

**DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT**

**(Arrêté du 25 mai 2016)**

Date de la soutenance : **16 octobre 2018**

Nom de famille et prénom de l’auteur : **CAVAILLES Matthieu**

Titre de la thèse : « Design innovant de matrices polarisantes pour le diagnostic précoce du cancer par IRM ».



**Résumé**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique non-destructive qui permet d’identifier la structure de molécules avec précision. Depuis les années 50, elle a connu un essor considérable avec des améliorations aussi bien au niveau des séquences de pulses qu’au niveau de son instrumentation. En effet, une large gamme d’expérience est aujourd’hui disponible permettant des analyses en 2 dimensions alors qu’il n’était possible d’analyser auparavant qu’un seul noyau à la fois. En ce qui concerne les spectromètres RMN, il est possible aujourd’hui d’effectuer en recherche des analyses de très haute précision sur des appareils allant jusqu’au gigaHz. Des nouvelles technologies sont aussi disponibles pour réduire au maximum les bruits parasites. En parallèle, de nouvelles technologies visant à augmenter l’intensité des signaux par augmentation de la polarisation n’ont cessé de croître. On compte parmi elles la méthode dite « brute-force », le pompage optique, la Para-Hydrogen Induced Polarization (PHIP) ou encore la polarisation dynamique nucléaire (PDN).

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à la PDN qui est une technique d’hyperpolarisation permettant de polariser des échantillons liquides à très basse température (1-4 K). La procédure habituelle nécessite de mélanger l’échantillon avec un « agent glaçant » et des radicaux dans des proportions bien contrôlées. Cette « agent glaçant » est un solvant tel que le glycérol ou le DMSO permet d’éviter l’agrégation des radicaux et des molécules d’intérêt lors du processus de refroidissement de l’échantillon et de conserver une répartition homogène et aléatoire des radicaux dans la solution. Ces espèces paramagnétiques utilisées pour ces expériences sont classées en deux grandes familles que sont les nitroxides et les trityls. Parmi les nitroxides, le 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl connu aussi sous le nom de TEMPO est communément utilisé pour polariser les atomes d’hydrogène des molécules cibles. Les radicaux trityl sont eux généralement employés pour polariser les atomes de carbone des molécules d’intérêt. D’autres types de radicaux sont aussi en cours de développement de manière à optimiser la polarisation.

Après avoir préparé cet échantillon, il est placé dans réceptacle qui est lui-même introduit dans le polariseur. Les micro-ondes sont déclenchées pour transférer la haute polarisation des électrons aux espèces cibles qui voient l’intensité de leurs signaux RMN augmentée. Avec ce type de formulation, on observe des polarisations élevées par exemple autour de
P = 90 % pour des espèces protonées en présence de radicaux TEMPO. Bien que de telles valeurs soient obtenues, une fois que l’échantillon est retiré du polariseur, l’ensemble des espèces relaxent très rapidement vers leur état d’équilibre gommant ainsi toute amélioration obtenue par polarisation.

En 2003, la PDN connait une révolution grâce à une avancée scientifique mise au point par Ardenkjaer-Larsen et al.. Connecté au sommet du polariseur, ils installent un tunnel relié à un spectromètre RMN permettant de transférer l’échantillon hyperpolarisé à température ambiante dans un tube RMN. Une amélioration considérable du rapport signal sur bruit de plus de 10 000 est observée pour la première fois à l’état liquide. Depuis cette prouesse, de nombreuses équipes de recherche améliorent le système de dissolution afin de réduire le temps de transfert et d’optimiser la séparation entre les radicaux et les échantillons. Les espèces paramagnétiques provoquent la relaxation des noyaux ce qui conduit à une perte considérable de la polarisation. On peut également citer une autre amélioration développée par Milani et al. qui consiste en l’élaboration d’un tunnel magnétique permettant une exposition continue et minimale à un champ magnétique même lors de l’étape de dissolution. De cette manière, une plus grande polarisation est maintenue et mesurée après dissolution dans le spectromètre RMN. Une version commerciale du polariseur connue sous le nom de SPINlab est même disponible à la vente chez GE Healthcare.

Suite à ces nombreux changements, de nouvelles applications telles que le suivi d’intermédiaires réactionnels ou le suivi métabolique par IRM ont fait leur apparition. Un exemple récurrent en d-DNP est l’étude de la transformation du pyruvate en lactate. En effet, l’effet Warburg est défini comme une surconsommation de glucose chez les patients atteints de cancer avec une transformation de celui-ci en pyruvate puis en lactate. A contrario, un organisme sain transforme le pyruvate par l’intermédiaire des mitochondries en CO2 et en énergie (Figure 1).



*Figure 1: Représentation schématique de la glycolyse et transformation du pyruvate en différents produits selon l’état des cellules : normales ou cancéreuses.*

Le diagnostic du cancer et son évolution pourront donc être suivis par injection au patient d’un bolus de pyruvate hyperpolarisé lors d’un examen IRM ; la présence de lactate permettant la détection du cancer ou d’en étudier son évolution. Cependant, la préparation de l’échantillon nécessite l’utilisation d’espèces paramagnétiques potentiellement toxiques d’autant plus sur des organismes affaiblis par la maladie.

