

ACOUSTIC BEHAVIOR OF NANOPARTICULES WITH A LIQUID CORE

ASTAFYEVA Ksenia, URBACH Wladimir, TAULIER Nicolas
*Laboratoire d'Imagerie Paramétrique. UMR 7623 CNRS – UPMC. 15 rue de l'école
de médecine. 75006 Paris.*

COULOUVRAT François, CONOIR Jean-Marc
*Institut Jean le Rond d'Alembert. UMR 7190 CNRS – UPMC. 4, Place Jussieu 75252
Paris Cedex 05.*

THOMAS Jean-Louis
*Institut des Nanosciences de Paris. UMR 7588 CNRS – UPMC. 4, Place Jussieu
75252 Paris Cedex 05.*

DIOU Odile, TSAPIS Nicolas, FATTAL Elias
*Physico-Chimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie. 8612 CNRS – Université Paris
Sud. Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry*

CONTINO-PEPIN Christiane, PUCCI Bernard
*Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, IBMM - UMR 5247, Université
d'Avignon*

Un intérêt croissant se portent sur les Agents de Contraste Ultrasonore (ACU) de taille nanométrique. Leur taille leur permet en effet de passer aisément entre les cellules endothéliales de la vascularisation tumorale pour venir s'accumuler dans la tumeur. Les contraintes liées à une stabilité et durée de vie suffisante imposent une utilisation de nanoparticules constituées d'un cœur liquide plutôt que d'une bulle de gaz. Cette caractéristique modifie les interactions entre l'onde ultrasonore et la nanoparticule par rapport à un ACU classique, de taille micrométrique et gazeux.

Nous nous sommes intéressé à deux types de nanoparticules à cœur liquide, les premières sont constituées d'une capsule polymérique très rigides, tandis que pour les secondes la capsule est composée de molécules tensioactives fluorées. Afin de caractériser les interactions ultrasons-nanoparticules, nous avons étudié de façon systématique le comportement acoustique de solutions de nos nanoparticules, où dans chaque solution une propriété élastique ou structurale de la nanoparticule a été modifiée.

Nous avons ainsi mesuré la vitesse ultrasonore dans la solution, l'atténuation du signal transmis dans la solution ainsi que le rapport signal à bruit du signal rétrodiffusé par la solution. Ces mesures ont été effectuées à différentes concentrations de nanoparticules (de solutions très diluées à très concentrées).

Pour comprendre nos résultats nous avons d'une part développé un nouveau modèle théorique décrivant le comportement acoustique d'une nanoparticule (ou d'une solution de nanoparticules très dilué), et d'autre part modélisé numériquement la propagation de l'onde ultrasonore dans des solutions de nanoparticules (diluées et concentrées).

La comparaison des résultats des simulations et des prédictions du modèle avec les mesures expérimentales nous ont permis de définir les mécanismes pertinents dans l'interaction ultrasons-nanoparticules suivant le type de nanoparticules utilisées.

ACOUSTIC BEHAVIOR OF NANOPARTICULES WITH A LIQUID CORE

ASTAFYEVA Ksenia, URBACH Wladimir, TAULIER Nicolas
*Laboratoire d'Imagerie Paramétrique. UMR 7623 CNRS – UPMC. 15 rue de l'école
de médecine. 75006 Paris.*

COULOUVRAT François, CONOIR Jean-Marc
*Institut Jean le Rond d'Alembert. UMR 7190 CNRS – UPMC. 4, Place Jussieu 75252
Paris Cedex 05.*

THOMAS Jean-Louis
*Institut des Nanosciences de Paris. UMR 7588 CNRS – UPMC. 4, Place Jussieu
75252 Paris Cedex 05.*

DIOU Odile, TSAPIS Nicolas, FATTAL Elias
*Physico-Chimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie. 8612 CNRS – Université Paris
Sud. Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry*

CONTINO-PEPIN Christiane, PUCCI Bernard
*Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, IBMM - UMR 5247, Université
d'Avignon*

A growing interest is going toward Ultrasound Contrast Agents (UCA) of nanometric size. Indeed, their size allows them to easily pass through the endothelial cells of the tumor vasculature to accumulate into the tumor. The constraints due to a sufficient stability and lifetime require the use of nanoparticles made of a liquid core instead of a gaz bubble. This characteristic modifies the interaction between an ultrasound wave and a nanoparticle compare to a regular UCA bubble of micrometric size.

We have investigated two types of liquid-core nanoparticles, the first one possesses a very rigid polymeric shell, whereas for the second type the shell is made of fluorine surfactant molecules.

In order to characterize the ultrasound-nanoparticle interaction, we have performed a systematic study of the acoustic behavior of solutions of our liquid-core nanoparticles, where in each solution an elastic or structural property of the nanoparticle has been modified.

We have measured the speed of sound in the solution, the attenuation of the ultrasound signal transmitted through the solution, and the signal-to-noise ratio of the signal backscattered by the solution. These measurements were performed at various concentration of nanoparticles (from very diluted to highly concentrated solution).

In order to understand and interpret our results, we have in one hand, developed a new theoretical model predicting the acoustic behavior of one nanoparticle (or of a diluted solution of nanoparticles), and in another hand, numerically modeled the ultrasound propagation through a (diluted or concentrated) solution of nanoparticles.

Depending of the type of nanoparticle utilized, the comparison of the numerical results and the theoretical predictions with the experimental measurements has allowed us to define the relevant mechanism in the ultrasound-nanoparticle interaction.

NOUVELLE METHODE DE RECALAGE POUR L'AMÉLIORATION DE L'ESTIMATION DES PARAMÈTRES QUANTITATIFS DE PERFUSION

BOUHLEL Nizar^{1,2}, CORON Alain^{2,4}, LUCIDARME Olivier^{3,5}, BRIDAL Lori^{2,4}

¹Univ Tunis El Manar, National Engineering School of Tunis, Laboratory U2S, Tunisia

²UPMC Univ Paris 06, UMR 7623, LIP, F-75005, Paris, France

³Radiology Department, APHP-Pitié Salpêtrière Medical Center, 75013 Paris, France

⁴CNRS, UMR 7623, LIP, F-75006, Paris, France

⁵CNRS, UMRS 678, LIF, F-75013, Paris, France

L'imagerie de contraste est une technique d'imagerie non invasive et non irradiante. Les échographes sont en plus facilement transportables et temps réel. L'imagerie de contraste utilise des agents de contraste sous forme de microbulles administrées par injection intraveineuse à un patient. Les applications cliniques de l'imagerie de contraste portent sur la visualisation des vaisseaux de petite taille, l'identification et la caractérisation de la vascularisation tumorale, en particulier la tumeur de foie.

L'évaluation des paramètres quantitatifs de perfusion tumorale nécessite la comparaison entre un modèle mathématique de flux et une courbe intensité-temps extraite de la région d'intérêt située dans la tumeur. Ces régions sont sélectionnées par un opérateur dans une image. A cause des mouvements dus aux organes internes, ces régions d'intérêt ne suivent pas les mêmes zones pour toute la séquence. Ceci mènent à des erreurs dans l'estimation des paramètres de la courbe intensité-temps. Pour améliorer la qualité de l'estimation des paramètres de perfusion, nous avons intérêt à compenser ses mouvements et procéder ainsi au recalage.

Généralement pour l'imagerie de contraste, l'imagerie conventionnelle est utilisée pour le recalage. L'imagerie conventionnelle correspond à la réponse linéaire des tissus et les images sont obtenues pendant l'injection des agents de contraste. Sur les échographes cliniques l'imagerie harmonique non linéaire et l'imagerie conventionnelle linéaire sont accessibles simultanément. Notre objectif est d'exploiter la complémentarité des deux modalités d'imagerie afin de réaliser un recalage performant permettant d'améliorer l'estimation des paramètres quantitatifs de perfusion.

Notre objectif est de trouver une transformation afin d'aligner l'ensemble des images d'une séquences avec une image de référence. La transformation est obtenue par minimisation d'une fonction coût. Habituellement la fonction coût ne prend en compte que l'image conventionnelle. Afin d'exploiter la complémentarité de l'image harmonique, une autre fonction coût exploitant les deux types d'image est construite.

Pour notre étude, nous disposons de huit séquences d'images de contraste acquises avec des tumeurs de foie. L'agent de contraste utilisé est de type SonoVue injecté en bolus. Les deux types de modalités conventionnelle et harmonique ont été acquises

et utilisées pour le recalage. Les deux types de recalage utilisant seulement la séquence linéaire et notre approche combinant les deux modalités ont été comparées pour évaluer premièrement la qualité de recalage et deuxièmement évaluer les effets sur l'estimation des paramètres de perfusion. Le recalage est évalué par un expert. L'index du Quality of Fit est calculé en utilisant un modèle mathématique de perfusion et la courbe intensité-temps pour toutes les séquences et pour chaque approche.

Une évaluation visuelle du recalage montre que notre approche donne des meilleurs résultats que l'utilisation seulement de la conventionnelle. L'index QOF est systématiquement amélioré par rapport à la première méthode. Ces résultats préliminaires sur un nombre limité de patients montrent l'intérêt de notre approche. Cette méthode permet une meilleure imagerie paramétrique de la lésion du foie et le développement de nouvelle méthode de segmentation des lésions.

A NEW REGISTRATION METHOD TO IMPROVE ESTIMATION OF PERFUSION QUANTIFICATION PARAMETERS

BOUHLEL Nizar^{1,2}, CORON Alain^{2,4}, LUCIDARME Olivier^{3,5}, BRIDAL Lori^{2,4}

¹Univ Tunis El Manar, National Engineering School of Tunis, Laboratory U2S, Tunisia

²UPMC Univ Paris 06, UMR 7623, LIP, F-75005, Paris, France

³Radiology Department, APHP-Pitié Salpêtrière Medical Center, 75013 Paris, France

⁴CNRS, UMR 7623, LIP, F-75006, Paris, France

⁵CNRS, UMRS 678, LIF, F-75013, Paris, France

Contrast enhanced ultrasound (CEUS) is a safe, noninvasive imaging technique. It is portable and produces images in real-time. Ultrasound contrast agents (UCA) consist of microbubbles administered intravenously to a patient. Contrast ultrasound has proven its clinical interest for the detection and characterization of tumor vascularization, in particular for the characterization of liver lesions.

Quantitative evaluation of tumor perfusion requires comparison between a mathematical model for flow and estimations of the acoustic intensity (proportional to contrast concentration) in a region of interest (ROI) within the tumor. ROI's are selected by an operator on one image, but due to internal organ movement, they don't strictly track the same zone throughout the sequence. This leads to errors in the estimation of the time-intensity curves. To enhance the quality of the estimated perfusion parameters we need to compensate for this motion by image registration.

The registration correction of the contrast images is usually achieved by alignment of conventional (linear, tissue-response) images obtained at different times during the passage of contrast agent. With certain imaging systems, conventional images are acquired simultaneously with nonlinear images detecting only the microbubbles flowing through the tissue. Our objective is to exploit both linear and nonlinear sequences to improve motion compensation (and, thus perfusion quantification) and to investigate if the motion compensation based on the two modalities provides better results than that based on conventional images alone. This approach is justified by the fact that the linear response of the tissue and the nonlinear response of microbubbles are complementary.

Our goal is to find a transformation to align all images within a sequence with a reference image selected at a specific time-point by the operator. The quality of the alignment is evaluated by the cost function or the similarity measure (minimizing the cost function gives the optimum transformation). First, the cost function is calculated for the sequence of conventional images. To use information from the nonlinear sequences another cost function taking into account both the linear and harmonic images was constructed.

