

COMPLEXATION DES LANTHANIDES(III) PAR DES LIGANDS POLYAZOTES A NOYAU PYRIDINIQUE POUR L'IRM ET L'IMAGERIE OPTIQUE

BONNET Célia,¹ CAILLE Fabien,^{1,2} BURON Frédéric,² SUZENET Franck,² PETOUD Stéphane¹, JAKAB-TOTH Eva¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France (celia.bonnet@cns-orleans.fr)

²Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 6005, rue de Chartres, 45067 Orléans, France

L'imagerie est devenue un outil indispensable de la pratique médicale et de la recherche biomédicale. Ces trente dernières années ont vues l'explosion du nombre de techniques d'imageries et de leurs applications. Parmi les techniques de pointe, certaines sont caractérisées par une forte résolution mais une faible sensibilité (l'imagerie par résonance magnétique nucléaire, IRM), et d'autres par une forte sensibilité mais une faible résolution au niveau macroscopique (l'imagerie optique). L'imagerie bimodale, combinant l'IRM et l'imagerie optique, présente l'avantage d'allier la forte sensibilité de la luminescence et la très bonne résolution de l'IRM. Les complexes de lanthanides(III) sont particulièrement adaptés pour la conception de tels agents bimodaux puisque tous ces cations présentent une réactivité chimique similaire alors que leurs propriétés optiques et magnétiques sont spécifiques à chacun. Les complexes de Gd^{3+} sont connus pour être des agents de contraste efficaces pour l'IRM, et de nombreux cations Ln^{3+} émettent soit dans le domaine du visible, soit dans le proche infra-rouge (IR). L'imagerie proche IR est plus adaptée aux applications biologiques en raison de la faible dispersion des photons, de l'absence de luminescence provenant des tissus biologiques à ces longueurs d'onde, et du fait que les photons pénètrent plus profondément, ce qui permet de faire de l'imagerie non-invasive. [1]

Nous avons récemment développé des agents bimodaux à base de pyridine qui sont actifs à la fois en optique et en IRM (voir schéma). Les complexes de lanthanides, possédant deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination du métal sont stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement. Les ligands présentent une bonne sélectivité pour les lanthanides(III) par rapport aux cations endogènes tels que Zn^{2+} , Ca^{2+} et Cu^{2+} . Les composés ne forment pas non plus de complexes ternaires avec les anions endogènes, ce qui limiterait la relaxivité en milieu biologique. Tous les complexes donnent naissance à une émission dans le domaine proche IR avec de très bons rendements quantiques.[2] Nous avons montré, pour la première fois, que même des complexes bishydratés peuvent avoir une efficacité comparable à celle des meilleurs composés du domaine. [3] L'augmentation de la conjugaison sur la pyridine, et plus particulièrement sa modification en quinoline, a permis de décaler la longueur d'onde d'excitation vers des énergies plus basses, plus adaptées aux systèmes biologiques. Enfin, aucune toxicité à long-terme n'a été observée *in vivo* sur les souris.

Dans le but de rechercher de nouveaux chromophores, nous avons aussi développé un système amphiphile (**3**) qui forme des micelles en solution. Un chromophore hydrophobe a été inclus dans la micelle formée par les complexes de Ln^{3+} et nous

avons montré qu'un transfert d'énergie a lieu entre les deux entités qui ne sont pas liées de façon covalente.[4]

References

[1] R. Weissleder, *Nature Biotechnol.*, **2001**, *19*, 316.

[2] L. Pellegatti, J. Zhang, B. Drahos, S. Vilette, F. Suzenet, G. Guillaumet, S. Petoud, E. Toth, *Chem. Commun.*, **2008**, 6591; C.S. Bonnet, F. Buron, F. Caillé, C.M. Shade, B. Drahos, L. Pellegatti, J. Zhang, S. Vilette, L. Helm, C. Pichon, F. Suzenet, S. Petoud, E. Toth, *Chem. Eur. J.*, .accepted.

[3] S. Comby, D. Imbert, C. Vandevyver, J.-C. Bünzli, *Chem.-Eur. J.*, **2007**, *13*, 936.

[4] C.S. Bonnet, L. Pellegatti, F. Buron, C.M. Shade, S. Vilette, V. Kubicek, G. Guillaumet, F. Suzenet, S. Petoud, E. Toth, *Chem. Commun.*, **2010**, 124.

PYRIDINE-BASED LANTHANIDE COMPLEXES AS MRI AND LUMINESCENT BIMODAL PROBES

BONNET Célia,¹ CAILLE Fabien,^{1,2} BURON Frédéric,² SUZENET Franck,² PETOUD Stéphane¹, JAKAB-TOTH Eva¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France (celia.bonnet@cnr-orleans.fr)

²Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 6005, rue de Chartres, 45067 Orléans, France

Imaging has become an indispensable tool in medical practice and biomedical research. In the past three decades there has been a huge increase in the number of imaging technologies and their applications. Among the state-of-the art bioimaging modalities, some are characterized by high resolution but low sensitivity (magnetic resonance imaging, MRI), others by high sensitivity but low macroscopic resolution (optical imaging). Luminescent/MRI bimodal imaging offers the advantage of combining both the high sensitivity of luminescence and the high resolution of MRI. Lanthanide complexes are particularly adapted to design such bimodal agents, as they have a similar chemical behaviour while their magnetic and optical properties are specific of each ion. Gd³⁺ complexes are well-known as efficient contrast agents, and several Ln³⁺ cations emit in the visible or in the near infrared (NIR) range. NIR imaging is more compatible with biological applications as low scattering of NIR photons allows for a better image resolution, the lack of NIR luminescence in biological systems makes the detection highly sensitive, and NIR photons can cross significant tissue depths for non-invasive imaging.[1]

We have recently developed pyridine-based bimodal agents that are active both in MRI and as NIR luminescent probes (cf scheme). The bishydrated complexes are found to be thermodynamically and kinetically stable, and the ligands show a significant selectivity for Ln³⁺ over endogenous cations such as Zn²⁺, Ca²⁺ and Cu²⁺ as shown by pH-potentiometric measurements. The chelates do not form ternary complexes with endogenous donors which does not limit relaxivity in biological media. Photophysical characterizations have also been performed, and all the complexes give rise to NIR emission with remarkable quantum yields.[2] We have shown for the first time that even bishydrated complexes can have a quantum yield in the same range as those of the most optimized chelates so far reported.[3] The extended conjugation of the pyridine and particularly the modification into quinoline was successful in shifting the excitation energy of the system towards lower values, more adapted to biological systems. The *in vivo* toxicity has also been assessed on mice and no long-term toxicity was found.

