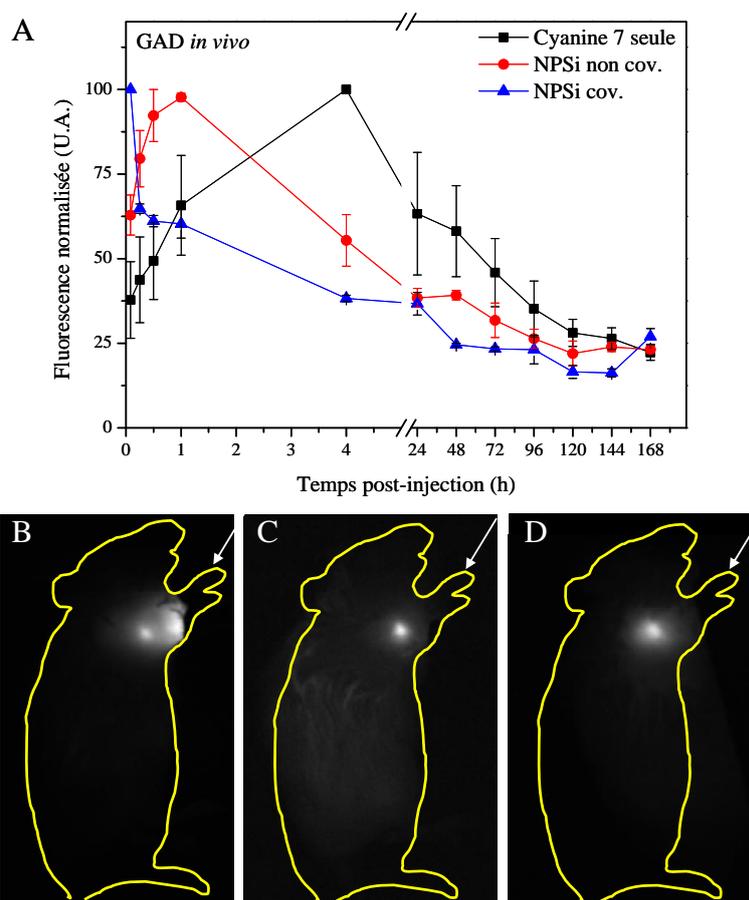


Figure 42 : Suivi de la fluorescence du GAD *in vivo* au cours du temps suite à l'injection de différents traceurs fluorescents

Les souris ont été injectées avec 3,44 μ g de cyanine 7 (A, noir), 300 pmol de nanoparticules de silice dont la cyanine 7 est liée de façon non covalente (A, rouge) ou covalente (A, bleu) puis imagées à l'aide du FluobeamTM au cours du temps. Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM, n = 3 par groupe. Les images du flanc droit des souris 4 h après injection sont représentées en B, C et D, respectivement. Le point d'injection (flèche) est caché et les temps d'exposition sont de 10 ms (B et C) et 200 ms (D).

Suite à l'injection de cyanine 7 seule, la fluorescence du GAD augmente progressivement jusque 4 h post-injection puis diminue jusque 7 jours. Cependant, la localisation précise du GAD suite à une injection de cyanine 7 libre n'est pas aisée, à cause de la fluorescence intense des tissus environnants (Figure 42 B). La petite taille de la molécule de cyanine 7, comparable à celle du bleu patenté, est à l'origine de son extravasation des capillaires lymphatiques.

Après une injection de NPSi où la cyanine est liée de façon non covalente, la fluorescence du GAD augmente progressivement jusque 1 h post-injection puis diminue jusque 7 jours. Dans ce cas, le GAD est clairement défini et facilement identifiable (Figure 42 C). La cinétique de fluorescence des NPSi avec cyanine 7 liée de façon covalente (lot F25-4) est totalement différente, avec un maximum d'intensité à 5 min post-injection puis une diminution progressive du signal.

ii. Impact de la stabilité colloïdale des NPSi sur leur migration dans le GAD

Afin d'apprécier l'influence de la stabilité des NPSi sur leur migration dans le GAD, la fluorescence *in vivo* du GAD a été suivie pendant 7 jours suite à l'injection de différents lots de NPSi covalente dont la synthèse a été faite avec du surfactant possédant des groupements –COOH (famille F21) ou non (famille F25).

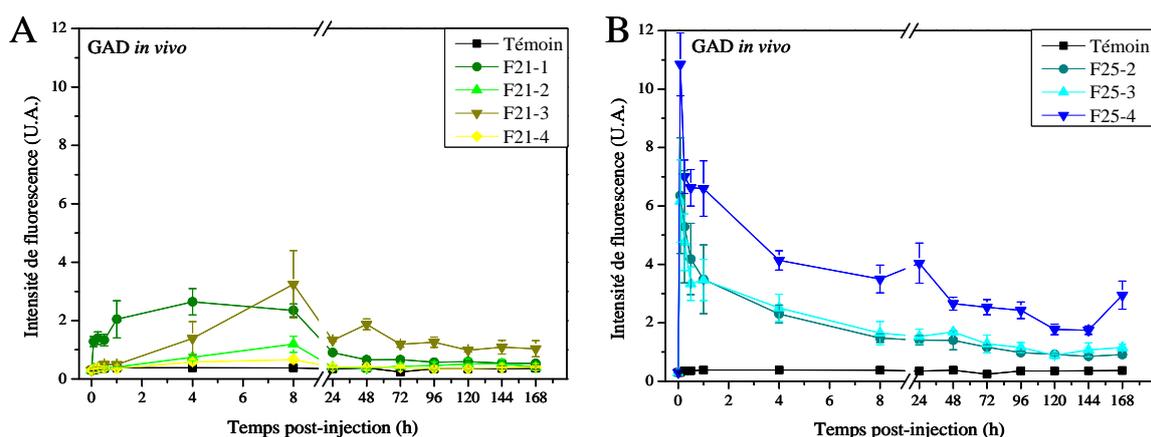


Figure 43 : Suivi de la fluorescence *in vivo* du GAD suite à l'injection sous-cutanée de 300 pmol de NPSi covalente avec différentes chimies de surface

A. Lot de nanoparticules F21 (F21-1, F21-2, F21-3 et F21-4) contenant 0, 15, 30 et 45% de groupements –COOH, respectivement.

B. Lot de nanoparticules F25 (F25-2, F25-3 et F25-4) contenant 0,05, 0,1, 0,2 et 0,4 % de groupements CEST, respectivement.

Les cinétiques de migration des NPSi covalentes varient fortement en fonction de la méthode de synthèse utilisée. En l'absence de groupements –COOH et CEST (lot F21-1), la fluorescence du ganglion montre un plateau de 1 heure à 8 heures après injection, puis une diminution rapide jusque 24 h (Figure 43 A). En introduisant des groupements carboxyliques (lot F21-2 à F21-4), et ce, quel que soit le pourcentage greffés à la surface des NPSi, la cinétique de fluorescence dans le GAD est ralentie, avec un pic de fluorescence 8 h après injection, suivi d'une décroissance rapide jusqu'à 24 h (Figure 43 A).

Lorsque la synthèse des NPSi se fait avec du surfactant « pur », les charges négatives sont apportées par les groupements CEST et les NPSi migrent très rapidement dans le GAD, avec un maximum de fluorescence à 5 min post-injection, suivi d'une décroissance régulière jusque 7 jours après injection (Figure 43 B).

A l'intérieur d'une même famille de NPSi, aucune variation de cinétique de migration ne peut être remarquée et les différences d'intensité de fluorescence du GAD peuvent être attribuées à des modifications de rendement quantique de fluorescence des différents lots (Tableau 9 et Tableau 10).

Le lot F25-4 semble être le plus approprié dans un contexte clinique puisqu'il est stable d'un point de vue colloïdal et qu'il permet de visualiser rapidement et avec une intensité de fluorescence élevée le GAD, et ce, jusque 8 h après injection. Les études ultérieures se sont portées sur ce lot de NPSi covalente (noté NPSi cov. dans les résultats).

6. Analyse de la biodistribution et de l'excrétion de la cyanine 7 et des nanoparticules de silice par imagerie de fluorescence

Les souris ont été sacrifiées 24 h et 7 jours après l'injection et les organes ont été disséqués puis imagés à l'aide du système modifié du FluobeamTM. L'intensité de fluorescence des organes des souris ayant reçu une injection de traceurs fluorescents (cyanine 7 libre, NPSi covalente ou non) a été comparée au cours de temps et confrontée à celle des organes des souris « témoin » (Figure 44).

Les rendements quantiques de fluorescence et les coefficients d'extinction molaire des différentes formes de cyanine 7 étant distincts (Tableau 8, Tableau 9 et Tableau 10), il est impossible de comparer leur biodistribution par fluorescence. Les propriétés optiques des tissus (coefficient d'absorption, de diffusion,...) étant variable d'un organe à l'autre, il est impossible également de comparer la fluorescence des organes entre eux. En revanche, il est possible de comparer, pour une même forme de cyanine 7 injectée, la fluorescence d'un même organe à 24 h et à 7 jours post-injection.

Le GAD, le foie et les reins sont les seuls organes présentant une forte augmentation de fluorescence 24 h après injection de traceurs par rapport aux souris « témoin ».

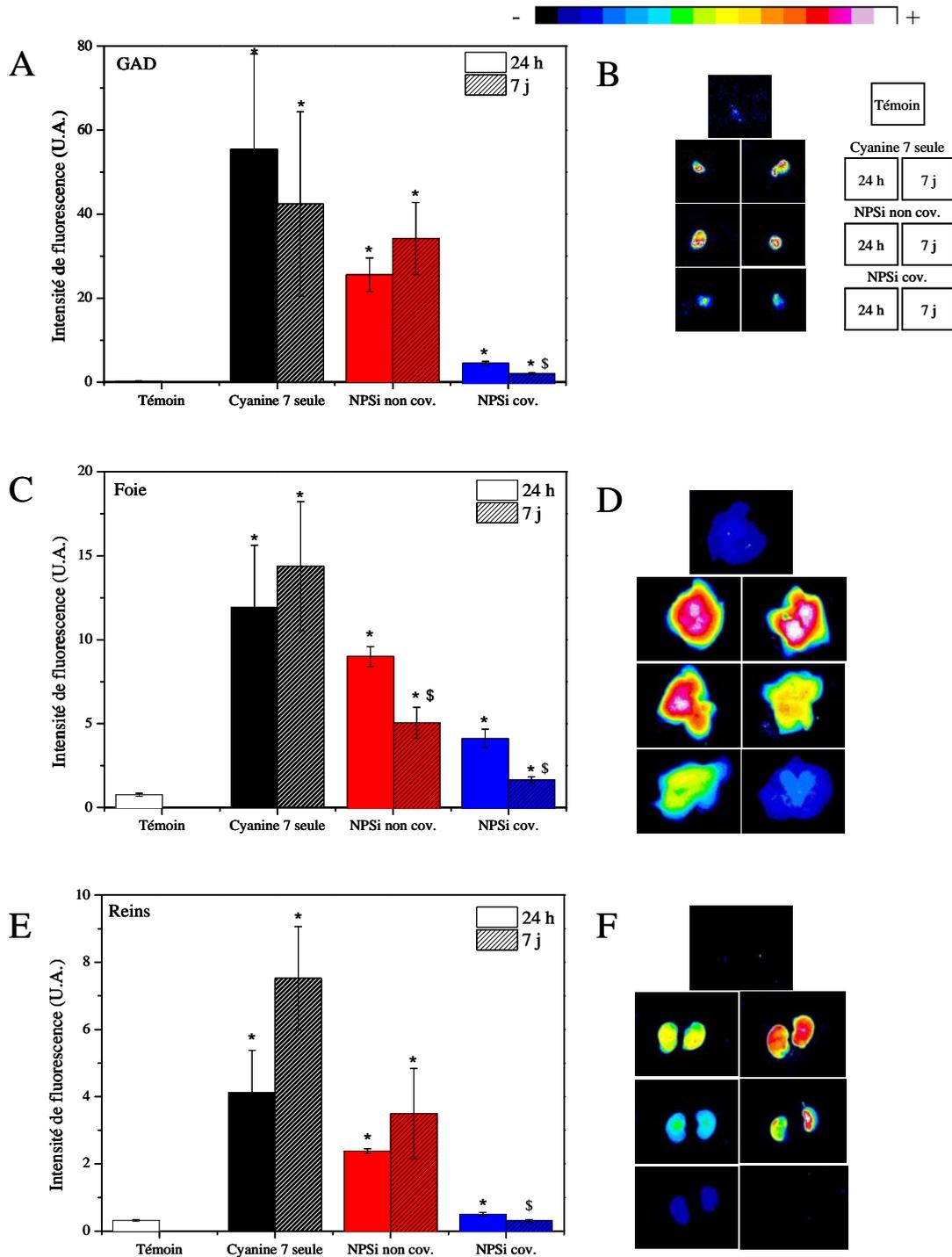


Figure 44 : Fluorescence *ex vivo* d'organes 24 h et 7 jours après injection de traceurs fluorescents

Les valeurs d'intensité de fluorescence des GAD, foie et reins sont représentées en A, C et E, respectivement avec, en blanc, les organes de souris témoin, en noir, les souris injectées avec la cyanine 7 seule, en rouge, les nanoparticules de silice dont la cyanine 7 est liée de façon non covalente et en bleu, les nanoparticules de silice dont la cyanine 7 est liée de façon covalente. Les barres pleines représentent les intensités de fluorescence à 24 h alors que les barres rayées, celles à 7 j. Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM, $n = 3$ par groupe, * : $p < 0,05$ par rapport à l'organe témoin correspondant, \$: $p < 0,05$ par rapport à l'organe correspondant à 24 h. Les images B, D, F sont représentatives respectivement des GAD, foie et reins de souris témoins, injectées avec 3,44 μg de cyanine 7, 300 pmol de nanoparticules de silice dont la cyanine 7 est liée de façon non covalente ou covalente, imagés *ex vivo* à l'aide du Fluobeam™ 24 h et 7 j après injection selon le schéma précisé en B. Les temps d'exposition sont de 10 ms pour les GADs, 100 ms pour les foies et 400 ms pour les reins.

Alors que la fluorescence dans le GAD et les reins reste comparable à 24 h et 7 jours post-injection de cyanine 7 seule ou de NPSi non cov., celle-ci diminue au cours du temps pour les NPSi cov. (Figure 44 A, B, E et F). Dans le foie, la fluorescence reste identique entre 24 h et 7 jours après injection de cyanine 7 seule mais elle diminue au cours du temps après une injection de NPSi, que la cyanine 7 soit liée de façon covalente ou non (Figure 44 C et D).

Après l'injection de cyanine 7 seule ou encapsulée dans des nanoparticules, les souris sont hébergées dans des cages à métabolisme permettant le recueil journalier des excréments (urines et fèces). Alors que les urines ne présentent aucune variation d'intensité de fluorescence au cours du temps par rapport aux urines des souris « témoin » (résultats non présentés), la fluorescence des fèces est maximale les deux premiers jours après injection puis elle diminue au cours du temps, quelle que soit la forme selon laquelle la cyanine 7 a été injectée (Figure 45).

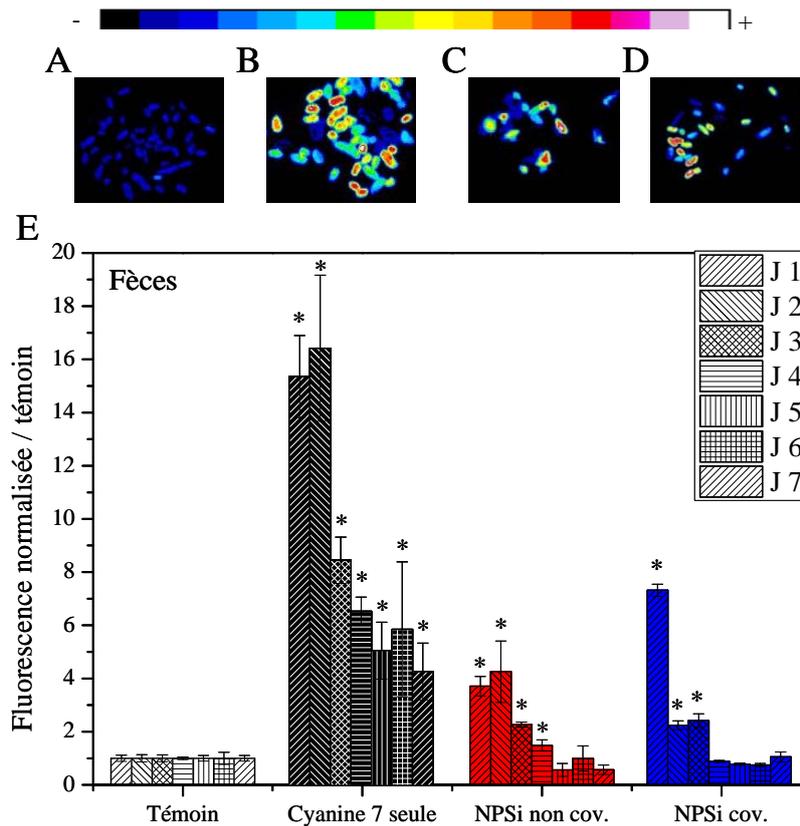


Figure 45 : Excrétion fécale de la cyanine 7 par imagerie de fluorescence

Les fèces quotidiennes des souris injectées en sous-cutané dans la patte antérieure droite avec 20 μ L de sérum physiologique (A, E blanc), 3,44 μ g de cyanine 7 (B, E noir), 300 pmol de nanoparticules de silice dont la cyanine 7 est liée de façon non covalente (C, E rouge) ou covalente (D, E bleu) ont été imagées à l'aide du Fluobeam™. A - D : Images représentatives des fèces 24 h après injection. Temps d'exposition : A, 300 ms ; C, 10 ms ; D et E, 100 ms. E : Intensité normalisée de fluorescence des fèces au cours du temps post-injection. Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM, n = 3 par groupe, * : p < 0,05 par rapport au jour correspondant du témoin.

Les fèces issues des souris injectées avec la forme libre de la cyanine 7 présentent une fluorescence très intense, qui reste supérieure à celle des fèces des souris « témoin » jusque 7 jours après injection (Figure 45 A, C). En revanche, l'excrétion de la cyanine 7 par les fèces semble n'être active que les trois et quatre premiers jours suivant l'injection de NPSi covalente ou non covalente, respectivement (Figure 45 A, C, D, E).

Les résultats de toxicité cellulaire et de visualisation du GAD ayant démontré la supériorité des NPSi encapsulant la Cy7 de façon covalente sur la Cy7 libre ou liée de façon non covalente à la matrice de silice, nous avons étudié la biodistribution des NPSi covalente au cours du temps par une mesure de la fluorescence des organes *ex vivo* (Figure 46). Ici aussi la comparaison de la fluorescence des organes entre eux n'est pas possible mais les variations d'intensité de fluorescence d'un même organe au cours du temps peuvent être examinées.

La fluorescence du point d'injection est maximale entre 5 min et 1 h post-injection puis diminue fortement jusque 3 mois. En parallèle, entre 1 h et 24 h, on note une augmentation de la fluorescence dans l'estomac (fluorescence doublée par rapport au témoin), les reins (fluorescence doublée par rapport au témoin) et le foie (fluorescence multipliée d'un facteur 10 par rapport au témoin) (Figure 46).

La fluorescence dans le foie diminue ensuite à 7 jours jusqu'à atteindre la valeur du témoin 3 mois après l'injection (Figure 46), indiquant la perte de fluorescence des NPSi ou leur excrétion. La présence de fluorescence dans les fèces dans les premiers jours suivant l'injection (Figure 45) permet d'affirmer que les NPSi sont excrétées par la voie fécale. En revanche, la fluorescence des NPSi n'a pas pu être retrouvée dans la vessie ou les urines, montrant l'absence d'élimination urinaire des NPSi. Dans les organes du SRE (foie, rate et poumons), la fluorescence des NPSi est repérée à différents temps post-injection, montrant l'intervention des macrophages dans l'élimination des NPSi. Trois mois après l'injection, la fluorescence n'est plus repérée qu'au point d'injection et dans le GAD.

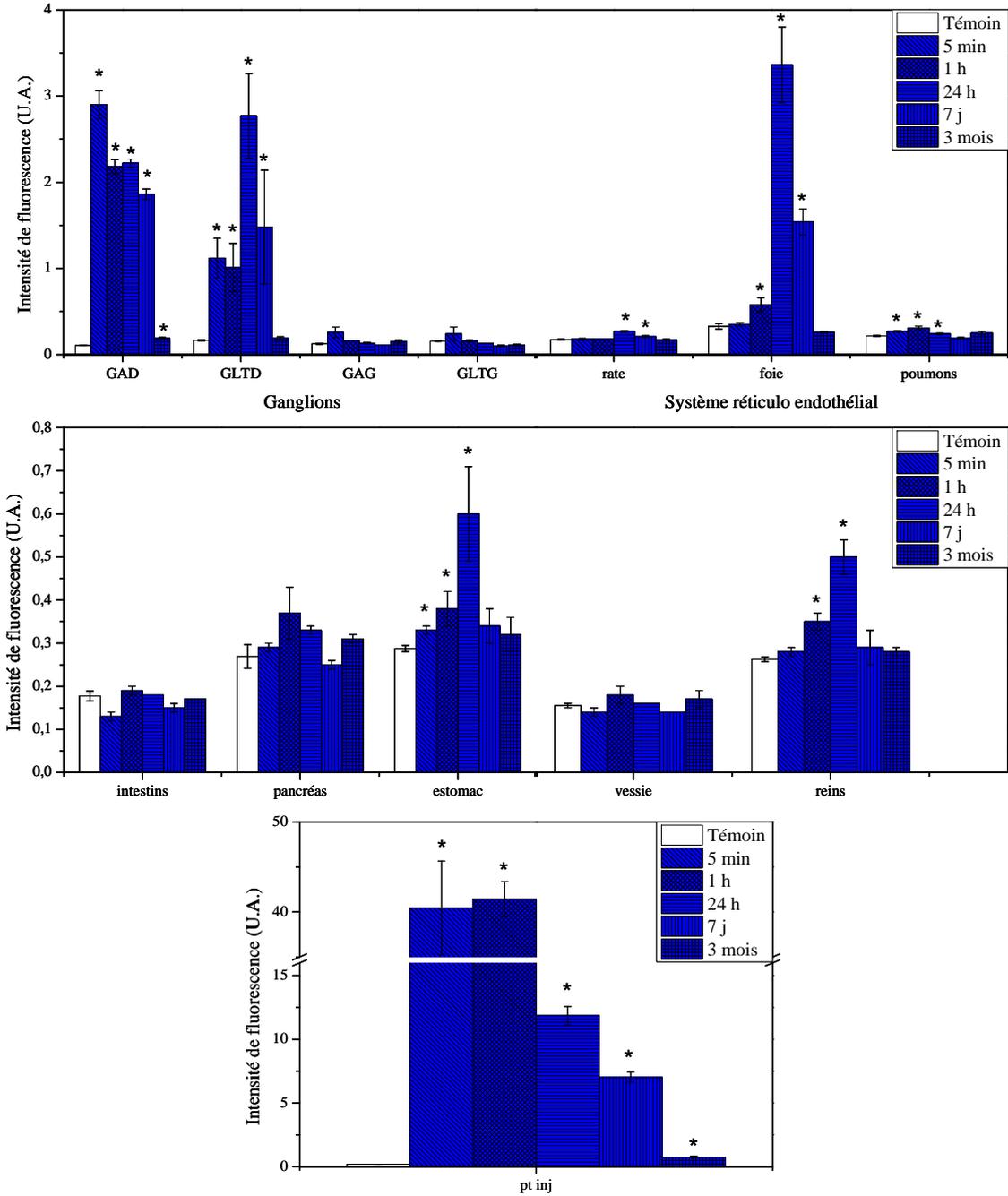


Figure 46 : Suivi au cours du temps de la fluorescence *ex vivo* des organes des souris injectées avec 300 pmol de NPSi dont la cyanine 7 est liée de façon covalente (lot F25-4)

Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM, n = 3 par groupe, * : p < 0,05 par rapport à l'organe témoin correspondant.

7. Détermination des propriétés optiques des tissus murins

L'absorption et la diffusion de la lumière dans les tissus sont responsables de l'atténuation du signal de fluorescence des organes. L'imagerie de fluorescence ne permet donc pas de mesurer, de façon quantitative, la quantité de NPSi dans les tissus. Afin de quantifier les phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière dans les tissus, les coefficients d'absorption (μ_a), de diffusion réduit (μ'_s) et d'anisotropie (g) des deux principaux organes de stockage repéré par l'étude de biodistribution par fluorescence, c'est-à-dire le foie et les reins, ont été déterminés à partir des mesures de transmission collimatée, de transmittance et de réflectance obtenues par spectrophotométrie.

Tableau 11 : Propriétés optiques du foie et des reins de souris

| | | μ_a (cm ⁻¹) | μ'_s (cm ⁻¹) | g | μ_{eff} (cm ⁻¹) |
|-------|--------------------|-----------------------------|------------------------------|-------|--|
| Foie | $\lambda = 740$ nm | 1,61 | 26,10 | 0,782 | 11,17 |
| | $\lambda = 840$ nm | 1,26 | 24,02 | 0,797 | 9,53 |
| Reins | $\lambda = 740$ nm | 1,21 | 14,78 | 0,814 | 7,28 |
| | $\lambda = 840$ nm | 0,84 | 12,42 | 0,828 | 5,58 |

Le Tableau 11 présente les coefficients d'absorption (μ_a), de diffusion réduit (μ'_s), d'anisotropie (g) et d'extinction effectif (μ_{eff}) du foie et des reins de souris saines à deux longueurs d'onde : 740 nm, qui est la longueur d'onde d'excitation des NPSi et 840 nm, qui est leur longueur d'onde d'émission de fluorescence. Le coefficient d'extinction effectif permet d'exprimer l'atténuation de la lumière totale due à l'absorption et à la diffusion de la lumière.

Comme prévu pour les longueurs du proche infrarouge, plus la longueur d'onde augmente (de 740 nm à 840 nm), moins la lumière est atténuée (diminution de μ_{eff}) et donc plus la lumière peut pénétrer en profondeur. La comparaison des coefficients d'extinction effectif μ_{eff} permet d'affirmer que la lumière d'excitation est plus atténuée dans le foie que dans les reins. En utilisant un laser proche infrarouge (740 nm), le volume de tissu irradié est plus important dans les reins que dans le foie. De même, la lumière émise par les nanoparticules présentes dans les organes (840 nm) est moins atténuée dans les reins que dans le foie. A des concentrations de NPSi équivalentes dans ces deux organes, les valeurs de fluorescence du foie devraient donc être plus faibles que celles des reins.

Or, d'après la Figure 44 C et E, 24 h après injection et quel que soit le type de nanoparticules, les valeurs d'intensité de fluorescence du foie sont supérieures à celles des reins. Nous pouvons donc conclure de ces résultats que la concentration de NPSi dans le foie est supérieure à celle dans les reins.

Les résultats précédents (cytotoxicité, suivi de fluorescence au cours du temps, biodistribution,...) nous ont permis de choisir les nanoparticules encapsulant la cyanine 7 de façon covalente comme étant le meilleur traceur parmi ceux testés. Afin de quantifier la présence des NPSi covalente, nous avons réalisé une extraction chimique sur les principaux organes de stockage.

8. Biodistribution des nanoparticules de silice covalente par extraction chimique

Après dissection, les principaux lieux de stockage des NPSi (point d'injection, foie, ganglions droits et fèces) ont subi une extraction chimique afin de doser leur contenu en cyanine 7 par spectrofluorimétrie. Les intensités de fluorescence des organes ont ensuite été comparées à celles d'une gamme étalon réalisée avec des concentrations croissantes de NPSi (Figure 47).