Eight hepatic CEUS sequences were acquired from patients with liver lesions. SonoVue contrast agent was injected intravenously as a bolus. Dual images in conventional and cadence CPS (Cadence Contrast Pulse Sequencing) were acquired. Only data within a 250 x 250 pixel rectangular region surrounding the lesion are considered. Registration transformations obtained using linear sequences alone and the combined approach calling upon both linear and nonlinear data were

compared to evaluate firstly the improvement of the ROI alignment and secondly the effect of this alignment on the estimation of perfusion parameters. ROI contour position throughout the sequences was compared when a ROI drawn by an expert on the reference image was automatically transferred by the image-alignment algorithms and when the ROI was drawn by the expert operator on each image of the sequences. A Quality of Fit (QOF) index between the mathematical model for perfusion and the estimations of the acoustic intensity as a function of time (time-intensity curve) was calculated for each sequence and approach.

Visual evaluation of alignment shows that our approach gives better alignment than the use of the conventional sequence alone. The QOF index was consistently best for the combined linear and nonlinear registration approach. These preliminary results on a limited number of patients demonstrate the potential usefulness of our approach. Ultimately this approach should enable robust parametric imaging in hepatic lesions and contribute to the development of algorithms for automatic segmentation of lesions.

IMAGERIE MOLECULAIRE PAR IRM CEST DE LA NEO-ANGIOGENESE TUMORALE CHEZ LA SOURIS A L'AIDE D'AGENTS DE CONTRASTE LIPOCEST FONCTIONNALISES

FLAMENT Julien¹, GEFFROY Françoise¹, MEDINA Christelle², ROBIC Caroline²,
MAYER Jean-François², MERIAUX Sébastien¹, PORT Marc², BLOCH Gilles¹, LE
BIHAN Denis¹, LETHIMONNIER Franck¹, BOUMEZBEUR Fawzi¹

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

²Guerbet, Research Division, BP 57400, 95943 Roissy-Charles de Gaulle Cedex,
France

INTRODUCTION

Les LipoCEST sont des agents de contraste liposomaux concentrant des complexes paramagnétiques CEST (pour « Chemical Exchange Saturation Transfer ») [1,2]. Ils possèdent une sensibilité de détection *in vitro* de l'ordre du nanomolaire et sont facilement fonctionnalisables par greffe de peptides ciblant des marqueurs spécifiques tels que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ exprimées lors de la néo-angiogenèse tumorale [3]. Notre objectif est de démontrer la détection des agents LipoCEST par IRM-CEST *in vivo* après injection systémique et de valider la stratégie de ciblage spécifique des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ présents au niveau de tumeurs cérébrales U87MG. Des images de fluorescence des agents LipoCEST incorporant de la rhodamine dans leur membrane et des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ obtenues après marquage immunohistochimique devraient confirmer l'association spécifique des deux.

MATERIELS ET METHODES

Modèle animal. L'étude a été menée sur 24 souris « nude » avec une tumeur cérébrale induite par injection IC de cellules U87MG (taille tumeur ~ 2-5mm).

Agents de contraste. Deux Tm(III)-LipoCEST (Guerbet, France) incorporant de la rhodamine ont été utilisés: RGD-LipoCEST (fonctionnalisé) et Ctrl-LipoCEST (contrôle) présentant des contrastes aMTR (« asymmetric Magnetization Transfer Ratio ») maximaux de -17% et -20% respectivement ($B_{1sat} = 7\mu T$, $\delta_{sat} = \pm 8ppm$).

IRM-CEST. Les acquisitions CEST ont été réalisées avant ($t = 0'$) et après ($t = 18'/30'/42'/60'/72'/84'/96'/108'$) injection de 200 μL d'agent de contraste ($n = 12$ pour chaque LipoCEST) à 7T (Bruker, Allemagne) à l'aide d'une séquence MSME (TE/TR = 54/5000ms, R = 150x150x660 μm^3 , $T_{acq} = 14min$) précédée d'une saturation ($T_{sat} = 400ms$, $B_{1sat} = 7\mu T$, $\delta_{sat} = \pm 8ppm$).

RESULTATS ET DISCUSSION

Comme l'illustre la Fig. 1.A, les LipoCEST sont tout les deux visibles *in vivo* après injection IV avec des spots plus intenses (max. aMTR = -6.5%) localisés essentiellement dans la périphérie de la tumeur.

Après moyenne à travers les deux cohortes ($n = 12$) des aMTRs dans chaque ROIs « tumeur » et « controlatéral », des décours temporels ont été tracés (Fig. 1.B) et un test de Student a été appliqué. On observe une accumulation non-spécifique du Ctrl-LipoCEST dans les deux ROIs et du RGD-LipoCEST dans la zone « controlatérale » (Fig. 1.B, lignes verte, jaune et rouge respectivement) suivie d'un wash-out des

LipoCEST. En revanche dans la « tumeur » avec le LipoCEST fonctionnalisé, l'association semble irréversible et le contraste CEST dans cette condition est significativement différent des trois autres au-delà d'une heure post-injection (Fig. 1.B, ligne bleue, $p < 0.01$).

Les résultats histologiques montrent que les LipoCEST et les cibles $\alpha_v\beta_3$ sont bien présents et co-localisent (Fig. 2, 3^{ème} colonne). Comme attendu, le Ctrl-LipoCEST a été rincé par la perfusion alors que le RGD-LipoCEST reste lié de façon spécifique aux récepteurs $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 2, 2^{ème} et 4^{ème} lignes respectivement).

CONCLUSION

Cette étude représente la première visualisation *in vivo* d'un LipoCEST après injection systémique. De plus, elle constitue une première étape vers l'imagerie moléculaire des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ impliqués dans la néo-angiogenèse tumorale grâce à des agents LipoCEST fonctionnalisés.

FIGURES

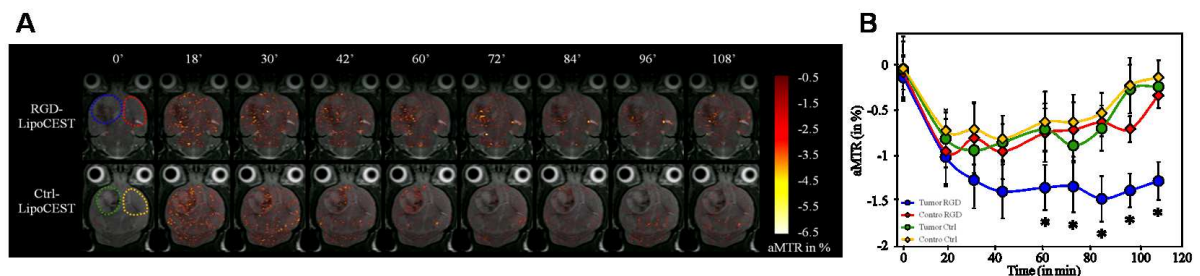


Figure 1. A. Décours temporels typiques d'images CEST acquises sur ~2h après injection IV de RGD-LipoCEST (haut) ou de Ctrl-LipoCEST (bas). Les ROIs « tumeur » et « controlatéral » ont été définies manuellement pour moyenner les aMTRs et appliquer les tests statistiques (ROIs bleue/verte : « tumeur »; ROIs rouge/jaune : « controlatéral »). **B.** Moyenne des aMTRs ($n = 12$) dans les ROIs « tumeur » et « controlatéral » (lignes bleue et rouge respectivement avec le RGD-LipoCEST; lignes verte et jaune respectivement avec le Ctrl-LipoCEST).

Figure 1. A. Typical time-series of CEST images acquired over ~2h following IV injection of either RGD-LipoCEST (top) or Ctrl-LipoCEST (bottom). The "tumor" and "controlateral" ROIs were defined manually to average aMTRs and run statistical tests (blue/green ROIs : "tumor"; red/yellow ROIs : "controlateral"). **B.** Mean aMTRs after group averaging ($n=12$) in "tumor" and "controlateral" ROIs (blue and red lines respectively with RGD-LipoCEST; green and yellow lines respectively with Ctrl-LipoCEST).

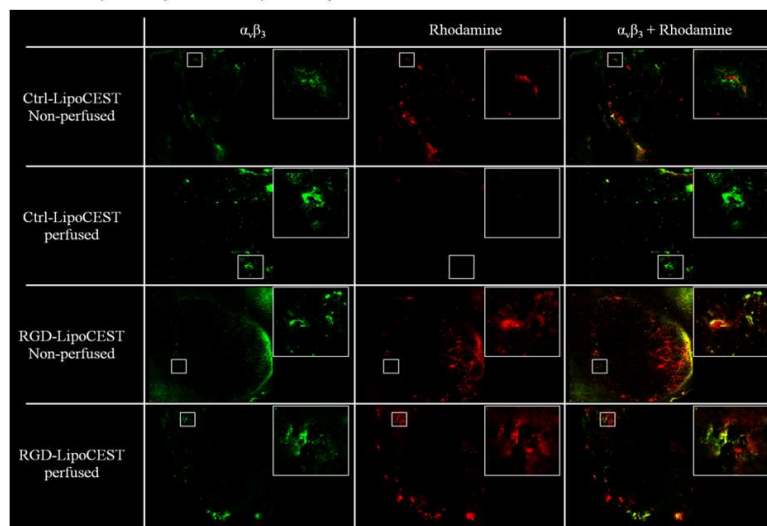


Figure 2. Images de fluorescence des récepteurs $\alpha_v\beta_3$, du LipoCEST et superposition des deux (1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} colonnes respectivement) dans 4 combinaisons différentes de LipoCEST et de méthode de sacrifice. Un zoom sur un vaisseau sanguin (carré blanc) est mis en évidence.

Figure 2. Fluorescence images off $\alpha_v\beta_3$ receptors, LipoCEST and overlay (1st, 2nd and 3rd columns respectively) in 4 different combinations off LipoCEST and sacrifice method. A zoom of a blood vessel (white square) was highlighted.

MOLECULAR IMAGING BY CEST MRI OF MICE BRAIN TUMOR NEO-ANGIOGENESIS USING TARGETED LIPOCEST CONTRAST AGENT

FLAMENT Julien¹, GEFFROY Françoise¹, MEDINA Christelle², ROBIC Caroline²,
MAYER Jean-François², MERIAUX Sébastien¹, PORT Marc², BLOCH Gilles¹, LE
BIHAN Denis¹, LETHIMONNIER Franck¹, BOUMEZBEUR Fawzi¹

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

²Guerbet, Research Division, BP 57400, 95943 Roissy-Charles de Gaulle Cedex,
France

INTRODUCTION

LipoCEST are liposomal contrast agents concentrating paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) complexes [1,2]. They allow achieving nanomolar sensitivity *in vitro* and can be easily functionalized by grafting peptide in order to target specific biomarkers such as the integrin $\alpha_v\beta_3$ expressed in tumor neo-angiogenesis [3]. We propose to demonstrate firstly that LipoCEST can be detected *in vivo* after systemic injection using CEST-MRI and secondly that $\alpha_v\beta_3$ receptors expressed by U87MG brain tumors can be specifically targeted using a RGD-LipoCEST. Fluorescence images of LipoCEST incorporating rhodamine in their membrane and $\alpha_v\beta_3$ receptors obtained after immuno-histochemistry staining should confirm their specific binding.

MATERIALS AND METHODS

Animal model. The study was performed on 24 "nude" mice with a brain tumor induced by IC injection of U87MG cells (tumor size ~ 2-5mm).

Contrast Agents. Two Tm(III)-LipoCEST (Guerbet, France) incorporating rhodamine were used: RGD-LipoCEST (targeted) and Ctrl-LipoCEST (control) exhibiting strong specific aMTR ("asymmetric Magnetization Transfer Ratio"): -17% and -20% respectively ($B_{1sat} = 7\mu T$, $\delta_{sat} = \pm 8ppm$).