In the search of new chromophores, we have also developed an amphiphilic system (**3**) that forms micelles in solution and that can be used for chromophore screening. The hydrophobic chromophore was included inside a micelle formed by Ln³⁺ complexes and we showed that energy transfer can occur between the two entities not covalently linked.[4]

References

[1] R. Weissleder, *Nature Biotechnol.*, **2001**, *19*, 316.

- [2] L. Pellegatti, J. Zhang, B. Drahos, S. Vilette, F. Suzenet, G. Guillaumet, S. Petoud, E. Toth, *Chem. Commun.*, **2008**, 6591; C.S. Bonnet, F. Buron, F. Caillé, C.M. Shade, B. Drahos, L. Pellegatti, J. Zhang, S. Vilette, L. Helm, C. Pichon, F. Suzenet, S. Petoud, E. Toth, *Chem. Eur. J.*, .accepted.
- [3] S. Comby, D. Imbert, C. Vandevyver, J.-C. Bünzli, *Chem.-Eur. J.*, **2007**, *13*, 936.
- [4] C.S. Bonnet, L. Pellegatti, F. Buron, C.M. Shade, S. Vilette, V. Kubicek, G. Guillaumet, F. Suzenet, S. Petoud, E. Toth, *Chem. Commun.*, **2010**, 124.

NANOCAPSULES PEGYLÉES DE PERFLUOROOCXYLBROMURE : DE LA FORMULATION AU CIBLAGE

DIOU Odile¹, TSAPIS Nicolas¹, DELPLACE Vianney¹, NICOLAS Julien¹,
MACKIEWICZ Nicolas, BRULET Annie², GIRAUDEAU Céline³, VALETTE Julien³,
PAYEN Thomas⁴,
BRIDAL Lori⁴, FATTAL Elias¹

¹UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément
92296 Châtenay-Malabry, France

²Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) Saclay, LLB, 91191 Gif sur Yvette,
France

³Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut d'Imagerie Biomédicale
(I²BM), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Fontenay-aux-Roses, France

⁴Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, UMR 7623 CNRS-UPMC, Paris.

Un des enjeux importants dans le traitement du cancer, est de concevoir des systèmes qui permettent de diagnostiquer la maladie à un stade de développement précoce. De plus en plus d'agents de contrastes multimodaux font leur apparition combinant par exemple la fluorescence, le PET, ou les rayons X. Dans cette étude, l'accent a été mis sur deux techniques complémentaires : l'échographie pour sa large disponibilité, son faible coût et sa rapidité, et l'IRM du Fluor 19, pour sa spécificité et sa haute résolution. Dans ce but, nous avons conçu des agents de contraste bimodaux : des nanocapsules PEGylées de perfluorooctylbromure. Douées de furtivité vis-à-vis de la capture par les cellules du système immunitaire, ces dernières devraient pouvoir s'accumuler dans les tumeurs par effet EPR (Enhanced Permeation and Retention). En vue d'un ciblage actif, les nanocapsules ont aussi été fonctionnalisées par un peptide RGD, spécifique des intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées par les cellules endothéliales des néo-vaisseaux. La concentration et l'immobilisation des agents sur une surface pourraient alors permettre d'augmenter le contraste aussi bien pour l'IRM que pour l'échographie.

Les capsules ont été formulées par un procédé d'émulsion-évaporation à partir de PLGA-PEG, pour le ciblage passif, et d'un mélange PLGA-PEG/PLA-PEG-RGD (RGD : Arginine-Glycine-Acide Aspartique), pour le ciblage actif. Le rendement d'encapsulation en PFOB a été déterminé par RMN du Fluor. La taille des objets nanométriques, $d=120\text{nm}$, a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière et confirmée par Microscopie Electronique à Transmission. De plus, la structure cœur-couronne est préservée (CryoTEM, TEM, Diffusion des Neutrons aux Petits Angles). Des mesures de potentiel Zeta et de Spectroscopie des rayons X ont mis en évidence la modification de surface des capsules. Plusieurs tests in-vitro ont été réalisés. L'évaluation de l'activation du complément a permis de montrer que les nanocapsules PEGylées sont furtives. Un test d'affinité sur les cellules HUVEC a mis en évidence la disponibilité du peptide, en surface des capsules. In vivo, une étude de la cinétique de capture par le foie a été réalisée chez la souris par IRM du Fluor. La quantité de PFOB absorbée par l'organe est suivie 1.5 heures après injection intra-veineuse des nanocapsules PEGylées et non PEGylées. Enfin, l'échogénéicité

aux fréquences cliniques (7-14MHz) de l'agent a pu être confirmée grâce à des injections intra-tumorales de nanocapsules PEGylées.

PEGYLATED NANOCAPSULES OF PERFLUOROOCXYL BROMIDE: FROM FORMULATION TO TARGETING

DIOU Odile¹, TSAPIS Nicolas¹, DELPLACE Vianney¹, NICOLAS Julien¹,
MACKIEWICZ Nicolas, BRULET Annie², GIRAUDEAU Céline³, VALETTE Julien³,
PAYEN Thomas⁴,
BRIDAL Lori⁴, FATTAL Elias¹

¹UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément
92296 Châtenay-Malabry, France

²Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) Saclay, LLB, 91191 Gif sur Yvette,
France

³Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut d'Imagerie Biomédicale
(I²BM), Molecular Imaging Research Center (MIRCent), Fontenay-aux-Roses, France

⁴Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, UMR 7623 CNRS-UPMC, Paris.

The need to detect cancer at its early stages, as well as, to deliver chemotherapy to targeted site motivates many researchers to build theranostic platforms which combine diagnostic and therapy. Among imaging modalities, ultrasonography and MRI are widely available, non invasive and complement each other. Both techniques often require the use of contrast agents. We are developing PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as dual contrast agents. Being stealth they should accumulate passively into implanted tumors by the EPR (Enhanced Permeation and Retention) effect. Alternatively, they could be targeted to the neovasculature, via the overexpressed $\alpha_v\beta_3$ integrins, by decorating the nanocapsules with RGD moieties. Concentration and immobilization of the agents on a surface may improve the contrast enhancement for both imaging modalities.

Nanocapsules for passive or active targeting were prepared by emulsion-evaporation process either with PLGA-PEG or a mixture of PLGA-PEG and PLA-PEG-RGD (arginine-glycine-aspartic acid). The encapsulation efficiency of PFOB was estimated by ¹⁹F NMR. Nanoobject size distribution was measured by Dynamic Light Scattering and correlated to Transmission Electron microscopy, d=120nm. TEM, CryoTEM and Small Angle Neutron Scattering reveal that core-shell structure is preserved. Surface modification was assessed by Zeta potential and X-ray Photoelectron Spectroscopy. In vitro, stealthiness of the PEGylated nanocapsules was evidenced by complement activation experiments and peptide decoration by binding affinity measurements on HUVEC. A kinetic study of the liver uptake was performed by ¹⁹F MRI in mice, during the first 1.5 hours after intravenous administration of PEGylated and non PEGylated nanocapsules. Finally echogenicity of the system was proven in vivo at clinical frequencies (7-14MHz) after intratumoral injection.