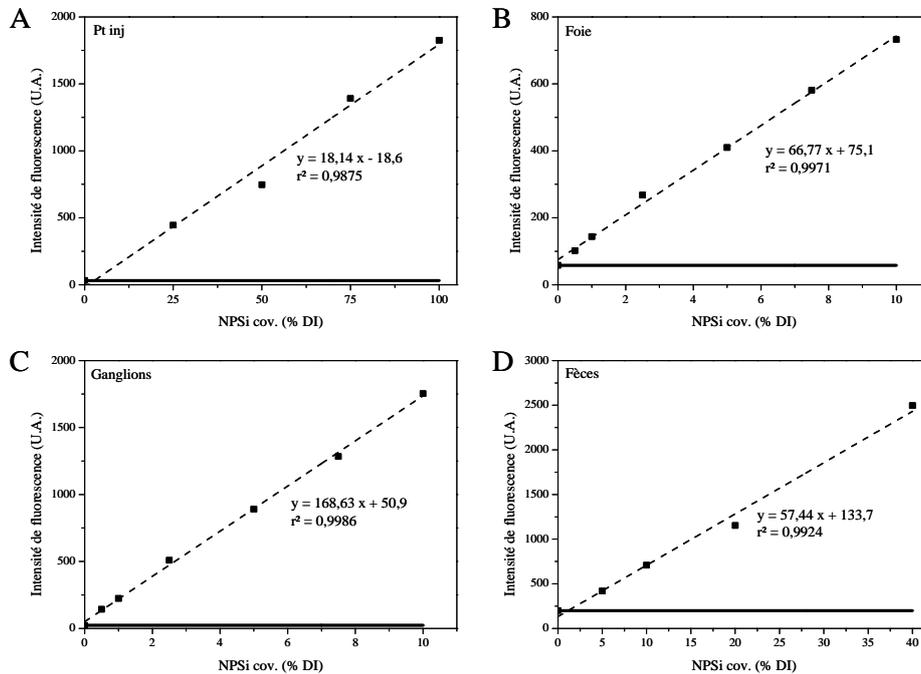


Figure 47 : Droites étalon représentant la fluorescence des organes après extraction en fonction de la concentration en NPSi cov.

Les organes (Point d'injection – A, Foie – B, Ganglion – C) et les fèces (D) ont été mis en contact avec des concentrations croissantes de NPSi covalente et ont subi le protocole d'extraction. La droite en trait plein correspond à l'autofluorescence de l'organe (non mis en contact avec les NPSi) et la droite en pointillé à la droite de régression linéaire, dont l'équation et le coefficient de détermination sont précisés à côté.

Aucune fluorescence n'a pu être détectée dans les organes des souris « Témoin » après extraction (Tableau 12). Suite à leur injection sc. dans la patte, le principal organe de rétention des NPSi est le point d'injection, avec des quantités de NPSi allant de $40,57 \pm 1,94$ % DI à 5 minutes après injection à $13,93 \pm 0,67$ % DI à 7 jours. La quantité de NPSi dans le point d'injection n'est plus détectable à 3 mois après injection (Tableau 12). Pour ces mesures, seule l'extrémité de l'avant bras des souris a subi l'extraction et on peut penser qu'en prenant l'intégralité du membre antérieur, qui contient de nombreux vaisseaux lymphatiques, le pourcentage de dose injectée serait proche de 100 % à 5 min après injection.

Bien que le GAD présente une fluorescence intense *in vivo* avec le Fluobeam™ 5 min après injection, son contenu moyen en NPSi n'est que de 0,67 % DI. Le contenu en NPSi dans le foie n'est détectable qu'à partir de 24 h, avec une valeur de $12,53 \pm 1,91$ % DI, puis diminue jusque 7 jours après injection où il atteint la valeur de $2,42 \pm 1,24$ % DI. Trois mois après injection, le contenu en NPSi dans le foie n'est plus détectable (Tableau 12).

La fluorescence des fèces n'est pas détectable avec la méthode d'extraction utilisée mais on peut émettre l'hypothèse que des doses inférieures à 5 % DI (limite de détection de cette méthode) ont été excrétées chaque jour, conduisant à l'élimination progressive des NPSi de l'organisme.

Tableau 12 : Quantité de cyanine 7 dans les organes après extraction chimique et dosage spectrofluorimétrique

| | | Pt inj | GAD | GLTD | Foie | | Fèces |
|--------------|--------|------------------|------|------|------------------|----------|-------|
| Témoin | | ND | ND | ND | ND | Témoin | ND |
| NPSi cov. | 5 min | $40,57 \pm 1,94$ | 0,67 | 0,18 | ND | (J1-J7) | ND |
| | 1 h | $50,71 \pm 6,20$ | 0,53 | 0,18 | ND | NPSi cov | |
| | 24 h | $13,78 \pm 1,22$ | 0,33 | 0,69 | $12,53 \pm 1,91$ | (J1-J7) | |
| | 7 j | $13,93 \pm 0,67$ | 0,81 | 0,28 | $2,42 \pm 1,24$ | | |
| | 3 mois | ND | ND | ND | ND | | |

ND, non détectable. Les résultats sont présentés en % DI, moyenne \pm ESM, n = 3 par organe.

La fluorescence d'un seul ganglion étant faible, l'extraction a été faite en regroupant 3 ganglions et les résultats donnés représentent la moyenne des 3 ganglions.

9. Toxicité *in vivo* des NPSi covalente

Le suivi de la masse corporelle des souris permet de prédire, en cas de perte ou de non prise de poids, une toxicité générale des produits testés sur l'animal. La masse corporelle des souris a été suivie pendant 3 mois après l'injection de 300 pmol de F25-4 et aucune différence de masse corporelle n'a pu être détectée ($p > 0,05$) (Figure 48 A), confirmant l'absence ou la faible toxicité générale des NPSi avec cyanine 7 liée de façon covalente.

Les principaux organes de rétention des NPSi sont le point d'injection, les ganglions du coté de l'injection et le foie. Le point d'injection et les ganglions étant retirés lors de la chirurgie, il ne reste dans l'organisme que le foie comme principal stock de NPSi.

Le foie étant un organe vital, il est important de vérifier l'absence d'hépatotoxicité des NPSi. Pour cela, plusieurs marqueurs de toxicité hépatiques ont été étudiés : la masse relative du foie a été calculée par le ratio de la masse de l'organe sur la masse corporelle de la souris suite au sacrifice des souris à différents temps après injection (Figure 48 B), des coupes histologiques de foie ont été lues à la recherche de changements morphologiques (Figure 48 C à F) et les enzymes hépatiques ont été dosées dans le sérum des souris afin de repérer d'éventuels dommages hépatiques (résultats non présentés).

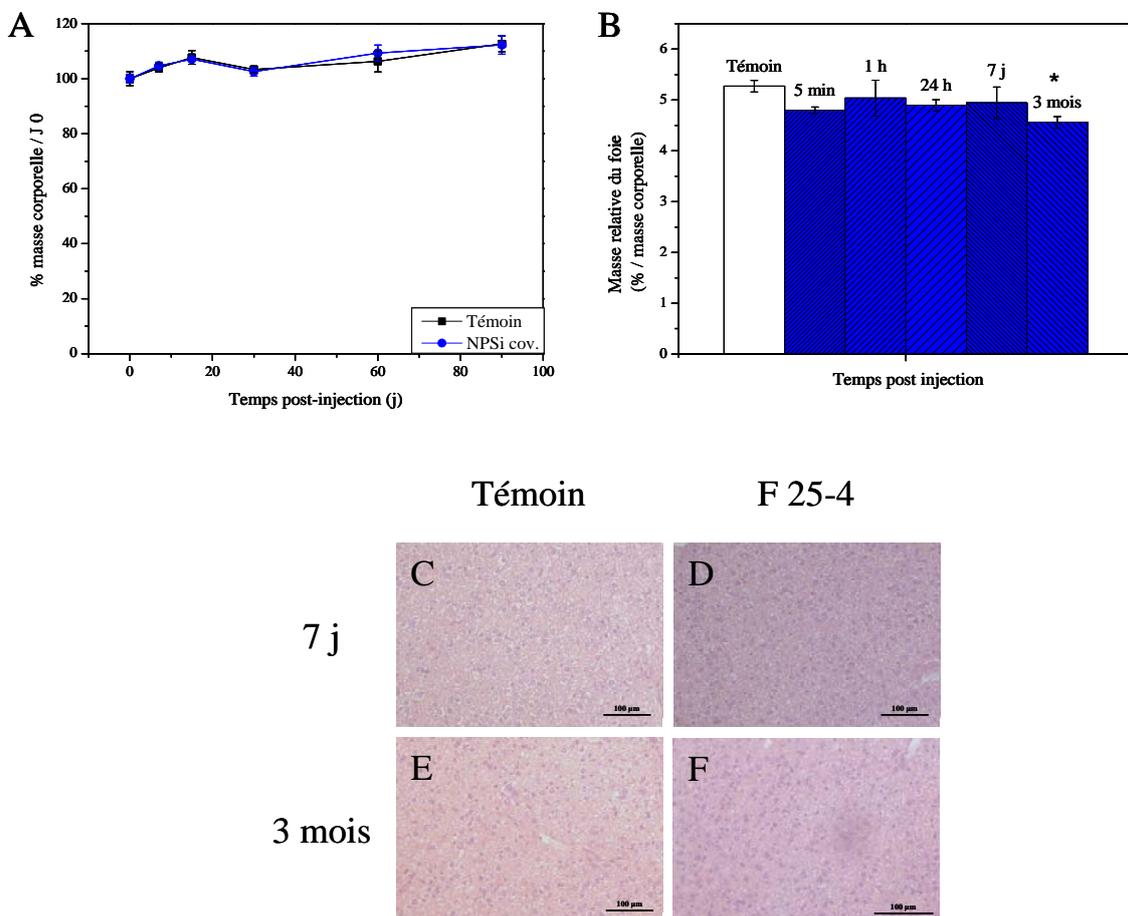


Figure 48 : Toxicité *in vivo* des nanoparticules de silice renfermant la cyanine 7 liée de façon covalente

Les souris ont été injectées en s.c. dans la patte antérieure droite avec 20 μ L de sérum physiologique (Témoin) ou 300 pmol de NPSi dont la cyanine 7 est liée de façon covalente à la matrice de silice (NPSi cov., bleu) et leur masse a été suivie jusque 3 mois après injection (A). Les souris ont été sacrifiées à différents temps après injection (5 min, 1 h, 24 h, 7 j et 3 mois) et le ratio de la masse du foie sur la masse corporelle de la souris a été calculé (B). Les résultats sont présentés en moyenne \pm ESM, n = 3 par groupe, * : p < 0,05 par rapport au témoin.

C - F : Images représentatives de coupes histologiques de foie par coloration HES, échelle 100 μ m. Les coupes histologiques de foie après 7 jours (C, D) ou 3 mois (E, F) de souris « témoin » (C, E) ont été comparées à celles de souris injectées avec les NPSi cov. (D, F).

Jusque 7 jours après injection de NPSi avec cyanine 7 liée de façon covalente, les souris ne montrent aucune différence statistique de la masse relative du foie (Figure 48 B, $p > 0,05$). Une légère diminution de la masse relative du foie est visible 3 mois après injection ($p = 0,0209$).

En revanche, aucune anomalie morphologique du tissu hépatique n'est repérable suite à la lecture des coupes histologiques entre les souris « témoin » et les souris injectées avec les NPSi cov. (Figure 48 C à F). La phosphatase alcaline a été dosée dans le sérum à 24 h, 7 jours et 3 mois post-injection et aucune différence significative n'est décelable entre les souris « témoin » et les souris ayant reçu une injection de NPSi cov. (résultats non présentés).

D'après les tests réalisés lors de cette étude, les NPSi renfermant la cyanine 7 de façon covalente ne semblent donc pas toxiques chez les souris.

D. Discussion

La visualisation du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge est une alternative intéressante aux traceurs actuels (colorant bleu et radiocolloïde). Malgré les bonnes caractéristiques photophysiques des molécules de la famille des cyanines, ces fluorophores organiques ne sont pas idéaux pour la cartographie du GS du fait de leur petite taille limitant leur rétention dans les ganglions lymphatiques ^[144,250-252]. Pour pallier ce problème, plusieurs stratégies peuvent être employées. Le mélange de l'ICG avec de l'albumine humaine avant injection permet d'augmenter le diamètre hydrodynamique de la particule à 7 nm ^[144]. Cependant la rétention dans le ganglion reste limitée à 30 minutes ^[144] et la stabilité photophysique de ce traceur n'est pas optimale puisqu'il subit une extinction importante de la fluorescence quand sa concentration augmente ^[250]. La méthode utilisée dans cette étude pour augmenter la taille du fluorophore (cyanine 7) est de l'encapsuler dans une NPSi. La cyanine 7 a été incorporée à la matrice de silice de deux manières différentes : par un piégeage physique (non covalente) ou par une liaison covalente.

Si la cyanine 7 est liée de façon non covalente à la silice, elle peut être libérée dans le milieu (Figure 37) et être toxique pour les cellules fibroblastiques (Figure 39). En revanche, en cas de liaison covalente de la cyanine 7 à la silice, la libération du fluorophore dans le milieu est inhibée, ce qui rend les NPSi totalement non toxiques jusqu'aux concentrations testées (Figure 39 et Figure 40). Dans les tests d'hémolyse, aucune toxicité des NPSi n'est enregistrée, que la cyanine 7 soit liée de façon covalente ou non (Figure 40 B), alors que les tests MTT des NPSi où la cyanine 7 est liée de façon non covalente montrent une toxicité similaire à celle de la cyanine 7 seule (Figure 39). Cette différence de toxicité entre les tests peut être liée au temps de contact entre les NPSi et les cellules. Dans le test MTT, les NPSi sont incubées avec les cellules pendant 24 h, durée suffisante pour une libération du fluorophore dans le milieu. En revanche, les NPSi ne sont mises en présence avec les GR que pendant 2 h pour le test d'hémolyse et il est possible que la libération de la cyanine 7 encapsulée à l'intérieur de la matrice de silice ne soit pas effective au bout de 2 h.

Il est intéressant de remarquer que les NPSi semblent avoir un effet protecteur sur la stabilité membranaire, puisque les taux d'hémolyse obtenus sont inférieurs à ceux établis avec le témoin négatif (Figure 40 B). Pourtant, les nanoparticules de silice sont connues pour provoquer l'hémolyse des GR en raison de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'interaction électrostatique des groupements silanols (Si-OH) présents à la surface des NPSi avec la membrane des GR ^[253,254].

La protection contre l'hémolyse pourrait être liée à la présence de groupements PEG à la surface des nanoparticules, qui réduisent l'hémolyse des GR par rapport aux nanoparticules non recouvertes de PEG ^[253,255]. Des expériences complémentaires ont en effet montré une diminution de l'hémolyse en présence de concentrations en PEG 400 allant jusqu'à 2,5 % (résultats non présentés). Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ce processus : le PEG peut améliorer la biocompatibilité des particules et, en s'adsorbant à la surface des GR, les rendre moins susceptibles aux cisaillements à l'origine de leur hémolyse ^[256].

Des études récentes ont également démontré une absence de cytotoxicité des NPSi par test MTT sur des fibroblastes de souris ^[257] ou sur des cellules souches mésenchymateuses ^[258]. Il semblerait donc que la silice ne soit pas toxique par elle-même et ce serait la cyanine qui, dans notre cas, est responsable d'une éventuelle toxicité.

Les caractéristiques spectrales de la cyanine 7 sont bien adaptées à l'imagerie de fluorescence *in vivo* puisqu'elle émet dans le proche infrarouge. Sa fluorescence peut donc être détectée dans le GAD directement à travers la peau avec un important rapport signal / bruit de fond (Figure 41). Pour les fluorophores émettant dans le visible, l'absorption des longueurs d'onde par les chromophores endogènes de la peau est un obstacle à la visualisation du GS et il est nécessaire de retirer la peau présente au-dessus du ganglion afin de le repérer puis de pratiquer son exérèse ^[153,233,259]. Avec des fluorophores du proche infrarouge comme la cyanine 7, la procédure de visualisation du GS est totalement non invasive.

La cyanine 7, qu'elle soit encapsulée dans une NPSi ou non, permet un repérage du GAD dès 5 minutes après injection (Figure 41). Cependant, la petite taille de la cyanine 7 seule est responsable de son extravasation et de sa migration dans les tissus environnants, conduisant à une mauvaise définition de l'emplacement du GAD. Le recours à des NPSi, dont la taille est plus grande que celle de la cyanine 7 seule, permet d'éviter ce problème. Les profils de migration des NPSi dans le GAD ont été établis à partir des images de fluorescence du flanc droit des souris *in vivo* et montrent des différences sensibles en fonction de la famille de NPSi (F21 vs. F25). Les deux paramètres majeurs qui influencent la migration des NPSi vers les ganglions lymphatiques sont la taille et la charge de surface des nanoparticules.

La taille des NPSi utilisées dans cette étude varie de 33 nm pour le lot F21-2 à 68 nm pour le lot F21-4 (Tableau 9) et de 32 nm pour le lot F25-3 à 45 nm pour le lot F25-4 (Tableau 10). Bien que ces valeurs soient assez variables, elles sont comprises dans l'intervalle [10 - 100 nm]. La taille des NPSi est donc compatible avec une bonne migration dans les ganglions, quel que soit le lot considéré ^[148].

Entre les deux familles de NPSi, le facteur « taille des nanoparticules » ne varie pas. En comparant les valeurs de potentiel zêta entre les lots de la famille F21 (Tableau 9) et les lots de la famille F25 (Tableau 10), il apparaît que les différences de charges de surface ne sont pas importantes. Les variations dans le profil de migration des NPSi dans le GAD entre ces deux familles ne peuvent donc être attribuées ni à leur taille, ni à leur chimie de surface. La principale différence entre les deux familles de NPSi repose sur leur méthode de synthèse.

Les NPSi de la famille F25, dont le cœur de silice a été stabilisé par le CEST, montrent un pic de fluorescence dans le GAD 5 min après injection, suivi d'une décroissance régulière jusque 24 h. En revanche, les NPSi de la famille F21 migrent dans le ganglion plus lentement, avec un pic de fluorescence 8 h après injection. Les NPSi de la famille F21 ont été synthétisées avec un surfactant portant des groupements -COOH, ce qui perturbe la formation des micelles de silice et rend les NPSi moins stables d'un point de vue colloïdal. A l'intérieur de l'organisme, ces NPSi ont alors tendance à perdre leur revêtement de surface en PEG, à s'agréger et à s'adsorber sur les protéines. Ces NPSi, qui sont toujours fluorescentes, ont une charge de surface moins négative et une taille plus grande, ce qui ralentit leur migration dans le GAD. Les NPSi de la famille F25, quant à elles, ont été synthétisées avec un surfactant « pur ». Elles sont donc plus stables et leur migration dans les lymphatiques est améliorée par rapport aux NPSi F21 non stables.

A l'intérieur d'une même famille de NPSi, les cinétiques de migration dans le GAD ne varient pas, ce qui est cohérent avec le fait que les potentiels zêta des NPSi ne sont pas très différents entre les lots (Tableau 9 et Tableau 10). Il semblerait que le nombre minimal de groupements CEST introduits durant la synthèse (0,05 % pour le lot F25-2) soit suffisant pour apporter des charges négatives et modifier la cinétique de migration dans le GAD par rapport au lot F21-1 ne possédant aucun groupement CEST. L'ajout de CEST en nombre plus important modifie légèrement leur potentiel zêta mais ne perturbe pas leur cinétique de migration dans le GAD. Les différences d'intensité de fluorescence observées entre les différents lots d'une même famille peuvent être attribuées à des variations de rendement quantique de fluorescence (Tableau 9 et Tableau 10).

L'étude de Rao, en 2009, a démontré une amélioration de la vitesse de migration dans les ganglions lymphatiques de nanoparticules d'acide poly(lactique-co-glycolique) avec l'augmentation de la densité des charges négatives de surface ^[260]. La capture des nanoparticules par les lymphatiques est améliorée avec l'augmentation des charges négatives grâce aux répulsions électrostatiques dues aux faibles charges négatives de la matrice interstitielle ^[260].

Dans notre étude, les charges de surface des NPSi ne sont pas aussi importantes (de -5 mV à -15 mV) que celles utilisées dans l'étude de Rao (de -36 mV à -57 mV) et les différences de potentiel zêta entre les lots d'une même famille ne sont pas très grandes, d'où une absence de variation de cinétique à l'intérieur d'une même famille de NPSi.

La biodistribution des NPSi cov. dans l'organisme suite à leur injection sc. dans la patte a été évaluée à l'aide des images de fluorescence des organes *ex vivo* à différents temps après injection. Seuls le point d'injection, les ganglions régionaux, le foie, les reins et les fèces des souris injectées présentent une intensité de fluorescence nettement supérieure à celle des organes des souris « témoin » (Figure 46). Cependant, la fluorescence, à cause des différences de propriétés optiques entre les organes, n'est pas une méthode de quantification absolue. Nous avons donc déterminé les coefficients d'absorption μ_a , de diffusion réduit μ'_s et d'anisotropie g des deux organes majeurs de stockage des NPSi, le foie et les reins, afin de comparer les valeurs d'intensité de fluorescence entre ces deux organes (Tableau 11). Il ressort de ces résultats que le foie est l'organe principal de rétention des NPSi, ce qui corrèle avec une excrétion fécale des nanoparticules (Figure 45).

Afin d'avoir une notion de la quantité de NPSi présentes dans les principaux organes fluorescents, ceux-ci ont subi une étape d'extraction chimique afin de doser leur contenu en fluorophore par spectrophotométrie et de comparer ces valeurs à celles obtenues avec une gamme étalon. La quantité de NPSi au point d'injection est maximale jusque 1 heure post-injection puis diminue progressivement, jusqu'à n'être plus détectable trois mois après injection. Dans le foie, la quantité de NPSi n'est détectable qu'à partir de 24 h et correspond à 12 % DI. Elle diminue ensuite au cours du temps et, après 3 mois, la fluorescence des NPSi dans le foie n'est plus décelable (Tableau 12). Dans les fèces, les quantités de NPSi ne sont pas assez importantes pour être détectées par notre méthode, bien que la présence des NPSi dans les fèces soit confirmée par leur fluorescence au FluobeamTM (Figure 45). L'excrétion fécale est également la voie d'élimination privilégiée des NPSi modifiées de façon organique (ORMOSIL)^[156] ou des NPSi de 80 nm renfermant de l'ICG^[164]. Du fait de leur taille (supérieure à 5,5 nm), les NPSi utilisées dans notre étude ne peuvent pas passer le filtre rénal et être éliminées par les urines^[149].

Etant donné que les NPSi sont présentes dans le foie jusque 7 jours post-injection, il est important de vérifier l'absence de toxicité sur cet organe vital. Pour cela, la masse relative du foie (Figure 48 B), la libération plasmatique de phosphatase alcaline (PAL) et les variations histologiques hépatiques (Figure 48 C et D) des souris injectées avec les NPSi ont été comparées aux celles des souris « témoin ».

D'après l'ensemble des résultats, les NPSi cov. ne modifient pas la fonction hépatique et ce, jusque 3 mois après l'injection. La fonction hépatique ne semble pas être altérée puisque les taux de PAL restent identiques à ceux des souris « témoin » et aucune anomalie histologique n'a pu être détectée. Les taux de nombreuses enzymes hépatiques (aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, PAL, lactate déshydrogénase, ...) se trouvent augmentés dans le sérum en cas de dommages hépatiques et sont classiquement mesurés pour évaluer la fonction hépatique. La PAL, enzyme la plus utilisée dans les tests de toxicité hépatique, est produite par les cellules bordant les canaux biliaires. En cas d'obstruction du système de drainage biliaire, la PAL est la première enzyme dont le taux augmente dans le sérum ^[261]. De précédentes études ont également démontré que les NPSi ne provoquent pas d'augmentation des taux de PAL, mais à forte dose (> 500 mg.kg⁻¹), les niveaux d'activités d'autres marqueurs (aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, bilirubine totale) se trouvent modifiés ^[262,263]. Il serait donc intéressant de vérifier que ces marqueurs ne sont pas modifiés au cours du temps après l'injection de NPSi. Les souris, suivies pendant 3 mois, ont été régulièrement observées et aucun changement dans la prise de poids (Figure 48 A), le comportement, l'alimentation ou l'activité des souris n'a pu être détecté, présageant l'absence de toxicité générale des NPSi.

De tels résultats ont également été retrouvés avec les ORMOSIL injectés en iv. ^[156] et les NPSi renfermant de la rhodamine injectées en intrapéritonéal ^[264]. Néanmoins, il est important de s'assurer de l'absence de toxicité générale des NPSi à plus long terme et de leur élimination complète de l'organisme. Enfin, dans un objectif clinique, il faudra vérifier la capacité des NPSi à migrer dans le GS lorsque celui-ci est envahi par des cellules métastatiques.

Pour conclure, les avantages de l'utilisation de fluorophores encapsulés dans des nanoparticules de silice sont multiples : augmenter la taille du traceur afin de favoriser sa rétention dans le GS, améliorer la stabilité du fluorophore en le protégeant contre les agents extérieurs responsables de l'extinction de sa fluorescence, diminuer la toxicité du fluorophore encapsulé et rendre la nanoparticule hydrophile éliminant ainsi le recours à des solvants nocifs. Les NPSi renfermant la cyanine 7 de façon covalente semblent donc être de bons candidats pour la cartographie du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge.

Chapitre IV : Discussion générale

La technique de biopsie du GS est actuellement la technique de référence pour le diagnostic des métastases ganglionnaires ^[61]. Elle consiste en l'injection à proximité de la tumeur de deux traceurs, un colorant bleu et un radiocolloïde. Ces traceurs migrent vers les ganglions lymphatiques en suivant la même voie que les cellules métastatiques. Dans le même temps opératoire que l'exérèse tumorale, les ganglions bleus et radioactifs sont extraits puis analysés afin de déterminer leur statut métastatique. Les GS étant les premiers ganglions de la chaîne lymphatique ^[42], leur statut permet de prédire l'envahissement du reste de l'organisme et d'orienter les traitements post-chirurgicaux (radiothérapie, chimiothérapie...) ^[28]. Cette technique est très performante mais les traceurs utilisés présentent de nombreux inconvénients. Le colorant, de part sa petite taille, migre rapidement hors des GS et colore les ganglions de second échelon et les tissus environnants ^[87]. De plus, il est à l'origine de réactions allergiques qui peuvent engager le pronostic vital des patients ^[77]. L'utilisation de la radioactivité engendre des dépenses non négligeables ^[93] et n'est pas toujours accessible dans les centres hospitaliers éloignés d'un service de médecine nucléaire.

L'imagerie de fluorescence est une alternative intéressante pour la cartographie des GS étant donné sa forte sensibilité, la facilité de son utilisation, la possibilité d'avoir des informations en temps réel, l'absence de radiations ionisantes et son coût limité ^[134]. Les fluorophores émettant dans le proche infrarouge (680 - 900 nm) sont les plus intéressants puisque la lumière d'émission n'est que faiblement absorbée par les chromophores endogènes, permettant la visualisation de structures en profondeur (jusque 1 cm) ^[136]. Dans cette fenêtre thérapeutique, la fluorescence des chromophores endogènes est également extrêmement faible, renforçant ainsi le rapport signal / bruit ^[138].