CEST-MRI. CEST acquisitions were acquired before ($t = 0'$) and after ($t = 18'/30'/42'/60'/72'/84'/96'/108'$) injection of 200 μL of contrast agent ($n = 12$ for each LipoCEST) at 7T (Bruker, Germany) using a MSME sequence (TE/TR = 54/5000ms, R = 150x150x660 μm^3 , $T_{acq} = 14min$) preceded by a saturation pulse ($T_{sat} = 400ms$, $B_{1sat} = 7\mu T$, $\delta_{sat} = \pm 8ppm$).

RESULTS AND DISCUSSION

As shown by Fig. 1.A, both LipoCEST were visible *in vivo* after IV injection and brighter spots (max. aMTR = -6.5%) were essentially located in the "tumor" ROI periphery.

After group averaging ($n = 12$) over both "tumor" and "controlateral" ROIs, corresponding time-series were plotted (Fig. 1.B) and Student's t-tests were performed. One can note a non-specific accumulation of Ctrl-LipoCEST in both ROIs and RGD-LipoCEST in "controlateral" ROI (Fig. 1.B, green, yellow and red lines respectively) followed by a wash-out of LipoCEST contrast agents. However in the "tumor" ROI with targeted LipoCEST, the binding seemed to be irreversible and CEST contrast in this condition was significantly different from the others beyond one hour post-injection (Fig. 1B, blue line, $p < 0.01$).

Histological study proved that LipoCEST and $\alpha_v\beta_3$ were present and mostly co-localized (Fig. 2, 3rd column). As expected, Ctrl-LipoCEST was flushed away when brain was perfused whereas RGD-LipoCEST remained bounded (Fig. 2, 2nd and 4th lines respectively).

CONCLUSION

This study represents the first visualization *in vivo* of LipoCEST following systemic injection. Moreover, it constitutes a conclusive first step toward molecular imaging of $\alpha_v\beta_3$ receptors involved in tumor neo-angiogenesis using targeted LipoCEST contrast agents.

REFERENCES

- [1] Aime et al., *Angew Chem* 2005; 44(34), 5513
 [2] Balaban et al., *JMR* 2000; 143(1), 79
 [3] Eliceiri et al., *Mol. Medicine* 1998; 4(12), 741

FIGURES

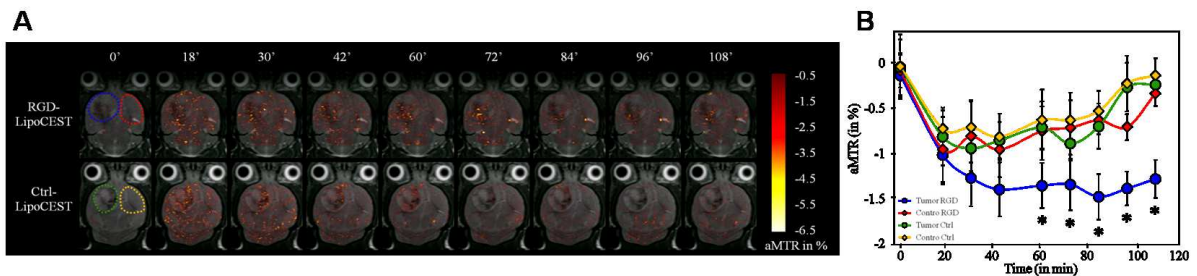


Figure 1. A. Décours temporels typiques d'images CEST acquises sur ~2h après injection IV de RGD-LipoCEST (haut) ou de Ctrl-LipoCEST (bas). Les ROIs « tumeur » et « controlatéral » ont été définies manuellement pour moyenniser les aMTRs et appliquer les tests statistiques (ROIs bleue/verte : « tumeur »; ROIs rouge/jaune : « controlatéral »). **B.** Moyenne des aMTRs (n = 12) dans les ROIs « tumeur » et « controlatéral » (lignes bleue et rouge respectivement avec le RGD-LipoCEST; lignes verte et jaune respectivement avec le Ctrl-LipoCEST).

Figure 1. A. Typical time-series of CEST images acquired over ~2h following IV injection of either RGD-LipoCEST (top) or Ctrl-LipoCEST (bottom). The "tumor" and "controlateral" ROIs were defined manually to average aMTRs and run statistical tests (blue/green ROIs : "tumor"; red/yellow ROIs : "controlateral"). **B.** Mean aMTRs after group averaging (n=12) in "tumor" and "controlateral" ROIs (blue and red lines respectively with RGD-LipoCEST; green and yellow lines respectively with Ctrl-LipoCEST).

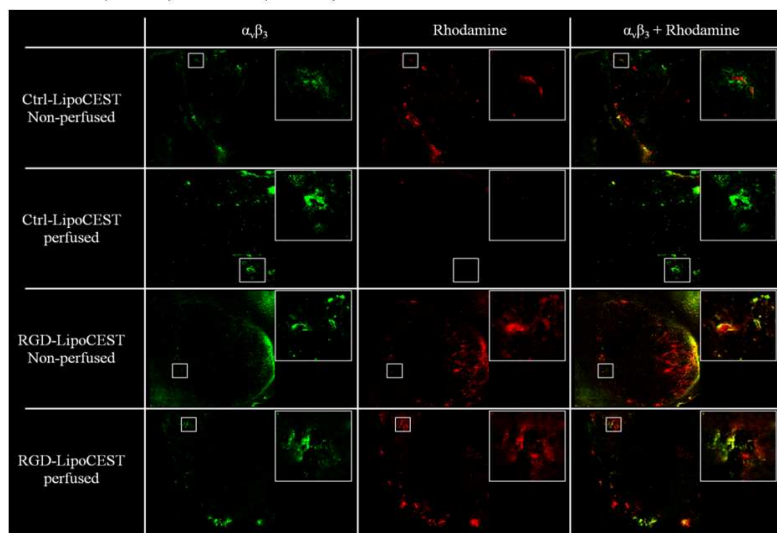


Figure 2. Images de fluorescence des récepteurs $\alpha_v\beta_3$, du LipoCEST et superposition des deux (1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} colonnes respectivement) dans 4 combinaisons différentes de LipoCEST et de méthode de sacrifice. Un zoom sur un vaisseau sanguin (carré blanc) est mis en évidence.

Figure 2. Fluorescence images off $\alpha_v\beta_3$ receptors, LipoCEST and overlay (1st, 2nd and 3rd columns respectively) in 4 different combinations off LipoCEST and sacrifice method. A zoom of a blood vessel (white square) was highlighted.

DENDRIMERES LUMINESCENTS DE GENERATION 3 A BASE DE LANTHANIDE POUR IMAGERIE CELLULAIRE

FOUCAULT Alexandra, VILLETTE Sandrine, PETOUD Stéphane

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR4301, Orléans, France

Présentation souhaitée : oral

Les composés de lanthanides luminescents possèdent des propriétés uniques offrant de nombreux avantages pour l'étude de problèmes biologiques. Leur temps de vie de luminescence sont relativement longs (de quelques nanosecondes à plusieurs millisecondes), ils résistent à la photodécomposition et ont des bandes d'émissions étroites qui ne se recouvrent pas permettant ainsi de les distinguer spectralement. De plus, certains lanthanides (Yb^{3+} , Nd^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} , Pr^{3+}) émettent dans le proche infrarouge, ce qui les rend particulièrement intéressants pour l'imagerie *in vivo*. En plus de pénétrer profondément dans les tissus biologiques sans créer de dommages, ce type de lumière permet de travailler dans un domaine où l'autofluorescence est très faible, donnant ainsi un meilleur rapport signal sur bruit et une meilleure sensibilité de détection.

Les lanthanides ont une faible absorption dans le domaine de l'UV et du visible. Pour palier à cela, il est nécessaire de sensibiliser les différents cations lanthanides par l'effet d'antenne : un sensibilisateur ou chromophore va capter l'énergie lumineuse d'excitation et la transférer par des interactions de type non-radiatif au lanthanide qui va alors émettre sa luminescence. De plus, le cation lanthanide doit être proche de l'antenne et coordonné de manière à former un complexe stable pour éviter que métal libre (qui est toxique) ne soit relâché dans la cellule.

Le laboratoire a développé des nouveaux composés dérivés de dendrimères polyamidoamine de génération-3 capables de sensibiliser les cations lanthanides mais également d'augmenter considérablement la sensibilité de la détection en maximisant le nombre de photons émis par unité de volume. Les dendrimères étudiés sont composés de 8 cations lanthanides (Eu^{3+} ou Nd^{3+}) sensibilisés par 32 antennes dérivées de 1,8-naphthalimide.

Notre but est actuellement d'étudier le comportement de ces nouveaux composés dans la cellule avant de nous intéresser au petit animal. Nous avons montré que ces dendrimères ne sont pas toxiques et sont bien internalisés malgré leur poids moléculaire élevé (environ 29000 Dalton). Ces composés montrent également une bonne stabilité en milieu biologique. Des études de microscopie mettent en évidence une localisation préférentiellement périnucléaire ainsi qu'une transmission du composé aux cellules filles au cours des divisions cellulaires.

Les résultats obtenus et la forte intensité lumineuse émise par les dendrimères en fait des candidats de choix pour l'imagerie du petit animal.

GENERATION-3 LUMINESCENT DENDRIMER LANTHANIDE COMPLEXES FOR BIOLOGICAL IMAGERY

FOUCAULT Alexandra, Sandrine Villette et Stéphane Petoud

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR4301, Orléans, France

Présentation souhaitée : oral

Luminescent lanthanides probes are emerging in optical imaging. They have several advantages for the study and analysis of biological problems. Lanthanide ions possess long emission lifetimes (few tens of nanoseconds to several milliseconds), a good resistance to photodecomposition and sharp emission bands that allow spectral discrimination.

Several lanthanides (Yb^{3+} , Nd^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} , Pr^{3+}) emit in the near infrared (NIR) making them very interesting for *in vivo* imaging. NIR light can cross important depths of biological tissue and allow detection in a wavelength range almost free of autofluorescence, increasing signal-to-noise and detection sensitivity.

Free lanthanide ions show very small absorption in the UV and visible regions. For this reason, it is necessary to sensitize lanthanide ions by the “antenna effect”. An antenna is a chromophore which absorbs excitation light and transfers the energy to the lanthanide which can then emit its luminescence. In addition the lanthanide ion must be coordinated close to the antenna in a stable scaffold to prevent free lanthanide (which is toxic) to be released in cells.

We have developed new generation-3 polyamidoamine dendrimers which can sensitize 8 lanthanide ions (Eu^{3+} or Nd^{3+}) and possess 32 antennae derived from 1,8-naphthalimide attached to the end branches. This strategy allows to obtain a high number of photons per unit volume leading to enhanced sensitive detection.

The aim is to study the behavior of these new compounds *in cellulo* before studying it *in vivo* (mice, rat).

We have shown that our prototypes molecules are not cytotoxic and present a good cellular uptake despite the high molecular weight (approximately 29000 Dalton). We have demonstrated that these compounds are highly stable in biological environment. Microscopic studies showed perinuclear localization and a good transfer to daughter cells during cell divisions.

The strong emission light of our dendrimer imaging agents and their efficiencies *in cellulo* indicates that it could be a promising candidate for *in vivo* imaging.