EVALUATION MOLECULAIRE ET FONCTIONNELLE D'UN TRAITEMENT ANTI-ANGIOGENIQUE AVEC L'AGENT ULTRASONORE BR55 DANS DEUX MODELES ANIMAUX DE TUMEURS MAMMAIRE ET DE LA PROSTATE

HYVELIN Jean-Marc, TARDY Isabelle, POCHON Sybille, ARDITI Marcel, and
TRANQUART François

Bracco Suisse SA, Geneva Research Center and Manufacturing Site, CH-1228 Plan-Les-Ouates, Geneva, Switzerland

Objectif: L'efficacité des thérapies anticancéreuses est classiquement évaluée par la mesure de la taille tumorale (critère RECITS). Néanmoins l'effet des thérapies anti-angiogéniques suppose qu'une réduction de la vascularisation peut précéder les modifications morphologiques. La croissance vasculaire tumorale est dirigée par de nombreux facteurs angiogéniques, cibles des nouvelles thérapies. La détection de ces marqueurs au niveau moléculaire permettrait de prédire précocement l'efficacité thérapeutique. L'imagerie moléculaire ultrasonore (IM-US) est une technique d'imagerie quantifiable permettant la mesure non invasive des paramètres fonctionnels (perfusion) tumoraux ainsi que l'expression de marqueurs moléculaires. BR55 est un nouvel agent de contraste moléculaire ultrasonore spécifiquement dirigé contre le récepteur humain VEGFR2 (KDR). Cet agent possède à sa surface un peptide hétéro-dimérique qui se lie avec une forte affinité au KDR humain, mais aussi murin et rat. Nous avons testé l'hypothèse que l'imagerie moléculaire avec l'agent BR55 pourrait être plus prédictive de l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique que des modifications fonctionnelles (perfusion) et morphologiques (taille) tumorales.

Matériel and Méthodes: Deux modèles animaux ont été utilisés : un modèle de tumeur mammaire chimio-induite (injection du carcinogène NMU chez le rat) ; 2) le modèle de tumeur de la prostate (implantation orthotopique de cellules G - Dunning R-3327). Les animaux présentant une taille de tumeur, estimée par la surface transversale, égale à 0.4cm^2 (tumeur de la prostate) ou 1.5cm^2 (tumeur mammaire), ont été traités par le sunitinib (LC-laboratories, Woburn, MA, USA), un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase. Le suivi de la réponse tumorale a été effectué par IM-US sur une période de 10 jours. Les signaux de contraste en réponse à l'agent ultrasonore BR55 ont été quantifiés à l'aide d'un logiciel développé par Bracco Suisse qui permet de générer des courbes d'intensité en fonction du temps à partir des signaux ultrasonores linéarisés. À partir de ces courbes, nous avons déterminé les paramètres de perfusion, au cours de la phase d'arrivée de l'agent de contraste au sein de la tumeur. Le signal lié à la fixation de l'agent BR55 sur les récepteur KDR a été mesuré 10 minutes après injection de l'agent de contraste. Les paramètres de perfusion ont été mesurés dans le plan transversal le plus large de la tumeur, alors que le signal lié au bulles fixées a été mesuré sur toute la tumeur en réalisant un déplacement transversal de la sonde ultrasonore tous les 1 mm.

Résultats et Discussion: Dans les deux modèles tumoraux, le traitement avec le sunitinib induit une diminution du signal lié à la fixation des bulles BR55. Cette diminution apparaît plus précocement et de manière plus marquée que les variations morphologiques. Comparée à la perfusion tumorale, celle-ci décroît au cours du traitement mais de façon plus hétérogène par comparaison au signal ciblé de BR55. Ces résultats suggèrent que l'imagerie moléculaire du VEGFR2 à l'aide de l'agent de

contraste BR55 peut s'avérer très sensible pour identifier le caractère « répondeur » d'une tumeur/patient à un traitement anti-angiogénique.

MOLECULAR AND FUNCTIONAL ULTRASOUND ASSESSMENT OF THE RESPONSE TO ANTI-ANGIOGENIC TREATMENT WITH BR55 IN BREAST AND PROSTATE TUMOR ANIMAL MODELS

HYVELIN Jean-Marc, TARDY Isabelle, POCHON Sibylle, ARDITI Marcel, and
TRANQUART François

Bracco Suisse SA, Geneva Research Center and Manufacturing Site, CH-1228 Plan-Les-Ouates, Geneva, Switzerland

Purpose: Efficacy of anticancer therapies is commonly evaluated by measuring direct effects on the tumor by use of the Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST). However, with the advent of anti-angiogenic chemotherapy, vascular changes might occur initially without tumor size reduction, which can cast doubt on the sensitivity of RECIST criteria. Tumoral vascular growth is triggered by different pro-angiogenic factors. Molecular imaging of these markers could predict the response to anti-angiogenic treatment at an early stage. Ultrasound molecular imaging (US-MI), combined with quantification software is a promising non-invasive imaging method that allows assessment of both tumor perfusion and molecular marker expression. BR55 is an ultrasound contrast agent designed for US-MI of human VEGFR2 (KDR). BR55 is functionalized with a heterodimer peptide that binds to KDR with high affinity. We tested the hypothesis that performing US-MI with BR55 might be more predictive of anti-angiogenic treatment efficacy than changes in tumor perfusion and/or tumor volume.

Material and Methods: Spontaneous rat mammary tumor model (N-nitroso-N-methylurea treatment) and rat prostate tumor model (orthotopic implantation of G - Dunning R-3327 cells) were used. When tumor cross-sectional areas reached 0.4 cm² (prostate tumor) or 1.5 cm² (mammary tumor), animals received an anti-angiogenic treatment (sunitinib, LC-Laboratories, Woburn MA). Tumor response was monitored by US-MI over a 10-day period. Contrast enhancement was quantified (from DICOM files) using a software package developed in-house. Time intensity curves generated from linearized data were used to determine perfusion estimates during the initial wash-in phase. Targeted contrast enhancement due to bound BR55 microbubbles was assessed 10 minutes after BR55 injection. Perfusion parameters were measured in a scan plane across the largest section of the tumor, whereas BR55 binding was assessed by sweeping through the entire tumor (in 1mm steps), 10 min after injection, in order to evaluate global KDR expression.