Du fait des caractéristiques du système lymphatique, les nanoparticules utilisées pour un repérage rapide du GS doivent avoir une taille comprise entre 10 et 100 nm ^[148]. Plusieurs types de nanoparticules ont été analysés dans le but d'optimiser la visualisation du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge. La plupart des études portent sur des nanoparticules encapsulant un fluorophore organique. Les fluorophores les plus employés sont les cyanines, qui présentent de bonnes caractéristiques photophysiques (fort rendement quantique de fluorescence, important coefficient d'extinction molaire,...) et dont l'émission peut être ajustée dans le domaine du proche infrarouge. Le vert d'indocyanine est aujourd'hui l'unique colorant autorisé par la FDA pour l'imagerie infrarouge, mais sa faible photostabilité et sa prédisposition à l'agrégation n'en font pas un marqueur idéal.

Les nanoparticules peuvent être composées d'éléments organiques : protéines ^[173], polysaccharides ^[175], lipides ^[174], polymères synthétiques ^[176], silice ^[265], ou bien être constituées d'éléments inorganiques tels que les métaux lourds (QDs) ^[266]. Dans ce derniers cas, l'émission de fluorescence est liée au confinement quantique des électrons dans la structure de la nanoparticule et ne nécessite pas la présence d'un fluorophore organique ^[180].

L'objectif poursuivi au cours de cette thèse était d'étudier les capacités de migration dans le GS de QDs et de NPSi renfermant de la cyanine 7 afin de remplacer les traceurs actuellement employés. Leur biodistribution dans l'organisme, leur voie d'excrétion ainsi que leur potentielle toxicité, qui sont des notions essentielles à connaître avant toute application clinique, ont également été évaluées.

Les précédents travaux du laboratoire ont permis de démontrer que les QDs possèdent de bonnes aptitudes pour la visualisation rapide des ganglions lymphatiques régionaux.

Les premiers QDs commerciaux utilisés par notre équipe émettaient dans le domaine du visible (655 nm) mais la détection du ganglion axillaire directement à travers la peau n'était pas possible à cause de l'absorption de la lumière par les tissus sus-jacents ^[236]. Pour corriger ce problème de visualisation de la fluorescence en profondeur, des QDs émettant dans le proche infrarouge ont été utilisés. Ces QDs, composés de CdTeSe/ZnS, ont pu être repérés *in vivo* à travers la peau à l'aide de l'imageur pour petit animal FluobeamTM. Cependant, les analyses histologiques ont révélé la présence de zones inflammatoires dans les ganglions, témoignant de la toxicité de ces QDs ^[237]. Afin de limiter leur toxicité, des QDs dépourvus de cadmium ont été synthétisés. Leur fluorescence dans le proche infrarouge permet la visualisation des ganglions régionaux à travers la peau des souris, tout en présentant une toxicité aigüe locale réduite par rapport aux QDs à base de cadmium ^[238].

Les QDs à base d'indium semblent donc être très prometteurs pour la visualisation du GS mais aucune étude n'a examiné la migration des traceurs fluorescents en cas de ganglion envahi par les cellules métastatiques, ni la toxicité de ces QDs dépourvus de cadmium.

La première partie de ce manuscrit a pour but de démontrer les capacités migratoires des QDs à base d'indium dans un modèle orthotopique syngénique de carcinome mammaire murin, où le ganglion axillaire est métastatique. Il a en effet été démontré que la présence de métastases dans les vaisseaux ou les ganglions lymphatiques est responsable d'un blocage de la migration des traceurs, ce qui peut affecter la visualisation correcte du GS ^[103].

Afin de se rapprocher au plus près de la situation clinique, des cellules de carcinome mammaire murin ont été injectées en sous-cutanée dans la mamelle antérieure de souris et après environ 21 jours le ganglion axillaire a été repéré à l'aide de la fluorescence des QDs. L'envahissement métastatique du ganglion a été évalué par la présence de la cytokératine 19 (CK 19) en immunohistochimie et biologie moléculaire (RT-qPCR). La CK 19, qui est spécifique des cellules épithéliales (dont font partie les cellules de carcinome mammaire), est absente des ganglions lymphatiques sains et c'est pour cette raison qu'elle est le marqueur le plus utilisé chez l'Homme ^[129]. Le modèle murin utilisé est assez proche des cas cliniques puisque la dissémination métastatique se fait par la voie lymphatique et que le pourcentage de ganglions envahis chez la souris (environ 36 %) est semblable à celui retrouvé dans la récente étude clinique de 287 cas de cancers du sein ^[267].

Le FluobeamTM a été utilisé afin de cartographier les GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge. Les mesures de fluorescence *in vivo* ont permis de repérer le GS, qu'il soit envahi ou non, chez toutes les souris. De plus, aucune différence d'intensité de fluorescence n'a pu être démontré entre les GS envahis ou non. Ces résultats permettent d'affirmer que la migration des QDs dans le système lymphatique n'est pas compromise lorsque les cellules métastatiques sont présentes et qu'elles ne bloquent pas le passage des QDs.

Les premiers QDs utilisés pour l'imagerie *in vivo* étaient composés de métaux lourds comme le cadmium ^[236,237,266], élément fortement toxique *in vitro* ^[187,197,268]. Récemment, une équipe a étudié le comportement *in vivo* de QDs à base de cadmium suite à leur injection iv. chez des macaques ^[269]. Les paramètres classiques de toxicité *in vivo* (masse et température corporelles, comportement, alimentation, marqueurs hématologiques et biochimiques...) sont identiques chez les animaux témoins et les animaux injectés avec les QDs, démontrant une toxicité minimale des QDs. Des taux importants de cadmium et de sélénium ont pourtant été détectés dans le foie, la rate et les reins après trois mois mais aucune anomalie morphologique (inflammation, fibrose, nécrose, ...) n'a été détectée dans ces organes ^[269]. Ces résultats prouvent l'importance de la couche organique recouvrant le cœur des QDs pour limiter de façon significative leur toxicité. Néanmoins, des études à long terme sont nécessaires afin de déterminer la stabilité de ces QDs *in vivo*, le devenir de ces métaux lourds dans l'organisme et leurs éventuels effets secondaires.

Notre stratégie permettant de limiter la toxicité des QDs a été d'utiliser des QDs à base d'indium. Les tests de toxicité *in vitro* ont démontré une plus faible toxicité des QDs-indium par rapport aux QDs-cadmium.

Les études toxicologiques de l'indium sur l'organisme sont peu nombreuses et plusieurs organismes tels que l'US Occupational Safety and Health Administration ou la Communauté Economique Européenne ne classent pas cet élément dans la catégorie des carcinogènes. Selon le National Toxicology Program, la consommation quotidienne d'indium représente environ 8 µg/jour/personne^[270]. Afin de déterminer la dose d'indium injectée si les QDs sont administrés à l'Homme, une estimation basée sur la profondeur du ganglion peut être faite. Alors que chez le porc, dont le GS est localisé à environ 1 cm de profondeur, la dose de 400 pmol de QDs a permis une visualisation correcte du GS^[271], chez l'Homme, une dose de 2,4 nmol pourrait être nécessaire pour la cartographie du GS situé à une profondeur de 3 à 6 cm. Les QDs utilisés dans notre étude contiennent une dose d'indium de 385 ng In.pmol⁻¹ QDs. Ainsi, chez l'Homme, la quantité d'indium injectée serait d'environ 900 µg. Il est important de noter ici que la source principale de QDs (point d'injection et ganglions régionaux) est retirée lors de la chirurgie, éliminant ainsi environ 83 % de la dose injectée et réduisant fortement la quantité de QDs restants dans l'organisme. En effet, si le point d'injection est retiré 1 heure après l'injection des QDs, la quantité d'indium qui perdure dans le corps est de 17 % de la dose injectée (soit 160 µg) d'après notre étude sur la souris. Cette quantité d'indium restante est plutôt faible puisqu'elle ne représente que 5 % de la consommation annuelle d'indium par personne (2920 µg).

Après dissémination des QDs dans l'organisme, ces derniers sont captés par les organes du SRE (foie et rate) puis excrétés partiellement de l'organisme. En raison de la taille des nanoparticules (> 5,5 nm), l'excrétion des QDs par la voie urinaire est proscrite^[149].

Des QDs intacts (car fluorescents) ont été retrouvés dans les fèces des souris injectées, indiquant une excrétion par la voie hépatobiliaire, avec des taux n'excédant pas 3 % de la dose injectée après 4 jours. La diminution de 50 % de la quantité d'indium dans le foie au bout de 3 mois par rapport au premier jour suggère que les QDs sont éliminés de l'organisme au cours du temps par la voie fécale, à des taux trop faibles pour pouvoir être décelés par nos instruments de mesure. En revanche, d'autres auteurs relatent une séquestration totale des QDs dans le foie et une absence d'excrétion pendant plusieurs semaines après une injection iv.^[154]. Des études complémentaires doivent être mises en place afin de déterminer les taux d'excrétions des QDs-indium sur le long terme.

Les NPSi renfermant un fluorophore organique émettant dans le proche infrarouge sont une solution alternative aux QDs pour la cartographie du GS puisqu'elles présentent une brillance intense et une faible toxicité. Nous avons démontré, dans la deuxième partie de cette thèse, les nombreux avantages de l'encapsulation d'un fluorophore organique dans une matrice de silice et notamment la forte diminution de la toxicité *in vitro*. La liaison covalente de la cyanine 7 à la matrice de silice permet d'éviter sa libération dans le milieu et de limiter sa toxicité. Les NPSi cov. ne provoquent en effet aucune cytotoxicité (test MTT) sur les fibroblastes sains aux concentrations testées (jusqu'à 8 $\mu\text{g Cy7.mL}^{-1}$). En revanche, la cyanine 7 seule et les NPSi non cov. dont la cyanine 7 est libérée au cours du temps de la matrice de silice présentent une certaine toxicité vis-à-vis des fibroblastes. De plus, les NPSi ne semblent pas déstabiliser les membranes cellulaires puisque l'hémolyse des globules rouges est annihilée en présence de NPSi grâce aux groupements PEG de surface. Conformément à de nombreuses études, les NPSi utilisées dans ce travail ne semblent donc pas toxiques *in vitro*. La silice amorphe est utilisée depuis de nombreuses années dans les médicaments, la nourriture et les cosmétiques, sans preuve d'effets secondaires nocifs sur l'Homme ^[211]. En outre, plusieurs études ont démontré l'absence de cytotoxicité des NPSi *in vitro* sur des fibroblastes murins ou des kératinocytes humains ^[257,258]. Les NPSi sont donc considérées comme étant inertes et sans danger ^[272] et leur toxicité n'est due qu'au fluorophore encapsulé, la cyanine 7. La toxicité *in vivo* de la cyanine 7 n'a pas été évaluée, mais les composés de la famille des cyanines ne semblent pas intrinsèquement nocifs. Récemment, suite à l'injection iv. d'une cyanine (IR-780) chez la souris, aucun indice de toxicité aiguë n'a été rencontré jusqu'à 100 nmol ^[273]. Dans cette étude de Zhang *et al.*, le GS a été visualisé chez des souris et des porcs suite à une injection intradermique de 0,5 et 10 nmol de cyanine, respectivement. Cependant, 3 h après l'injection, la fluorescence dans le ganglion diminue, ce qui réduit la durée possible entre l'injection du traceur et la biopsie du GS ^[273].

L'encapsulation de la cyanine 7 dans une NPSi permet d'obtenir des particules de taille adéquate pour leur migration dans les ganglions lymphatiques (entre 28 et 68 nm). Alors que la cyanine 7 seule n'est pas retenue dans le ganglion et peut marquer les tissus environnants, les NPSi permettent une bonne définition du ganglion lymphatique régional. La méthode de synthèse des NPSi est un facteur important permettant de contrôler leur stabilité colloïdale. En effet, si le surfactant utilisé lors de la synthèse porte des groupements carboxyliques, la formation des micelles de silice est perturbée et le revêtement de surface en PEG se désorganise. Les NPSi ont alors tendance à s'agréger, ce qui rend leur migration dans le GAD moins efficace.

La taille des nanoparticules est un facteur essentiel régissant leur biodistribution et leur excrétion. La voie d'excrétion la plus favorable est l'élimination rénale puisque la route hépatobiliaire est un processus lent et la rétention à long terme des particules dans les organes du SRE augmente la toxicité. L'excrétion par la voie urinaire n'étant possible que pour des NPSi de taille inférieure à 5,5 nm ^[149], les NPSi utilisées dans notre étude, de diamètre hydrodynamique compris entre 28 et 68 nm, ne peuvent être excrétées que par la voie hépatobiliaire. Cette hypothèse est confirmée puisque la fluorescence du foie et des fèces indique une élimination fécale dans les premiers jours suivant l'injection. Sur le long terme, la fluorescence du foie diminue jusqu'à n'être plus détectable avec nos instruments de mesure à 3 mois après injection, indiquant la perte de fluorescence des NPSi ou leur excrétion.

Bien que le foie soit l'organe majeur de stockage, les NPSi ne semblent pas être toxiques pour cet organe puisque sa masse relative, son histologie et son intégrité (par l'absence de libération d'enzymes hépatiques dans le sérum) ne sont pas modifiées. De plus, les souris ne montrent pas de différences de comportement et de masse corporelle, présageant d'une absence de toxicité générale. Des analyses complémentaires doivent cependant être menées afin de valider l'absence de toxicité et de confirmer la diminution de la quantité de NPSi dans le foie permettant ainsi de justifier leur élimination de l'organisme.

Les nanoparticules de silice modifiées de manière organique (ORMOSIL) d'environ 20 nm montrent également une excrétion par la voie hépatobiliaire, avec une diminution de la fluorescence du foie à partir de 24 h ^[156]. La dégradation des NPSi dans l'organisme provoque la libération du fluorophore libre et son accumulation préférentielle dans la peau. Les analyses histologiques des organes majeurs (foie, rate, reins, poumons) ne présentent aucun changement pathologique ^[156].

Afin de s'assurer des capacités migratoires des NPSi dans le GS en cas d'envahissement tumoral, la cartographie du GS doit être effectuée dans un modèle orthotopique murin de carcinome mammaire présentant une dissémination lymphatique, de la même façon qu'avec les QDs.

Chapitre V : Conclusions et perspectives

Pour conclure, les nanoparticules fluorescentes utilisées dans ces deux études, Quantum Dots et NPSi renfermant de façon covalente la cyanine 7, présentent des caractéristiques idéales pour la cartographie du GS par imagerie de fluorescence infrarouge.

Nous avons démontré que les QDs peuvent migrer dans le GS, même en cas d'invasion métastatique. Les propriétés photophysiques des QDs les rendant très brillants, le GS est facilement détectable suite à l'injection sous-cutanée d'une faible dose de QDs. La majorité des nanoparticules étant localisée au point d'injection ou dans les ganglions régionaux, la quantité de QDs restants dans l'organisme après résection tumorale et biopsie du GS est faible. Du fait de leur taille, les QDs sont capturés par le SRE et sont en partie éliminés par la voie hépatobiliaire *via* les fèces. De plus, les QDs à base d'indium présentent une toxicité *in vitro* et *in vivo* réduite par rapport aux QDs-cadmium.

La cyanine 7 est un fluorophore proche infrarouge hydrophobe et de petite taille. Notre étude a confirmé que son encapsulation dans une matrice de silice permet d'obtenir un traceur ayant des caractéristiques optimales d'hydrophilicité, de biocompatibilité et de taille pour sa migration dans le GS. Grâce à la liaison covalente de la cyanine 7 à la silice, la libération du fluorophore est supprimée, ce qui limite fortement la toxicité des NPSi *in vitro* et *in vivo*. Les NPSi présentent une biodistribution semblable à celle des QDs, avec une prépondérance au point d'injection, dans les ganglions lymphatiques et le foie ainsi qu'une excrétion fécale dans les premiers jours suivant l'injection.

Les QDs et les NPSi sont des candidats très prometteurs pour la cartographie du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge puisque leur utilisation est plus simple, plus rapide et plus fiable que les techniques actuelles. Les résultats de futurs tests de toxicité permettront de les départager.

Perspectives

Les perspectives majeures de ce travail sont (i) l'encapsulation de QDs à base d'indium dans une nanoparticule de silice afin de combiner les avantages photophysiques des QDs à la faible toxicité de la silice, (ii) le ciblage des nanoparticules afin d'améliorer leur capture par le GS, (iii) le couplage des nanoparticules fluorescentes avec d'autres modalités d'imagerie afin d'associer les bénéfices de chaque méthode ou (iv) avec un agent thérapeutique pour rassembler, en une seule nanoparticule, le diagnostic et le traitement des métastases ganglionnaires.

L'évolution vers des QDs englobés dans de la silice est une possibilité intéressante afin de minimiser encore plus leur toxicité. De telles constructions sont déjà à l'étude et confirment de bonnes capacités migratoires dans le GS de QDs PbS recouverts d'une couche de silice-PEG et une absence de toxicité chez la souris ^[274].

Afin de limiter leur passage dans les ganglions de second échelon et d'accélérer leur migration dans les GS, les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées avec CXCR4, récepteur membranaire dont le ligand SDF-1 est fortement exprimé par les cellules des ganglions lymphatiques. Des nanoparticules d'albumine ont ainsi été greffées avec un ligand de CXCR4 et ont démontré une meilleure accumulation dans les ganglions régionaux que les nanoparticules non greffées ^[275]. La capture des traceurs par les GS étant ainsi améliorée, on peut imaginer pouvoir réduire la dose de nanoparticules injectées et donc réduire la toxicité.

La complémentarité de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui permet d'imager le corps entier, avec l'imagerie de fluorescence, qui possède une forte résolution spatiale, augure d'un avenir très prometteur. La multimodalité permettrait, dans un premier temps, de localiser par IRM un ganglion lymphatique en profondeur (dans le cas des cancers de la cavité abdominale, par exemple) puis, pendant la chirurgie, d'affiner son emplacement à l'aide de la fluorescence. Récemment, des QDs à base de silicium ont été dopés avec du manganèse afin d'être détectable par IRM et par imagerie de fluorescence ^[276]. Ces nanoparticules non toxiques n'ont cependant jamais été testées *in vivo* dans la détection du GS.

L'encapsulation dans une même nanoparticule d'un agent de diagnostic, tel qu'une nanoparticule fluorescente, et d'un agent de thérapie, comme une molécule de chimiothérapie confère à la nanoparticule le statut de « théranostique ». Ainsi, dans un liposome contenant des QDs, ont été inclus du docetaxel ^[277] ou de la doxorubicine ^[278], ce qui a permis de visualiser des cellules en culture et de délivrer, dans le même temps, la substance anticancéreuse. A ce jour, aucune nanoparticule théranostique n'a été expérimentée pour la cartographie du GS et l'éradication des cellules métastatiques.

Références bibliographiques

- [1] **INCa**, La situation du cancer en France en 2011. *Collection Rapports & synthèses*. 2011.
- [2] **Belot A., Grosclaude P. et al.**, Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2008, 56 (3): 159-175.
- [3] **Lastier D., Salines E. et al.**, Programme de dépistage du cancer du sein en France : résultats 2007-2008, évolutions depuis 2004. *InVS*. 2011.
- [4] **Slamon D. J., Godolphin W. et al.**, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989, 244 (4905): 707-712.
- [5] **Slamon D. J., Leyland-Jones B. et al.**, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001, 344 (11): 783-792.
- [6] **Nahta R., Esteva F. J.**, Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett*. 2006, 232 (2): 123-138.
- [7] **Ladjemi M. Z., Jacot W. et al.**, Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2010, 59 (9): 1295-1312.
- [8] **Ladjemi M. Z., Chardes T. et al.**, Vaccination with human anti-trastuzumab anti-idiotypic scFv reverses HER2 immunological tolerance and induces tumor immunity in MMTV.f.huHER2(Fo5) mice. *Breast Cancer Res*. 2011, 13 (1): R17.
- [9] **Allen N. E., Beral V. et al.**, Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *J Natl Cancer Inst*. 2009, 101 (5): 296-305.
- [10] **Merviel P., Jouvance O. et al.**, [Do there still exist risk factors for breast cancer?]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2011, 39 (9): 486-490.
- [11] **Weiss L. K., Burkman R. T. et al.**, Hormone replacement therapy regimens and breast cancer risk(1). *Obstet Gynecol*. 2002, 100 (6): 1148-1158.
- [12] **Yoney A., Kucuk A. et al.**, Male breast cancer: a retrospective analysis. *Cancer Radiother*. 2009, 13 (2): 103-107.
- [13] **Ford D., Easton D. F. et al.**, Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1998, 62 (3): 676-689.
- [14] <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/cancer-du-sein/le-sein> Visité le 07/02/2012.
- [15] **Scarff R. W., World Health O.**, Histological typing of breast tumours. *World Health Organization*. 1981.
- [16] **Tavassoli F. A., Devilee P. et al.**, Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. *IARC Press*. 2003.
- [17] <http://www.medespace.com/cancero/doc/sein.html>. Visité le 11/02/2012.
- [18] <http://www.cancerstaging.org/staging/index.html>. Visité le 07/02/2012.
- [19] **Singletary S. E., Allred C. et al.**, Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002, 20 (17): 3628-3636.
- [20] **Hultborn K. A., Larsson L. G. et al.**, The lymph drainage from the breast to the axillary and parasternal lymph nodes, studied with the aid of colloidal Au198. *Acta radiol*. 1955, 43 (1): 52-64.
- [21] **Olivier J. B., Verhaeghe J. L. et al.**, [Functional anatomy of the lymphatic drainage of the breast: contribution of sentinel lymph node biopsy]. *Ann Chir*. 2006, 131 (10): 608-615.
- [22] **Swartz M. H.**, Textbook of physical diagnosis: history and examination. *Elsevier Health Sciences*. 1998. Philadelphia.
- [23] **Cabarrot E.**, Histoire naturelle des cancers du sein. *Encycl Med Chir Gynécologie*. 2000.
- [24] **Sherwood L., Lockhart A. et al.**, Physiologie humaine. *De Boeck*. 2006.
- [25] **von der Weid P. Y., Zawieja D. C.**, Lymphatic smooth muscle: the motor unit of lymph drainage. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004, 36 (7): 1147-1153.
- [26] **Witte M. H., Witte C. L.**, Physiology 301 (clinical correlation lectures): lymph formation greater than lymph absorption: the formula of edema. A second experiment in the teaching of lymphology to medical students. *Lymphology*. 1973, 6 (2): 101-109.
- [27] **Rovenska E., Rovensky J.**, Lymphatic vessels: structure and function. *Isr Med Assoc J*. 2011, 13 (12): 762-768.
- [28] **Keshtgar M. R., Ell P. J.**, Sentinel lymph node detection and imaging. *Eur J Nucl Med*. 1999, 26 (1): 57-67.

- [29] **Leak L. V., Burke J. F.**, Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am J Anat.* 1966, 118 (3): 785-809.
- [30] **Alitalo K., Tammela T. et al.**, Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 2005, 438 (7070): 946-953.
- [31] **Uren R. F., Howman-Giles R. et al.**, Patterns of lymphatic drainage from the skin in patients with melanoma. *J Nucl Med.* 2003, 44 (4): 570-582.
- [32] **Olszewski W. L., Engeset A.**, Intrinsic contractility of prenodal lymph vessels and lymph flow in human leg. *Am J Physiol.* 1980, 239 (6): H775-783.
- [33] **Shayan R., Achen M. G. et al.**, Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis.* 2006, 27 (9): 1729-1738.
- [34] **He Y., Rajantie I. et al.**, Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.* 2005, 65 (11): 4739-4746.
- [35] <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/lymphatic/components/nodes.html>. Visité le 06/03/2012.
- [36] **Gref R., Minamitake Y. et al.**, Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science.* 1994, 263 (5153): 1600-1603.
- [37] **Frank M. M., Fries L. F.**, The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today.* 1991, 12 (9): 322-326.
- [38] **Owens D. E., 3rd, Peppas N. A.**, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006, 307 (1): 93-102.
- [39] **Peracchia M. T., Fattal E. et al.**, Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release.* 1999, 60 (1): 121-128.
- [40] **Gould E. A., Winship T. et al.**, Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer.* 1960, 13: 77-78.
- [41] **Cabanas R. M.**, An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer.* 1977, 39 (2): 456-466.
- [42] **Morton D. L., Wen D. R. et al.**, Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992, 127 (4): 392-399.
- [43] **Krag D. N., Weaver D. L. et al.**, Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol.* 1993, 2 (6): 335-340.
- [44] **Giuliano A. E., Kirgan D. M. et al.**, Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg.* 1994, 220 (3): 391-401.
- [45] **Uren R. F.**, Cancer surgery joins the dots. *Nat Biotechnol.* 2004, 22 (1): 38-39.
- [46] **Nathanson S. D.**, Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer.* 2003, 98 (2): 413-423.
- [47] **Weiss L.**, The pathobiology of metastasis within the lymphatic system. *Surg Oncol Clin N Am.* 1996, 5 (1): 15-24.
- [48] **Fisher B., Fisher E. R.**, The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. *Surg Gynecol Obstet.* 1966, 122 (4): 791-798.
- [49] **Adams R. H., Alitalo K.**, Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8 (6): 464-478.
- [50] **Cady B.**, Use of primary breast carcinoma characteristics to predict lymph node metastases. *Cancer.* 1997, 79 (10): 1856-1864.
- [51] **Cutuli B., Velten M. et al.**, Assessment of axillary lymph node involvement in small breast cancer: analysis of 893 cases. *Clin Breast Cancer.* 2001, 2 (1): 59-66.
- [52] **Classe J. M., Baffert S. et al.**, Cost comparison of axillary sentinel lymph node detection and axillary lymphadenectomy in early breast cancer. A national study based on a prospective multi-institutional series of 985 patients 'on behalf of the Group of Surgeons from the French Unicancer Federation'. *Ann Oncol.* 2012, 23 (5): 1170-1177.
- [53] **Knauer M., Konstantiniuk P. et al.**, Multicentric breast cancer: a new indication for sentinel node biopsy--a multi-institutional validation study. *J Clin Oncol.* 2006, 24 (21): 3374-3380.
- [54] **Veronesi U., Galimberti V. et al.**, Sentinel node biopsy in breast cancer: early results in 953 patients with negative sentinel node biopsy and no axillary dissection. *Eur J Cancer.* 2005, 41 (2): 231-237.