DENDRITIC CHELATES AND DENDRONIZED NANOPARTICLES AS USEFUL TOOLS FOR BIOMEDICAL IMAGING ((ME)MRI, SPECT)

GHOBRIL Cynthia,¹ GAROFALO Antonio,¹ POPA Gabriela,¹ BASLY Brice,¹ BILLOTEY Claire,² BEGIN-COLIN Sylvie,¹ and FELDER-FLESCHE Delphine¹

¹ *Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg IPCMS UMR CNRS/UdS 7504 23 rue du Loess BP 43, F-67034 Strasbourg, France.*

Delphine.Felder@ipcms.u-strasbg.fr

² *Laboratoire de Physico-chimie des Matériaux Luminescents LPCML-UCBL UMR 5620 5 place d'Arsonval F-69437 Lyon, France.*

Le développement des techniques scientifiques actuelles en médecine, telles l'imagerie par résonance magnétique et la Médecine Nucléaire, améliore jour après jour la qualité de la vie et la santé des Hommes. Le diagnostic de maladies neurodégénératives, telles la maladie de Parkinson, exige des agents contraste (AC) capables d'atteindre le cerveau et donc de passer la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Ainsi, le but de notre recherche est d'adopter une stratégie polyfonctionnelle pour l'élaboration d'agents de contraste MEMRI macromoléculaires et de radiopharmaceutiques SPECT, spécifiques du cerveau, par une approche 'dendritique'. Une telle approche apparaît également judicieuse pour l'élaboration de nanoparticules magnétiques multimodales utilisables en IRM.

Pour des applications biologiques, les dendrimères, et plus particulièrement, leurs composantes unitaires appelées "dendron", sont extrêmement prometteurs car la diversité de fonctionnalisation permise par la structure arborescente résout simultanément les problèmes de biocompatibilité, de toxicité, de stabilité *in vivo* et de spécificité. D'autre part, en plus de la multifonctionnalisation d'une molécule de bas poids moléculaire, la structure arborescente monodisperse permet une polyvalence de taille, de forme (selon la génération) et de propriétés physicochimiques (hydrophilie). Les effets résultants sur la stabilité (effet dendrimère), les qualités de contraste et la biodistribution des AC peuvent ainsi clairement être identifiés. Dans le domaine des biodendrimères, notre travail se concentre sur le développement de chélates dendritiques capables de complexer des ions tels le Manganèse (II) (MEMRI), mais également le ^{99m}Tc (SPECT). La structure branchée pegylée greffée au chélate est polyfonctionnelle et permet le greffage notamment de fluorophores : ces nano-objets sont alors utilisables en imagerie multimodale.

Dans une première partie, nous souhaiterions décrire la synthèse, les études de toxicité *in vitro* et de relaxivité *in vivo* d'un chélate dendritique de manganèse polyfonctionnel pour une possible application en imagerie cérébrale. Nous discuterons également la synthèse et la stabilité en milieu physiologique d'un radiopharmaceutique dendritique à base de ^{99m}Tc. Dans une deuxième partie consacrée aux nanoparticules hybrides dendronisées, nos études concernant des oxydes de fer de taille 12 nm menant à des suspensions très stables dans des conditions physiologiques, seront discutées en détails. Les propriétés magnétiques, optiques (par greffage de fluorophore), et la relaxivité de ces suspensions colloïdales

ont été également étudiées afin d'évaluer leur possible utilisation en tant qu'AC multimodal.

The development of the current scientific techniques in medicine such as Magnetic Resonance Imaging and Nuclear Medicine improve day by day the quality of human health and life. The diagnosis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer or Parkinson requires contrast agents (CAs) able to reach the brain by first getting through the Blood Brain Barrier (BBB). Thus, the goal of our research is to adopt a polyfunctional strategy for the elaboration of brain-specific macromolecular (Manganese Enhanced) MRI contrast agents and radiopharmaceuticals by means of chemical engineering and, in particular, a 'dendrimer' approach. Such approach appears also encouraging for the elaboration of smart magnetic nanoparticles useful for MRI.

For biological applications, dendrimers and especially the so-called "dendron" building blocks are very promising as the diversity of functionalization brought by the arborescent structure simultaneously solves the problems of biocompatibility, low toxicity, large *in vivo* stability and specificity. Moreover, in addition to the multifunctionalization of a low molecular weight molecule, the arborescent monodisperse building blocks allow a versatility of size (according to the generation) and of physicochemical properties (hydrophilic, lipophilic). The resulting effects on stability (dendrimer effect), contrast qualities and biodistribution of the contrast agents can clearly be identified. In the field of tree-like molecules, our work is focused on the development of dendritic chelates able to complex ions such as Manganese (II) (MEMRI) but also ^{99m}Tc for Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT). The arborescent PEGylated structure grafted at the focal point of the chelate is polyfunctional and allows for fluorophore binding leading to multimodal nanoobjects.

In a first part, the presentation will describe the synthesis, *in vitro* toxicity studies (on cerebellar neurons) and *in vivo* relaxivity measurements of dendritic polyfunctional Mn²⁺ chelates in regard to their potential application in (ME)MRI dedicated to brain imaging. We will also discuss the synthesis of a stable dendritic ^{99m}Tc-based radiopharmaceutical. In a second part dedicated to dendritic hybrid nanoparticles, the studies on dendronised Ultrasmall superparamagnetic Iron Oxides (USPIO) leading to very stable suspensions in physiological conditions will be discussed in details. The magnetic, optic and relaxation properties of the colloidal suspensions were also studied in order to evaluate the possible use of these materials as efficient multimodal Cas.

Bioconjugate Chemistry **2009**, *20*, 760-767; *New J. Chem.*, **2010**, *34*, 267-275; *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 985-987; *Biomaterials*. **2011**, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.026.

MIGNET_ SPHERULITES comme agent de contraste IRM

HATEM Maklouf¹, DOAN Bich-Thuy¹, KHAWAND Karel¹, MICHEL Agnès²,
VILLEMANT Benoît², AUTRET Gwennhael³, CUENOD Charles-André³, SCHERMAN
Daniel¹, BESSODES Michel¹, CRAUSTE-MANCIET Sylvie¹, BROSSARD Denis¹,
MIGNET Nathalie¹

¹UMR 8151 CNRS, U1022 INSERM, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique
et d'Imagerie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Chimie-ParisTech, 4
avenue de l'observatoire, 75006 Paris
Nathalie.Mignet@parisdescartes.fr

²Plateforme Géochimie Inorganique UPMC UFR 918, UPMC-CNRS UMR 7193
IsTeP, UMR 7154, IPGP, Equipe Géologie des Systèmes Volcaniques1, rue Jussieu
75005 Paris

³ Plateforme IRM, PARCC - HEGP - INSERM U.970, 56, rue Leblanc
75015 PARIS

Parmi les techniques d'imagerie in vivo, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) se distingue par sa résolution spatiale élevée, ses propriétés 3D, son caractère multiparamétrique et non invasif. L'IRM est reconnue comme un outil d'imagerie anatomique et fonctionnel puissant de diagnostic hospitalier chez l'homme pour identifier un tissu pathologique. L'IRM manque toutefois de sensibilité et doit la plupart du temps être accompagnée par l'injection d'agents de contraste. Le développement d'agents de contraste IRM toujours plus efficaces reste toutefois crucial pour fiabiliser le diagnostic et aider au suivi thérapeutique.

Les sphérulites [1] sont des structures organisées concentriques qui comportent plusieurs alternances de couches aqueuses et lipidiques. L'alternance des bicouches de phospholipides se poursuit jusqu'au cœur de l'objet (Figure). Ainsi des principes actifs peuvent-ils être concentrés dans ces structures. Dans ce travail, nous avons choisi d'évaluer des sphérulites contenant du gadolinium chélaté comme agent de contraste IRM.

La formulation de ces objets est basée sur des excipients acceptés au niveau pharmaceutique, le lipoid 80 et le tween 80. Le mélange de ces excipients est réalisé avec un milieu aqueux dans des proportions optimisées, puis est cisailé afin d'obtenir des sphérulites de l'ordre de 100 à 200 nm comme observé par cryo-microscopie (Figure).

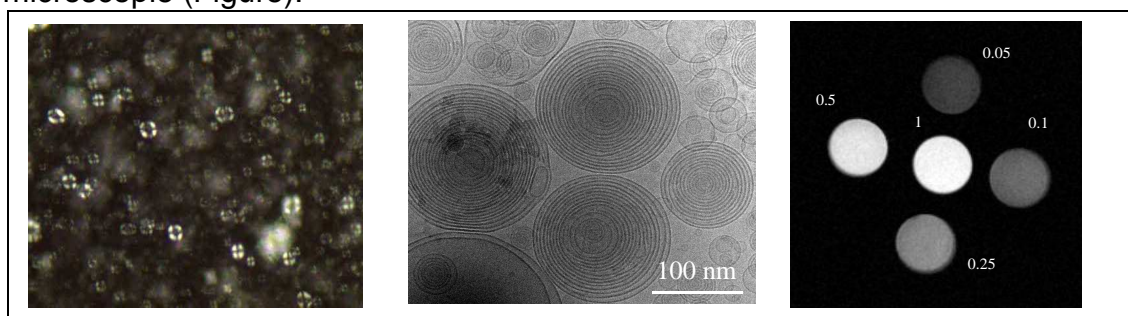


Figure: Polarisation de la lumière par des sphérulites observées par microscopie optique (gauche). Structure des sphérulites observée par cryomicroscopie électronique (droite). Image RM pondérée en T1 de sphérulites en concentration variable de Gadolinium à 7T

L'incorporation de chélates de gadolinium a été effectuée soit dans la phase aqueuse, dans les bicouches lipidiques ou bien par fonctionnalisation de la surface des particules, ceci afin d'évaluer l'impact de l'assemblage sur la relaxivité IRM r1 à différents champs magnétiques (0.47 à 7T). La quantité de gadolinium incorporée ou greffée a été dosée par spectrométrie par torche à plasma.

Nous avons montré que les sphérulites augmentaient la relaxivité d'un cryptand comme le DOTAREM lorsque celui-ci était incorporé via une ancre lipidique ou en surface des sphérulites en cohérence avec l'augmentation de la taille de l'édifice. Suite à ces résultats et en raison de la structure de ces objets et des études précédentes, les sphérulites seront par la suite évaluées en tant qu'agents théranostiques [2,3] et moléculaires [4-6].

SPHERULITES AS MRI CONTRAST AGENT

HATEM Maklouf¹, DOAN Bich-Thuy¹, Khawand Karel¹, MICHEL Agnès²,
VILLEMANT Benoît², AUTRET Gwennhael³, CUENOD Charles-André³, SCHERMAN
Daniel¹, BESSODES Michel¹, CRAUSTE-MANCIET Sylvie¹, BROSSARD Denis¹,
MIGNET Nathalie¹

¹UMR 8151 CNRS, U1022 INSERM, Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique
et d'Imagerie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Chimie-ParisTech, 4
avenue de l'observatoire, 75006 Paris
Nathalie.Mignet@parisdescartes.fr

²Plateforme Géochimie Inorganique UPMC UFR 918, UPMC-CNRS UMR 7193
IsTeP, UMR 7154, IPGP, Equipe Géologie des Systèmes Volcaniques1, rue Jussieu
75005 Paris

³ Plateforme IRM, PARCC - HEGP - INSERM U.970, 56, rue Leblanc
75015 PARIS

Among the imaging techniques in vivo, Magnetic Resonance Imaging (MRI) has the highest spatial resolution, excellent 3D properties, is multi-parametric and non-invasive. MRI is recognised as a powerful anatomic and functional imaging tool to identify a pathological tissue in clinic. However, MRI lacks sensitivity and is mostly used with contrast agents to increase the signal. The development of new contrast agents is still required to insure the diagnostic and propose personalised therapy.

Spherulites [1] are nanoparticles made of alternating aqueous and lipidic bilayers organised as onions. The absence of an aqueous core, as referred to their lipidic counterpart liposomes, could allow them to load a fair amount of drug. In this work, we chose to evaluate spherulites containing gadolinium as MRI contrast agents.

The formulation is based on pharmaceutically accepted excipient, which mixed at a specific ratio in presence of the right amount of water can lead to spherulites after shearing stress. The characterisation of these objects showed that the particles obtained were in the 100-200 nm range and exhibit 10 to 15 bilayers as observed by cryoelectron microscopy.