Results and Discussion: In both animal models, sunitinib treatment resulted in an earlier and more pronounced decrease in BR55 binding than reduction in tumor volume. Furthermore, decreased BR55 binding was larger and more consistent throughout the treatment course than perfusion changes. These data suggest that molecular imaging with BR55 of the specific angiogenesis marker KDR, will likely prove useful in humans for an early and accurate assessment of tumor response to specific treatment.

COMPARAISON DE TROIS MODALITÉS D'IMAGERIE MOLECULAIRE PAR IRM : APPLICATION À L'IMAGERIE DE L'ANGIOGENÈSE DANS UN MODÈLE SOURIS DE TUMEUR CÉRÉBRALE.

MARTY Benjamin¹, FLAMENT Julien¹, GIRAUDEAU Céline¹, GEFFROY Françoise¹, MEDINA Christelle², ROBIC Caroline², ROBERT Philippe², PORT Marc², LE BIHAN Denis¹, VALETTE Julien¹, MERIAUX Sébastien¹, BOUMEZBEUR Fawzi¹, LETHIMONNIER Franck¹

¹NeuroSpin, ²BM, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France

²Guerbet, Research Division, Roissy-Charles de Gaulle, France

Introduction

Récemment, le développement d'agents de contraste (AC) fonctionnalisés ouvre de nouveaux horizons pour l'imagerie moléculaire par IRM. Nous avons évalué trois AC reposant sur des principes différents : émulsion Gd (agent paramagnétique), LipoCEST [1] (agent shiftant) et émulsion fluorée (IRM du ¹⁹F). La comparaison des sensibilités et des spécificités relatives des trois modalités a été menée sur un modèle de tumeur cérébrale chez la souris, avec des AC fonctionnalisés par greffage d'un peptide RGD ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ exprimée lors de l'angiogenèse tumorale.

Matériels et Méthodes

Modèle animal. L'induction de tumeur cérébrale ($\varnothing \sim 2$ à 6mm) chez la souris est obtenue par injection IC de cellules U87MG.

AC. Pour chaque modalité, 2 AC ont été utilisés (RGD et Ctrl) : 2 émulsions de Gd ($r_1 = 2,4 \cdot 10^5 \text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), 2 LipoCEST présentant des contrastes aMTR (asymmetric Magnetization Transfer Ratio) maximaux pour $B_{1\text{opt}} = 7\mu\text{T}$ et $\delta_{\text{opt}} = \pm 8\text{ppm}$ et 2 émulsions de ¹⁹F (PFOB à 40% en masse).

IRM. Les acquisitions ont été réalisées à 7T, avant et dans les 2 heures suivant l'injection IV de chaque AC.

Gd: Une séquence IR-FGE de cartographie T_1 [2] ($R = 150 \times 150 \times 660 \mu\text{m}^3$, $T_{\text{acq}} = 12,5\text{min}$) a été acquise sur 10 souris (5 RGD et 5 Ctrl). Les cartes de concentration sont calculées en utilisant la relaxivité r_1 de l'AC.

CEST: Une séquence MSME ($R = 150 \times 150 \times 660 \mu\text{m}^3$, $T_{\text{acq}} = 14\text{min}$) précédée d'une saturation a été acquise sur 24 souris (12 RGD et 12 Ctrl).

¹⁹F: Une séquence MSME optimisée pour le CF_3 du PFOB [3] ($R = 500 \times 500 \times 6000 \mu\text{m}^3$, $T_{\text{acq}} = 18\text{min}$) a été acquise sur 12 souris (6 RGD et 6 Ctrl).

Résultats et Discussion

Comme l'illustre la figure 1, les AC sont détectés avec une sensibilité subnanomolaire quelle que soit la méthode employée. De plus, on observe systématiquement un contraste plus important avec les AC RGD au niveau de la tumeur (Fig.1.b,d,f). Cette différence peut être attribuée à l'association spécifique des peptides RGD aux récepteurs $\alpha_v\beta_3$ présents à la surface des néo-vaisseaux entourant la tumeur. Tel que résumé par le Tableau 1, les décours temporels (RGD et Ctrl) sont significativement différents ($p < 0,05$) dès la première acquisition pour les émulsions de Gd et ¹⁹F alors qu'ils ne le deviennent qu'après 1h pour le LipoCEST.

Pour les AC RGD, un plateau est rapidement atteint à des concentrations précisées dans le Tableau 1. On observe une diminution du contraste uniquement pour le LipoCEST-Ctrl, probablement en raison d'un temps de demi-vie plus court des liposomes circulants (~1h30) par rapport aux émulsions (~4h).

Les avantages et limitations de chaque approche sont résumés dans le Tableau 1. L'approche Gd semble proposer le meilleur compromis pour garantir une résolution spatiale élevée ainsi qu'une grande sensibilité de détection, mettant en évidence des différences significatives liées à la fonctionnalisation de l'AC même sur un petit nombre d'animaux. Toutefois la méthode de quantification utilisée repose sur une mesure *in vitro* de la relaxivité r_1 de l'AC. L'approche CEST permet aussi d'atteindre une bonne résolution spatiale et présente l'avantage d'être peu sensible aux AC circulants. Néanmoins, elle demeure sensible aux inhomogénéités de B_0 et B_1 et la quantification reste difficile en raison du contraste MT endogène. Enfin, l'absence de fluor endogène et la linéarité entre signal IRM et concentration en AC permet une quantification directe avec l'approche ^{19}F , mais celle-ci souffre d'une résolution spatiale plus faible que les modalités ^1H .

Conclusion

Cette étude constitue la première comparaison d'AC fonctionnalisés dans des conditions expérimentales similaires. Telle que l'illustre l'application sur un modèle souris de tumeur cérébrale, chaque modalité apporte des informations complémentaires ouvrant le champ d'exploration multimodale des pathologies cérébrales.