- [55] **Groetelaers R. P., van Berlo C. L. et al.**, Axillary recurrences after negative sentinel lymph node biopsy under local anaesthesia for breast cancer: a follow-up study after 5 years. *Eur J Surg Oncol.* 2009, 35 (2): 159-163.
- [56] **Defechereux T., Maweja S. et al.**, [Recent advances in breast cancer surgery: the sentinel-node biopsy technique]. *Rev Med Liege.* 2007, 62 (5-6): 410-413.
- [57] **Bevilacqua J. L., Kattan M. W. et al.**, Doctor, what are my chances of having a positive sentinel node? A validated nomogram for risk estimation. *J Clin Oncol.* 2007, 25 (24): 3670-3679.
- [58] http://kce.fgov.be/sites/default/files/page_documents/kce_143b_recommandations_cancer_du_sein_0.pdf. Visité le 19/03/2012.
- [59] **Lyman G. H.**, Guidelines of the National Comprehensive Cancer Network on the use of myeloid growth factors with cancer chemotherapy: a review of the evidence. *J Natl Compr Canc Netw.* 2005, 3 (4): 557-571.
- [60] **Rovera F., Frattini F. et al.**, Axillary sentinel lymph node biopsy: an overview. *Int J Surg.* 2008, 6 Suppl 1: S109-112.
- [61] **HAS, INCa**, Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique, Cancer du sein. 2010.
- [62] **Fisher B., Ravdin R. G. et al.**, Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast: results of a decade of cooperative investigation. *Ann Surg.* 1968, 168 (3): 337-356.
- [63] **Bonadonna G., Valagussa P. et al.**, Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med.* 1995, 332 (14): 901-906.
- [64] **Chaleur C., Vulliez L. et al.**, [Risk factors for tumor recurrence after breast conserving therapy: about 254 cases]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2008, 37 (2): 170-178.
- [65] **Carter C. L., Allen C. et al.**, Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989, 63 (1): 181-187.
- [66] **McMasters K. M., Tuttle T. M. et al.**, Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used. *J Clin Oncol.* 2000, 18 (13): 2560-2566.
- [67] **Dees E. C., Shulman L. N. et al.**, Does information from axillary dissection change treatment in clinically node-negative patients with breast cancer? An algorithm for assessment of impact of axillary dissection. *Ann Surg.* 1997, 226 (3): 279-287.
- [68] **Bezu C., Coutant C. et al.**, Anaphylactic response to blue dye during sentinel lymph node biopsy. *Surg Oncol.* 2011, 20 (1): e55-59.
- [69] **Eldrageely K., Vargas M. P. et al.**, Sentinel lymph node mapping of breast cancer: a case-control study of methylene blue tracer compared to isosulfan blue. *Am Surg.* 2004, 70 (10): 872-875.
- [70] **Thevarajah S., Huston T. L. et al.**, A comparison of the adverse reactions associated with isosulfan blue versus methylene blue dye in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Am J Surg.* 2005, 189 (2): 236-239.
- [71] **Tellier F., Ravelo R. et al.**, Sentinel lymph node detection by an optical method using scattered photons. *Biomed Opt Express.* 2010, 1 (3): 902-910.
- [72] **Hindie E., Groheux D. et al.**, [Sentinel node biopsy in breast cancer]. *Bull Cancer.* 2009, 96 (6): 713-725.
- [73] **Masannat Y., Shenoy H. et al.**, Properties and characteristics of the dyes injected to assist axillary sentinel node localization in breast surgery. *Eur J Surg Oncol.* 2006, 32 (4): 381-384.
- [74] **Kopp W. L.**, Anaphylaxis from alphazurine 2G during lymphography. *Jama.* 1966, 198 (6): 668-669.
- [75] **Beenen E., de Roy van Zuidewijn D. B.**, Patients blue on patent blue: an adverse reaction during four sentinel node procedures. *Surg Oncol.* 2005, 14 (4): 151-154.
- [76] **Barthelmes L., Goyal A. et al.**, Adverse reactions to patent blue V dye - The NEW START and ALMANAC experience. *Eur J Surg Oncol.* 2010, 36 (4): 399-403.
- [77] **Cady B.**, Consensus on sentinel node biopsy. *Breast J.* 2002, 8 (3): 123-125.
- [78] **Kalimo K., Jansen C. T. et al.**, Sensitivity to Patent Blue dye during skin-prick testing and lymphography. A retrospective and prospective study. *Radiology.* 1981, 141 (2): 365-367.

- [79] **Heinle E., Burdumy T. et al.**, Factitious oxygen desaturation after isosulfan blue injection. *Am Surg.* 2003, 69 (10): 899-901.
- [80] **Sadiq T. S., Burns W. W., 3rd et al.**, Blue urticaria: a previously unreported adverse event associated with isosulfan blue. *Arch Surg.* 2001, 136 (12): 1433-1435.
- [81] **Yusim Y., Livingstone D. et al.**, Blue dyes, blue people: the systemic effects of blue dyes when administered via different routes. *J Clin Anesth.* 2007, 19 (4): 315-321.
- [82] **Govaert G. A., Oostenbroek R. J. et al.**, Prolonged skin staining after intradermal use of patent blue in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2005, 31 (4): 373-375.
- [83] **Krag D., Weaver D. et al.**, The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *N Engl J Med.* 1998, 339 (14): 941-946.
- [84] **Higashi H., Natsugoe S. et al.**, Particle size of tin and phytate colloid in sentinel node identification. *J Surg Res.* 2004, 121 (1): 1-4.
- [85] **Lens M.**, Sentinel lymph node biopsy in melanoma patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010, 24 (9): 1005-1012.
- [86] **Chen S. L., Iddings D. M. et al.**, Lymphatic mapping and sentinel node analysis: current concepts and applications. *CA Cancer J Clin.* 2006, 56 (5): 292-309; quiz 316-297.
- [87] **Tuttle T. M., Zogakis T. G. et al.**, A review of technical aspects of sentinel lymph node identification for breast cancer. *J Am Coll Surg.* 2002, 195 (2): 261-268.
- [88] **Uren R. F., Howman-Giles R. B. et al.**, Role of lymphoscintigraphy for selective sentinel lymphadenectomy. *Cancer Treat Res.* 2005, 127: 15-38.
- [89] **McMasters K. M., Wong S. L. et al.**, Preoperative lymphoscintigraphy for breast cancer does not improve the ability to identify axillary sentinel lymph nodes. *Ann Surg.* 2000, 231 (5): 724-731.
- [90] **Dupont E., Cox C. E. et al.**, Utility of internal mammary lymph node removal when noted by intraoperative gamma probe detection. *Ann Surg Oncol.* 2001, 8 (10): 833-836.
- [91] **Cox C. E., Pendas S. et al.**, Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. *Ann Surg.* 1998, 227 (5): 645-653.
- [92] **Nejc D., Wrzesien M. et al.**, Sentinel node biopsy in patients with breast cancer--evaluation of exposure to radiation of medical staff. *Eur J Surg Oncol.* 2006, 32 (2): 133-138.
- [93] **Classe J. M.**, Evaluation médico-économique de la technique du ganglion sentinelle comparée au curage ganglionnaire dans les cancers du sein opérables d'emblée, *INCa*, 2008.
- [94] **Albertini J. J., Lyman G. H. et al.**, Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *Jama.* 1996, 276 (22): 1818-1822.
- [95] **Hung W. K., Chan C. M. et al.**, Randomized clinical trial comparing blue dye with combined dye and isotope for sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Br J Surg.* 2005, 92 (12): 1494-1497.
- [96] **ANAES**, La technique du ganglion sentinelle dans le cancer du sein - Rapport d'étape, 2002.
- [97] **Namer M., Gligorov J. et al.**, Recommandation pour la pratique clinique St-Paul-de-Vence « Cancers du sein », *Saint-Paul-de-Vence*, 2005.
- [98] **Bass S. S., Cox C. E. et al.**, The effects of postinjection massage on the sensitivity of lymphatic mapping in breast cancer. *J Am Coll Surg.* 2001, 192 (1): 9-16.
- [99] **Uren R. F., Howman-Giles R. et al.**, Lymphatic mapping of the breast: locating the sentinel lymph nodes. *World J Surg.* 2001, 25 (6): 789-793.
- [100] **Birdwell R. L., Smith K. L. et al.**, Breast cancer: variables affecting sentinel lymph node visualization at preoperative lymphoscintigraphy. *Radiology.* 2001, 220 (1): 47-53.
- [101] **Derossis A. M., Fey J. V. et al.**, Obesity influences outcome of sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Am Coll Surg.* 2003, 197 (6): 896-901.
- [102] **Goyal A., Newcombe R. G. et al.**, Factors affecting failed localisation and false-negative rates of sentinel node biopsy in breast cancer--results of the ALMANAC validation phase. *Breast Cancer Res Treat.* 2006, 99 (2): 203-208.
- [103] **Goyal A., Douglas-Jones A. G. et al.**, Effect of lymphatic tumor burden on sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Breast J.* 2005, 11 (3): 188-194.

- [104] **Brenot-Rossi I., Houvenaeghel G. et al.**, Nonvisualization of axillary sentinel node during lymphoscintigraphy: is there a pathologic significance in breast cancer? *J Nucl Med.* 2003, 44 (8): 1232-1237.
- [105] **Leijte J. A., van der Ploeg I. M. et al.**, Visualization of tumor blockage and rerouting of lymphatic drainage in penile cancer patients by use of SPECT/CT. *J Nucl Med.* 2009, 50 (3): 364-367.
- [106] **Lam T. K., Uren R. F. et al.**, False-negative sentinel node biopsy because of obstruction of lymphatics by metastatic melanoma: the value of ultrasound in conjunction with preoperative lymphoscintigraphy. *Melanoma Res.* 2009, 19 (2): 94-99.
- [107] **Estourgie S. H., Nieweg O. E. et al.**, Eight false negative sentinel node procedures in breast cancer: what went wrong? *Eur J Surg Oncol.* 2003, 29 (4): 336-340.
- [108] **Krag D. N., Ashikaga T. et al.**, Development of Sentinel Node Targeting Technique in Breast Cancer Patients. *The Breast Journal.* 1998, 4 (2): 67-74.
- [109] **Tafra L., Lannin D. R. et al.**, Multicenter trial of sentinel node biopsy for breast cancer using both technetium sulfur colloid and isosulfan blue dye. *Ann Surg.* 2001, 233 (1): 51-59.
- [110] **Tanis P. J., Nieweg O. E. et al.**, Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *J Am Coll Surg.* 2001, 192 (3): 399-409.
- [111] **Borgstein P. J., Meijer S. et al.**, Intradermal blue dye to identify sentinel lymph-node in breast cancer. *Lancet.* 1997, 349 (9066): 1668-1669.
- [112] **McMasters K. M., Wong S. L. et al.**, Dermal injection of radioactive colloid is superior to peritumoral injection for breast cancer sentinel lymph node biopsy: results of a multiinstitutional study. *Ann Surg.* 2001, 233 (5): 676-687.
- [113] **Klimberg V. S., Rubio I. T. et al.**, Subareolar versus peritumoral injection for location of the sentinel lymph node. *Ann Surg.* 1999, 229 (6): 860-865.
- [114] **Rodier J. F., Velten M. et al.**, Prospective multicentric randomized study comparing periareolar and peritumoral injection of radiotracer and blue dye for the detection of sentinel lymph node in breast sparing procedures: FRANSENODE trial. *J Clin Oncol.* 2007, 25 (24): 3664-3669.
- [115] **Tanis P. J., Nieweg O. E. et al.**, History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res.* 2001, 3 (2): 109-112.
- [116] **Estourgie S. H., Nieweg O. E. et al.**, Lymphatic drainage patterns from the breast. *Ann Surg.* 2004, 239 (2): 232-237.
- [117] **Krag D., Harlow S. et al.**, Technique of sentinel node resection in melanoma and breast cancer: probe-guided surgery and lymphatic mapping. *Eur J Surg Oncol.* 1998, 24 (2): 89-93.
- [118] **McMasters K. M., Wong S. L. et al.**, Defining the optimal surgeon experience for breast cancer sentinel lymph node biopsy: a model for implementation of new surgical techniques. *Ann Surg.* 2001, 234 (3): 292-300.
- [119] **Clarke D., Newcombe R. G. et al.**, The learning curve in sentinel node biopsy: the ALMANAC experience. *Ann Surg Oncol.* 2004, 11 (3 Suppl): 211S-215S.
- [120] **Classe J. M., Houvenaeghel G. et al.**, [Sentinel node detection applied to breast cancer: 2007 update]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2007, 36 (4): 329-337.
- [121] **Moll R., Franke W. W. et al.**, The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982, 31 (1): 11-24.
- [122] **Backus J., Laughlin T. et al.**, Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn.* 2005, 7 (3): 327-336.
- [123] **Chu P. G., Weiss L. M.**, Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2002, 40 (5): 403-439.
- [124] **van Diest P. J., Peterse H. L. et al.**, Pathological investigation of sentinel lymph nodes. *Eur J Nucl Med.* 1999, 26 (4 Suppl): S43-49.
- [125] **Cserni G., Gregori D. et al.**, Meta-analysis of non-sentinel node metastases associated with micrometastatic sentinel nodes in breast cancer. *Br J Surg.* 2004, 91 (10): 1245-1252.
- [126] **McCready D. R., Yong W. S. et al.**, Influence of the new AJCC breast cancer staging system on sentinel lymph node positivity and false-negative rates. *J Natl Cancer Inst.* 2004, 96 (11): 873-875.

- [127] **Viale G., Dell'Orto P. et al.**, Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg.* 2008, 247 (1): 136-142.
- [128] **Tsujimoto M., Nakabayashi K. et al.**, One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007, 13 (16): 4807-4816.
- [129] **Hughes S. J., Xi L. et al.**, A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg.* 2006, 243 (3): 389-398.
- [130] **Snook K. L., Layer G. T. et al.**, Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg.* 2011, 98 (4): 527-535.
- [131] **Weigelt B., Verduijn P. et al.**, Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br J Cancer.* 2004, 90 (8): 1531-1537.
- [132] **Visser M., Jiwa M. et al.**, Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008, 122 (11): 2562-2567.
- [133] **Lakowicz J. R.**, Principles of fluorescence spectroscopy. *Springer.* 2006.
- [134] **Lucarelli R. T., Ogawa M. et al.**, New approaches to lymphatic imaging. *Lymphat Res Biol.* 2009, 7 (4): 205-214.
- [135] **Stuker F., Ripoll J. et al.**, Fluorescence Molecular Tomography: Principles and Potential for Pharmaceutical Research. *Pharmaceutics.* 2011, 3 (2): 229-274.
- [136] **Mahmood U., Weissleder R.**, Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003, 2 (5): 489-496.
- [137] **Weissleder R., Ntziachristos V.**, Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med.* 2003, 9 (1): 123-128.
- [138] **Ntziachristos V., Bremer C. et al.**, Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol.* 2003, 13 (1): 195-208.
- [139] **Reuthebuch O., Haussler A. et al.**, Novadaq SPY: intraoperative quality assessment in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest.* 2004, 125 (2): 418-424.
- [140] **Tobis S., Knopf J. K. et al.**, Robot-Assisted and Laparoscopic Partial Nephrectomy with Near Infrared Fluorescence Imaging. *J Endourol.* 2012:
- [141] **Noura S., Ohue M. et al.**, Feasibility of a lateral region sentinel node biopsy of lower rectal cancer guided by indocyanine green using a near-infrared camera system. *Ann Surg Oncol.* 2010, 17 (1): 144-151.
- [142] **Holm C., Tegeler J. et al.**, Monitoring free flaps using laser-induced fluorescence of indocyanine green: a preliminary experience. *Microsurgery.* 2002, 22 (7): 278-287.
- [143] **Pic E., Bezdetnaya L. et al.**, Quantification techniques and biodistribution of semiconductor quantum dots. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009, 9 (3): 295-303.
- [144] **Troyan S. L., Kianzad V. et al.**, The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol.* 2009, 16 (10): 2943-2952.
- [145] **Gioux S., Choi H. S. et al.**, Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging.* 2010, 9 (5): 237-255.
- [146] **Zimmer J. P., Kim S. W. et al.**, Size series of small indium arsenide-zinc selenide core-shell nanocrystals and their application to in vivo imaging. *J Am Chem Soc.* 2006, 128 (8): 2526-2527.
- [147] **Cai X., Li W. et al.**, In vivo quantitative evaluation of the transport kinetics of gold nanocages in a lymphatic system by noninvasive photoacoustic tomography. *ACS Nano.* 2011, 5 (12): 9658-9667.
- [148] **Uren R. F., Howman-Giles R. B. et al.**, Regarding sentinel lymph node localization in early breast cancer. *J Nucl Med.* 1999, 40 (8): 1403-1406.
- [149] **Choi H. S., Liu W. et al.**, Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007, 25 (10): 1165-1170.

- [150] **Burns A. A., Vider J. et al.**, Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine. *Nano Lett.* 2009, 9 (1): 442-448.
- [151] **Ballou B., Lagerholm B. C. et al.**, Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem.* 2004, 15 (1): 79-86.
- [152] **He X., Nie H. et al.**, In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Anal Chem.* 2008, 80 (24): 9597-9603.
- [153] **Choi J., Burns A. A. et al.**, Core-shell silica nanoparticles as fluorescent labels for nanomedicine. *J Biomed Opt.* 2007, 12 (6): 064007.
- [154] **Fischer H., Liu L. et al.**, Pharmacokinetics of Nanoscale Quantum Dots In Vivo Distribution, Sequestration, and Clearance in the Rat. *Advanced Functional Materials.* 2006, 16: 1299-1305.
- [155] **Renaud G., Hamilton R. L. et al.**, Hepatic metabolism of colloidal gold-low-density lipoprotein complexes in the rat: evidence for bulk excretion of lysosomal contents into bile. *Hepatology.* 1989, 9 (3): 380-392.
- [156] **Kumar R., Roy I. et al.**, In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. *ACS Nano.* 2010, 4 (2): 699-708.
- [157] **Ballou B., Ernst L. A. et al.**, Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. *Bioconjug Chem.* 2007, 18 (2): 389-396.
- [158] **Schipper M. L., Cheng Z. et al.**, microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *J Nucl Med.* 2007, 48 (9): 1511-1518.
- [159] **Zhang F., Lees E. et al.**, Polymer-coated nanoparticles: a universal tool for biolabelling experiments. *Small.* 2011, 7 (22): 3113-3127.
- [160] **Dubertret B., Skourides P. et al.**, In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science.* 2002, 298 (5599): 1759-1762.
- [161] **Moghimi S. M., Rajabi-Siahboomi R.**, Advanced colloid-based systems for efficient delivery of drugs and diagnostic agents to the lymphatic tissues. *Prog Biophys Mol Biol.* 1996, 65 (3): 221-249.
- [162] **Alexis F., Pridgen E. et al.**, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008, 5 (4): 505-515.
- [163] **Faure A. C., Dufort S. et al.**, Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small.* 2009, 5 (22): 2565-2575.
- [164] **Souris J. S., Lee C. H. et al.**, Surface charge-mediated rapid hepatobiliary excretion of mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials.* 2010, 31 (21): 5564-5574.
- [165] **Bhadra D., Bhadra S. et al.**, Pegnology: a review of PEG-ylated systems. *Pharmazie.* 2002, 57 (1): 5-29.
- [166] **Gref R., Luck M. et al.**, 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2000, 18 (3-4): 301-313.
- [167] **Allen C., Dos Santos N. et al.**, Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). *Biosci Rep.* 2002, 22 (2): 225-250.
- [168] **Levchenko T. S., Rammohan R. et al.**, Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *Int J Pharm.* 2002, 240 (1-2): 95-102.
- [169] **Allen T. M., Hansen C. B. et al.**, Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim Biophys Acta.* 1993, 1150 (1): 9-16.
- [170] **Wilson K. D., Raney S. G. et al.**, Effects of intravenous and subcutaneous administration on the pharmacokinetics, biodistribution, cellular uptake and immunostimulatory activity of CpG ODN encapsulated in liposomal nanoparticles. *Int Immunopharmacol.* 2007, 7 (8): 1064-1075.
- [171] **Harivardhan Reddy L., Sharma R. K. et al.**, Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *J Control Release.* 2005, 105 (3): 185-198.

- [172] **Resch-Genger U., Grabolle M. et al.**, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods*. 2008, 5 (9): 763-775.
- [173] **Buckle T., van Leeuwen A. C. et al.**, A self-assembled multimodal complex for combined pre- and intraoperative imaging of the sentinel lymph node. *Nanotechnology*. 2010, 21 (35): 355101.
- [174] **Gravier J., Navarro F. P. et al.**, Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt*. 2011, 16 (9): 096013.
- [175] **Vera D. R., Hall D. J. et al.**, Cy5.5-DTPA-galactosyl-dextran: a fluorescent probe for in vivo measurement of receptor biochemistry. *Nucl Med Biol*. 2005, 32 (7): 687-693.
- [176] **Cartier R., Kaufner L. et al.**, Latex nanoparticles for multimodal imaging and detection in vivo. *Nanotechnology*. 2007, 18 (19): 195102.
- [177] **Zanarini S., Rampazzo E. et al.**, Ru(bpy)₃ Covalently Doped Silica Nanoparticles as Multicenter Tunable Structures for Electrochemiluminescence Amplification. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, 131 (6): 2260-2267.
- [178] **Wang L., Wang K. et al.**, Watching Silica Nanoparticles Glow in the Biological World. *Analytical Chemistry*. 2006, 78 (3): 646-654.
- [179] **Zamboni W. C., Torchilin V. et al.**, Best Practices in Cancer Nanotechnology: Perspective from NCI Nanotechnology Alliance. *Clin Cancer Res*. 2012, 18 (12): 3229-3241.
- [180] **Zrazhevskiy P., Sena M. et al.**, Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chem Soc Rev*. 2010, 39 (11): 4326-4354.
- [181] **Gomez D. E., Califano M. et al.**, Optical properties of single semiconductor nanocrystals. *Phys Chem Chem Phys*. 2006, 8 (43): 4989-5011.
- [182] **Alivisatos A. P.**, Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, 100 (31): 13226-13239.
- [183] **Gao X., Yang L. et al.**, In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr Opin Biotechnol*. 2005, 16 (1): 63-72.
- [184] **Chan W. C., Maxwell D. J. et al.**, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol*. 2002, 13 (1): 40-46.
- [185] **Barat B., Sirk S. J. et al.**, Cys-diabody quantum dot conjugates (immunoQdots) for cancer marker detection. *Bioconjug Chem*. 2009, 20 (8): 1474-1481.
- [186] **Ma N., Tikhomirov G. et al.**, Nucleic acid-passivated semiconductor nanocrystals: biomolecular templating of form and function. *Acc Chem Res*. 2010, 43 (2): 173-180.
- [187] **Hardman R.**, A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*. 2006, 114 (2): 165-172.
- [188] **Winnik F. M., Maysinger D.**, Quantum Dot Cytotoxicity and Ways To Reduce It. *Acc Chem Res*. 2012:
- [189] **Lovric J., Bazzi H. S. et al.**, Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J Mol Med (Berl)*. 2005, 83 (5): 377-385.
- [190] **Yang H., Liu C. et al.**, Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol*. 2009, 29 (1): 69-78.
- [191] **Albanese A., Sykes E. A. et al.**, Rough around the Edges: The Inflammatory Response of Microglial Cells to Spiky Nanoparticles. *ACS Nano*. 2010, 4 (5): 2490-2493.
- [192] **Schrand A. M., Dai L. et al.**, Toxicity testing of nanomaterials. *Adv Exp Med Biol*. 2012, 745: 58-75.
- [193] **Schrand A. M., Rahman M. F. et al.**, Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010, 2 (5): 544-568.
- [194] **Hoshino A., Hanaki K. et al.**, Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 314 (1): 46-53.
- [195] **Hoshino A., Fujioka K. et al.**, Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification. *Nano Letters*. 2004, 4 (11): 2163-2169.
- [196] **Rzagalinski B. A., Strobl J. S.**, Cadmium-containing nanoparticles: perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009, 238 (3): 280-288.

- [197] **Derfus A., Chan W. C. W. et al.**, Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification. *Nano Letters*. 2004, 4 (1): 11-18.
- [198] **Kirchner C., Liedl T. et al.**, Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* 2005, 5 (2): 331-338.
- [199] **Lovric J., Cho S. J. et al.**, Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol.* 2005, 12 (11): 1227-1234.
- [200] **Shiohara A., Hoshino A. et al.**, On the cyto-toxicity caused by quantum dots. *Microbiol Immunol.* 2004, 48 (9): 669-675.
- [201] **Cassette E., Pons T. et al.**, Synthesis and Characterization of Near-Infrared Cu-In-Se/ZnS Core/Shell Quantum Dots for In vivo Imaging. *Chem Mater.* 2010, 22 (22): 6117-6124.
- [202] **Jaiswal J. K., Mattoussi H. et al.**, Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol.* 2003, 21 (1): 47-51.
- [203] **Gao X., Chan W. C. et al.**, Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *J Biomed Opt.* 2002, 7 (4): 532-537.
- [204] **Wu X., Liu H. et al.**, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2003, 21 (1): 41-46.
- [205] **Voura E. B., Jaiswal J. K. et al.**, Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med.* 2004, 10 (9): 993-998.
- [206] **Chen M. L., Liu J. W. et al.**, Conjugation of quantum dots with graphene for fluorescence imaging of live cells. *Analyst.* 2011, 136 (20): 4277-4283.
- [207] **Hauck T. S., Anderson R. E. et al.**, In vivo quantum-dot toxicity assessment. *Small.* 2010, 6 (1): 138-144.
- [208] **Gao X., Cui Y. et al.**, In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2004, 22 (8): 969-976.
- [209] **Akerman M. E., Chan W. C. et al.**, Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99 (20): 12617-12621.
- [210] **Su Y., Peng F. et al.**, In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots. *Biomaterials.* 2011, 32 (25): 5855-5862.
- [211] **Fruijtier-Polloth C.**, The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-A nanostructured material. *Toxicology.* 2012, 294 (2-3): 61-79.
- [212] **Stöber W., Fink A. et al.**, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1968, 26 (1): 62-69.
- [213] **Van Blaaderen A., Vrij A.**, Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres. *Langmuir.* 1992, 8 (12): 2921-2931.
- [214] **Nyffenegger R., Quellet C. et al.**, Synthesis of Fluorescent, Monodisperse, Colloidal Silica Particles. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1993, 159 (1): 150.
- [215] **Verhaegh N. A. M., Blaaderen A. v.**, Dispersions of Rhodamine-Labeled Silica Spheres: Synthesis, Characterization, and Fluorescence Confocal Scanning Laser Microscopy. *Langmuir.* 1994, 10 (5): 1427-1438.
- [216] **Zhao X., Bagwe R. P. et al.**, Development of Organic-Dye-Doped Silica Nanoparticles in a Reverse Microemulsion. *Advanced Materials.* 2004, 16 (2): 173-176.
- [217] **Zanarini S., Rampazzo E. et al.**, Iridium Doped Silica-PEG Nanoparticles: Enabling Electrochemiluminescence of Neutral Complexes in Aqueous Media. *Journal of the American Chemical Society.* 2009, 131 (40): 14208-14209.
- [218] **Bonacchi S., Genovese D. et al.**, Luminescent silica nanoparticles: extending the frontiers of brightness. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011, 50 (18): 4056-4066.
- [219] **Haugland R. P., Gregory J. et al.**, Handbook of fluorescent probes and research products. *Molecular Probes.* 2002.
- [220] **Juris R.**, Dye doped, core/shell silica nanoparticles: Synthesis, characterization & biotechnological applications. 2012, *Thèse de sciences chimiques, Université de Bologne, Italie.*

- [221] **Kühn S., Mori G. et al.**, Modification of single molecule fluorescence close to a nanostructure: radiation pattern, spontaneous emission and quenching. *Molecular Physics*. 2008, 106 (7): 893-908.
- [222] **Ow H., Larson D. R. et al.**, Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano Lett*. 2005, 5 (1): 113-117.
- [223] **Sinclair R. S.**, The light stability and photodegradation of dyes. *Photochemistry and Photobiology*. 1980, 31 (6): 627-629.
- [224] **Bonnett R., Martinez G.**, Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2001, 57 (47): 9513-9547.
- [225] **Kneuer C., Sameti M. et al.**, A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug Chem*. 2000, 11 (6): 926-932.
- [226] **Luo D., Han E. et al.**, A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *J Control Release*. 2004, 95 (2): 333-341.
- [227] **Zhu S. G., Xiang J. J. et al.**, Poly(L-lysine)-modified silica nanoparticles for the delivery of antisense oligonucleotides. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004, 39 (Pt 2): 179-187.
- [228] **Law W.-C., Yong K.-T. et al.**, Optically and Magnetically Doped Organically Modified Silica Nanoparticles as Efficient Magnetically Guided Biomarkers for Two-Photon Imaging of Live Cancer Cells. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2008, 112 (21): 7972-7977.
- [229] **Brown S. C., Kamal M. et al.**, Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity. *Advanced Powder Technology*. 2007, 18 (1): 69-79.
- [230] **Yu K., Grabinski C. et al.**, Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. *Journal of Nanoparticle Research*. 2009, 11 (1): 15-24.
- [231] **Emerich D. F.**, Nanomedicine--prospective therapeutic and diagnostic applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2005, 5 (1): 1-5.
- [232] **Vivero-Escoto J. L., Taylor-Pashow K. M. et al.**, Multifunctional mesoporous silica nanospheres with cleavable Gd(III) chelates as MRI contrast agents: synthesis, characterization, target-specificity, and renal clearance. *Small*. 2011, 7 (24): 3519-3528.
- [233] **Jeon Y. H., Kim Y. H. et al.**, In vivo imaging of sentinel nodes using fluorescent silica nanoparticles in living mice. *Mol Imaging Biol*. 2010, 12 (2): 155-162.
- [234] **Kim S., Ohulchanskyy T. Y. et al.**, Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *J Am Chem Soc*. 2007, 129 (9): 2669-2675.
- [235] **Park J. H., Gu L. et al.**, Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nat Mater*. 2009, 8 (4): 331-336.
- [236] **Robe A., Pic E. et al.**, Quantum dots in axillary lymph node mapping: biodistribution study in healthy mice. *BMC Cancer*. 2008, 8: 111.
- [237] **Pic E., Pons T. et al.**, Fluorescence Imaging and Whole-Body Biodistribution of Near-Infrared-Emitting Quantum Dots after Subcutaneous Injection for Regional Lymph Node Mapping in Mice. *Mol Imaging Biol*. 2009, 12 (4): 394-405.
- [238] **Pons T., Pic E. et al.**, Cadmium-free CuInS₂/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. *ACS Nano*. 2010, 4 (5): 2531-2538.
- [239] **Rampazzo E., Boschi F. et al.**, Multicolor core/shell silica nanoparticles for in vivo and ex vivo imaging. *Nanoscale*. 2012, 4 (3): 824-830.
- [240] **Rampazzo E., Bonacchi S. et al.**, Energy Transfer from Silica Core - Surfactant Shell Nanoparticles to Hosted Molecular Fluorophores. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, 114 (45): 14605-14613.
- [241] **Levitz S. M., Diamond R. D.**, A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis*. 1985, 152 (5): 938-945.
- [242] **Chouly C., Bordenave L. et al.**, In vitro study of the hemocompatibility of superparamagnetic contrast agent for magnetic resonance imaging. *Clin Mater*. 1994, 15 (4): 293-301.
- [243] **Goodman C. M., McCusker C. D. et al.**, Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem*. 2004, 15 (4): 897-900.
- [244] **Slowing I., Wu C. W. et al.**, Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small*. 2009, 5 (1): 57-62.