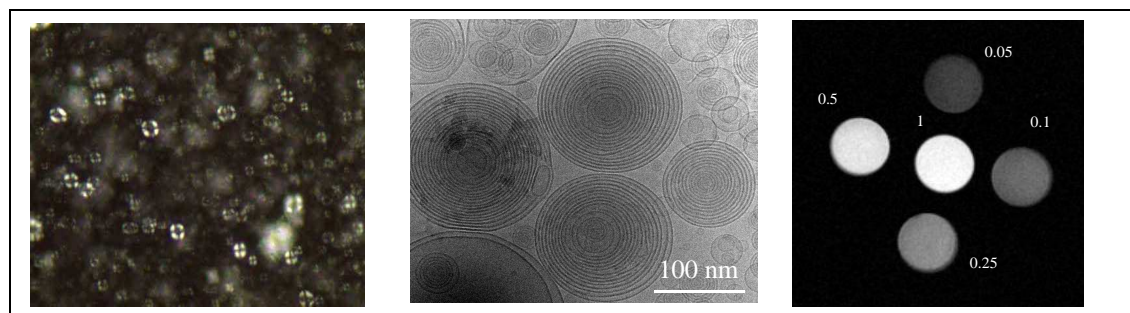


Figure: Light polarisation with spherulites observed by optical microscopy (left). Spherulitic structures observed by cryoelectron microscopy (middle). T1-MRI signal of spherulites at increasing Gd concentration (mM) at 7T (Right).

Incorporation of gadolinium chelates was either done in the aqueous phase in between the bilayers, in the lipidic bilayer or at the surface of the particles. We then evaluated the impact of these various assemblies on the relaxivity r_1 at different fields (0.47 to 7T). Amount of gadolinium incorporated or grafted was dosed by ICP-MS.

We found that inserting a lipid bearing a gadolinium chelate or coupling this gadolinium chelate at the surface of the spherulites increased the relaxivity of this chelate, such as DOTAREM or DTPA.Gd, as could be expected from the size increase of the assembly. Based on these results, the specific structure of the spherulites, and the literature, we will evaluate now the interest of using spherulites as theranostic [2,3] and molecular [4,5] agents.

1. Freund, O.; Mahy, P.; Amedee, J.; Roux, D.; Laversanne, R., Encapsulation of DNA in new multilamellar vesicles prepared by shearing a lyotropic lamellar phase. *J Microencapsul* **2000**, *17*, 157-168.
2. Mignet, N.; Brun, A.; Degert, C.; Delord, B.; Roux, D.; Helene, C.; Laversanne, R.; Francois, J.C., The spherulites(tm): A promising carrier for oligonucleotide delivery. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 3134-3142.
3. Pott, T.; Roux, D., DNA intercalation in neutral multilamellar membranes. *FEBS Lett* **2002**, *511*, 150-154.
4. Chenevier, P.; Delord, B.; Amedee, J.; Bareille, R.; Ichas, F.; Roux, D., Rgd-functionalized spherulites as targeted vectors captured by adherent cultured cells. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1593*, 17-27.
5. Poirier, C.; van Effenterre, D.; Delord, B.; Johannes, L.; Roux, D., Specific adsorption of functionalized colloids at the surface of living cells: A quantitative kinetic analysis of the receptor-mediated binding. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 2450-2457.
6. Simard, P.; Hoarau, D.; Khalid, M.N.; Roux, E.; Leroux, J.C., Preparation and in vivo evaluation of pegylated spherulite formulations. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1715*, 37-48.

**COMPLEXES DE LANTHANIDES A BASE D'AMINOPYRIDINE :
AGENTS DE CONTRASTE MULTIMODAUX POUR LA DETECTION D'UNE
ACTIVITE ENZYMATIQUE**

HE Jiafeng¹, CHAUVIN Thomas², PETOUX Stephane², BADET Bernard¹, TÓTH
Eva², DURAND Philippe¹

¹ *ICSN-CNRS (UPR 2301) Avenue de la Terrasse 91198 Gif-sur-Yvette*

² *CBM-CNRS (UPR 4301), Rue Charles Sadron, 45071 Orléans*

Les sondes PARACEST ou luminescentes construites à partir de lanthanides sont des plateformes utiles pour l'imagerie moléculaire. Elles présentent des propriétés différentes et complémentaires qu'il est intéressant de combiner pour la visualisation d'événements à l'échelle moléculaire. C'est dans ce but que nous avons conçu et synthétisé de nouveaux ligands macrocycliques dérivés d'aminopyridines. Les propriétés physicochimiques de leurs complexes avec la plupart des lanthanides ont été étudiées en vue de leur application comme agents bimodaux. L'addition d'une entité auto-immolable confère à ces plateformes une sensibilité à l'activité d'une large gamme d'activités enzymatiques qu'il devient alors possible de détecter.

AMINOPYRIDINE BASED LANTHANIDE COMPLEXES: MULTIMODAL CONTRAST AGENTS FOR ENZYME DETECTION

HE Jiefang¹, CHAUVIN Thomas², PETOUX Stephane², BADET Bernard¹, TÓTH Eva², DURAND Philippe¹

¹ ICSN-CNRS (UPR 2301) Avenue de la Terrasse 91198 Gif-sur-Yvette

² CBM-CNRS (UPR 4301), Rue Charles Sadron, 45071 Orléans

PARACEST and luminescent lanthanide-based probes are suitable platforms for application as molecular imaging agents. They exhibit different and complementary specific features that could be interesting to combine for visualization of molecular events. In this hope we designed, synthesized and evaluated new aminopyridine-based macrocyclic ligands. Physicochemical properties of their complexes with most of the lanthanides were studied in view of their application as bimodal agents. Addition of self-immolative spacers on this platform endowed these agents with the capacity of targeting a large variety of enzymes enzyme-sensitive.

UTILISATION DES AGENTS DE CONTRASTE ULTRASONORE EN RECHERCHE PRECLINIQUE: RECOMMANDATIONS POUR L'IMAGERIE DU PETIT ANIMAL

HYVELIN Jean-Marc, TARDY Isabelle, ARBOGAST Christophe, COSTA Maria,
EMMEL Patricia, HELBERT Alexandre, THERAULAZ Martine
and TRANQUART François

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

L'imagerie non invasive est un outil majeur dans l'amélioration des processus de recherche et développement de nouvelle thérapie. Les techniques d'imagerie ultrasonores permettent la détection, la caractérisation et le suivi de lésions induites dans les modèles animaux. De plus, la majorité des échographes utilisés en imagerie préclinique sont identiques à ceux utilisés en clinique humaine favorisant ainsi la translation entre recherche préclinique et application clinique. Les agents de contraste ultrasonore (ACU) sont des microbulles de gaz stabilisé par une coque lipidique pour la plupart d'entre eux. Les ACU associés aux modes de détection ultrasonore spécifique, permettent une imagerie de haute résolution de la perfusion des organes/lésions en temps réel, appelé Imagerie de Contraste Dynamique Ultrasonore (ICDU). Le récent développement d'agent de contrastes ultrasonores ciblés offre la capacité d'imager la perfusion et l'expression de marqueurs moléculaires au sein d'un organe/lésion. Cette technique d'imagerie moléculaire ultrasonore (IM-US) repose sur la capacité de la microbubble à se lier à un récepteur endothélial d'intérêt grâce à la présence d'un peptide/anticorps attaché sur la coque lipidique.

Néanmoins, bien que ces techniques d'imagerie offrent un intérêt majeur, l'imagerie ultrasonore moléculaire requiert une très bonne reproductibilité. L'imagerie de contraste ultrasonore est une technique pouvant être affecté par l'opérateur requérant une procédure rigoureuse dans : 1) la préparation et l'utilisation des agents de contraste ; 2) l'injection de ces agents ; 3) l'optimisation des paramètres de l'échographe et de la procédure d'acquisition. L'harmonisation de ces procédures permettrait de diminuer la variabilité entre les utilisateurs ainsi qu'entre les centres de recherche.

Nous présenterons des éléments clés pouvant altérer la reproductibilité des résultats et fournirons des recommandations pour limiter/supprimer leurs effets. Sur la base de notre expérience dans le développement d'agent de contraste, nous avons identifié plusieurs facteurs pouvant être répartis selon trois groupes : ceux qui relatent de la physiologie de l'animal ; ceux liés aux agents de contraste ultrasonore ; et ceux liés à l'acquisition des signaux ultrasonores. Parmi ces facteurs seront discutés : les agents de contraste utilisés chez l'animal, leur préparation, la dose optimale, l'injection, la préparation et le monitoring de l'animal, l'anesthésie de l'animal, les réglages de l'échographe et finalement les procédures d'acquisition.

USE OF ULTRASOUND CONTRAST AGENTS IN PRECLINICAL RESEARCH: RECOMMENDATIONS FOR SMALL ANIMAL IMAGING

HYVELIN Jean-Marc, TARDY Isabelle, ARBOGAST Christophe, COSTA Maria,
EMMEL Patricia, HELBERT Alexandre, THERAULAZ Martine
and TRANQUART François

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

Non-invasive imaging modalities provide unique tools to improve efficiency in the drug discovery and development process. Ultrasound techniques represent a real opportunity in that field for detection, characterization and monitoring of induced lesions in animal models. Ultrasound contrast agents (UCA), consist of microbubbles containing low solubility gases stabilized by a shell. UCA combined with the specific ultrasound contrast mode detection offers real time and high spatial resolution (allowing detection of tiny amounts of microbubbles at the microvascular-sized vessels) of the organ and lesion blood perfusion, so called Dynamic Contrast Enhancement Ultrasound imaging (DCE-US). With the advent of targeted UCA, ultrasound imaging is gaining momentum in the field of molecular imaging particularly due to the simultaneous real time anatomical and functional/molecular imaging capabilities. Ultrasound molecular imaging (US-MI) relies on the selective targeting and binding of acoustically active contrast agent at marker of interest that are expressed on the endothelial cell surface in relation to a disease.

Moreover, even though imaging modalities are helpful in the observation of some induced lesions, the need for reproducible bioimaging markers has recently emerged to help researchers in drug profiling or molecular imaging. DCE-US and US-MI are operator dependent modalities imaging, requiring rigorous step by step protocol for: 1) the preparation and the use of ultrasound contrast agent; 2) the injection; 3) the determination of the ultrasound platform settings and the imaging procedure. Standardized procedure in the use, injections and imaging will limit variability between operators and research centres.

We report key factors which can be incriminated in the result variability and recommend some preventive methods to limit or cancel their effect in the final results. Based on our experience, we have identified the following factors which can be aggregated into three categories one related to the animal physiology, one related to the agents and one related to the ultrasound acquisition: the UCA used in those animals, its preparation, its optimal concentration and injection procedure, the animal handling during DCE-US imaging session, the effect of anaesthesia carrier gas and/or ventilation on DCE-US signal, the ultrasound platform settings and finally the acquisition procedures

SEQUENCES ULTRASONORES HAUTE FREQUENCE (20 – 40 MHz) POUR LA DETECTION DES AGENTS DE CONTRASTE NANOMETRIQUES

JAFARI Sara¹, DIOU Odile², TSAPIS Nicolas², FATTAL Elias², BRIDAL S.Lori¹

¹*Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, UMR 7623 Université Pierre et Marie Curie and CNRS, France*

²*Physicochimie-Pharmacotechnie-Biopharmacie, UMR CNRS 8612 and Univ Paris-Sud, France*

Les systèmes nanométriques avec un cœur perfluorocarbon liquide (PFC) ont le potentiel d'être utilisés comme vecteurs médicamenteux et agents de contraste ultrasonores. Ces types de nano-particules à cœur liquide sont très stables et peuvent s'accumuler dans la tumeur par EPR (Enhanced Permeability and Retention). Toutefois, la sensibilité de la détection acoustique et l'évaluation non invasive de leur accumulation restent des problèmes centraux.