[1] Aime et al. Angew Chem 2005

[2] Deichman et al. MRM 1999

[3] Giraudeau et al. MRM 2010

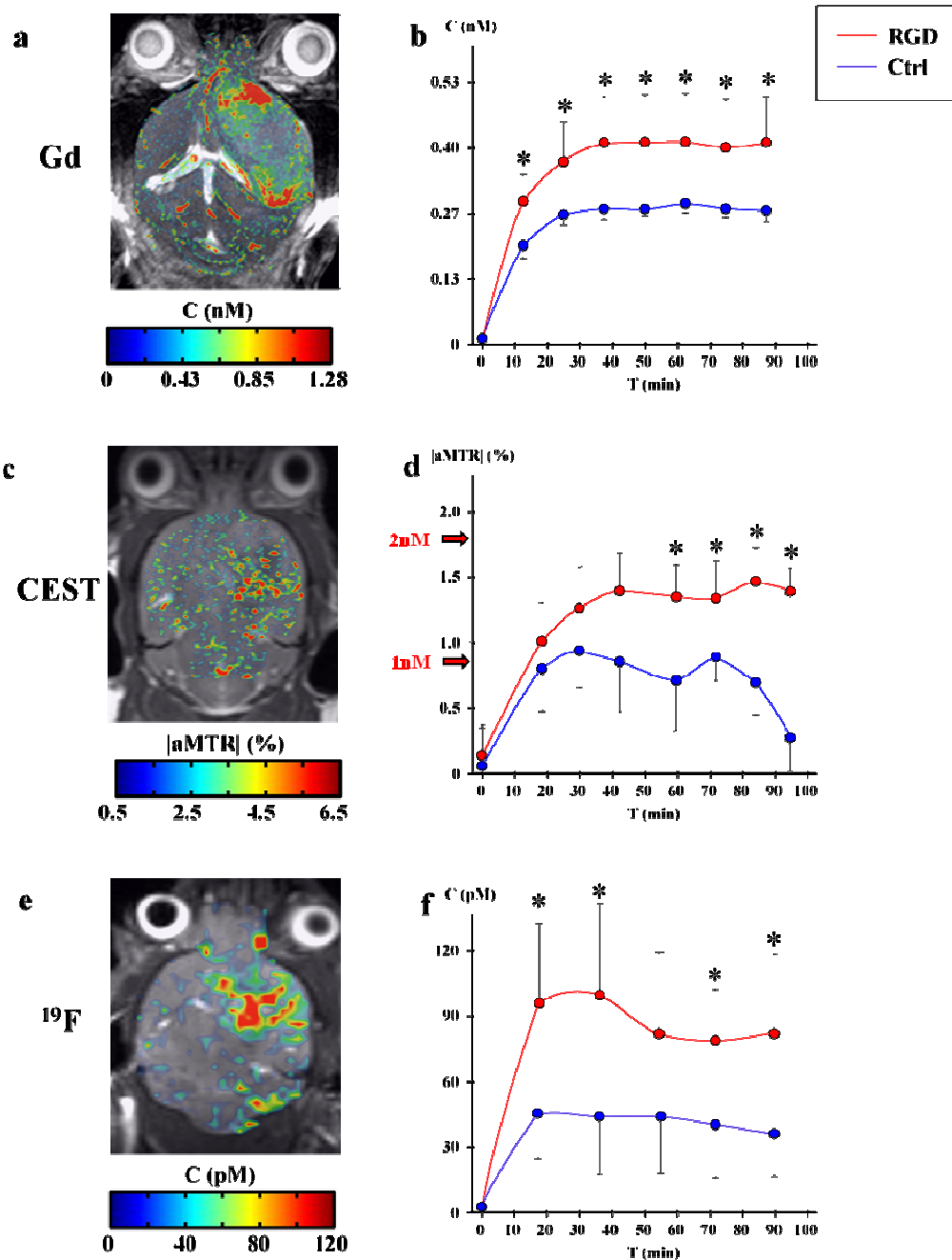


Figure 1. Exemple d'images acquises après injection IV du AC RGD pour les modalités Gd, CEST et ^{19}F (a, c, e respectivement). Décours temporels obtenus après injection IV des AC RGD et Ctrl (lignes rouges et bleues respectivement) pour les modalités Gd, CEST et ^{19}F (b, d, f respectivement). Le signal est moyenné dans la zone tumorale et à travers la cohorte (n=5/5 pour Gd, n=12/12 pour CEST et n=6/6 pour ^{19}F).

Figure 1. Example of images acquired after IV injection of RGD CA for Gd, CEST and ^{19}F modalities (a, c, e respectively). Time course obtained after IV injection of RGD et Ctrl CA (red and blue curve respectively) for Gd, CEST and ^{19}F modalities (b, d, f respectively). Signal is averaged in the tumor region and through the animal cohort (n=5/5 for Gd, n=12/12 for CEST et n=6/6 for ^{19}F).

COMPARISON OF THREE MRI MOLECULAR IMAGING MODALITIES: APPLICATION TO ANGIOGENESIS IMAGING IN A BRAIN TUMOR MOUSE MODEL.

MARTY Benjamin¹, FLAMENT Julien¹, GIRAUDEAU Céline¹, GEFFROY Françoise¹, MEDINA Christelle², ROBIC Caroline², ROBERT Philippe², PORT Marc², LE BIHAN Denis¹, VALETTE Julien¹, MERIAUX Sébastien¹, BOUMEZBEUR Fawzi¹, LETHIMONNIER Franck¹

¹NeuroSpin, ²BM, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France

²Guerbet, Research Division, Roissy-Charles de Gaulle, France

Introduction

The recent development of targeted contrast agents (CA) has opened the way for MRI molecular imaging. Here we evaluated three different CA based on different principles: Gd-based emulsion (paramagnetic agent), LipoCEST [1] (shifting agent) and fluorine emulsion (¹⁹F MRI). A comparison of the three modalities sensitivity and specificity was performed on a mouse model of brain tumor using CA grafted with RGD peptides to specifically target $\alpha_v\beta_3$ integrins over-expressed in angiogenic vessels.

Materials and Methods

Animal model. Brain tumors (\varnothing ~2 to 6mm) were induced in nude mice by IC injection of U87MG cells.

CA. For each modality, 2 CA were used (RGD and Ctrl): 2 Gd-based emulsions ($r_1=2,4.10^5\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), 2 LipoCEST exhibiting maximum aMTR (asymmetric Magnetization Transfer Ratio) contrasts for $B_{1\text{opt}}=7\mu\text{T}$ and $\delta_{\text{opt}}=\pm 8\text{ppm}$, and 2 ¹⁹F emulsions (PFOB, 40% w/w).

MRI. Acquisitions were carried out at 7T, before and within the 2h following IV injection of each CA.

Gd: A T₁ mapping IR-FGE sequence [2] ($R=150\times 150\times 660\mu\text{m}^3$, $T_{\text{acq}}=12,5\text{min}$) was acquired on 10 mice (5 RGD and 5 Ctrl). Concentration maps were derived using the CA relaxivity r_1 .

CEST: A MSME sequence ($R=150\times 150\times 660\mu\text{m}^3$, $T_{\text{acq}}=14\text{min}$) preceded by a saturation was acquired on 24 mice (12 RGD and 12 Ctrl).

¹⁹F: A MSME sequence optimized for the CF3 peak of PFOB [3] ($R=500\times 500\times 6000\mu\text{m}^3$, $T_{\text{acq}}=18\text{min}$) was acquired on 12 mice (6 RGD and 6 Ctrl).