- [245] **Pickering J. W., Prahl S. A. et al.**, Double-integrating-sphere system for measuring the optical properties of tissue. *Appl Opt.* 1993, 32 (4): 399-410.
- [246] <http://omlc.ogi.edu/software/iad/index.html>. Visité le 21/05/2012.
- [247] http://omlc.ogi.edu/calc/mie_calc.html. Visité le 21/05/2012.
- [248] **De Grand A. M., Lomnes S. J. et al.**, Tissue-like phantoms for near-infrared fluorescence imaging system assessment and the training of surgeons. *J Biomed Opt.* 2006, 11 (1): 014007.
- [249] **Rattan S. I.**, Targeting the age-related occurrence, removal, and accumulation of molecular damage by hormesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010, 1197: 28-32.
- [250] **Ohnishi S., Lomnes S. J. et al.**, Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping. *Mol Imaging.* 2005, 4 (3): 172-181.
- [251] **Aoyama K., Kamio T. et al.**, Sentinel lymph node biopsy for breast cancer patients using fluorescence navigation with indocyanine green. *World J Surg Oncol.* 2011, 9: 157.
- [252] **Namikawa K., Yamazaki N.**, Sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green fluorescence for cutaneous melanoma. *Eur J Dermatol.* 2011, 21 (2): 184-190.
- [253] **He Q., Zhang J. et al.**, The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses. *Biomaterials.* 2010, 31 (6): 1085-1092.
- [254] **Thomassen L. C., Rabolli V. et al.**, Model system to study the influence of aggregation on the hemolytic potential of silica nanoparticles. *Chem Res Toxicol.* 2011, 24 (11): 1869-1875.
- [255] **Singh P., Gupta U. et al.**, Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice. *Bioconjug Chem.* 2008, 19 (11): 2239-2252.
- [256] **Kameneva M. V., Repko B. M. et al.**, Polyethylene glycol additives reduce hemolysis in red blood cell suspensions exposed to mechanical stress. *Asaio J.* 2003, 49 (5): 537-542.
- [257] **Uboldi C., Giudetti G. et al.**, Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutat Res.* 2012, 745 (1-2): 11-20.
- [258] **Park K. S., Tae J. et al.**, Characterization, in vitro cytotoxicity assessment, and in vivo visualization of multimodal, RITC-labeled, silica-coated magnetic nanoparticles for labeling human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine.* 2010, 6 (2): 263-276.
- [259] **Cong L., Takeda M. et al.**, Uniform silica coated fluorescent nanoparticles: synthetic method, improved light stability and application to visualize lymph network tracer. *PLoS One.* 2010, 5 (10): e13167.
- [260] **Rao D. A., Forrest M. L. et al.**, Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery. *J Pharm Sci.* 2009, 99 (4): 2018-2031.
- [261] **Patlolla A. K., Berry A. et al.**, Study of hepatotoxicity and oxidative stress in male Swiss-Webster mice exposed to functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Mol Cell Biochem.* 2011, 358 (1-2): 189-199.
- [262] **Liu T., Li L. et al.**, Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials.* 2011, 32 (6): 1657-1668.
- [263] **Huang X., Li L. et al.**, The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano.* 2011, 5 (7): 5390-5399.
- [264] **Kim J. S., Yoon T. J. et al.**, Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci.* 2006, 89 (1): 338-347.
- [265] **Qian J., Wang D. et al.**, Photosensitizer encapsulated organically modified silica nanoparticles for direct two-photon photodynamic therapy and in vivo functional imaging. *Biomaterials.* 2012, 33 (19): 4851-4860.
- [266] **Soltesz E. G., Kim S. et al.**, Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann Thorac Surg.* 2005, 79 (1): 269-277.
- [267] **Vincent-Salomon A., Caly M. et al.**, Lobular phenotype related to occult-metastatic spread in axillary sentinel node and/or bone marrow in breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 2009, 45 (11): 1979-1986.
- [268] **Tsay J. M., Michalet X.**, New light on quantum dot cytotoxicity. *Chem Biol.* 2005, 12 (11): 1159-1161.

- [269] **Ye L., Yong K. T. et al.**, A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nat Nanotechnol.* 2012, 7 (7): 453-458.
- [270] **NTP**, Toxicology and carcinogenesis studies of indium phosphide in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). *U.S. department of Health and Human Services.* 2001.
- [271] **Kim S., Lim Y. T. et al.**, Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol.* 2004, 22 (1): 93-97.
- [272] **Becker L. C., Bergfeld W. F. et al.**, Safety assessment of silica and related cosmetic ingredients. *Cosmetic Ingredient Review, Washington, DC, USA.* 2009, *Unpublished Report by the Cosmetic Ingredient Review: pp. 1-81.*
- [273] **Zhang C., Wang S. et al.**, Sentinel lymph node mapping by a near-infrared fluorescent heptamethine dye. *Biomaterials.* 2010, 31 (7): 1911-1917.
- [274] **Wang D., Qian J. et al.**, 'Green'-synthesized near-infrared PbS quantum dots with silica-PEG dual-layer coating: ultrastable and biocompatible optical probes for in vivo animal imaging. *Nanotechnology.* 2012, 23 (24): 245701.
- [275] **Bunschoten A., Buckle T. et al.**, Targeted non-covalent self-assembled nanoparticles based on human serum albumin. *Biomaterials.* 2012, 33 (3): 867-875.
- [276] **Tu C., Ma X. et al.**, Paramagnetic, silicon quantum dots for magnetic resonance and two-photon imaging of macrophages. *J Am Chem Soc.* 2010, 132 (6): 2016-2023.
- [277] **Muthu M. S., Kulkarni S. A. et al.**, Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. *Biomaterials.* 2012, 33 (12): 3494-3501.
- [278] **Kumar R., Kulkarni A. et al.**, In vitro evaluation of theranostic polymeric micelles for imaging and drug delivery in cancer. *Theranostics.* 2012, 2 (7): 714-722.

Annexes

Listes des annexes

| | |
|--|-----|
| A. Animal models for photodiagnosis and photodynamic therapy..... | 156 |
| B. Synthesis and characterization of near infrared Cu-In-Se/ZnS core/Shell Quantum Dots for <i>in vivo</i> imaging..... | 166 |
| C. Production scientifique..... | 175 |

A. Animal models for photodiagnosis and photodynamic therapy

M-A. D'Hallewin, **M. Helle**, J. Garrier, L. Bezdetnaya, F. Guillemin

Israel Journal of Chemistry, article sous presse

DOI : 10.1002/ijch.201100074

Review

M. D'Hallewin et al.

DOI: 10.1002/ijch.201100074

Animal Models for Photodiagnosis and Photodynamic TherapyM. D'Hallewin,^{*,[a]} M. Helle,^[a] J. Garrier,^[a] L. Bezdetsnaya,^[a] and F. Guillemin^[a]

Abstract: A prerequisite for starting a clinical trial is evidence of a positive impact of the technique or drug in animals. The choice of the animal model is thus very important and should mimic as closely as possible the human situation. A variety of animal models have been validated for pharmaceutical trials. The situation in phototheranostics however is not fully clear. This is due to the very complex in-

terplay of various elements such as vascularization, oxygenation, drug availability and biodistribution, light absorption, and scattering. The present paper will give general information on aspects of animal models that have to be considered in phototheranostics, as well as highlight some typical animal models that are useful for the investigation of light-tissue interactions.

Keywords: animal models · antitumor agents · cancer · photodynamic therapy · sensitizers

1. Introduction

Phototheranostics refers to the diagnosis and subsequent treatment of a disease using a single molecule that acts as both a fluorophore for diagnostic purposes and a photosensitizer for eradication of the lesion. Animal models that aim to test these molecules or devices for optical diagnosis or light delivery should thus mimic as closely as possible the human situation. Originally, drug screening was performed on animals with peritoneal tumors induced by intraperitoneal injection of leukemia cells.^[1] Since 1976, a broad panel of various other tumor cell lines, including solid human tumors representative of the major cancer types, have been tested in rodents following subcutaneous, intraperitoneal or intravenous administration.^[2] Since most drugs are directed towards specific molecular targets, the aim of animal models is to express those targets through genetic engineering.

Since photodynamic therapy (PDT) is a radiation therapy, different selection criteria are required when developing animal models, and the commonly used models are inappropriate. The unique interaction between the photosensitizer incorporated in cells, light, and molecular oxygen necessitates a model that is comparable to the human situation in terms of vascularization, blood flow, scattering, and the absorption coefficient of the tissue as well as its depth. Additional questions arise when considering an appropriate animal model such as the choice of cell line and implantation site and whether or not to use an immunocompetent animal. Ultimately, the choice of the model will depend on the scientific question to be answered.

Spontaneous tumors are extremely rare but can be generated by administration of carcinogens. This is an ex-

remely time-consuming procedure with a rather low reproducibility rate, and may also induce exposure risks to the animal-handling personnel. This method is however recommended for testing optical diagnostic techniques, since it allows all steps in carcinogenesis to be evaluated. Optical techniques have thus been assessed for both UV- and chemically induced skin diseases,^[3,4] as well as oral cancer using the hamster cheek pouch model.^[5] The latter will be discussed in more detail below.

One of the first reports studying subcutaneous tumors dates from 1953.^[6] Hewitt subcutaneously injected ascites-forming sarcoma cells into mice. He found that adult mice were more resistant to tumor growth but that this could be overcome by increasing the number of inoculated cells. This technique is reproducible and convenient to perform, does not require anesthesia of the animal, and allows for visual assessment of tumor growth as well as response. However, tumor take rates and drug response can vary widely according to the site of implantation.^[7–10] The tumor host environment is thus very important and also affects PDT efficacy. Indeed, Chan et al. showed that certain phthalocyanine derivatives that were the most active *in vitro* failed to have any tumor reductive effect on subcutaneous tumors.^[11] In another experiment, Gibson et al. demonstrated that human mesothelio-

[a] M. D'Hallewin, M. Helle, J. Garrier, L. Bezdetsnaya, F. Guillemin
Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039
Campus Sciences, BP 70239
Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506 (France) and
CNRS, CRAN, UMR 7039 (France) and
Centre Alexis Vautrin, CRLCC, avenue de Bourgogne
Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54511 (France)

ma cells and rat mammary carcinoma had an inverted sensitivity to PDT when investigated *in vitro* or in subcutaneous implants, despite the equal photosensitizer uptake.^[12] This can probably be attributed to the differences in vascularization between the host environments. Indeed, Chen et al. showed that orthotopic prostate tumors have a higher vessel density, with more permeable vessels and less hypoxia compared to subcutaneous tumor nodules.^[13] Accordingly, photosensitizer concentration was higher in prostatic locations shortly after administration, whereas PDT efficacy was highest after longer intervals due to the better oxygenation.^[13] Orthotopic models are also essential when dealing with optical diagnoses with regard to optical characteristics of the tissue. The optical characteristics of human and canine tissue are fairly identical, which is probably also true for rodents.^[14] Any differences arise from factors such as the density of hair follicles, pigmentation, the thickness of different tissue layers, and the amount of subcutaneous fat. The drawbacks of orthotopic implantation include the necessity for some surgical skills, anesthesia, and potential postoperative mortality.

Another important aspect is the choice of cell line. Most pharmacological studies are performed in nude animals presenting tumors of human origin. With regard to the impact of immune reactions in PDT, syngeneic strains in immunocompetent animals are probably to be preferred.^[15] Tumors can be induced either by injection of cells or implantation of solid tumor lumps. Cells produce higher tumor take rates whereas solid tumor implantation has more invasive and metastatic potential and frequently includes central necrotic areas.^[16–18] When comparing large studies, it appears that the use of primary tumors more closely reflects clinical response compared to injection of cell lines.^[19,20] Tumor take rates can be enhanced by first growing the tumors subcutaneously or by culturing them for a certain number of passages in monolayer cultures.^[9] In order to grow epithelial tumors, the environment must first be chemically prepared in order to accept tumor implantation and subsequent tumor growth.^[9,21]

Marie Ange D'Hallewin was born in 1959 in Brussels. She obtained her MD degree in 1984 in Leuven and qualified as a urologist and professor in medicine after her PhD on light tissue interactions for bladder cancer diagnosis and treatment. She is currently appointed at the Centre Alexis Vautrin, Comprehensive Cancer Centre in Nancy, France, and is a member of the CRAN-CNRS, a multidisciplinary research team including biologists, physicists and mathematicians.



The most commonly studied animals are rats and mice. The choice, however, will depend on the study objective, such as in cases where photosensitizer biodistribution in rodents cannot be directly correlated to humans. Indeed, it was shown that *meta*(tetra-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC, Foscan) levels remain constant in human plasma for at least twelve hours, whereas almost all mTHPC has been lost from mouse plasma six hours after intravenous administration.^[22] Biodistribution in Syrian hamsters is comparable to humans, albeit with a reduced mTHPC fluorescence.^[23] When wound healing is to be considered, pig skin is a better choice than rodent skin. Indeed, matrix remodeling and elastin neosynthesis, the final stages in wound healing, are finalized after several months in humans, start after six weeks in pigs and can be observed as early as one week in mice.^[24–26] The study of adverse events that occur in clinical practice will also influence the choice of animal. When considering oesophageal strictures, PDT should not be performed in rodents since the light dose required to induce submucosal damage will already have provoked lethal pulmonary changes, and only pigs will develop oesophageal fibrosis at high fluences.^[27]

The choice of animal model, with regard to the very complex interactions observed in photodiagnostics and photodynamic therapy, is thus essential and can dramatically influence obtained results. The primary consideration when choosing the correct model is the ultimate aim of the study and the scientific question with a perfect background of all parameters involved in light tissue interactions. In this paper we wanted to highlight some animal models, including non-cancerous models, which can be of interest in photo-theranostics.

2. Osteoarthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic chronic inflammatory disease characterized by symmetrical polyarticular synovitis and the ensuing cartilage erosion, which results in bone destruction in the final stages. Current treatment is mostly palliative, consisting of analgesics and anti-inflammatory drugs. Surgical synovectomy is an open arthroscopic approach while radiation synovectomy consists of intra-articular application of radioactive agents with associated potential radiation hazards. The presence of severe bone destruction will require replacement surgery. Recently, renewed interest has arisen concerning the potential benefits of photodynamic treatment of inflamed synovial tissue.^[28,29] Various photosensitizers have shown a pronounced accumulation in this tissue type.^[29–32]

Determination of the correct animal model to evaluate PDT effectiveness will depend on the aims of the study. Intra-articular light delivery necessitates larger animals such as hares or rabbits, whereas transdermal illumination can be performed in rats or mice. Synovitis can be in-

Review

M. D'Hallewin et al.

duced in a single joint by intra-articular inoculation of pro-inflammatory drugs, whereas systemic administration of RA-promoting factors will initialize polyarticular arthritis. The latter offers the advantage that multiple irradiation settings can be tested on a single rodent. Various drugs can be used for injection into joints, including collagenase,^[33] destructive murine fibroblasts (comparable to the synovial fibroblasts present in RA),^[28] methylated bovine serum, or ovalbumin following systemic immunization.^[29,30] Polyarthritis can be obtained in rats by a single intradermal or subcutaneous administration of either collagen II or pristine.^[34] Different joints will be affected according to the inductor agent and 80–100% of the rats will develop RA.

The rats are anesthetized by isoflurane inhalation and extension of the hind paw reveals the whitish appearance of the patellar tendon, through which intra-articular injection is performed. Irrespective of the inductor, symptoms are most acute after one week and thereafter progressively decrease. Polyarthritis symptoms are maximal at two to three weeks and remain stable for at least two weeks. The development of the disease can be visually assessed by the appearance of swelling and redness. Joint swelling can be measured with a caliper and a redness scoring system can also be used to evaluate arthritis grade. More generalized edema is evaluated by measuring the displaced volume after insertion of the paw into a tube containing a water solution, with the opposite paw being taken as a control. Blood analysis will show the appearance of rheumatoid factors such as specific antibodies to cyclic citrullinated proteins, acute-phase serum amyloid, or the presence of nitric oxide. Histological assessment evaluates hyperplasia of cells, hypertrophy of the synovial layer and the density of inflammatory infiltrate.

3. Bladder Cancer

Although the incidence of bladder cancer is relatively low, the prevalence is rather high due to the very high recurrence rates of non-muscle invasive cancers.^[35] Furthermore, the presence of carcinoma in situ (CIS) that cannot be detected by conventional methods has been shown to be an important risk factor for disease progression, because specific survival is heavily affected by the presence of CIS.^[36] Early detection of such lesions is thus mandatory to reduce mortality rates. Fluorescence-guided cystoscopy has been shown to increase detection rate, as well as decrease progression and recurrence in humans.^[37] Nevertheless, the high number of false positive fluorescence results and the fast photobleaching observed remain troublesome. Hence, the timely development of other more specific fluorophores is much needed.

Spontaneous bladder tumors are rare in rodents but can be induced by addition of various agents to drinking water or food. Although these models are useful for

studying chemoprevention, the process of tumor induction takes more than eight months. Heterotopic implants cannot be used for the evaluation of intravesical treatments or diagnostic techniques based on optical characterization, due to the differences in absorption and diffusion properties of the bladder wall compared to skin and muscle. The ideal orthotopic model would be easy to perform with a high reproducibility. Animals must be immunocompetent and tumors must be of urothelial origin and staging should be controlled. When endoscopic procedures have to be applied, female rats are to be preferred over male animals and mice, due to the diameter and anatomy of the urethra.

Tumors are induced by intravesical administration of urinary bladder cancer cells of human or rodent origin, generated spontaneously or through chemoinduction.^[38,39] The cell lines used have been selected to ensure rapid in vitro growth, efficient tumor growth when implanted subcutaneously, stable tumor characteristics, potential metastatic behavior, and expression of specific molecular markers.^[38,40] However, these cell lines are composed of a unique cell type, which does not necessarily reflect pathological conditions observed in humans. This may in turn affect therapeutic outcome, but interferes less with diagnostic approaches.

Tumor cell adhesion and subsequent growth necessitate damage to the epithelial layers. Removal of the protective glycosaminoglycan layer can be achieved by intravesical instillation of trypsin or poly-L-lysine, which ensures tumor take rates of about 80%.^[41] Removal of the umbrella and intermediate cells with basal cells still present does not prevent adhesion and results in 100% tumor take rates.^[21] Contact time with the damaging agent is crucial, since excessive damage will provoke important inflammatory reactions or even bladder perforation and ensuing animal death.^[21,42] Mechanical damage, such as that resulting from electrocautery or mechanical abrasion of the dome, requires more technical skill and carries high risk of perforation.^[43,44] Furthermore, such tumors are frequently more invasive, or at least covered by normal urothelium, which will alter both therapeutic and diagnostic results.^[21,45] The amount of instilled cells must be sufficient and a minimum of 10^4 – 10^5 cells need to be administered for good tumor take rates.^[41,46] Increasing the contact time with cells also promotes tumor growth. One hour seems to be an appropriate time period. Prolongation of this will cause an increased urinary volume with either leakage, and thus loss of cells, or reflux and the appearance of upper urinary tract lesions.^[47,48]

Tumor stages have to be controlled when assessing therapeutic effect. This is difficult to achieve in models with multifocal lesions following acid induction and instillation with syngeneic bladder cancer cells.^[49] After localized desepithelialization, a single tumor will develop at the injury site with a predictable evolution in stage.^[21] Carcinoma in situ present at day three will become inva-

sive after one week in all rats. Instillation of human bladder cancer cells (BIU 87) in immunodeficient mice develops more slowly, with superficial lesions at day seven and progressive invasion at two weeks.^[50] The number of cell passages will also influence the tumor stage, with an increased amount of invasive lesions occurring after an increased number of *in vitro* or *in vivo* passages.^[21,51,52]

Rats are anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg), which ensures a deep anesthesia for three hours. They are placed in a supine position and catheterized with a guide wire. A 14 G canula, previously lubricated, is then introduced over the guide wire. The shape of the catheter top must be slightly conical to dilate the urethra without provoking any damage. The bladder is then emptied by gentle abdominal pressure. The deepithelializing agent is then instilled for an appropriate time before emptying the bladder and rinsing several times with phosphate-buffered saline. The maximal bladder content is approximately 0.5 mL and the bladder volume can be assessed by abdominal palpation. Cells are then instilled and the catheter is clamped for one hour before being removed. Tumors can be detected as early as three days postinduction with random growth of tumors at different stages as shown in Figure 1, ten days after instillation of tumor cells.

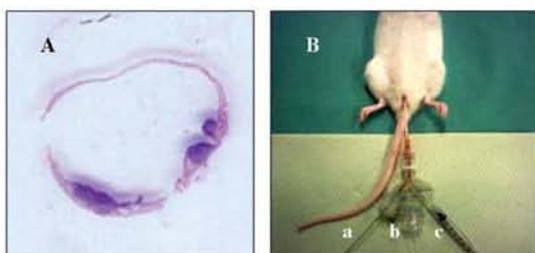


Figure 1. (A) Macroscopic view of a rat bladder ten days post-intravesical administration of syngeneic AY27 cells, showing multiple tumors at different stages. (B) Setup for bladder PDT with trifurcated canula with: (a) guide wire, (b) laser fibre, and (c) syringe for bladder filling.

4. Hamster Cheek Pouch Model

Oral cancer is the sixth most common cancer worldwide with an estimated annual incidence of 275,000.^[53] The main established risk factors are smoking, tobacco or betel nut chewing, alcohol, and radiation. Despite huge efforts to improve therapeutic outcome, survival rates have not improved over the last decade, with a five-year survival rate inferior to 60%. This is mainly due to local recurrences, metastases, and second primary cancers in the upper aerodigestive tract.^[54] Survival is closely associated with tumor stage with, for example, cancer of the tongue having survival rates of up to 80% at early stages and only 10% for late-stage disease. Early diagnosis is

thus mandatory to reduce morbidity and mortality rates of oral cancer. Nevertheless, despite increased public education, the proportion of patients presenting with advanced disease has not changed over the last forty years.^[55] Detection is a real challenge, since a one cubic millimeter nodule, which is barely visible with the naked eye, already contains 10^6 cells.^[56] Various optical techniques have been developed over the last decades in order to enhance sensitivity and specificity of cancer diagnosis. Before being validated for clinical use, these techniques have to be extensively tested in animals. It is thus very important that they mimic as closely as possible human carcinogenesis.

The Syrian golden hamster cheek pouch model is presently the animal model that most accurately represents the cellular and molecular changes that occur with initiation and progression in human oral cancer.^[57] Salley originally described this model in 1954, with the aim of producing an orthotopic epithelial cancer.^[58] The cheek pouch can be inverted and has a very thin overlying skin, and is thus easy to observe with transillumination while the animal is immobilized in a special device.^[59] Carcinogenesis is induced by the application of hydrocarbons dissolved in acetone or benzene. A paintbrush is dipped into the solution and applied to the pouch. The best results were obtained with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) in an acetone solution. One can observe different modifications going from hyperplasia, through benign papilloma, dysplasia, and carcinoma *in situ*, to invasive carcinoma. In order to standardize the procedure, Morris further investigated the impact of the age of the animal, drug concentration, and duration of application.^[60] Younger animals were found to be more susceptible to tumor induction than older ones and five weeks was found to be the ideal age. High DMBA concentrations were too toxic whereas very low concentrations failed to produce tumor growth, with 0.5% providing good results. Thrice-weekly application was more efficient than twice weekly. Morris also developed a new application technique, since the aforementioned paintbrush method showed signs of leakage of the carcinogen from the mouth and onto the paws, with secondary tumor induction and higher toxicity to the animals. By first wiping the brush on the container, the amount of leakage was minimized and induction was restricted to the pouch. This model is conventionally used for prevention, diagnosis, and treatment studies. Since the model is very labor intensive, involving thrice-weekly DMBA application for approximately sixteen weeks, and exposes the investigator to carcinogens during this time period, a variant of the model has been described based on sustained release of DMBA.^[61] Cotton sutures are impregnated with DMBA and fixed in the submucosa of the deepest portion of the pouch. Release of DMBA is 95% complete at fifteen months and tumor take rates are 90% at twenty weeks as opposed to 100% with the “traditional” method. This

Review

M. D'Hallewin et al.

technique requires inhalation anesthesia and some surgical skills. The handling of the animal during the carcinogenesis period is however reduced by tenfold. Since the surgical sutures have not yet been commercialized, this model has so far only been described by research groups in Vancouver, using chemists to produce the specific surgical thread.^[61,62]

DMBA-induced oral epithelial cancer in hamsters reflects many aspects of human cancer development such as gene expression, immune-derived cytokines, epidermal growth factor and neovascularization.^[63] However, the pouch mucosa is much thinner than the rest of the oral mucosa and than the human mucosa, and has a single submucosal connective tissue.^[64] This will influence light distribution, which in turn might hamper correlation of optical diagnostic findings between hamsters and humans. The hamster cheek pouch model remains however the gold standard for optical diagnosis of cancer at various stages in carcinogenesis. Steady-state and time-resolved spectroscopy, autofluorescence, exogenous fluorescence, lifetime imaging, and optical coherence tomography are amongst the many techniques that have been used with the hamster cheek pouch model.^[62,65–69]

5. Age-Related Macular Degeneration

Age-related macular degeneration (AMD) is the main cause of blindness in the elderly. The first clinical markers are the accumulation of lipofuscin in the retinal pigment epithelium, and deposits of lipids known as drusen between the retinal pigment epithelium and the basement membrane and within Bruch's membrane. Oxidation of these lipids damages the lysosomal membranes, and leakage of hydrolytic enzymes results in cell damage to the retina and so-called "dry" AMD.^[70] No medical or surgical treatment is available for this condition, although vitamin supplements with high doses of antioxidants have been suggested, as have immune system regulators to suppress oxidative stress and immune activation pathways. This disease can be induced in rats by exposure to blue or white light.^[71,72] In a further stage, disruption of Bruch's membrane will result in inflammation, which provokes choroidal neovascularization (CNV) and so-called "wet" AMD.^[73] Neovessel formation will induce leakage of blood and proteins below the macula, with an ensuing inflammatory reaction and ultimately irreversible fibrosis. There are thus three major systems involved in the formation and progression of CNV: inflammation, proteolysis, and angiogenesis.