Des travaux antérieurs (<20 MHz) ont démontré une réponse acoustique détectable pour les nanoparticules à cœur liquide perfluorooctyl bromide (PFOB), particules de 200 nm de diamètre encapsulées dans une coque homogène de PLGA poly (lactide-co-glycolide). Cette détection n'est toutefois possible qu'à des concentrations très élevées, bien supérieures à celles obtenues par l'EPR.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la réponse acoustique des nanocapsules de PLGA à cœur liquide et également des billes de latex (comme contrôle de la diffusion linéaire) aux séquences haute fréquence (20 - 40 MHz) dans le but de développer une détection plus sensible des nanoparticules.

Les nanoparticules ont un cœur unique de PFOB liquide entouré d'une coque de PLGA homogène, biodégradable et biocompatible. Trois type de particules de diamètre de 150-170 nm ont été produites avec rapports d'épaisseur de coque (E) sur le rayon des particules (R), (E/R : 0,25, 0,35 et 1) en faisant varier les proportions PFOB/PLGA. Les mesures de contrôle ont été effectuées à l'aide de solutions de billes de latex de 100 nm de diamètre. Les nanoparticules ont été suspendues dans l'eau filtrée, dégazée pour obtenir des solutions avec 1×10^{13} particules par ml.

Les solutions de nanoparticules ont été injectées dans un canal cylindrique de 1 mm de diamètre placé dans un gel pads échographique, acoustiquement transparent et immergé dans l'eau filtrée et dégazée ($24 \text{ }^\circ\text{C} < T < 26 \text{ }^\circ\text{C}$). Une pompe à seringue a été utilisée pour maintenir un flux constant (1 mm/s à travers le canal). Un transducteur haute fréquence de lithium Niobate, à la fréquence centrale de 32 MHz (distance focale de 8 mm, F-nombre = 2), a été placé verticalement par rapport au canal de telle sorte que la zone focale soit centrée dans le canal. Les données ont été acquises en utilisant un prototype haute fréquence avec un séquenceur programmable et une large bande passante (2 à 80 MHz). Les impulsions sinusoïdale modulée par une gaussienne ont été générées sous MATLAB et transférées vers le transducteur par l'intermédiaire d'un amplificateur de puissance linéaire (1-100 MHz de bande passante). Les échos renvoyés vers le transducteur ont été amplifiés, filtrés (filtre passe-bande de 1 à 90 MHz) et échantillonnés à

200MHz. Les données Radiofréquences (RF) ont été acquises et transférées vers le PC pour post-traitement et pour l'analyse de spectre puissance moyen.

Pour chaque solution, les données ont été acquises avec les séquences conventionnelles, Inversion de Pulse (PI), et la sous harmonique avec les impulsions aux pressions négatives de 700kPa à 2.1MPa, ($\Delta P \sim 0,3$ MPa). Pour chaque série de mesures, 100 lignes de données RF indépendants ($N = 256$) ont été enregistrées. L'intensité de spectre de puissance moyenne et l'écart type ont été calculés pour chaque série des données.

Dans les gammes acoustiques explorées, aucune réponse sous-harmonique n'a été détectée pour les particules testées. Les nanoparticules à cœur liquide avec l'épaisseur de la coque la plus fine, renvoient la réponse acoustique la plus forte (10 dB de plus que les NP pleines et 15 dB de plus que les billes de latex). La réponse de la deuxième harmonique de ces particules augmente plus avec la pression envoyée par rapport à la réponse des NPs ou les billes de latex. La Séquence PI a renforcé la réponse de la 2ème harmonique tout en réduisant les composantes de la fréquence fondamentale. Cette séquence devrait aider à obtenir une meilleure détection des nanocapsules in vivo.

HIGH FREQUENCY (20 – 40 MHZ) ULTRASOUND PULSE SEQUENCES FOR DETECTION OF NANOPARTICLE CONTRAST AGENTS

JAFARI Sara¹, DIOU Odile², TSAPIS Nicolas², FATTAL Elias², BRIDAL S.Lori¹

¹*Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, UMR 7623 Université Pierre et Marie Curie and CNRS, France*

²*Physicochimie-Pharmacotechnie-Biopharmacie, UMR CNRS 8612 and Univ Paris-Sud, France*

Nano-systems containing liquid perfluorocarbon (PFC) have potential as drug carriers and ultrasound contrast agents. Such liquid-core nanoparticles are highly stable and can accumulate within tumors by Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect. Sensitive acoustic detection and noninvasive assessment of their accumulated concentration, however, remain central problems. Previous work has demonstrated detectable acoustic response at frequencies < 20 MHz for liquid perfluorooctyl bromide (PFOB), ~200-nm particles, surrounded by a homogeneously-thick, PLGA poly(lactide-co-glycolide) shell. Such detection however was only possible at very high concentrations, well above those obtained by EPR.

The objective of this work was to evaluate the acoustic response for high frequency (20- 40 MHz) tone-burst sequences from liquid-core PLGA nanocapsules, filled PLGA particles and latex beads (linear scattering control) to develop more sensitive strategies for nanoparticle detection.

Nanoparticles were produced with a single, centered core of liquid PFOB surrounded by a homogeneously-thick, PLGA shell that is biodegradable and biocompatible. Particles with diameter around 150-170 nm were produced with three different shell-thickness-to-particle-radius (T/R) ratios (0.25, 0.35 and 1) by varying the PFOB/PLGA proportions. Control measurements were performed using solutions of 100-nm diameter latex beads. The nanoparticles were suspended in filtered, degassed water to obtain solutions with 1×10^{13} particles per mL.

Solutions of nanoparticles were injected through a cylindrical, 1-mm diameter channel in an acoustically transparent gel pad immersed in filtered and degassed water ($24 \text{ }^\circ\text{C} < T < 26 \text{ }^\circ\text{C}$). A syringe pump was used to maintain constant flow (1 mm/s through the channel). A Lithium Niobate, 32-MHz center-frequency transducer (8-mm focal length, F-number = 2) was placed such that the focal zone was centered within the channel. Data were acquired using a programmable, broad bandwidth (2 - 80 MHz bandwidth) prototype system. Gaussian-modulated, sinusoidal tone bursts and sequences of tone bursts generated with a custom MatLab program were transferred to the prototype's 12-bit, 200-MHz programmable sequencer then through a linear power amplifier (1-100 MHz bandwidth) to the transducer. Echoes returned to the transducer were amplified, bandpass filtered (1 to 90 MHz) and digitized at 200 MSPS. The radiofrequency (RF) data were acquired and transferred to a PC for off-line analysis of pulse sequences and subsequent spectral analysis.

Data were acquired for each solution at matched conditions with conventional; pulse-inversion, PI; and sub-harmonic pulse sequences at transmit peak negative

pressures 700KPa – 2.1MPa, ($\Delta P \sim 0.3$ MPa). For each series of measurements, 100 sets of independent ($N = 256$) radio-frequency data lines were recorded. Average power spectral intensity and standard deviation were calculated for each set of waveforms.

Within the explored acoustic range, no subharmonic response was detected from any of the particles tested. The liquid core nanoparticles with the least shell thickness provided the strongest acoustic response (10 dB higher than filled NC and 15 dB higher than latex beads). Second harmonic response from these particles also increased more with increasing incident pressure than for the other NPs or for the linear control particles. PI sequences reinforced the 2nd harmonic response while reducing contributions at the fundamental frequency which should help to eliminate background scattering from tissue for improved detection of NPs in vivo.

LIPONANOPARTICULES COMME SONDES D'IMAGERIE BIMODAL

Sara LACERDA, Célia BONNET, Loïc LEBEGUE, Sandrine VILLETTE, Stéphane PETOUD, Chantal PICHON and Eva JAKAB-TOTH

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans

L'imagerie moléculaire basée sur les nanoparticules est un domaine interdisciplinaire émergent, permettant de comprendre les maladies au niveau moléculaire. Les barrières biologiques et biophysiques sont franchies grâce à l'incorporation au sien d'une même structure de ligands pour le ciblage, d'agents d'imagerie et d'agents thérapeutiques. Ces plateformes sont donc intéressantes pour des applications théranostiques. Elles présentent également l'avantage d'offrir un meilleur contraste, de contenir un grand nombre de molécules actives et de présenter un temps de circulation élevé.¹ Par ailleurs, les nanoparticules naturelles présentent une toxicité réduite et sont biodégradables.²

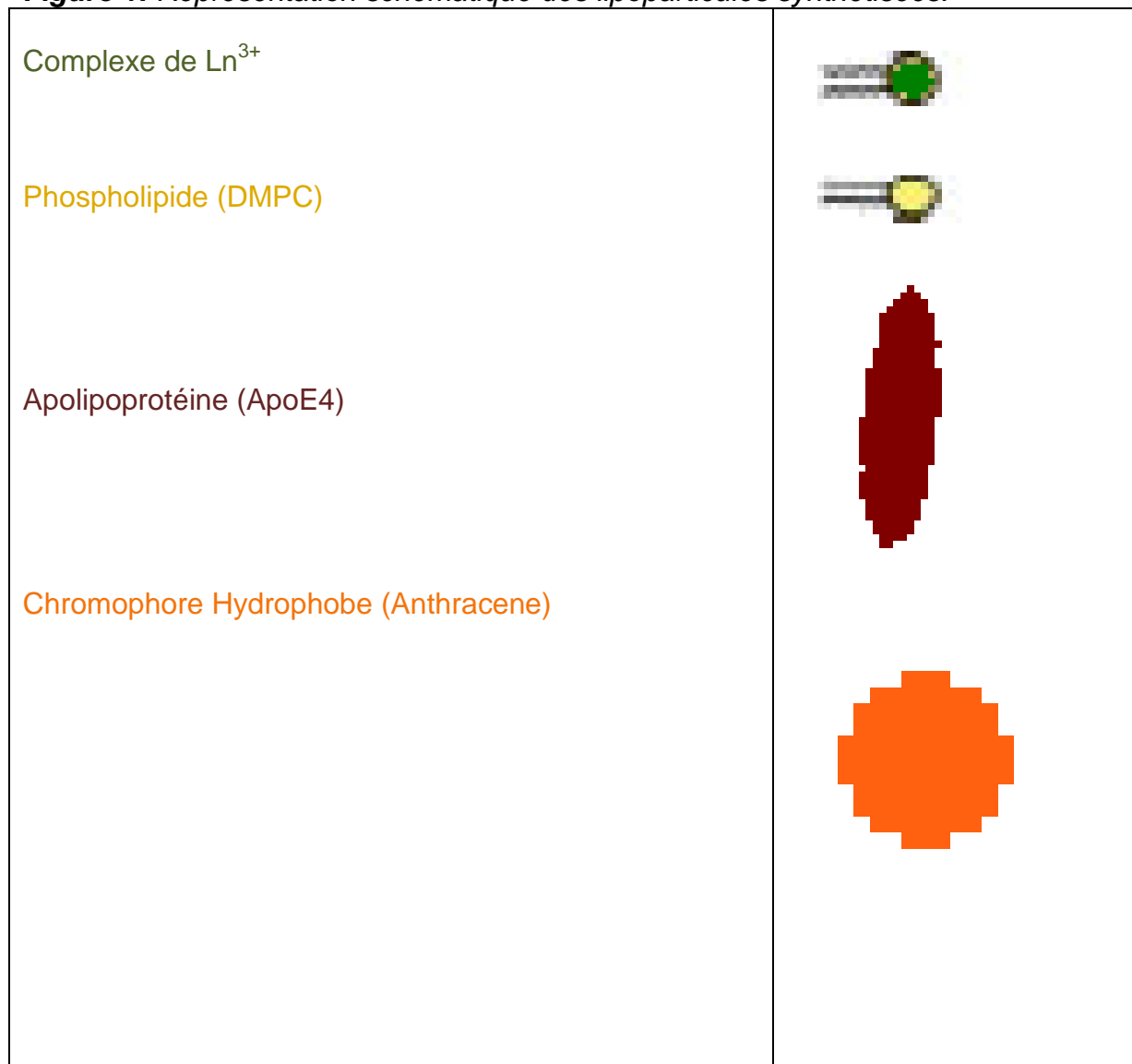
Parmi les diverses techniques d'imagerie, certaines sont caractérisées par une résolution élevée mais une faible sensibilité (Imagerie de Résonance Magnétique, IRM), et d'autres par une sensibilité élevée, mais une faible résolution (Imagerie Optique, IO). L'imagerie bimodal offre l'avantage de pouvoir coupler la forte sensibilité de l'IO avec la haute résolution de l'IRM. Les complexes de lanthanides sont bien adaptés pour la conception de sondes d'imagerie bimodale grâce à leurs propriétés magnétiques et optiques spécifiques, et leur réactivité chimique similaire. En outre, les cations lanthanides luminescents présentent des avantages par rapport aux fluorophores organiques, comme la résistance au photoblanchiment, des longues durées de vie de luminescence, l'absence de réabsorption et des bandes d'émission sont bien définies.³ Néanmoins, pour que les ions lanthanides deviennent luminescentes, un chromophore, qui agit comme antenne, doit être présent.