Results and Discussion

As illustrated by Figure 1, CA are detected with a sub-nanomolar sensitivity by the three modalities. Moreover a higher contrast is systematically observed for RGD contrast agents inside the tumor. This difference can be ascribed to a specific association of RGD peptides to $\alpha_v\beta_3$ integrins expressed at the neo-vessels surface. As summarized in Table 1, time courses (RGD vs Ctrl) are significantly different ($p<0.05$) from the first time point for Gd-based and ¹⁹F emulsions but only after 1h with the LipoCEST. For each RGD-CA a plateau is rapidly reached at concentrations

specified in Table 1. A contrast decrease is only observed for the Ctrl LipoCEST, probably due to a shorter half life of flowing liposomes (~1h30) compared to emulsions (~4h).

Advantages and limitations of each approach are summarized in Table 1. Gd-based approach seems to offer the best compromise to ensure a high spatial resolution and sensitivity of detection, highlighting significant differences with functionalized CA, even on a small number of animals. However, quantification method is based on *in vitro* measurement of the CA relaxivity r_1 . CEST approach also leads to a high spatial resolution and is quite insensitive to flowing CA. Nevertheless, this method is sensitive to B_0 and B_1 inhomogeneities and quantification is hampered by endogenous MT contrast. Finally, ^{19}F approach allows direct quantification thanks to both lack of endogenous fluorine and linearity between MRI signal and CA concentration, but suffers from a lower spatial resolution compared to ^1H modalities.

Conclusion

To our knowledge, this study is the first comparison of functionalized CA used in similar experimental conditions. As shown by their application on a brain tumor mouse model, each modality provides additional information, promising for multimodal investigation of brain diseases.

[1] Aime et al. Angew Chem 2005

[2] Deichman et al. MRM 1999

[3] Giraudeau et al. MRM 2010

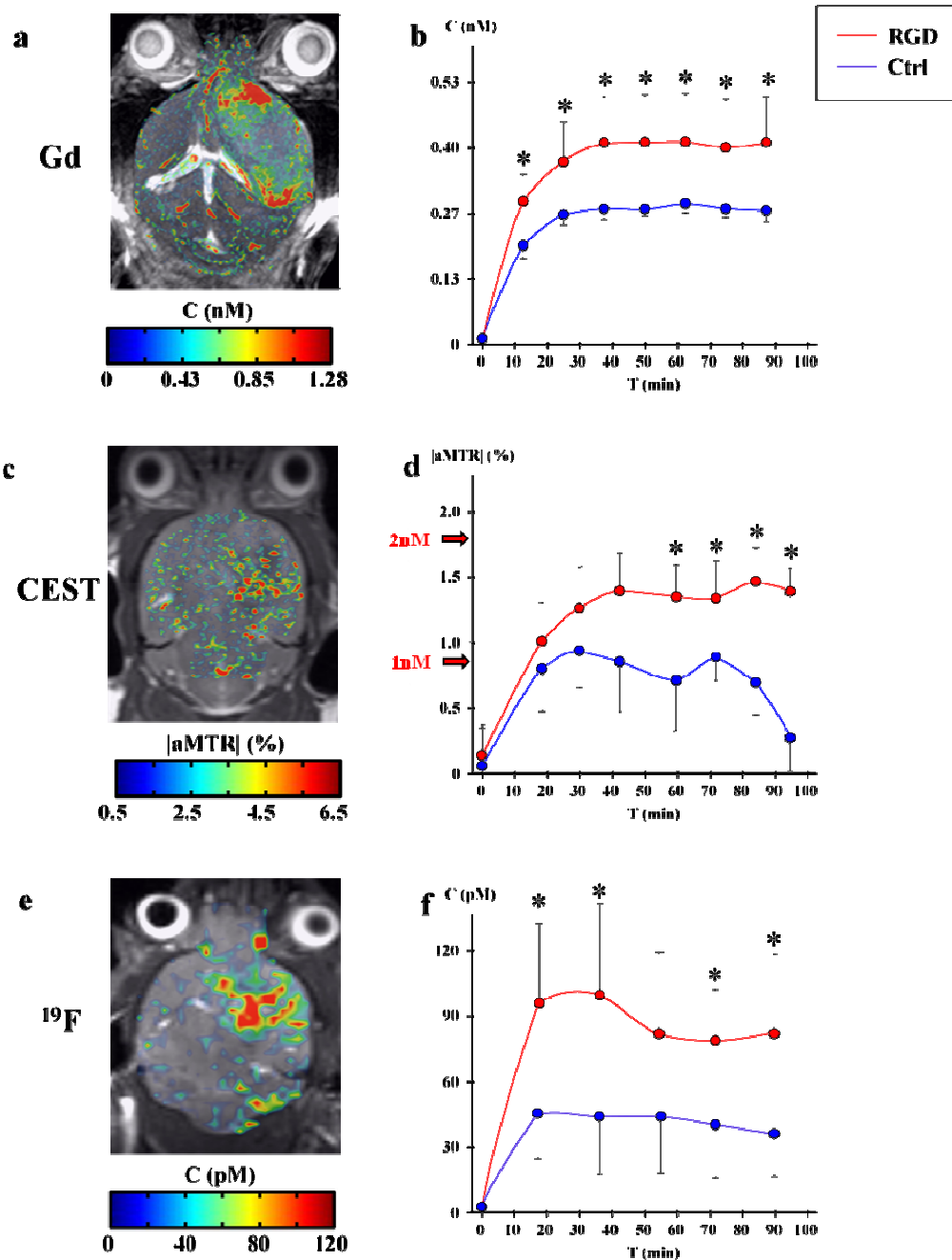


Figure 1. Exemple d'images acquises après injection IV du AC RGD pour les modalités Gd, CEST et ^{19}F (a, c, e respectivement). Décours temporels obtenus après injection IV des AC RGD et Ctrl (lignes rouges et bleues respectivement) pour les modalités Gd, CEST et ^{19}F (b, d, f respectivement). Le signal est moyenné dans la zone tumorale et à travers la cohorte (n=5/5 pour Gd, n=12/12 pour CEST et n=6/6 pour ^{19}F).

Figure 1. Example of images acquired after IV injection of RGD CA for Gd, CEST and ^{19}F modalities (a, c, e respectively). Time course obtained after IV injection of RGD et Ctrl CA (red and blue curve respectively) for Gd, CEST and ^{19}F modalities (b, d, f respectively). Signal is averaged in the tumor region and through the animal cohort (n=5/5 for Gd, n=12/12 for CEST et n=6/6 for ^{19}F).