Three categories of animal model can be discerned: laser-induced, surgically induced, and genetically engineered. All three types have their advantages and disadvantages and the final choice depends on the study objective. Small-animal models (e.g., mice, rats) are indicated for ex vivo studies, whereas for in vivo observations and

longitudinal studies, larger animals (e.g., rabbits, pigs, monkeys) are more suitable. In general, disruption of Bruch's membrane is essential for CNV development. This can be achieved by laser photocoagulation. The original model was developed in monkeys and later in rats.^[74,75] Many different laser types and illumination settings have been proposed, using argon, krypton or diode lasers emitting in the red, green or blue spectral regions.^[76] Spot sizes can vary between 50–500 μm , laser output 10–400 mW, and duration 0.05–0.1 s. Onset of vascular leakage occurs within one to three weeks following injury. Other surgical techniques have been proposed, mostly based on injection of vascular endothelial growth factor (VEGF) or VEGF-inducing substances, for specific research areas mostly related to molecular pathways in CNV genesis and progression.^[76]

6. Chick Chorioallantoic Membrane

The chick chorioallantoic membrane (CAM) assay is a commonly used method for studying angiogenic activities and drug delivery in vivo.^[77,78] It is based on the vascular membrane found in the eggs of birds and reptiles. The first tumor transplantation in the CAM was described a century ago, but CAM tumor models remain sparse and poorly characterized as compared to murine models.^[79,80]

The first day of incubation is considered the first day of embryonic development (embryo development day, EDD).^[78] Three extraembryonic membranes protect and nourish the embryo during its development: the yolk sac membrane, the amnion, and the CAM. The latter is a transparent and highly vascularized membrane formed during EDD four to five by the fusion of the mesodermal layers of both the allantois and the chorion. This results in a highly vascularized mesodermal structure in which arteries, veins, and an intricate capillary plexus will proliferate until EDD eleven.^[81] It is connected to the embryonic circulation by the allantoic arteries and veins, which are associated with lymphatic vessels.^[82] The CAM acts as a respiratory organ until hatching, stores excreted material, transports electrolytes (sodium and chloride) from the allantoic sac, and mobilizes calcium from the shell to start bone mineralization.^[83] Several features of the CAM change during embryonic development, such as the composition of the extracellular matrix, the degree of differentiation of both endothelial cells and vessels, the characteristics of the interendothelial junctions, and the location of the vessels within the CAM.^[82] It is thus crucial to use embryos at the same EDD. The CAM assay is characterized by several major advantages such as its ease of access, the extensive vascularization, the relatively simple experimental approach, and the naturally immunodeficient environment, thus enabling the use of human antibodies. It is a perfect model for photonics approaches

since it uses a very thin (<100 μm) and transparent membrane.

The CAM has been used as a host to study tumor cell intravasation and dissemination and formation of spontaneous metastases.^[84] After superficial inoculation, cells will penetrate the vasculature and develop metastatic locations in the embryo. The choice of cell type, however, is important since cell lines derived from tumors with a low metastatic potential exhibit the same behavior in the CAM and do not show any signs of invasive growth.^[85] Moreover, cells have to grow very fast since only five to nine days remain between tumor inoculation and hatching. Experimental metastasis is achieved much faster by direct injection of tumor cells in the allantoic vein. Nevertheless, one has to choose cell lines with invasive characteristics, identical to the ones that allow tumor growth in the membrane.^[85]

Before opening, fertilized chicken eggs are washed with sterile water and transferred to a hatching incubator at 37.4° and 80% humidity, equipped with an automatic rotator. At EDD three, under laminar flow, 6–7 mL of albumin are removed with a sterile syringe connected to a 20 G needle through a hole drilled at the narrow apex. A round window is cut into the shell, which allows detachment of the embryo from the eggshell. Embryo development is controlled and dead or malformed eggs are excluded. The window is then sealed with tape and static incubation is continued and controlled every two days until EDD ten. On EDD ten, a one centimeter inner diameter Teflon ring is placed on the CAM surface. Secondly, the CAM ectodermic epithelium is superficially abraded with a scalpel in the center of the ring and 40 μL of an exponentially growing cell suspension is deposited. The cell concentration is different for each cell line and for some it appears necessary to add growth factors such as VEGF. A vascularized tumor is obtained at EDD fourteen to fifteen and eggs need to be sacrificed at EDD seventeen before hatching. Figure 2 shows some typical images of a CAM implanted with EMT6 cells.

7. Lymphatic Metastases

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women and the second leading cause of death.^[86] Lymph node invasion is one of the first signs of tumor progression, due to the special features of lymphatic vessels, which for example allow for the easy traffic of interstitial fluids and immune cells.^[87] Correct lymph node status evaluation is thus essential in order to offer patients the most appropriate treatment option. Current clinical techniques to localize the first lymph node station (the so-called sentinel lymph node) involve the use of radiolabeled drugs. Their selectivity and specificity also depends on the degree of invasion of the node.^[88] Innovative diagnostic techniques should thus be tested on breast cancer

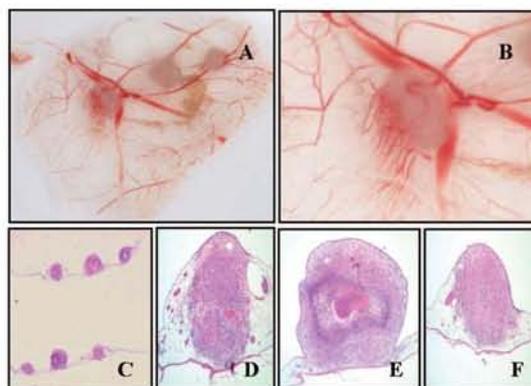


Figure 2. Images of EMT6 tumors on CAM at EDD 17 after fixation with 4% paraformaldehyde. Upper panel: photographs of tumors at low (A) and high (B) magnification. Lower panel: hematoxylin-eosin-safran staining of EMT6 tumors at 10x (C) and 40x (D-F) magnification.

models with a spontaneous development of lymphatic metastases.

Subcutaneous implantation of human breast cancer cell lines in immunodeficient rodents often fails to induce tumor progression, since the mouse microenvironment differs and orthotopic implants are more appropriate.^[89] Orthotopic implantation of cancer cells will lead to the formation of primary tumors and subsequent invasion of lymphatic or blood vessels and growth of secondary tumors.^[90] Syngeneic mouse models have been developed by rounds of transplantation and metastasis formation and selection.^[91] Numerous strains show either the absence of local tumor growth, absence of metastases, or dissemination, which is preferentially hematogenous or lymphatic.

As an example, 10^6 4T1 cells are injected in the first mammary fat pad of mice. After approximately three weeks tumors have reached the maximal ethical volume of 1000 mm^3 . Lymph node invasion is detected in 30–60% of animals depending on the technique used. The gold standard in cancer diagnosis remains of course pathology, but detection of single cells in a lymph node remains problematic, resulting in a low degree of tumor detection of only 30%. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) aims at the detection of cytokeratin 19, which is expressed by the tumor cells but not the native tissue, enhancing tumor detection by 20%.^[92] Figure 3 shows a mouse bearing an orthotopic breast cancer (not visible on this image) after subcutaneous administration of near-infrared quantum dots that migrate from the injection site to the first (sentinel) lymph node.

Review

M. D'Hallewin et al.

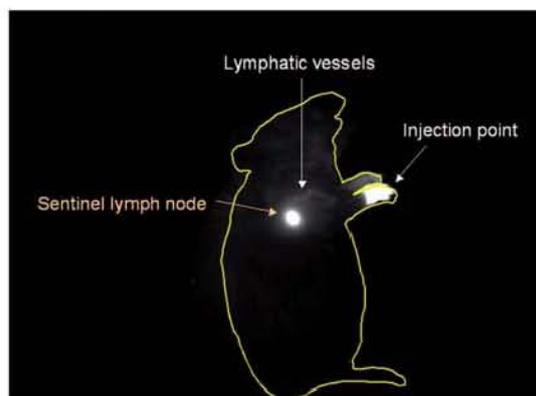


Figure 3. In vivo fluorescence imaging of the right flank of the mouse axillar lymph node five minutes after subcutaneous injection of 20 pmol of quantum dots. A Fluobeam imaging system (Fluoptics, Grenoble, France) was used with an excitation wavelength of 690 nm and a charge-coupled device (CCD) camera with a 750 nm long pass emission filter and an exposure time of 10 ms.

8. Organ Metastases

One of the easiest organ metastasis models is the peritoneal carcinomatosis model. The original report of this model by Goldie et al. dates from 1951.^[93] They found that tumor cells inoculated in the peritoneal cavity were able to grow in the peritoneal fluid, with the same pattern as in vitro and a growth rate proportional to the number of inoculated cells. Injection of peritoneal fluid of inoculated mice into other mice led to the development of peritoneal lesions, identical to the ones observed after injection of mashed tumor-bearing organs or subcutaneously induced tumors.^[94] This model is now widely used in oncological research with either syngeneic cell strains in rats or human cell lines in nude rodents.^[95,96] Tumors are multifocal and nonencapsulated with a minimal amount of necrosis. According to the cell line used, usually $1\text{--}2 \times 10^6$ cells are injected intraperitoneally and peritoneal growth is observed after one to three weeks following inoculation. These tumors further invade adjacent organs, which can lead to retroperitoneal, supradiaphragmatic, and abdominal wall lesions.^[97] This model is also capable of inducing distant metastases and has been extensively described compared to subcutaneous tumors in nude mice.^[97] Tumor spread is both lymphatic, with massive invasion of mediastinal lymph nodes, and hematogenous, with lung metastases.

Liver metastases are a common feature associated with colorectal cancer. The optical properties of this extremely highly vascularized organ necessitate an orthotopic model for theranostic approaches. When a solitary lesion is required, a subcapsular or intraparenchymal administration after laparotomy of either a cell suspension or tumor fragments is a reproducible method with acceptable com-

plication rates.^[98,99] Creating metastases that are more closely related to the clinical context necessitates vascular migration of cells. Orthotopic implantation of cells can induce spontaneous metastases but the model has a low reproducibility.^[100] Direct intrasplenic or intraportal injection have the highest reproducibility rates but necessitate certain surgical skills to reduce perioperative mortality.^[101,102] The choice of cell line seems to be very important since tumor growth will be observed more with aggressive cell types.

Bone metastases can be an interesting topic for optical diagnosis. Orthotopic syngeneic growing tumors in rodents seldom metastasize to the bone. Some selected combinations have been shown to produce skeletal localization from breast or prostate origin.^[103,104] Reports on human cell lines in immunodeficient animals are more frequent and have been used in imaging studies.^[105–107]

9. Summary and Outlook

Many animal models have been developed for drug screening, including genetically modified animals, in order to be as closely as possible comparable to humans. When considering phototheranostics, these models are inappropriate. Diagnostic applications first of all require identical optical characteristics of tissues from humans and animals. Orthotopic models are thus mandatory, taking into account the differences in tissue thickness in rodents. Ideally, tumors should be induced so that all changes observed during carcinogenesis in humans can be reproduced. A drawback of such animal models is the time needed to obtain tumor growth, as well as a relative lack of reproducibility.

Rough screening of the effect of PDT can be performed in the simplest animal model that consists of the subcutaneous injection of tumor cells. When more specific questions are to be addressed, other models including the CAM model must be critically assessed with regard to the parameters that are to be investigated.

References

- [1] S. Harrison in *Tumor Models in Cancer Research* (Ed.: B. A. Teicher), Humana Press Inc., New Jersey, **2002**, pp. 3–19.
- [2] J. M. Venditti, R. A. Wesley, J. Plowman, *Adv. Pharmacol. Chemother.* **1984**, *20*, 1–20.
- [3] K. G. Phillips, R. Samatham, N. Choudhury, J. C. Gladish, P. Thuillier, S. L. Jacques, *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 041514.
- [4] M. Amouroux, G. Díaz-Ayil, W. C. Blondel, G. Bourghackly, A. Leroux, F. Guillemain, *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 014011.
- [5] J. A. Jo, B. E. Applegate, J. Park, S. Shrestha, P. Pande, I. B. Gimenez-Conti, J. L. Brandon, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2010**, *57*, 2596–2599.
- [6] H. B. Hewitt, *Br. J. Cancer* **1953**, *7*, 367–383.

- [7] R. Stephenson, C. P. Dinney, K. Gohji, N. G. Ordóñez, J. J. Killion, I. J. Fidler, *Invest. Urol.* **1981**, *19*, 20–23.
- [8] B. A. Teicher, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2435–2443.
- [9] Y. Kang, M. Omura, A. Suzuki, T. Oka, Y. Nakagami, C. Cheng, Y. Nagashima, T. Inoue, *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 996–1001.
- [10] M. G. Donelli, R. Rosso, S. Garattini, *Int. J. Cancer* **1967**, *2*, 421–424.
- [11] W. S. Chan, C. M. West, J. V. Moore, I. R. Hart, *Br. J. Cancer* **1991**, *64*, 827–832.
- [12] S. L. Gibson, T. H. Foster, R. H. Feins, R. F. Raubertas, M. A. Fallon, R. Hilf, *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 473–481.
- [13] B. Chen, B. W. Pogue, X. Zhou, J. A. O'Hara, N. Solban, E. Demidenko, P. J. Hoopes, T. Hasan, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 720–727.
- [14] R. Splinter, W. F. Cheong, M. J. van Gemert, A. J. Welch, *Lasers Surg. Med.* **1989**, *9*, 37–41.
- [15] P. Mroz, A. Szokalska, M. X. Wu, M. R. Hamblin, *PLoS One* **2010**, *5*, e15194.
- [16] B. C. Giovanella, S. O. Yim, J. S. Stehlin, L. J. Williams Jr., *J. Natl. Cancer Inst.* **1972**, *48*, 1531–1533.
- [17] X. Wang, Z. An, J. Geller, R. M. Hoffman, *Prostate* **1999**, *39*, 182–186.
- [18] M. Pocard, H. Tsukui, R. J. Salmon, B. Dutrillaux, M. F. Poupon, *In Vivo* **1996**, *10*, 463–469.
- [19] J. I. Johnson, S. Decker, D. Zaharevitz, L. V. Rubinstein, J. M. Venditti, S. Schepartz, S. Kalyandrug, M. Christian, S. Arbuck, M. Hollingshead, E. A. Sausville, *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 1424–1431.
- [20] C. C. Scholz, D. P. Berger, B. R. Winterhalter, H. Hens, H. H. Fiebig, *Eur. J. Cancer* **1990**, *26*, 901–905.
- [21] S. El Khatib, S. Berrahmoune, A. Leroux, L. Bezdetnaya, F. Guillemin, M. A. D'Hallewin, *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 1327–1331.
- [22] M. Triesscheijn, M. Ruevekamp, R. Out, T. J. Van Berkel, J. Schellens, P. Baas, F. A. Stewart, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 113–122.
- [23] T. Glanzmann, M. Forrer, S. A. Blant, A. Woodtli, P. Grosjean, D. Braichotte, H. van den Bergh, P. Monnier, G. Wagnières, *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *57*, 22–32.
- [24] H. J. De Vries, J. E. Zeegelaar, E. Middelkoop, G. Gijssbers, J. Van Marle, C. H. Wildevuur, W. Westerhof, *Br. J. Dermatol.* **1995**, *132*, 690–697.
- [25] H. J. De Vries, E. Middelkoop, J. R. Mekkes, R. P. Dutrieux, C. H. Wildevuur, H. Westerhof, *Wound Repair Regen.* **1994**, *2*, 37–47.
- [26] D. Schwartz, *J. Anat.* **1977**, *124*, 401–411.
- [27] Y. Perry, M. W. Epperly, H. C. Fernando, E. Klein, S. Finkelstein, J. S. Greenberger, J. D. Luketich, *J. Surg. Res.* **2005**, *123*, 67–74.
- [28] B. Funke, A. Jungel, S. Schastak, K. Wiedemeyer, F. Emmrich, U. Sack, *Lasers Surg. Med.* **2006**, *38*, 866–874.
- [29] A. Hansch, O. Frey, M. Gajda, G. Susanna, J. Boettcher, R. Bräuer, W. A. Kaiser, *Lasers Surg. Med.* **2008**, *40*, 265–272.
- [30] K. Trauner, R. Gandour-Edwards, M. Bamberg, N. S. Nishioka, T. Flotte, S. Autry, T. Hasan, *Lasers Surg. Med.* **1998**, *22*, 147–156.
- [31] A. D. Beischer, P. Bhathal, R. de Steiger, D. Penn, S. Stylli, *ANZ J. Surg.* **2002**, *72*, 517–522.
- [32] D. Gabriel, N. Busso, Z. A. So, H. van den Bergh, R. Gurny, N. Lange, *J. Controlled Release* **2009**, *138*, 225–234.
- [33] T. Kikuchi, T. Sakuta, T. Yamaguchi, *Osteoarthritis Cartilage* **1998**, *6*, 177–186.
- [34] W. Hou, L. Meng, L. Tian, W. Zhu, C. Jiang, S. Lu, *Clin. Exp. Rheumatol.* **2010**, *28*, 532–538.
- [35] C. Murta-Nascimento, B. J. Schmitz-Dräger, M. P. Zeegers, G. Steineck, M. Kogevinas, F. X. Real, N. Malats, *World J. Urol.* **2007**, *25*, 285–295.
- [36] I. Fukui, M. Yokokawa, H. Sekine, T. Yamada, K. Hosoda, D. Ishiwata, K. Oka, T. Sarada, T. Tohma, T. Yamada, *Cancer* **1987**, *59*, 164–173.
- [37] Y. Shen, H. B. Grossman, A. Stenzl, M. Burger, Y. Fradet, L. A. Mynderse, M. S. Soloway, J. A. Witjes, M. Kriegmair, A. Karl, *J. Urol.* **2010**, *184*, 1907–1913.
- [38] S. M. Cohen, J. P. Jacobs, M. Arai, S. Fukushima, G. H. Friedell, *Invest. Urol.* **1981**, *19*, 136–141.
- [39] R. Oyasu, *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 747–755.
- [40] C. J. Herman, P. D. Vegt, F. M. Debruyne, G. P. Vooijs, F. C. Ramaekers, *Am. J. Pathol.* **1985**, *120*, 419–426.
- [41] E. S. Chan, A. R. Patel, A. K. Smith, J. B. Klein, A. A. Thomas, W. D. Heston, W. A. Larchian, *J. Urol.* **2009**, *182*, 2926–2931.
- [42] D. R. Siemens, J. C. Austin, W. A. See, J. Tartaglia, T. L. Ratliff, *J. Urol.* **2001**, *165*, 667–671.
- [43] P. Sindhvani, J. A. Hampton, M. M. Baig, R. Keck, S. H. Selman, *J. Urol.* **2001**, *166*, 1498–1501.
- [44] P. E. Werthman, K. E. Drazan, J. T. Rosenthal, R. Khalili, A. Shaked, *J. Urol.* **1996**, *155*, 753–756.
- [45] J. F. Bisson, R. M. Parache, P. Droulle, D. Notter, C. Vigneron, F. Guillemin, *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 280–285.
- [46] S. Berrahmoune, L. Bezdetnaya, A. Leroux, F. Guillemin, M. A. D'Hallewin, *J. Urol.* **2009**, *181*, 1381–1386.
- [47] B. A. Hadaschik, P. C. Black, J. C. Sea, A. R. Metwalli, L. Fazli, C. P. Dinney, M. E. Gleave, A. I. So, *BJU Int.* **2007**, *100*, 1377–1384.
- [48] T. Watanabe, N. Shinohara, A. Sazawa, T. Harabayashi, Y. Ogiso, T. Koyanagi, M. Takiguchi, A. Hashimoto, N. Kuzumaki, M. Yamashita, M. Tanaka, H. B. Grossman, W. F. Benedict, *Cancer Gene Ther.* **2000**, *7*, 1575–1580.
- [49] Z. Xiao, T. J. McCallum, K. M. Brown, G. G. Miller, S. B. Halls, I. Parney, R. B. Moore, *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 638–646.
- [50] L. Chong, Y. Ruping, B. Jiancheng, Y. Guohong, F. Yougang, W. Jiansong, G. Xiang, H. Jie, X. Shusheng, *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 394–398.
- [51] H. C. Arentsen, K. Hendricksen, E. Oosterwijk, J. A. Witjes, *World J. Urol.* **2009**, *27*, 313–317.
- [52] K. Hendricksen, J. Molkenboer-Kuennen, E. Oosterwijk, C. A. Hulsbergen-van de Kaa, J. A. Witjes, *BJU Int.* **2008**, *101*, 889–893.
- [53] J. Ferley, F. Bray, P. Pisani, D. M. Parkin, *IARC Cancer Base*, IARC Press, Lyon, **2004**.
- [54] G. L. Day, W. J. Blot, *Cancer* **1992**, *70*, 14–19.
- [55] S. E. Scott, E. A. Grunfeld, M. McGurk, *Community Dent. Oral Epidemiol.* **2006**, *34*, 337–343.
- [56] S. Q. Lam, J. Hung, B. Palcic, *Trends Photochem. Photobiol.* **1991**, *3*, 309–322.
- [57] E. Vairaktaris, S. Spyridonidou, V. Papakosta, A. Vylliotis, A. Lazaris, D. Perrea, C. Yapijakis, E. Patsouris, *Oral Oncol.* **2008**, *44*, 315–324.
- [58] J. J. Salley, *J. Dent. Res.* **1954**, *33*, 253–262.
- [59] E. Johansen, *J. Dent. Res.* **1952**, *3*, 361–365.
- [60] A. L. Morris, *J. Dent. Res.* **1961**, *40*, 3–15.
- [61] B. Heller, A. M. Klufftinger, N. L. Davis, N. F. Quenville, *Am. J. Surg.* **1996**, *172*, 678–680.
- [62] I. Pathak, N. L. Davis, Y. N. Hsiang, N. F. Quenville, B. Palcic, *Am. J. Surg.* **1995**, *170*, 423–426.

Review

M. D'Hallewin et al.

- [63] S. Nagini, P. V. Letchoumy, T. A. Ramachandran, *Oral Oncol.* **2009**, *45*, 31–37.
- [64] F. Walker, J. Carter, G. P. Crawford, H. Laird, A. M. Lessells, J. E. Pollet, *Br. J. Exp. Pathol.* **1970**, *51*, 379–384.
- [65] D. G. Farwell, J. D. Meier, J. Park, Y. Sun, H. Coffman, B. Poirier, J. Phipps, S. Tinling, D. J. Enepekides, L. Marcu, *Arch. Otolaryngol., Head Neck Surg.* **2010**, *136*, 126–133.
- [66] Y. Sun, J. Phipps, D. S. Elson, H. Stoy, S. Tinling, J. Meier, B. Poirier, F. S. Chuang, D. G. Farwell, L. Marcu, *Opt. Lett.* **2009**, *34*, 2081–2083.
- [67] See Ref. [66].
- [68] R. N. Graf, F. E. Robles, X. Chen, A. Wax, *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 064030.
- [69] M. C. Skala, K. M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K. W. Eliciciri, J. G. White, N. Ramanujam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 19494–19499.
- [70] U. T. Brunk, A. Terman, *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 611–619.
- [71] A. R. Wielgus, R. J. Collier, E. Martin, F. B. Lih, K. B. Tomer, C. F. Chignell, J. E. Roberts, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1505–1512.
- [72] T. Maeda, A. Maeda, M. Matosky, K. Okano, S. Roos, J. Tang, K. Palczewski, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50*, 4917–4925.
- [73] M. Nozaki, B. J. Raisler, E. Sakurai, J. V. Sarma, S. R. Barnum, J. D. Lambiris, Y. Chen, K. Zhang, B. K. Ambati, J. Z. Baffi, J. Ambati, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 2328–2333.
- [74] S. J. Ryan, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **1979**, *127*, 707–745.
- [75] E. T. Dobi, C. A. Puliafito, M. Destro, *Arch. Ophthalmol.* **1989**, *107*, 264–269.
- [76] H. E. Grossniklaus, S. J. Kang, L. Berglin, *Prog. Retin. Eye Res.* **2010**, *29*, 500–519.
- [77] M. Hagedorn, M. Balke, A. Schmidt, W. Bloch, H. Kurz, S. Javerzat, B. Rousseau, J. Wilting, A. Bikfalvi, *Dev. Dyn.* **2004**, *230*, 23–33.
- [78] A. Vargas, M. Zeisser-Labouebe, N. Lange, R. Gurny, F. Delie, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1162–1176.
- [79] J. B. Murphy, P. Rous, *J. Exp. Med.* **1912**, *15*, 119–132.
- [80] E. I. Deryugina, J. P. Quigley, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 1119–1130.
- [81] D. O. DeFouw, V. J. Rizzo, R. Steinfeld, R. N. Feinberg, *Microvasc. Res.* **1989**, *38*, 136–147.
- [82] D. Ribatti, B. Nico, A. Vacca, L. Roncali, P. H. Burri, V. Djonov, *Anat. Rec.* **2001**, *264*, 317–324.
- [83] K. Kunzi-Rapp, P. Kaskel, R. Steiner, R. U. Peter, G. Krahn, *Pigment Cell Res.* **2001**, *14*, 9–13.
- [84] E. I. Deryugina, E. M. Conn, A. Wortmann, J. J. Partridge, T. A. Kupriyanova, V. C. Ardi, J. D. Hooper, J. P. Quigley, *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7*, 1197–1211.
- [85] M. C. Subauste, T. A. Kupriyanova, E. M. Conn, V. C. Ardi, J. P. Quigley, E. I. Deryugina, *Clin. Exp. Metastasis* **2009**, *26*, 1033–1047.
- [86] T. Morimoto, T. Nagao, K. Okazaki, M. Kira, Y. Nakagawa, A. Tangoku, *Breast Cancer* **2009**, *16*, 2–9.
- [87] J. P. Sleeman, W. Thiele, *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2747–2756.
- [88] T. Heuser, T. Rink, E. Weller, H. Fitz, H. H. Zippel, R. Kreienberg, T. Kühn, *Breast Cancer Res. Treat.* **2001**, *67*, 125–132.
- [89] X. Fu, P. Le, R. M. Hoffman, *Anticancer Res.* **1993**, *13*, 9001–9004.
- [90] G. H. Heppner, F. R. Miller, P. M. Shekhar, *Breast Cancer Res.* **2000**, *2*, 331–334.
- [91] C. J. Aslakson, F. R. Miller, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 1399–1405.
- [92] G. Cserni, I. Amendoeira, N. Apostolikas, J. P. Bellocq, S. Bianchi, G. Bussolati, W. Boecker, B. Borisch, C. E. Connolly, T. Decker, P. Dervan, M. Drijkoningen, I. O. Ellis, C. W. Elston, V. Eusebi, D. Faverly, P. Heikkila, R. Holland, H. Kerner, J. Kulka, J. Jacquemier, M. Lacerda, J. Martinez-Penuela, C. De Miguel, J. L. Peterse, F. Rank, P. Regitnig, A. Reiner, A. Sapino, B. Sigal-Zafrani, A. M. Tanous, S. Thorstenson, E. Zozaya, C. A. Wells, *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 1654–1667.
- [93] H. Goldie, M. D. Felix, *Cancer Res.* **1951**, *11*, 73–80.
- [94] H. Goldie, B. R. Jeffries, A. M. Jones, M. Walker, *Cancer Res.* **1953**, *13*, 566–572.
- [95] P. Collinet, F. Sabban, M. Cosson, M. O. Farine, R. Villet, D. Vinatier, S. Mordon, *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 647–651.
- [96] N. J. Harlaar, J. W. Hesselink, J. S. de Jong, G. M. van Dam, *Eur. Surg. Res.* **2010**, *45*, 308–313.
- [97] A. P. Kyriazis, L. DiPersio, G. Michael, A. J. Pesce, J. D. Stinett, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3186–3190.
- [98] D. Lechaux, A. Gervais, L. Dazord, P. A. Eliat, F. Francoini, L. Lemaire, N. Rioux-Leclercq, V. Catros-Quemener, *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 151–158.
- [99] F. Marchal, N. Tran, S. Marchal, A. Leroux, L. Bolotine, F. Guillemin, J. P. Villemot, *Oncol. Rep.* **2005**, *14*, 1203–1207.
- [100] A. Thalheimer, C. Otto, M. Bueter, B. Illert, S. Gattenlohner, M. Gasser, M. Fein, C. T. Germer, A. M. Waaga-Gasser, *Eur. Surg. Res.* **2009**, *42*, 195–200.
- [101] R. Lafreniere, S. A. Rosenberg, *J. Natl. Cancer Inst.* **1986**, *76*, 309–322.
- [102] G. Gambarota, A. Veltien, H. van Laarhoven, M. Philippen, A. Jonker, O. R. Mook, W. M. Frederiks, A. Heerschap, *MAGMA* **2004**, *17*, 281–287.
- [103] M. Lelekakis, J. M. Moseley, T. J. Martin, D. Hards, E. Williams, P. Ho, D. Lowen, J. Javni, F. R. Miller, A. Slavin, R. L. Anderson, *Clin. Exp. Metastasis* **1999**, *17*, 163–170.
- [104] M. Koutsilieris, *In Vivo* **1992**, *6*, 199–203.
- [105] A. Wetterwald, G. van der Pluijm, I. Que, B. Sijmons, J. Buijs, M. Karperien, C. W. Löwik, E. Gautschi, G. N. Thalmann, M. G. Cecchini, *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 1143–1153.
- [106] M. Edinger, T. J. Sweeney, A. A. Tucker, A. B. Olomu, R. S. Negrin, C. H. Contag, *Neoplasia* **1999**, *1*, 303–310.
- [107] M. Yang, E. Baranov, A. R. Moossa, S. Penman, R. M. Hoffman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 12278–12282.