Poursuivant le travail initié dans l'équipe sur les complexes lanthanides bimodaux à base de pyridine,^{4,5} nous avons préparé des nouvelles particules de type lipoprotéines. Ces particules (Figure 1) sont constituées par: (i) des complexes de Ln³⁺ actifs en imagerie, (ii) l'Apolipoprotéine ApoE4, permettant le ciblage des récepteurs LDL (présents au niveau de la Barrière Hémato Encéphalique (BHE) ou de la membrane de quelques tumeurs) et (iii) des molécules d'intérêt thérapeutiques, incorporées suivant leurs propriétés lipophiles.

On présente la synthèse et la caractérisation de lipoparticules constituées par des complexes de Nd^{III}, Yb^{III} et Gd^{III}, où l'anthracène a été incorporé comme antenne potentielle pour la sensibilisation de la luminescence de Nd^{III} et Yb^{III}.

Ces nouvelles nanoplatformes ont une bonne relaxivité (surtout par rapport au ProHance[®]) et la présence de l'anthracène permet la sensibilisation des lanthanides étudiés. Le ciblage des récepteurs de transferrine a été réalisé grâce à des liposomes fonctionnalisés avec des phospholipides biotinilés et évalué sur des cellules HeLa. Par ailleurs, le ciblage des récepteurs LDL, étudié sur un modèle *in vitro* de BHE, a été accompli grâce à des lipoprotéines avec l'ApoE4. Tous ces résultats sont prometteurs et indiquent la possible utilisation de ce type de particules comme agents bimodaux IRM/IO.

Figure 1: Représentation schématique des lipoparticules synthétisées.



Références:

1. D. Pan, G.M. Lanza, S.A. Wickline and S.D. Caruthers, *European Journal of Radiology*, **2009**, 70(2): 274-285.
2. D.P. Cormode, P.A. Jarzyna, W.J.M. Mulder, Z.A. Fayad, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2010**, 62: 329-338.
3. S.V. Eliseeva and J.-C. Bünzli, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39: 189-227.
4. L. Pellegatti, J. Zhang, B. Drahos, S. Villette, F. Suzenet, G. Guillaumet, S. Petoud and É. Tóth, *Chem. Commun.* **2008**, 6591 – 6593.
5. C.S. Bonnet, L. Pellegatti, F. Buron, C. M. Shade, S. Villette, V. Kubíček, G. Guillaumet, F. Suzenet, S. Petoud and É. Tóth, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 124–126.

LIPONANOPARTICLES AS BIMODAL IMAGING PROBES

Sara LACERDA, Célia BONNET, Loïc LEBEGUE, Sandrine VILLETTE, Stéphane PETOUD, Chantal PICHON and Eva JAKAB-TOTH

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans

Nanoparticle-based molecular imaging has emerged as an interdisciplinary area, showing promises to understand the components, processes, dynamics and therapies of a disease at a molecular level. Biological and biophysical barriers are overcome by the integration of targeting ligands, imaging agents and therapeutics into nanoplatforms which can allow their use for theranostic applications.¹ Nanoparticles are versatile platforms that incorporate contrast-generating materials offering several attracting features including an improved contrast, high payloads and long circulation times. Moreover, natural nanoparticles have important advantages as delivery platforms such as low toxicity and biodegradability.²

Among the bio-imaging modalities available, some are characterized by high resolution but low sensitivity (MRI), others by high sensitivity but low resolution (OI). Luminescent/MRI bimodal imaging offers the advantage of coupling the high sensitivity of luminescence with the high resolution of MRI. Lanthanide complexes are well suited for the design of bimodal imaging probes: they combine optimized magnetic and optical properties, while the similar chemical reactivities allow facile substitution of one Ln³⁺ by another. In addition, lanthanide cations provide complementary properties over organic fluorophores, such as resistance to photobleaching, long luminescence lifetimes, no reabsorption and sharp emission bands. Nevertheless, the use of lanthanide ions requires the presence of a chromophore, which acts as an antenna, transferring its energy to the Ln to become luminescent.³

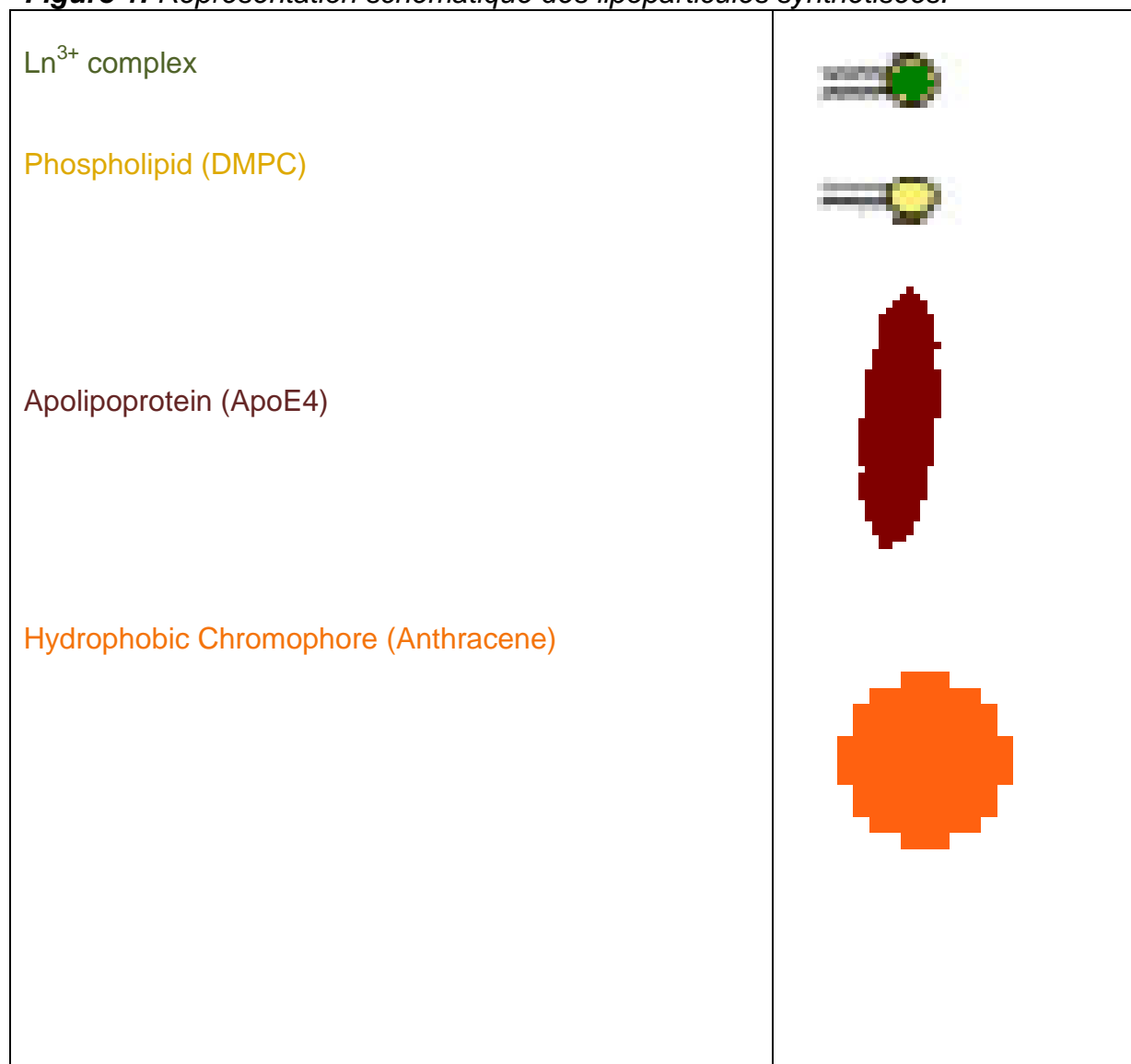
Based on our on-going research on lanthanide-based multimodal probes and using the expertise already acquired with pyridine-based lanthanide complexes,^{3,4} we prepare novel lipoprotein-like particles. These particles (figure 1) are constituted of: (i) pyridine-based Ln³⁺ complexes^{3,4} as imaging probes, incorporated into the apolar core of the particles; (ii) Apolipoprotein ApoE4 that dictates their targeting into LDL receptors (located in the Blood-Brain Barrier (BBB) or in some cancer cells); and (iii) possible molecules with therapeutic interest, incorporated in different spots according to their lipophilicity.

Herein we present the synthesis and full characterization of lipoparticles containing Nd^{III}, Yb^{III} and Gd^{III} complexes, in which anthracene has been incorporated as a potential sensitizer for the Nd^{III} and Yb^{III} luminescence.

These novel nanoplatforms showed improved relaxivity (when compared to ProHance[®]) and the presence of anthracene allowed the lanthanide's sensitisation. The targeting of transferrin receptors was achieved with liposomes including a biotinylated phospholipid (studies performed in HeLa cells). Moreover, the targeting of LDL receptors by means of ApoE4-containing lipoproteins was accomplished at a BBB *in vitro* model.

These results seem promising for the use of such particles as bimodal MRI/OI agents.

Figure 1: Représentation schématique des lipoparticules synthétisées.



References:

1. D. Pan, G.M. Lanza, S.A. Wickline and S.D. Caruthers, *European Journal of Radiology*, **2009**, 70(2): 274-285.
2. D.P. Cormode, P.A. Jarzyna, W.J.M. Mulder, Z.A. Fayad, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2010**, 62: 329-338.
3. S.V. Eliseeva and J.-C. Bünzli, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39: 189-227.
4. L. Pellegatti, J. Zhang, B. Drahos, S. Villette, F. Suzenet, G. Guillaumet, S. Petoud and É. Tóth, *Chem. Commun.* **2008**, 6591 – 6593.
5. C. S. Bonnet, L. Pellegatti, F. Buron, C. M. Shade, S. Villette, V. Kubíček, G. Guillaumet, F. Suzenet, S. Petoud and É. Tóth, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 124–126.