Suite à ces observations, nous avons développé, par procédé sol-gel, différentes matrices polarisantes nommées HYPSO pour HYbrid Polarizing SOlids. Ces silices mésoporeuses sont hautement poreuses et présentent de grandes surfaces spécifiques ainsi que de grands volumes poreux. Des espèces paramagnétiques y sont liées de manière covalente grâce à la mise au point et au contrôle d’une synthèse multi-étape robuste. Les matériaux fonctionnalisés présentent les caractéristiques nécessaires pour être utilisés en d-DNP tels que de grands volumes poreux ou l’absence d’interaction avec les micro-ondes. De plus, l’immobilisation des radicaux sur ce type de support a permis de s’affranchir de l’utilisation « d’agent glaçant » puisque ces derniers sont réparties de manière homogène et aléatoire à la surface des matériaux.

Dans un premier temps, l’immobilisation de radicaux TEMPO a été réalisée sur un solide mésoporeux organisé connu sous le nom de SBA-15. Ce type de matériau présente un arrangement hexagonal de son réseau poreux qui est constitué de longs canaux parallèle (Figure 2).

*Figure 2: Directe incorporation des fragments azido dans une structure de type SBA-15.*

Ces matériaux sont tout d’abord imprégnés avec une solution de référence composée d’un mélange H2O : D2O (2 : 8) puis introduits dans la polariseur DNP à basse température (1-4 K). Le transfert de polarisation des électrons aux protons effectué par l’irradiation micro-onde a révélé une polarisation maximale P (1H) = 50 % pour B0 = 6.7 T et T = 1.2 K.

En comparaison et basé sur le même schéma de synthèse, des radicaux TEMPO ont été immobilisés sur des matériaux mésoporeux organisés de type SBA-16. Ces matériaux affichent une porosité de type cubique 3D avec des cavités interconnectées par des canaux (Figure 3).



*Figure 3: Directe incorporation des fragments azido dans une structure de type SBA-16.*

Après imprégnation de ces nouveaux matériaux avec une solution contenant un mélange H2O : D2O (2 : 8), une polarisation maximale P (1H) = 63 % a été mesurée pour un champ magnétique de B0 = 6.7 T et une température de T = 1.2 K. Cette différence de polarisation avec les matériaux de type SBA-15 a été expliquée par l’influence de la matrice de silice. L’architecture de cette dernière qui présente une porosité interconnectée dans les 3 dimensions de l’espace favorise la diffusion de la polarisation au sein même de la matrice. En complément, une solution à 3M [1-13C] d’acétate de sodium a été imprégnée dans la matrice de silice et une expérience de polarisation croisée a permis de transférer la polarisation des protons aux carbones. Dans ce même polariseur, une polarisation P (13C) = 36 % a été mesurée et la valeur obtenue peut être expliquée par une perte de polarisation lors du transfert réalisé par CP ainsi que des différences chimiques entre les deux solutions.

Il est important de noter l’efficacité de ces matrices qui fournissent des polarisations tout à fait convenables avec des avantages considérables.

Dans un second temps, une étude de l’influence de la taille des pores à granulométrie constante a été réalisée sur des sphères de silice non structurées. Puis une étude de la taille des grains avec un diamètre poreux fixe de 6 nm. Afin d’obtenir des résultats comparables, des concentrations équivalentes de radicaux TEMPO ont été immobilisés à la surface de ces billes.



Les échantillons avec un diamètre poreux de 6 nm et une granulométrie comprise entre 250 µm et 500 µm ont permis premièrement d’améliorer la filtration des solides et de faciliter l’expulsion du liquide hyperpolarisé. Une polarisation record de P (1H) = 99 % (± 5 %) a été enregistré sur ces même matériaux après imprégnation d’une mixture H2O : D2O (2 : 8). Ce résultat surpasse même les polarisations proton utilisant la formulation de base dépourvue de matrice polarisante qui jusqu’à ce jour fournissaient de meilleures polarisations. Après un transfert de la polarisation des protons aux carbones pour notre solution de référence à 3M
[1-13C] d’acétate de sodium, une augmentation de la polarisation jusqu’à P (13C) = 51 % a été mesurée témoignant encore de l’efficacité de ces nouvelles matrices polarisantes.

En tant que preuve de concept, des images IRM utilisant les matériaux HYPSOs en tant que matrices polarisantes ont été obtenues par hyperpolarisation d’une solution d’acétate de sodium de référence. Cette solution hyperpolarisée a été injectée dans un phantom qui consiste en un tube RMN muni d’un capillaire remplie avec du D2O. Par l’intermédiaire d’une séquence FLASH et d’une sonde à gradient triple, une tranche de ce tube a été imagée. Ceci sont les premières images IRM témoignant du potentiel des matrices HYPSOs (Figure 4).



*Figure 4: Images IRM d'une section d'un tube RMN contenant un capillaire remplie avec du D2O après utilisation d’une matrice polarisante HYPSO pour hyperpolariser le liquide.*

Enfin, nous nous sommes intéressés à une toute nouvelle formulation basée sur l’incorporation de radicaux TEMPO dans des xérogels de silice. Au lieu d’être sous forme de poudre, ces échantillons sont des monolithes de silice avec des textures similaires à celles des matériaux utilisés précédemment. Les premiers résultats affichent de bonnes polarisations avec la capacité d’utiliser un même monolithe pour polariser différents liquides.