Received: July 12, 2011

Accepted: April 11, 2012

Published online: August 21, 2012

B. Synthesis and characterization of near infrared Cu-In-Se/ZnS core/Shell Quantum Dots for in vivo imaging

E. Cassette, T. Pons, C. Bouet, M. Helle, L. Bezdetnaya, F. Marchal, B. Dubertret

Chemistry of Materials, 2010 22 (22), pp 6117–6124

Synthesis and Characterization of Near-Infrared Cu–In–Se/ZnS Core/Shell Quantum Dots for *In vivo* ImagingE. Cassette,[†] T. Pons,^{*,†} C. Bouet,[†] M. Helle,[‡] L. Bezdetsnaya,[‡] F. Marchal,[‡] and B. Dubertret[†][†]Laboratoire de Physique et Etude des Matériaux, UMR 8213, ESPCI, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, 10, rue Vauquelin, 75005 Paris, France, and [‡]Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received July 6, 2010. Revised Manuscript Received September 28, 2010

Near-infrared (NIR) semiconductor quantum dots (QDs) represent promising fluorescent probes for biological and biomedical imaging. CuInSe₂ is a good candidate for these applications due to its bandgap in the near-infrared and the reduced toxicity of its components compared to other NIR QD materials (CdTe, CdHgTe, PbS, etc.). Here we present a simple one-pot synthetic route without injection to make fluorescent sphalerite Cu–In–Se core and Cu–In–Se/ZnS core/shell QDs. We show that the photoluminescence (PL) of the resulting core QDs can be tuned from ~700 nm to ~1 μm depending on the QD size (from ~2 to ~5 nm in diameter). The optical and structural properties of these QDs are consistent with charge recombination via donor–acceptor levels instead of direct excitonic recombination. Finally, we show that the growth of a ZnS shell around these QDs increases their PL quantum yield substantially (up to 40–50% at 800 nm) and allows preservation of their PL properties after solubilization into water and *in vivo*, as demonstrated by detection of the regional lymph node in a mouse.

Semiconductor nanocrystals or quantum dots (QDs) have emerged as a novel class of light-absorbing and -emitting materials for many applications (LEDs, photovoltaics, thin film transistors, etc.) because of their unique electronic and optical properties.^{1–3} In addition, their high extinction coefficient, brightness, and photostability make them promising fluorescent probes for biological imaging.^{4,5} These diverse and promising applications have triggered considerable progress in the synthesis of core and core–shell QDs composed of many II–VI, IV–VI, and III–V materials (see, for examples, refs 6 and 7 and references therein). Because the bandgap of these particles depends on both their size and composition, these QDs now span a broad wavelength range, from the UV (CdS, ZnSe, etc.) to the infrared (PbS, PbSe, Cd₃P₂, etc.). The near-infrared (NIR) range (~700–1100 nm) corresponds to a spectral region of minimal absorbance

and diffusion by biological tissues and is particularly interesting for *in vivo* fluorescence imaging applications.⁸ Near-infrared QDs are therefore promising fluorescent probes for several biomedical applications such as optically guided surgery.^{9,10} However, so far applications of QDs to the clinical field have been hampered by the high toxicity of the NIR QD constituents as in CdTe, CdHgTe, and PbS. Other applications of NIR QDs, including photovoltaics, would strongly benefit from the development of less toxic and more environmentally friendly QD materials.

CuInS₂ and CuInSe₂ are I–III–VI semiconductors with direct bandgaps of 1.53 and 1.04 eV, respectively, and are widely used as thin films in photovoltaic applications.^{11–14} There has been recently a renewed interest in the synthesis of CuInS₂ and CuInSe₂ QDs for *in vivo*

*Corresponding author. E-mail: thomas.pons@espci.fr.

- (1) Efros, A. L.; Rosen, M. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 475–521.
- (2) Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545–610.
- (3) Talapin, D. V.; Lee, J. S.; Kovalenko, M. V.; Shevchenko, E. V. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 389–458.
- (4) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446.
- (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.; Weiss, S. *Science* **2005**, *307*, 538–544.
- (6) Park, J.; Joo, J.; Kwon, S. G.; Jang, Y.; Hyeon, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4630–4660.
- (7) Reiss, P.; Protiere, M.; Li, L. *Small* **2009**, *5*, 154–168, and references therein.

- (8) Frangioni, J. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 626–634.
- (9) Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 41–46.
- (10) Kim, S.; Lim, Y. T.; Soltesz, E. G.; De Grand, A. M.; Lee, J.; Nakayama, A.; Parker, J. A.; Mihaljevic, T.; Laurence, R. G.; Dor, D. M.; et al. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 93–97.
- (11) Ramanathan, K.; Contreras, M. A.; Perkins, C. L.; Asher, S.; Hasoon, F. S.; Keane, J.; Young, D.; Romero, M.; Metzger, W.; Noufi, R.; et al. *Prog. Photovoltaics* **2003**, *11*, 225–230.
- (12) Klenk, R.; Klaer, J.; Scheer, R.; Lux-Steiner, M. C.; Luck, I.; Meyer, N.; Ruhle, U. *Thin Solid Films* **2005**, *480*, 509–514.
- (13) Romeo, A.; Terheggen, A.; Abou-Ras, D.; Batzner, D. L.; Haug, F. J.; Kalin, M.; Rudmann, D.; Tiwari, A. N. *Prog. Photovoltaics* **2004**, *12*, 93–111.
- (14) Repins, I.; Contreras, M. A.; Egaas, B.; DeHart, C.; Scharf, J.; Perkins, C. L.; To, B.; Noufi, R. *Prog. Photovoltaics* **2008**, *16*, 235–239.

imaging or photovoltaics.^{15–21} Recent reports have shown in particular that core/shell CuInS₂/ZnS QDs may reach reasonably high fluorescence quantum yields in the visible and NIR range, up to ~800–850 nm, and offer promising alternatives to II–VI QDs for in vivo fluorescence imaging because of the absence of heavily toxic and/or carcinogenic Cd, Pb and Hg metal ions.^{17,19,22} We have recently shown that CuInS₂/ZnS QDs present a much reduced toxicity compared to CdTeSe/CdZnS core/shell QDs.²² CuInSe₂ QDs could also constitute promising probes for in vivo imaging. In particular, they could reach longer wavelengths (theoretically up to ~1200 nm) and so allow both excitation and emission processes to occur in an optimal wavelength range (~800–950 nm). Moreover, the toxicity of their components is reduced compared to cadmium, lead, and mercury. There have been relatively few reports on CuInSe₂ QD synthesis, and most of them did not report any photoluminescence (PL).^{16,20,23–26} Recently, Nose et al. reported CuInSe₂ QDs emitting between 820 and 940 nm but with PL quantum yields (QY) less than 5%.²¹ Allen et al. reported the synthesis of Cu–In–Se QDs with PL QY up to 25%.¹⁸ However, the latter QDs could not maintain their PL properties in water due to the lack of a high bandgap shell to protect the Cu–In–Se cores, and the synthesis involved expensive and hazardous bis(trimethylsilyl)selenide precursor. In this manuscript we report a simple synthetic scheme without injection using selenourea as a selenium precursor, which yields Cu–In–Se core and Cu–In–Se/ZnS core/shell materials emitting from ~700 nm to ~1040 nm. We characterize their photophysical and structural properties, discuss the origin of their photoluminescence and demonstrate their application for biological *in vivo* imaging.

Experimental Section

Chemicals. Tri-*n*-octylphosphine (CYTOP-380, TOP) was a gift from CYTEC. Di-*n*-octylamine (98%, DOA) was purchased from Acros Organics. Selenourea was purchased from Strem Chemicals (>99%, SeU). Oleylamine (>70%, OAm), 1-octadecene (90%, ODE), 1-dodecanethiol (>97%, DDT), copper(I)

chloride (>99%, CuCl), indium(III) chloride (99.999%, InCl₃), zinc chloride (98%, ZnCl₂) and potassium ethylxanthogenate (>98%, K(EtX)) were purchased from Sigma-Aldrich. Zinc nitrate hexahydrate (>98%, Zn(NO₃)₂ · 6 H₂O) and sodium oleate (>82%, Na(OA)) were purchased from Riedel-de Haën. All chemicals were used as provided without further purification. TOP, InCl₃, and SeU were stored under an Ar atmosphere, and SeU was additionally kept in the dark.

Cu–In–Se QD Synthesis. In a typical core synthesis, all precursors (0.4 mmol CuCl, 0.4 mmol InCl₃, 0.8 mmol SeU) were introduced in a three-necked flask with 10 mL of ODE and 4 mL of TOP and briefly sonicated. Then, 4 mL of OAm and 2 mL of DDT were added. The solution was stirred and degassed for 30 min under vacuum. The flask was then refilled with argon and the solution heated to final temperatures T_f ranging from 80 to 250 °C. Heating was stopped immediately after the target temperature was reached and the flask was cooled down to room temperature. The QDs were precipitated in ethanol (acetone may be added typically up to 5% to avoid phase separation) and centrifuged. Cu–In–Se cores were then redispersed in a non-polar solvent, typically in 10 mL of hexane.

ZnS Precursor Preparation. Zinc bis(ethylxanthogenate) (Zn(EtX)₂) was prepared from K(EtX) and ZnCl₂ as follows: 10 mmol of ZnCl₂ and 20 mmol of K(EtX) were separately dissolved in 20 mL of distilled water. The solutions were slowly mixed under stirring to form a white precipitate that was isolated, washed for several cycles with water, and dried. Zn(OA)₂ was prepared from Zn(NO₃)₂ and Na(OA): 15 mmol of Zn(NO₃)₂ dissolved in 40 mL of methanol were added to a solution of 30 mmol of Na(OA) dissolved in 200 mL of methanol. The resulting white precipitate was isolated, washed, and dried.

Cu–In–Se/ZnS Core/Shell QD Synthesis. Half of the CuInSe₂ cores prepared as indicated above were redispersed in 4 mL of ODE and 1 mL of OAm into a new three-neck flask. The flask was degassed under vacuum at room temperature to remove hexane and H₂O traces. A solution of Zn(EtX)₂ and Zn(OA)₂ (respectively 40 and 500 mg) dispersed in ODE (2 mL), TOP (3 mL), and DOA (1 mL) was loaded into an injection syringe. One milliliter of this solution was introduced at room temperature into the flask, and the temperature was raised to 190 °C. The rest of ZnS precursors were added dropwise into the flask in 1 h under argon atmosphere. The reaction flask was cooled down at the end of the injection. The resulting Cu–In–Se/ZnS QDs were precipitated in ethanol and acetone and redispersed in hexane.

Optical Characterization. All optical measurements were performed at room temperature with QDs dispersed in hexane or water. Absorption measurements were carried out with a Cary 5E UV–vis–NIR spectrophotometer (Varian). Photoluminescence (PL), photoluminescence excitation (PLE), integrated photoluminescence excitation (IPLE) spectra and time-resolved fluorescence were acquired using a FCS900 spectrometer (Edinburgh Instruments) equipped with R928-P and R5509–72 photomultipliers (Hamamatsu) and a USB2000 fluorimeter (Ocean Optics). PLE and IPLE spectra of QD solutions with optical densities below 0.1 at 300 nm were recorded using excitation wavelengths ranging from 300 to 800 nm. Each PL spectra was normalized by the excitation intensity and then integrated over all emission wavelengths. This integrated intensity was plotted versus the excitation wavelength to provide the IPLE spectrum. The sample fluorescence quantum yields were evaluated in comparison with rhodamine 6G in ethanol as reference (excited at 530 nm) or Indocyanine Green in dimethylsulfoxide for NIR samples (excited at 750 nm).

- (15) Panthani, M. G.; Akhavan, V.; Goodfellow, B.; Schmidtke, J. P.; Dunn, L.; Dodabalapur, A.; Barbara, P. F.; Korgel, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16770–16777.
- (16) Guo, Q.; Kim, S. J.; Kar, M.; Shafarman, W. N.; Birkmire, R. W.; Stach, E. A.; Agrawal, R.; Hillhouse, H. W. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2982–2987.
- (17) Xie, R.; Rutherford, M.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5691–5697.
- (18) Allen, P. M.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9240–9241.
- (19) Li, L.; Daou, T. J.; Texier, I.; Kim Chi, T. T.; Liem, N. Q.; Reiss, P. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2422–2429.
- (20) Koo, B.; Patel, R. N.; Korgel, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3134–3135.
- (21) Nose, K.; Omata, T.; Otsuka-Yao-Matsuo, S. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 3455–3460.
- (22) Pons, T.; Pic, E.; Lequeux, N.; Cassette, E.; Bezdalnaya, L.; Guillemin, F. o.; Marchal, F. d. r.; Dubertret, B. *ACS Nano* **2010**, *4*, 2531–2538.
- (23) Castro, S. L.; Bailey, S. G.; Raffaele, R. P.; Banger, K. K.; Hepp, A. F. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3142–3147.
- (24) Tang, J.; Hinds, S.; Kelley, S. O.; Sargent, E. H. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6906–6910.
- (25) Zhong, H. Z.; Li, Y. C.; Ye, M. F.; Zhu, Z. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 025602.
- (26) Norako, M. E.; Brutchey, R. L. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 1613–1615.

Structural Characterization. For the following characterizations, QDs were washed by several cycles of precipitation/redispersion with ethanol and acetone to remove excess organic components. High resolution transmission electron microscopy (HRTEM) images were acquired on a JEOL 2010 field electron gun microscope operated at 200 keV. Elemental analysis was performed by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) on a Hitachi S-3600N scanning electron microscope operated at 20 keV. Powder X-ray diffraction (XRD) patterns were acquired using a Philips X'Pert diffractometer with a Cu K α source. The widths of the XRD peaks are related to the crystallite size by the Scherrer formula

$$\text{FWHM} = \frac{0.89\lambda_{\text{CuK}\alpha}}{d\cos(\theta)}$$

where fwhm is the full width half-maximum of the peak, $\lambda_{\text{CuK}\alpha}$ is the wavelength of the Cu K α X-ray source, d is the average crystallite size, and θ is the diffraction angle.

Solubilization in Water. Cu–In–Se/ZnS QDs were precipitated in ethanol and resuspended in chloroform before cap exchange with dithiol sulfobetaine zwitterionic ligands in a water/chloroform biphasic solution as previously described.²⁷ The resulting QDs were purified by ultrafiltration (Vivaspin, 10 kDa cutoff) and ultracentrifugation on 10–40% sucrose gradients for 20 min on a Optima-Max Beckman-Coulter ultracentrifuge (MLS-50 rotor, 50,000 rpm). The QD band was extracted, purified by ultrafiltration and finally resuspended in 20 mM NaCl aqueous solution.

Small Animal Imaging. Three 10-week-old female Balb/c mice (Balb/cOlaHsd) (Harlan, Gannat, France) weighing 20 g were used in these experiments. Mice were kept in 12 h light/dark cycle and had access to food and water ad libitum. Specific purified diet (TD.94045, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) was used to reduce tissue autofluorescence in the NIR spectral region. The animals received care in accordance with established guidelines of FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) and animal procedures were performed in compliance with institutional and national guidelines. The injections were performed under gaseous anesthesia with isoflurane (Forene, Abbott France, Rungis, France) by introducing the mice into a chamber where the air flow with 4.5% of isoflurane was adjusted to 500 mL/min. The anesthesia was maintained by placing the mice under a mask with 2.5% of isoflurane and the air flow of 250 mL/min. Mice were injected subcutaneously (s.c.) in the distal part of the right anterior paw with 20 μ L of a solution of \sim 800 nm emitting Cu–In–Se/ZnS QDs (\sim 0.5 optical density at 690 nm) in phosphate buffer saline (PBS). After product delivery, the right paw was kneaded to improve product migration. *In vivo* optical imaging of QDs was performed using a Fluobeam 700 NIR imaging system (Fluoptics, Grenoble, France). This system is composed of a laser emitting at 690 nm, a 750 nm long-pass emission filter and a CCD camera. The power density of laser irradiation on tissue was 7 mW/cm² and the CCD exposure time was 10 ms. The region of interest (ROI) was depilated using a commercial hair-removal cream before imaging. The QD injection point was hidden to improve the visualization of the lymph node.

ICP-MS Measurements. The right axillary lymph node was dissected at four hours post injection and dissolved with 70% HNO₃ under heating. Its concentration in indium was measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS,

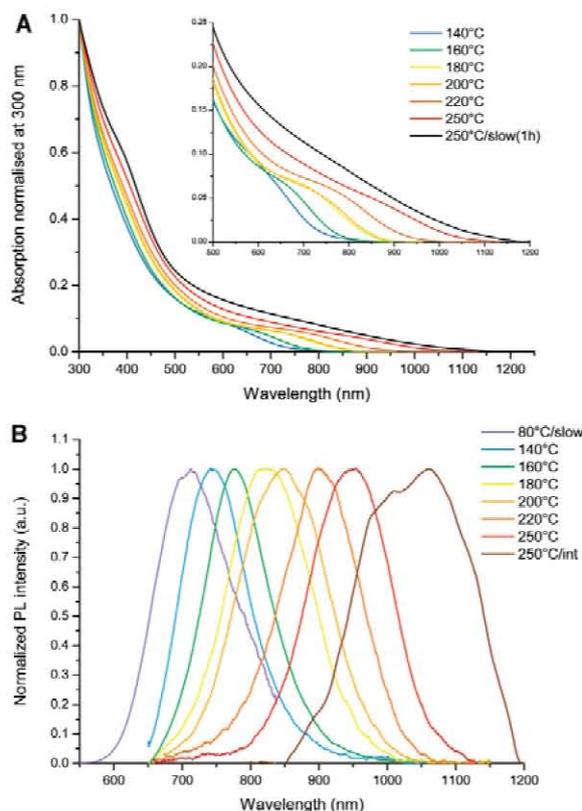


Figure 1. (A) Absorption spectra and (B) PL spectra of Cu–In–Se core QDs. Samples were synthesized by fast heating ($T_f = 140$ – 250 °C), slower heating to $T_f = 80$ °C (B, purple) or $T_f = 250$ °C with a 1 h rise (A, black), and intermediate heating to $T_f = 250$ °C (B, brown).

Laboratoire Ascal, France) and compared with the QD injection solution to determine the injected dose percentage (%ID) in this lymph node.

Results and Discussion

Cu–In–Se Core Synthesis. The Cu–In–Se cores were synthesized in a one-pot route without injection. Copper and indium chlorides were solubilized in ODE using TOP, OAm and DDT ligands, and mixed with selenourea in proportions corresponding to CuInSe₂ stoichiometry. After degassing, the solution was heated under argon. We tested different types of heating conditions, either “fast” heating, where the final temperature (T_f) is reached in about 10–15 min, or “slow” heating, where the final temperature is reached in about 1 h. Above 40–50 °C, the solution turns limpid and colorless, indicating the complexation of metal chlorides by TOP and SeU dissolution. The solution turns yellow then red at around 110–130 °C for fast heating or starting at 80 °C for slow heating, indicating nanocrystal nucleation. As the temperature increases, the solution turns darker. This synthesis is somewhat similar to the one recently reported by Koo et al.²⁰ which does not produce fluorescent QDs. This is due to several notable differences: here, selenourea was added directly to the flask instead of being separately

(27) Muro, E.; Pons, T.; Lequeux, N.; Fragola, A.; Sanson, N.; Lenkei, Z.; Dubertret, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4556–4557.

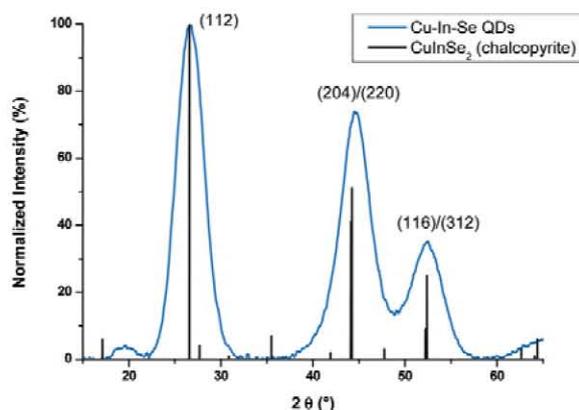


Figure 2. X-ray diffractograms of Cu–In–Se cores synthesized at 160 °C and reference (bulk CuInSe₂ chalcopyrite⁴¹).

dissolved in OAm. We note that absence of OAm in the reaction led to slow nucleation and rapid aggregation of the resulting materials. Another difference is the presence of TOP: in the absence of TOP, QDs were formed but did not show any fluorescence. Finally, we noted that the presence of DDT increased the colloidal stability of the QDs in particular at high temperatures: without DDT, the QDs were unstable above 200 °C. In comparison, the QD reaction solution with DDT could be heated to 250 °C without QD precipitation, which we attribute to stronger binding of DDT ligands compared to OAm or TOP, and this allowed us to reach longer wavelengths.

We will now discuss the optical and structural properties of the obtained Cu–In–Se QDs and the origin of their photoluminescence. The obtained nanocrystals showed absorption and photoluminescence spectra that are dependent on the final temperature T_f (Figure 1A, B). Absorption spectra shifted to redder wavelengths with increasing temperature. PL spectra from fast heating syntheses ranged from 750 nm for $T_f = 140$ °C to ~950 nm for $T_f = 250$ °C. PL quantum yields increase from ~4% for $T_f = 140$ °C up to ~20% for $T_f = 180$ °C and fall down for redder wavelengths to ~3% for the sample synthesized at $T_f = 250$ °C with an intermediate heating (~20 min). We observed that the optical properties of the Cu–In–Se nanocrystals only evolved very slowly with time when kept at the final temperature for $T_f > 100$ °C. Slower heating syntheses induced a nucleation at lower temperatures (~80 °C) and redder wavelengths than fast heating syntheses for the same final temperatures, Figure 1A. Quantum dots synthesized at 250 °C with a one hour temperature rise were non fluorescent, but intermediate heating speed (15–20 min) gave PL emission >1040 nm. In contrast to II–VI QDs, the resulting QD absorption spectra do not display any sharp absorption features, and the PL spectra were broad, typically 110–150 nm fwhm, consistently with what was previously reported for CuInS₂ and CuInSe₂ QDs.^{17–19,21,22} Here we will try to determine whether these optical properties are due to some dispersion in size, shape, and/or

composition of the resulting nanoparticles, or to intrinsic optical properties, by examining the QD structural properties.

XRD patterns for fast and intermediate synthesis samples were consistent with CuInSe₂ sphalerite (zinc blende) structure (Figure 2) with three major peaks at $(26.70 \pm 0.04)^\circ$, $(44.59 \pm 0.05)^\circ$, and $(52.53 \pm 0.12)^\circ$ for the (112), (220), and (312) lattice planes, respectively. We noted the absence of any significant diffraction peak at 35.48° in contrast to the chalcopyrite structure reported with other synthetic procedures.^{16,18} This suggests that the indium and copper cations are not ordered in the crystal structure. Similar synthetic conditions using copper iodide and indium acetate reacted with DDT in absence of selenourea yielded CuInS₂ QDs.¹⁹ We therefore investigated whether our QDs are composed of pure Cu–In–Se or of a Cu–In–Se/Cu–In–S alloy. The presence of sulfur would cause a shift of the XRD peaks toward those of CuInS₂ (the lattice parameter difference between these two materials is about 5%). Here the positions of the diffraction peaks suggest that the QDs do not contain a significant fraction of sulfur atoms for all fast heating samples. In contrast, the S/Se ratio for the sample synthesized by slow heating to 250 °C (1 h temperature rise) was not negligible (estimated to ~30% with a linear approximation between the peak positions of CuInSe₂ and CuInS₂ materials) since the XRD peaks were shifted to 27, 44.9, and 53.2° for (112), (220), and (312) lattice planes, respectively. This may be due to a higher depletion of selenourea precursors as the reaction yield increases.

High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) of samples synthesized by fast and intermediate heating showed monocrystalline particles ranging from nearly spherical ~3 nm QDs for $T_f = 180$ °C to slightly faceted ~5 nm (triangular) QDs for $T_f = 250$ °C (see the Supporting Information, Figure S1). Synthesis at 250 °C with a slow heating (1 h temperature rise) gave both faceted and round NCs larger than 8 nm that were not fluorescent (see the Supporting Information, Figure S1). However, for particles smaller than 5 nm, the low contrast offered by the QDs did not allow accurate determination of their size. We therefore used the Scherrer formula to estimate the size of the Cu–In–Se core QDs from the XRD peak widths. The resulting XRD sizes were well correlated with TEM sizes but were slightly smaller for the sample synthesized with a slow heating to 250 °C (1 h temperature rise, see the Supporting Information, Figure S2). Broadening of the XRD peaks for this specific sample could be attributed to strain and/or composition heterogeneity as indicated by the incorporation of S discussed above. However, XRD size estimation measurements of our Cu–In–Se QDs showed that all QDs were smaller than the bulk exciton of CuInSe₂ ($2a_B = 10.8$ nm), and that the size progressively increases with the reaction temperature (see the Supporting Information, Figure S2). This is consistent with the observed progressive red shift of the QDs due to confinement effects.