STRATEGIE POUR DEFINIR DES AGENTS PEPTIDIQUES DE CIBLAGE PERMETTANT DE VISUALISER PAR IRM LES ALTERATIONS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE AU COURS DE LA NEUROINFLAMMATION

PETRY Klaus G.¹, VEKRIS Antoine¹, MIRAUX Sylvain², LONGUET Stéphanie³, MORDELET Elodie¹, FRANCONI Jean-Michel², DUGUET Etienne⁴, LECOMMANDOUX Sébastien³, BOIZIAU Claudine¹

1) INSERM U1049;

2) CNRS RMSB UMR5536

3) ENSCPB,

4) ICMCB Bordeaux University, 146 rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux/France
klaus.petry@inserm.fr

Dans la sclérose en plaques (SEP), les lésions cérébrales inflammatoires impliquent des altérations cellulaires et moléculaires massives de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Afin d'identifier, dans des tissus de cerveaux sains, les altérations moléculaires focales des cellules endothéliales lors d'une neuroinflammation, nous avons mené une étude comparative *in vivo* par phage display avec des peptides de criblage constitués de 7 acides aminés dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale de la SEP en phase aiguë chez le rat (EAE) *versus* rats sains. Parmi les répertoires de ligands peptidiques générés "EAE" et "sain", les ligands peptidiques retenus remplissent les critères sélectifs de deux approches originales: 1) l'analyse *in silico* des séquences peptidiques par des alignements de protéines référencées dans la base de données des mammifères (homme, singe, rat, souris) où plusieurs ligands peptidiques (jusqu'à six) miment la même protéine, 2) l'enrichissement en séquences codant pour les deux répertoires (EAE vs sains) après hybridation soustractive des ADN. Au total, 81 nouveaux ligands peptidiques ont été identifiés comme étant réactifs pour l'EAE et indétectable dans les tissus de cerveau sain. Pour certaines des protéines identifiées qui sont individuellement mimées par plusieurs ligands peptidiques, la fonction physiologique (neuro-) inflammatoire est connue. Pour beaucoup d'autres, les gènes codant pour les protéines sont identifiés, mais leurs fonctions restent à démontrer. Comme preuve de concept de notre approche de discrimination des lésions inflammatoires du système nerveux central à partir de tissu cérébral sain, nous avons effectué des études de binding *in vivo* chez le rat et *in vitro* avec les ligands peptidiques sélectionnés. L'analyse histologique des tissus cérébraux montre que les ligands peptidiques sélectionnés se lient spécifiquement aux cellules endothéliales cérébrales chez les rats EAE caractérisées par une infiltration de macrophages ED1+. Après une incubation des ligands peptidiques spécifiques sur des coupes de cerveaux sains vs neuroinflammés EAE, l'analyse par PCR confirme la présence de certaines séquences des ligands peptidiques. *In vivo*, pour étudier le ciblage des sites neuro-inflammatoires par les ligands peptidiques, nous avons induit une lésion focale inflammatoire dans le cerveau du rat. Les ligands peptidiques sélectionnés sont marqués chimiquement avec du Gadolinium-DTPA et administrés par voie intraveineuse. Sous anesthésie, les examens IRM des animaux sont effectués à 4,7

T et révèlent un marquage au niveau de la lésion focale. Afin de tester la capacité des ligands peptidiques à agir comme un médicament potentiel *in vivo*, nous avons mis l'accent sur un ligand peptidique spécifique, le clone 48. Le peptide 48 synthétisé est lié de façon covalente à la surface d'un nanocargo dans lequel un colorant fluorescent et/ou un agent de contraste pour l'IRM est incorporé. Une lésion cérébrale focale est induite puis le peptide-nanocargo est administré par voie intraveineuse. Nos résultats montrent que le peptide-nanocargo cible spécifiquement la lésion inflammatoire. L'analyse histologique par immunofluorescence confirme ce résultat qui est également validé *in vivo* par IRM. Considérant que la neuroinflammation dans le modèle EAE et l'induction de lésions cérébrales focales génère de nombreux processus d'activations moléculaires communs au niveau des cellules endothéliales, nous avons identifié de nouveaux peptides de ciblage spécifiques de ces altérations ainsi que certaines protéines impliquées dans ces interactions moléculaires. *In vitro*, les cellules endothéliales cérébrales humaines hCMEC/D3 sous stimulation pro-inflammatoire révèlent le binding spécifique de certains ligands peptidiques comme le clone 48. Les protéines mimées par les peptides sélectionnés et les protéines exprimées à la surface des cellules endothéliales cérébrales sont hautement conservées entre le rat et l'homme ce qui suggère de nouvelles informations pour étudier l'inflammation du système nerveux central *in vivo* dans la SEP et le développement de nouveaux outils de contraste pour IRM.

Support financier: ANR-TecSan, CR Aquitaine, INSERM, CNRS, ARSEP

STRATEGY TO DEFINE PEPTIDE TARGETING AGENTS FOR IN VIVO MR IMAGING OF CELLULAR AND MOLECULAR ALTERATIONS OF BLOOD BRAIN BARRIER IN NEUROINFLAMMATION

PETRY Klaus G.¹, VEKRIS Antoine¹, MIRAUX Sylvain², LONGUET Stéphanie³, MORDELET Elodie¹, FRANCONI Jean-Michel², DUGUET Etienne⁴, LECOMMANDOUX Sébastien³, BOIZIAU Claudine¹

1) INSERM U1049

2) CNRS RMSB UMR5536

3) ENSCPB,

4) ICMCB Bordeaux University, 146 rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux/France
klaus.petry@inserm.fr

In Multiple Sclerosis (MS), the inflammatory brain lesions involve massive cellular and molecular alterations of the blood brain barrier (BBB). To identify among healthy brain tissue such focal molecular alterations of the microvascular endothelial cells upon neuroinflammation, we have performed a comparative *in vivo* phage displayed 7 amino acids peptide ligands screening during the acute phase of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) rat model of MS and in healthy rats. Among the generated peptide ligand repertoires “EAE” and “Healthy” only those peptide ligands were retained that fulfilled criteria of two original approaches: 1) *in silico* analysis of peptide sequences by alignments to the reference protein databases of mammalia (human, monkey, rat, mouse) where several peptide ligands (up to six) are mimicking the same protein, 2) enrichment of encoding sequences by physical subtractive DNA hybridization of the two repertoires (EAE versus healthy animals). In total, 81 new peptide ligands were identified of being specifically reactive for EAE and not detectable in healthy rat brain tissue. For some of the identified proteins that are individually mimicked by several peptide ligands, the physiological function in (neuro-) inflammation is known. For many others, the genes of the encoding proteins have been identified, but their functions remain unknown.

As proof of concept for our approach to discriminate inflammatory CNS lesions from normal CNS tissue with the retained peptide ligands, we have performed binding studies both *in vitro* and *in vivo* in rats. In double labelling histology of CNS tissues, the selected peptide ligands bound specifically to vascular endothelial cells in inflamed brain tissue of EAE rats that was further characterised by macrophages (ED1+) infiltration. After *in vitro* incubation of phage peptide ligands with brain tissue sections binding specificity of some selected peptides to EAE neuroinflammation vs healthy controls was further confirmed by PCR with primers corresponding to the individual peptide sequences.