To examine the effect of size on the bandgap of these Cu–In–Se QDs, we represented the energy corresponding to the effective bandgap derived from absorption

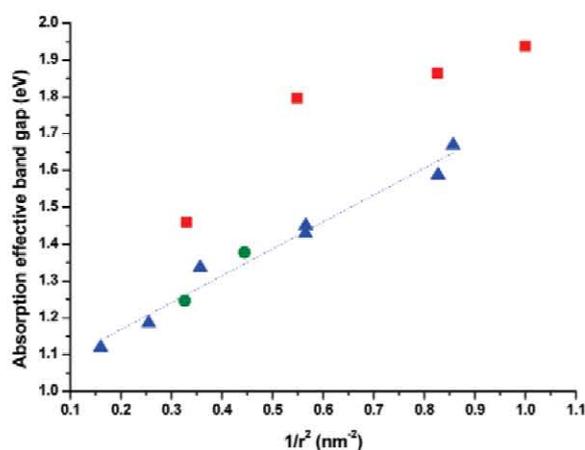


Figure 3. Effective bandgap was plotted versus the inverse square radii of QDs (blue triangles; black line, linear fit). Two other experimental results are shown in red (CuIn₅Se₈) and in green (CuIn_{2.3}Se₄) from previously reported data¹⁸ for comparison.

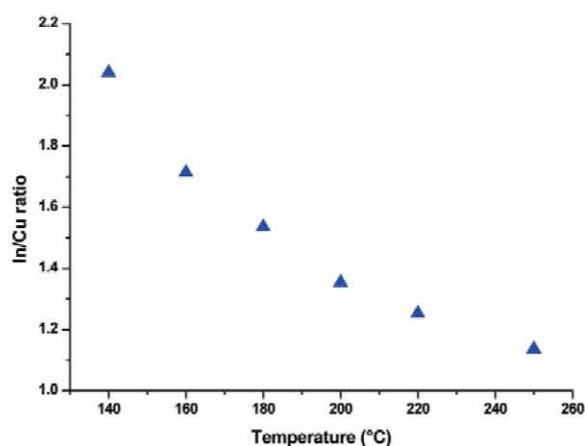


Figure 4. Evolution of the In/Cu ratio in Cu–In–Se core QDs during the fast heating synthesis.

spectra (see the Supporting Information, Figure S3) as a function of the inverse of the QD square diameter (Figure 3, blue triangles). This shows that the effective bandgap energy varies approximately linearly with $1/r^2$, as expected from a simple excitonic confinement model. Extrapolating this curve to infinite size gives a bandgap value of 1.02 ± 0.03 eV, which is comparable to the value of bulk CuInSe₂. These data are well-correlated with those reported by Allen et al.¹⁸ for CuIn_{2.3}Se₄ QDs, as shown in Figure 3 (green dots). In contrast, the CuIn₅Se₈ samples give higher bandgap in particular for smaller QDs (Figure 3, red squares). This may be attributed to the larger difference in composition between these latter QDs and ours (see below), and the corresponding differences in the bulk bandgap and the quantum confinement contribution (carrier effective masses, etc.).

To evaluate the effect of the composition on the sample bandgaps and PL emissions, we studied the In/Cu ratio for fluorescent samples. The composition of the QDs was estimated by EDX spectroscopy and confirmed the presence

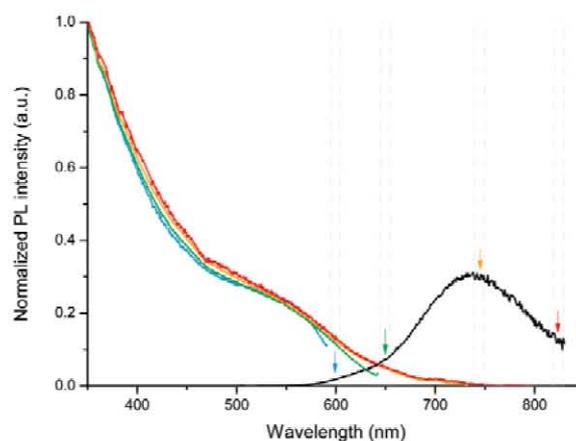


Figure 5. Photoluminescence excitation spectra corresponding to different emission wavelengths (colored arrows) from 600 to 820 nm, and the corresponding PL spectrum excited at 350 nm (black).

of Cu, In, Se in diverse proportions (see the Supporting Information, Table ST1). The spectra also showed the presence of sulfur atoms (S/Se \sim 30%) for all samples obtained by fast heating. As discussed above in XRD measurements, the sulfur was not incorporated into the QD cores in a significant fraction, suggesting that the DDT ligands participate in the QD surface passivation. The cation/anion proportions were as expected consistent with degrees of oxidation of Cu⁺, In³⁺, and Se²⁻. The In/Cu ratio in the QDs varies during the synthesis: the initial QDs are rich in indium (In/Cu = \sim 2 for QDs emitting at λ_{em} = 750 nm) and progressively reaches In/Cu stoichiometry for larger QDs (Figure 4). Many different compositions exist for Cu–In–Se crystals (CuInSe₂, CuIn_{1.5}Se₃, CuIn_{2.3}Se₄, CuIn₃Se₅, CuIn₅Se₈, etc.), which reflects the high stability of defect pairs: 2 copper vacancies with a substitution of indium on a copper site ($2V_{Cu}^- + In_{Cu}^{2+}$).²⁸ These materials exhibit very close lattice parameters so the resulting XRD patterns are not distinguishable within our peak widths. To understand the variations of QD composition during the fast heating synthesis, we estimated the In/Cu ratio of the atoms deposited on the QDs between the first sample taken at 140 °C and subsequent reaction times/temperatures using the In, Cu, Se composition and the size of the different QD samples (see the Supporting Information). The In/Cu ratio of the deposited material is close to one at all times (see the Supporting Information, Figure S4). This suggests that the QDs initially nucleate with a high In/Cu ratio and that the subsequent growth corresponds to deposition of stoichiometric CuInSe₂. Even though the QD bandgap depends on the composition (the bulk bandgap of CuInSe₂ is 1.04 eV, whereas that of CuIn₃Se₅ is 1.21 eV,²⁹), our results suggest that the shifts in absorption and emission spectra during the synthesis are mainly due to a progressive increase in size resulting in a decrease of quantum confinement effects, and to a lesser extent to a difference in composition.

(28) Zhang, S. B.; Wei, S. H.; Zunger, A.; Katayama-Yoshida, H. *Phys. Rev. B* **1998**, *57*, 9642–9656.

(29) Wasim, S. M.; Rincon, C.; Marin, G.; Delgado, J. M. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 94–96.

These structural properties provide a framework to better understand the optical properties of our Cu–In–Se QDs. Cu–In–Se PL spectra are broad even for smaller QDs (fwhm ~ 110 – 150 nm) and exhibit large Stokes shifts (from ~ 130 to ~ 100 nm with increasing wavelength) compared to II–VI QDs, as was previously reported for CuInS₂ and CuInSe₂.^{17–19} In addition, we noted that photoluminescence excitation (PLE) spectra do not vary much with the selected emission wavelength within a QD population (Figure 5). This indicates that QDs with nearly identical absorption properties exhibit very different Stokes shift and emission spectra, in contrast to what is observed with II–VI QDs. So the broad PL spectra may not be attributed only to size and/or composition heterogeneity but must arise from the nature of the PL emission. The PL decay of these Cu–In–Se QDs is dominated by a decay time that is much longer than what is usually observed for II–VI materials (see the Supporting Information, Figure S5A): 170–275 ns compared to ~ 10 – 20 ns for CdSe QDs.³⁰ These results are also inconsistent with a photoluminescence produced by band-edge exciton recombination. They instead suggest that the exciton energy is rapidly transferred to defect levels within the bandgap, and that the radiative recombination then occurs as a donor–acceptor transition. These donor–acceptor pairs may be linked to the observed presence of ($2V_{Cu}^- + In_{Cu}^{2+}$) defect pairs, as discussed above and as previously discussed in other reports.²¹ Even though the emission is not directly due to band edge recombination, the PL spectra still shift to the blue when the particle size decreases due to quantum confinement, albeit slower than the absorption spectra (see the Supporting Information, Figure S6). This indicates that the energy of the donor and acceptor electronic levels involved in the radiative recombination are correlated with the energy of the valence and conduction bands.

The PL quantum yield of our Cu–In–Se core QDs was still sensitive to surface oxidation. In particular, transfer of the Cu–In–Se QDs into water by ligand exchange resulted in an immediate loss of the QD PL. It was therefore necessary to grow a high bandgap ZnS shell around the cores to protect them from their environment.

Cu–In–Se/ZnS Core/Shell Synthesis and *In vivo* Imaging. Zinc sulfide was chosen to overcoat the CuInSe₂ QDs for its large bandgap (3.61 eV), which provides a type I band alignment^{31,32} with Cu–In–Se cores and its relatively close crystalline structure (zinc-blende). The lattice mismatch between ZnS and CuInSe₂ is about 7%, which should allow epitaxial growth of several ZnS monolayers without introducing excessive strain on the cores.³³ ZnS presents a reduced toxicity, which is crucial for a surface material that will be in contact with biological tissues.

- (30) Crooker, S. A.; Barrick, T.; Hollingsworth, J. A.; Klimov, V. I. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 2793–2795.
 (31) Nakada, T.; Hongo, M.; Hayashi, E. *Thin Solid Films* **2003**, *431*, 242–248.
 (32) Worz, M.; Pschorr-Schoberer, E.; Flierl, R.; Preis, H.; Gebhardt, W. *J. Appl. Phys.* **1998**, *84*, 2871–2875.
 (33) Ithurria, S.; Guyot-Sionnest, P.; Mahler, B.; Dubertret, B. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 265501.

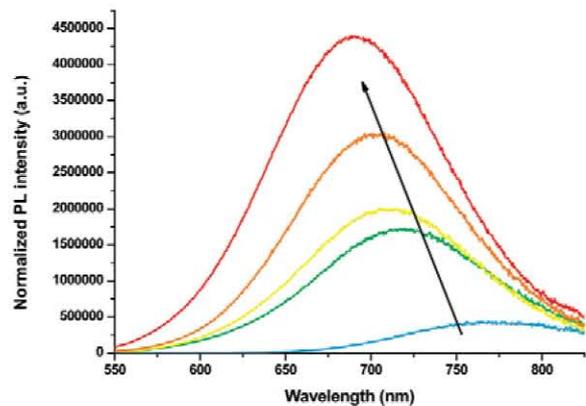


Figure 6. Photoluminescence spectra of Cu–In–Se (blue) and Cu–In–Se/ZnS QDs normalized by their optical density at the excitation wavelength (530 nm), during the growth of a ZnS shell on cores synthesized at 140 °C (from green to red, corresponding to injected volumes of ZnS solution of 0.5, 1, 3, and 4 mL).

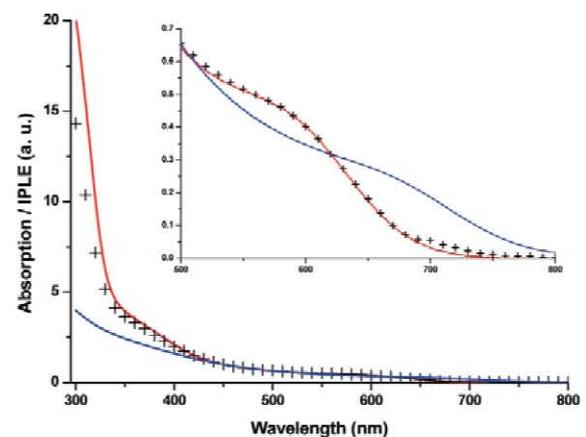


Figure 7. Normalized absorption (red line) and IPLE (crosses) spectra of a core–shell sample after the ZnS shell growth. The absorption spectrum of the corresponding Cu–In–Se cores ($T_f = 140$ °C) is shown in blue. Inset: zoom.

Moreover, this material is well-resistant to oxidation. Several methods have been developed to grow ZnS shell on QDs, e.g., CdSe, CdS, and more recently, InP⁷ or CuInS₂.^{17,19,22} Here ZnS shell growth was performed by dropwise injection of zinc bis(ethylxanthogenate) and zinc oleate at 190 °C.³⁴ The high reactivity of these precursors allows using a relatively low reaction temperature and avoids interdiffusion of Zn into the cores and excessive dissolution of the Cu–In–Se cores with OAm.

For all samples, the fluorescence quantum yield was strongly enhanced during the growth of ZnS. For example, for cores synthesized at 140 °C, ZnS shell growth resulted in a QY increasing about 10-fold, from ~ 4 to 43% as shown in Figure 6, which is to the best of our knowledge the highest PL QY reported for Cu–In–Se QDs. This may indicate an improved surface passivation of the core by ZnS. We found that under excitation, the

- (34) Protiere, M.; Reiss, P. *Nanoscale Res. Lett.* **2006**, *1*, 62–67.

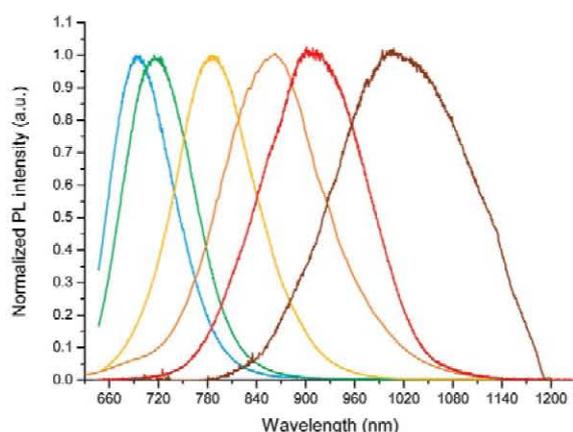


Figure 8. PL spectra of Cu–In–Se/ZnS QDs corresponding to core samples synthesized at, from left to right, $T_f = 140, 160, 200, 220,$ and 250 °C with fast heating and 250 °C with intermediate heating. The emission maxima range from 700 nm to ~ 1030 nm.

fluorescence of samples emitting at visible wavelengths was detected by eye even at high temperature (200 °C) during the synthesis. This was not the case of core QDs where nonradiative recombinations from surface states prevailed. ZnS shell growth could be followed by a progressive increase in the high energy ($\lambda < 350$ nm) portion of the integrated PLE (IPLE) corresponding to the shell contribution (Figure 7). The intensity increase between 350 and 440 nm was probably due to a small diffusion of Zn into the cores. Using IPLE instead of the usual single emission wavelength PLE is preferable with broad PL spectra as it avoids selecting QD subpopulations. Final IPLE and absorption spectra were similar but showed a small amount of ZnS nanocrystals nucleation, as confirmed in XRD measurements (data not shown). Fluorescence spectra were progressively shifted to the blue (particularly for smaller cores) during shell growth, which could be due to interdiffusion of zinc into the cores. Final PL maxima covered a wide spectral range from 700 to 1030 nm (Figure 8) with ~ 40 – 50% of QY for $\lambda_{PL} \leq 800$ nm and decreasing to $\sim 10\%$ for the reddest sample at ~ 1000 nm.

No significant growth was measured in TEM between the cores and the corresponding core/shell QDs, probably because of the small thickness of deposited ZnS compared to the size distribution (see Figure S7 in the Supporting Information). The shapes were mostly similar to the Cu–In–Se core QDs. PL measurements showed that spectral widths and decay times of core and core/shell QDs were similar (see Figure S5 in the Supporting Information), suggesting that surface passivation did not modify the nature of the emission and therefore that the defects at the origin of the PL emission are located inside the Cu–In–Se cores (data not shown).

Water solubilization of Cu–In–Se/ZnS QDs emitting at 800 nm was performed by exchanging the initial hydrophobic ligands with new hydrophilic ligands composed of a dithiol anchor group and a compact sulfobetaine zwitterionic group.²⁷ The exchanged QDs were stable in water and standard biological buffers for long periods of



Figure 9. In vivo fluorescence imaging of the right flank of a mouse before (left) and 4 h after subcutaneous injection of QDs (right). The injection point is hidden to improve visualization of the lymph node.

time (at least several months) and retained high quantum yields (typically 20% for PL ~ 800 nm compared to $\sim 40\%$ in organic solutions; this PL decrease is similar to what has been previously reported for, e.g., CdSe-based QDs^{35,36}). We finally tested these core/shell QDs for *in vivo* imaging in small rodents by performing imaging of the right axillary lymph node. Lymph node status is a key prognostic factor in patients with breast cancer, because it is the first regional step of lymphatic drainage and metastasis of the primary tumor. Lymph node imaging using near-infrared fluorescent QDs may offer a promising alternative to the current procedures involving consecutive injections of radioactive colloids and blue dyes.^{37,38} The QDs were purified by ultracentrifugation and ultrafiltration and ~ 20 μL (~ 0.5 optical density at 690 nm) were injected subcutaneously into the right anterior paw of healthy mice. The regional lymph node was visible as soon as a few minutes and for several hours after injection by near-infrared fluorescence imaging (Figure 9 and the Supporting Information, Figure S8), and the QD accumulation in the right axillary lymph node at 4 h postinjection corresponded to $1.42 \pm 0.42\%$ of the injected dose as indicated by ICP-MS measurements of In concentration, which is consistent with what was previously observed with other II–VI or I–III–VI₂ near-infrared QDs.^{10,22,39,40} This demonstrates that the Cu–In–Se/ZnS core/shell QDs

- (35) Liu, W.; Howarth, M.; Greytak, A. B.; Zheng, Y.; Nocera, D. G.; Ting, A. Y.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1274–1284.
- (36) Susumu, K.; Uyeda, H. T.; Medintz, L. L.; Pons, T.; Delehanty, J. B.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13987–13996.
- (37) Ferrari, A.; Rovera, F.; Dionigi, P.; Limonta, G.; Marelli, M.; Besana Ciani, I.; Bianchi, V.; Vanoli, C.; Dionigi, R. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, *6*, 1503–15.
- (38) Rovera, F.; Frattini, F.; Marelli, M.; Corben, A. D.; Dionigi, G.; Boni, L.; Dionigi, R. *Int. J. Surg.* **2008**, *6*(Suppl 1), S109–12.
- (39) Ballou, B.; Ernst, L. A.; Andreko, S.; Harper, T.; Fitzpatrick, J. A. J.; Waggoner, A. S.; Bruchez, M. P. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 389–396.
- (40) Pic, E.; Pons, T.; Bezdetnaya, L.; Leroux, A.; Guillemain, F.; Dubertret, B.; Marchal, F. *Mol. Imaging Biol.* **2009**, *12*, 394–405.
- (41) Suri, D. K.; Nagpal, K. C.; Chadha, G. K. *J. Appl. Crystallogr.* **1989**, *22*, 578–583.

maintained their optical properties *in vivo* for at least several hours.

Conclusion

We have presented here a novel and simple scheme for the synthesis of fluorescent Cu–In–Se core and Cu–In–Se/ZnS core/shell QDs. This synthesis could be easily scaled up since it does not require injection or hazardous precursors. The core sizes were controlled by the final temperature of the synthesis or by the speed of the temperature rise. The resulting core–shell QDs offer PL emission tunable from 700 to 1000 nm directly dependent on the particle size, with quantum yields ranging from ~50% for smaller QDs to 10% to larger QDs in organic solvents. Their photophysical properties are consistent with donor–acceptor recombination rather than direct band edge exciton recombination. Zinc sulfide shell growth provided good PL stability in aqueous environ-

ment, as was demonstrated with *in vivo* imaging of regional lymph nodes in mice. These QDs represent a novel class of Cd-, Hg-, and Pb-free emitters in the near-infrared range up to 1 μm that extend the spectral range offered by previously reported CuInS₂-based QDs. Further careful studies will be needed to determine the toxicity of these Cu–In–Se/ZnS QDs, and we expect that these QDs could find numerous applications in light emitting devices or for *in vivo* imaging with reduced toxicity.

Acknowledgment. We thank X. Xu for assistance with TEM imaging. We acknowledge Agence Nationale pour la Recherche (ANR) for financial support.

Supporting Information Available: Additional experimental and methodological details (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

C. Production scientifique

Publications

M. Helle, E. Cassette, L. Bezdetnaya, T. Pons, A. Leroux, F. Plénat, F. Guillemain, B. Dubertret, F. Marchal *Visualisation of sentinel lymph node with indium-based near infrared emitting quantum dots in a murine metastatic breast cancer model* **PLoS One**, 7(8): e444433. DOI :10.1371/journal.pone.0044433

E. Cassette*, **M. Helle***, L. Bezdetnaya, F. Marchal, B. Dubertret, T. Pons *Design of new Quantum Dot Materials for Deep Tissue Infrared Imaging* **Advanced Drug Delivery Reviews**, article sous presse

M-A. D'Hallewin, **M. Helle**, J. Garrier, L. Bezdetnaya, F. Guillemain *Animal models for photodiagnosis and photodynamic therapy* **Israel Journal of Chemistry**, article sous presse, DOI : 10.1002/ijch.201100074

E. Cassette, T. Pons, C. Bouet, **M. Helle**, L. Bezdetnaya, F. Marchal, B. Dubertret *Synthesis and characterization of near infrared Cu-In-Se/ZnS core/Shell Quantum Dots for in vivo imaging* **Chemistry of Materials**, 2010 22 (22), pp 6117–6124

Communications orales🗣️ et par posters📄

🗣️ **M. Helle**, E. Pic, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, B. Dubertret, F. Marchal. *Biodistribution des Quantum Dots dépourvus de métaux lourds (CuInS₂/ZnS) émettant dans le proche infrarouge sur souris saines.* **2^{ème} colloque Inter-régional Grand Est de Recherche Translationnelle en Oncologie**, Nancy, 8 - 9 septembre 2011

🗣️ **M. Helle**, E. Pic, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, B. Dubertret, F. Marchal. *Biodistribution des Quantum Dots dépourvus de métaux lourds (CuInS₂/ZnS) émettant dans le proche infrarouge sur souris saines.* **Colloque Nano-Hybrides 8**, Bastia, 5 - 9 juin 2011

📄 **M. Helle**, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, B. Dubertret, F. Marchal. *Biodistribution of near-infrared emitting CuInS₂/ZnS Quantum Dots by mass spectroscopy and fluorescence imaging of sentinel lymph node in mice.* **Clinical Nanomedicine**, Bâle, 7 – 9 mai 2012

📄 **M. Helle**, T. Pons, L. Bezdetnaya, A. Leroux, F. Plénat, F. Guillemain, B. Dubertret, F. Marchal. *Visualisation du ganglion sentinelle à l'aide de QDs à base d'indium émettant dans le proche infrarouge dans un modèle murin métastatique de cancer du sein.* **7^{ème} Journée Claude Huriet de la recherche biomédicale**, Nancy, 2 mars 2012

📄 **M. Helle**, E. Pic, T. Pons, E. Rampazzo, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, L. Prodi, B. Dubertret, F. Marchal. *Evaluation of the toxicity of fluorescent nanoparticles used in the detection of the sentinel lymph node in breast cancer.* **Conférence INRS 2011 – Risques liés aux nanoparticules et aux nanomatériaux**, Nancy, 5 - 7 avril 2011

📄 **M. Helle**, E. Pic, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, B. Dubertret, F. Marchal. *Biodistribution of near-infrared emitting CuInS₂/ZnS quantum dots by mass spectroscopy and fluorescence imaging of axillary lymph node in healthy mice.* **Colloque Photobiology 2010**, Paris, 25 - 26 octobre 2010

📄 **M. Helle**, E. Pic, T. Pons, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, B. Dubertret, F. Marchal. *Biodistribution of near-infrared emitting CuInS₂/ZnS Quantum Dots by mass spectroscopy and fluorescence imaging of axillary lymph node in healthy mice.* **12^{èmes} Journées de la Matière Condensée**, Troyes, 23 – 27 août 2010

Localisation du ganglion sentinelle au moyen de nanoparticules fluorescentes émettant dans le proche infrarouge : Application au cancer du sein

La biopsie du ganglion sentinelle (GS) est actuellement la technique de référence pour le diagnostic des métastases ganglionnaires du cancer du sein. Cependant, les traceurs utilisés pour la cartographie du GS (colorant bleu et radiocolloïde) ne sont pas idéaux et peuvent occasionner des réactions allergiques et engendrer des coûts importants. Une alternative à l'utilisation de ces traceurs repose sur le repérage du GS par imagerie de fluorescence proche infrarouge à l'aide de nanoparticules. Deux types de nanoparticules ont été étudiés : les Quantum Dots (QDs) à base d'indium et les nanoparticules de silice (NPSi) renfermant de la cyanine 7.

Notre étude s'est basée sur des QDs-indium, dont la toxicité est supposée être plus faible que celle des QDs à base de cadmium. La visualisation du GS par les traceurs actuels étant altérée par l'envahissement métastatique du ganglion, un modèle murin de carcinome mammaire présentant des métastases ganglionnaires a été utilisé. La présence de cellules métastatiques dans le ganglion n'affecte pas la migration des QDs puisqu'aucune différence d'intensité de fluorescence n'a pu être détectée entre les ganglions sains et les ganglions envahis. L'étude de biodistribution a mis en évidence une capture majeure des QDs au point d'injection et dans les ganglions ainsi qu'une plus faible concentration dans le foie et la rate. La toxicité des QDs a été évaluée *in vitro* et a démontré une toxicité fortement réduite des QDs-indium par rapport aux QDs-cadmium.

Les NPSi ont été largement appliquées à l'imagerie tumorale mais les études portant sur la visualisation du GS sont peu nombreuses. Les avantages de l'encapsulation de la cyanine 7, fluorophore hydrophobe émettant dans le proche infrarouge, dans des NPSi comprennent notamment une meilleure rétention dans le GS et une toxicité *in vitro* considérablement limitée par rapport au fluorophore libre. Les souris ont été suivies pendant 3 mois après injection de NPSi et aucun signe de toxicité générale ou hépatique n'a pu être décelé.

Ces deux types de nanoparticules fluorescentes sont particulièrement bien adaptés à la cartographie du GS et pourraient avantageusement remplacer les traceurs employés actuellement.

Mots clés : ganglion sentinelle, imagerie de fluorescence proche infrarouge, Quantum Dots à base d'indium, nanoparticules de silice, cyanine

Mapping of sentinel lymph node with near-infrared emitting nanoparticles: Breast cancer application

Sentinel lymph node (SLN) biopsy is a reliable technique for the diagnosis of metastases in breast cancer. However, the tracers used (blue dye and radiocolloid) are not optimal because they can cause allergic reactions and major costs in waste processing. Our strategy was to use near-infrared emitting nanoparticles for the mapping of SLN: indium-based Quantum Dots (QDs) and cyanine 7 embedded in silica nanoparticles (SiNP).

We investigated indium-based QDs, which are presumed to be less toxic than their cadmium-based counterparts. Considering that SLN mapping is impaired if lymph nodes are invaded by metastatic cells, we therefore used a murine model of mammary carcinoma with lymphatic metastases. Metastatic cells did not influence the migration of QDs in the SLN since no difference in fluorescence intensity could be observed between healthy and metastatic SLN. The biodistribution study concluded that the major organs of retention were the injection point and lymph nodes whereas liver and spleen accumulated fewer QDs. The cytotoxicity tests demonstrated a weak *in vitro* toxicity of indium-compared to cadmium-based QDs.

SiNP have been already used for tumor imaging but reports on the mapping of SLN with near-infrared emitting SiNP are sparse. The benefits of the encapsulation of the hydrophobic near-infrared emitting fluorophore cyanine 7 included a better retention in the SLN and a reduced *in vitro* toxicity compared to free fluorophore. The *in vivo* toxicity in mice was followed during 3 months after injection and did not reveal any signs of general or hepatic toxicity.

Both fluorescent nanoparticles are thus well adapted for the mapping of the SLN and could be a favourable substitute to the actually tracers.

Key words: sentinel lymph node, near-infrared fluorescence imaging, indium-based Quantum Dots, silica nanoparticles, cyanine