For *in vivo* targeting of neuroinflammation sites by peptide ligands, we induced a focal inflammatory lesion in the rat brain that developed over 16h. Selected phage peptide ligands were chemically labelled with Gadolinium-DTPA and were administered by intravenous injection. Under anaesthesia, MRI scans of animals were performed at 4.7T and revealed specific labelling of the focal lesion.

We have further tested the capacity of the selected peptide ligands as potential drug carrier *in vivo*. For this proof of concept study, we have focussed on one peptide ligand (clone 48). The synthesized peptide was covalently linked to the surface of a nanocargo in which was further incorporated a fluorescent dye and/or a MRI contrast agent. Again, a focal brain lesion was induced and the peptide-nanocargo construct was administered by i.v. injection. Specific targeting of the peptide-nanocargo construct at the inflammatory lesion site was confirmed histologically by immunofluorescence and *in vivo* by MRI monitoring.

Considering that neuroinflammation in both EAE and the induced focal brain lesions generates many common molecular activation processes of endothelial cells, we have identified new targeting peptides of such molecular alterations. We have further identified some mimicked proteins that are involved in such molecular interactions at endothelial cells during neuroinflammation. *In vitro*, human endothelial cells hMEC/D3 under proinflammatory stimulation reveal specific binding by some of selected peptides, incl peptide 48. The proteins mimicked by peptides and the labelled endothelial proteins are highly conserved between rat and human and provide thus new tools and information to study *in vivo* CNS inflammation in Multiple Sclerosis.

Supported by ANR-TecSan, CR Aquitaine, INSERM, CNRS, ARSEP

L'IMAGERIE MOLECULAIRE TEP DES RECEPTEURS 5-HT_{1A} FONCTIONNELS

ZIMMER Luc

*Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CNRS-INSERM-Université Lyon 1)
CERMEP- Hospices Civils de Lyon*

Les récepteurs 5-HT_{1A} sont impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques en neurologie et psychiatrie. Cette famille de récepteurs est également une cible thérapeutique pour de nouveaux traitements antidépresseurs, anxiolytiques voire pour des molécules « pro-cognitives » dans la prise en charge de la maladie d'Alzheimer.

À l'heure actuelle, il existe plusieurs radiotraceurs pour l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A}. Cependant, ces radiopharmaceutiques (utilisés en recherche clinique) sont tous des antagonistes. Ils se fixent donc sur l'ensemble des récepteurs 5-HT_{1A} c'est-à-dire ceux dits à haute affinité (couplés aux protéines G et pouvant transmettre un signal pharmacologique) et également sur les récepteurs à basse affinité (non-couplés aux protéines G et non fonctionnels). Dans ce contexte, un radiotraceur agoniste permettrait de visualiser et quantifier spécifiquement les récepteurs fonctionnels, rejoignant ainsi la notion « d'imagerie fonctionnelle ». De plus, l'imagerie d'un agoniste radiomarqué permettrait une approche indirecte des fluctuations des concentrations extracellulaires de la sérotonine (unique approche non invasive chez l'homme). En effet, la sérotonine, de comportement agoniste, ne se fixe que sur les récepteurs sérotoninergiques de haute affinité, entrant en compétition directe avec un agoniste radiomarqué.

L'imagerie *in vivo* d'un radiotraceur agoniste, comparée à celle d'un antagoniste, permettrait de quantifier localement le statut fonctionnel des récepteurs 5-HT_{1A} chez des patients au cours de l'évolution de leur pathologie ou de leur traitement. De plus, l'imagerie quantitative des récepteurs 5-HT_{1A} permettrait aussi d'étudier les interactions, en termes de taux d'occupation, de couplage ou de libération de sérotonine, avec les médicaments-candidats 5-HT_{1A}.

Dans ce contexte, plusieurs équipes tentent de développer le premier agoniste 5-HT_{1A} utilisable chez l'homme. De nombreux échecs ont été rapportés dans la littérature, confirmant que le choix de la molécule-candidate est crucial. Notre équipe a proposé des molécules, initialement développées comme antidépresseurs, qui nous paraissaient présenter des caractéristiques originales pour l'imagerie TEP. Nos résultats initiaux (Lemoine et al, Eur J Nucl Med, 2010) nous ont conduits à sélectionner une molécule agoniste présentant une affinité remarquable de 0,1 nM pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Le [¹⁸F]F13714 est un radiotraceur présentant des caractéristiques précliniques favorables à son usage en TEP (Lemoine et al, soumis). Il est donc envisagé de poursuivre son développement pour le transformer à terme en radiopharmaceutique utilisable chez l'homme pour des applications encore inédites.

PET MOLECULAR IMAGING OF FUNCTIONAL SEROTONIN 5-HT_{1A} RECEPTORS

ZIMMER Luc

*Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CNRS-INSERM-Université Lyon 1)
CERMEP- Hospices Civils de Lyon*

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5 HT) and its various receptors are involved in numerous central nervous system functions. Among the currently known 5-HT receptors, the 5-HT_{1A} receptor is the best characterized subtype. It is tightly implicated in the pathogenesis of mood disorders e.g. depression, in cognitive processes and thus represents an important target for drug therapy, particularly for antidepressants, anxiolytics and antidemential drugs.

Binding to 5-HT_{1A} receptors can be visualized *in vivo* by positron emission tomography (PET), facilitating the translation from animal research to man. More than a static quantification of brain receptors, we propose an original approach for the functional imaging of 5-HT_{1A} receptors, exploiting pharmacological properties.

5-HT_{1A} receptors exist in high- and low-affinity states depending on their coupling to G-proteins. Agonists bind preferentially to the high-affinity state of the receptor, which is coupled to the G-protein and is pharmacologically mobilizable. This binding could therefore provide a measure of functional 5-HT_{1A} receptors. Moreover, agonist tracers may be more sensitive to extracellular changes in serotonin, since they only compete with receptors in the high affinity state that are also receptive to neurotransmitter binding. PET imaging could therefore be used to measure *in vivo* regional changes of serotonin evoked by pharmacological challenges.

Since all clinical PET 5-HT_{1A} radiopharmaceuticals are antagonists, we developed preclinically the first radiofluorinated agonists from compounds initially investigated as potential antidepressants (Lemoine et al, Eur J Nucl Med, 2010). Particularly, [¹⁸F]F13714 presents interesting characteristics for probing *in vitro* and *in vivo* the high-affinity states of the 5-HT_{1A} receptors (Lemoine et al, submitted).

Although questions are still pending regarding the correlation between 5-HT_{1A} functional state at a pathophysiological process and the following therapeutic efficacy, our results illustrate the potential value of PET pharmaco-imaging.