NANOPARTICULES A LUMINESCENCE PERSISTANTE POUR L'IMAGERIE OPTIQUE *IN VIVO* ET *IN VITRO*

MALDINEY Thomas, RICHARD Cyrille, SEGUIN Johanne, BESSODES Michel, and SCHERMAN Daniel

UPCGI, UMR8151 CNRS - U1022 INSERM: 4, avenue de l'Observatoire 75006 Paris
Un intérêt grandissant pour les sondes optiques susceptibles d'être utilisées à des fins de diagnostic a déjà permis plusieurs grandes avancées dans le développement d'outils efficaces pour l'imagerie non invasive du petit animal. La plupart de ces inventions, des quantum-dots aux fluorophores organiques, sont élaborées dans le respect de principes clés, parmi lesquels nous citerons une certaine capacité à limiter l'absorption et l'autofluorescence des tissus, une bonne stabilité photochimique en milieu biologique, ou encore un rendement quantique élevé.

Dans le respect de ces principes, notre équipe a récemment développé une nouvelle sonde d'imagerie optique émettant dans le proche infrarouge, appelée nanoparticules à luminescence persistante (PLNP), pour l'imagerie non invasive en temps réel chez la souris.

Nous rapportons ici le premier exemple de fonctionnalisation de nanoparticules à luminescence persistante pour le ciblage de plusieurs types de cellule cancéreuse : les exemples de cellules du cancer de la prostate et de gliomes de rat seront discutés.

Nous montrons également que la compréhension de la physique associée au phénomène de luminescence persistante a permis de découvrir une composition plus intense, présentant des propriétés optiques améliorées et une émission rouge plus longue, nécessaire aux applications chez le petit animal.

NANOPARTICULES A LUMINESCENCE PERSISTANTE POUR L'IMAGERIE OPTIQUE *IN VIVO* ET *IN VITRO*

MALDINEY Thomas, RICHARD Cyrille, SEGUIN Johanne, BESSODES Michel, and
SCHERMAN Daniel

UPCGI, UMR8151 CNRS - U1022 INSERM: 4, avenue de l'Observatoire 75006 Paris

A growing insight toward optical sensors has already led to several major improvements in the development of convenient probes for *in vivo* imaging. Most inventions, from inorganic quantum dots to near-infrared organic dyes, generally gather around several key driving principles as the ability to background absorption or autofluorescence from tissue, a good photostability of the probe, and a high quantum yield.

Following a similar approach, our team recently developed persistent luminescence nanoparticles (PLNP), emitting in the near-infrared region, for real-time *in vivo* imaging in healthy and tumor-bearing mice.

We now report the first proof that PLNP functionalized with the proper ligand can successfully target cancer cells *in vitro*. The example of prostate cancer cells and rat glioma cells will be discussed.

In addition to such biological applications, we show that proper understanding of the physics associated to persistent luminescence allowed the discovery of a brighter composition with enhanced optical properties and longer red afterglow, critical for bioimaging.

GDDO3A-PIB: UN MARQUEUR IRM POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER

MARTINS AF¹, MORFIN J-F¹, HAMPLOVA A¹, KUBICEK V¹, LEBEGUE L¹, PICHON C¹, SUSENET F², SALERNO M³, LAZAR A⁴, DUYNCKAERTS C⁴, GERALDES C.F.G.C.⁵, TOTH E¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire CNRS, Rue Charles Sadron, Orléans, France

² Université d'Orléans, rue de Chartres, Orléans, France

³ Université Paris 13, Laboratoire ANBioPhy, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, Bobigny, France

⁴ Centre de Recherche de l'ICMUPMC INSERM UMR S 975, Hôpital de la Salpêtrière, Laboratoire de neuropathologie Raymond Escourolle, Paris, France

⁵ Center for Neuroscience and Cell Biology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme la plus fréquente de détérioration intellectuelle chez les personnes âgées, caractérisée par un dépôt de plaques amyloïdes dans le cerveau et des dégénérescences neurofibrillaires. La détection précoce des dépôts β -amyloïde ($A\beta$) *in vivo* est très difficile. Récemment, de petites molécules radiomarquées par ¹¹C, capables d'entrer dans le cerveau et cibler spécifiquement les plaques amyloïdes, ont été développées pour l'imagerie TEP. Ces molécules sont dérivées de la thioflavine T [1-2], et en particulier, l'analogue non chargé 6-OH-BTA-1 (composé de Pittsburgh B - PiB) est très efficace pour traverser la BHE et pour cibler sélectivement les agrégats β -amyloïdes de la MA. Une limitation importante de la TEP est l'obligation d'utiliser des molécules avec des isotopes radioactifs à courte durée de vie. L'utilisation des marqueurs $A\beta$ liés à un agent de contraste (AC) pour l'IRM constituerait une approche non-invasive intéressante pour l'imagerie *in vivo*. Récemment, Poduslo et al., a utilisé un AC pour l'IRM, le GdDTPA, conjugué à un peptide β -amyloïde humain modifié avec une putrescine sur le C terminal. [3] Ce peptide $A\beta$ conjugué est capable de traverser la BHE et de cibler sélectivement les plaques amyloïdes individuellement dans le cerveau de souris transgéniques avec la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, en raison de sa grande taille, plusieurs jours (semaines) sont nécessaires pour obtenir un bon contraste IRM des plaques amyloïdes *in vivo*.

Dans une tentative de cibler ces plaques $A\beta$ plus rapidement en utilisant des complexes métalliques de petite taille, nous avons synthétisé un nouveau dérivé de PiB-DO3A permettant de complexer Gd(III).

References:

1. Mathis CA et al. (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12(3):295-8.
2. Nesterov EE, Skoch J, Hyman BT, Klunk WE, Bacskai BJ, Swager TM. (2005) *Angew Chem Int Ed Engl.* 26(34):5452-6.
3. Poduslo JF, Curran GL, Gill JS. (1998) *J. Neurochem.* 71(4):1651-60.

GDDO3A-PIB: A POTENTIAL MRI MARKER FOR ALZHEIMER'S DISEASE

MARTINS AF¹, MORFIN J-F¹, HAMPLOVA A¹, KUBICEK V¹, LEBEGUE L¹, PICHON C¹, SUSENET F², SALERNO M³, LAZAR A⁴, DUYCKAERTS C⁴, GERALDES C.F.G.C.⁵, TOTH E¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire CNRS, Rue Charles Sadron, Orléans, France

² Université d'Orléans, rue de Chartres, Orléans, France

³ Université Paris 13, Laboratoire ANBioPhy, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, Bobigny, France

⁴ Centre de Recherche de l'ICMUPMC INSERM UMR S 975, Hôpital de la Salpêtrière, Laboratoire de neuropathologie Raymond Escourolle, Paris, France

⁵ Center for Neuroscience and Cell Biology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

The Alzheimer's disease (AD) is the most frequent form of intellectual deterioration in elderly individuals, characterized by the brain deposition of amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Early detection of the β -amyloid (A β) deposits in vivo is very difficult. Recently ¹¹C-radiolabeled small-molecules have been developed, capable of entering the brain and specifically targeting amyloid plaques for imaging with PET, such as several Thioflavin T derivatives [1-2]. In particular, the uncharged analogue 6-OH-BTA-1 (Pittsburgh compound B - PIB) is highly efficient both in crossing the BBB and in selective binding to AD amyloid aggregates. A major limitation of PET is the requirement for the markers to be labelled with short-lived isotopes. The use of A β marker linked to a MRI CA would constitute an attractive noninvasive in vivo imaging approach. Recently, Poduslo used CA aided MRI to image AD plaques with Gd(III)DTPA conjugated to a putrescine-modified human A β peptide able to cross the BBB and selectively target individual amyloid plaques in the brain of Alzheimer's disease transgenic mice. [3] Nevertheless, due to its large size, several days (weeks) of incubation with the CA are necessary to obtain the labeling of amyloid plaques in transgenic mouse brain in vivo.

In an attempt to label A β plaques using small metal complexes for the diagnostics of Alzheimer disease, we synthesized a PIB-derivative of DO3A.

References:

1. Mathis CA et al. (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12(3):295-8.
2. Nesterov EE, Skoch J, Hyman BT, Klunk WE, Bacskai BJ, Swager TM. (2005) *Angew Chem Int Ed Engl.* 26(34):5452-6.
3. Poduslo JF, Curran GL, Gill JS. (1998) *J. Neurochem.* 71(4):1651-60.

HABILITER DES SONDAS OFF-ON A UTILISER DES FLUOROPHORES ESIPT POUR L'IMAGERIE MOLECULAIRE DE PEPTIDASES

Thorn-Seshold Oliver, Vargas-Sanchez Monica, McKeon Sean, Hasserodt Jens

*Laboratoire de Chimie UMR CNRS UCBL 5182, Ecole Normale Supérieure de Lyon,
46 allée d'Italie, 69364 Lyon*

L'imagerie moléculaire in vivo de peptidases¹ est particulièrement attractive au vu de la spécificité (pour une séquence peptidique) qu'elle peut fournir, le nombre significatif de biomarqueurs pour des états sains et pathogènes qui font partie de cette famille d'enzymes, et l'exploitation de l'amplification catalytique (telle qu'elle est trouvée dans des tests ELISA ex vivo par exemple). Tant qu'il n'y a pas d'exemples pour la plupart des modalités d'imagerie de sondes ou agents qui opèrent selon le mode off-on, l'imagerie optique permet la conception de molécules qui changent leurs propriétés spectrales, dans certains cas en partant d'un état qui n'émet pas du tout (off). Or, la plupart d'eux sont basées sur des fluorophores hydrosolubles (coumarines, fluorescéines, ou cyanines) qui s'éloignent du site de leur libération de la sonde déclenchée par l'enzyme cible; ils souffrent également beaucoup du phénomène de photodégradation qui, par conséquent, est souvent lamenté par des experts du domaine.²

Nous avons cherché à répondre à ces inconvénients en choisissant une classe peu usuelle de fluorophores fréquemment ignorés par des compilations de fluorophores habituels³ : la famille des fluorophores basés sur l'effet ESIPT dont l'exemple le plus connu est trouvable dans la technologie ELF97 appelé "ultra-sensible" par Invitrogen-Molecular Probes. Cet exemple est la hydroxyphényl-quinazolinone (HPQ) qui est exceptionnel en étant un fluorophore en état solide avec une émission extrêmement brillante et remarquablement photostable dans le jaune-vert, et qui possède également un déplacement de Stokes de 130 nm qui écarte toute perturbation par l'auto-fluorescence des tissus. En tant que fluorophore solide il faut l'incorporer dans une sonde plus grande qui lui doit être parfaitement hydrosoluble. Suite à son relâchement il précipite sur place et combat ainsi effectivement la dilution du signal causée par la diffusion, correspondant à une fixation du signal. "ESIPT" remplace "excited-state intramolecular proton transfer". Quand ce transfert est inhibé, par exemple en remplaçant le proton par un substituant clivable par l'enzyme, alors la fluorescence est tout simplement supprimée. Or, aucune sonde fluorogène (ou pro-fluorescente) basée sur cette classe de fluorophores a été commercialisée voire appliquée en imagerie, à part d'une pour les phosphatases.

Nous avons récemment réussi à surmonter les obstacles technologiques qui ont empêchés le domaine à proposer des sondes off-on répondeur basés sur ce type de fluorophore.⁴ En concevant une sonde à trois composantes plutôt que de deux composantes (classiques), nous avons obtenu une molécule qui remplit toutes les spécifications recherchées :

(a) hydro-soluble, (b) robuste (pas de dégradation dans le milieu physiologique au cours de longues périodes), (c) un état initial non-fluorescent (off), (d) une cinétique de réponse rapide à notre enzyme témoin, la leucine aminopeptidase, (e) libération de microcristaux intensément fluorescent, (f) même pas 24 h d'irradiation à la longueur

d'onde optimale (UV) d'excitation baissera l'intensité de fluorescence à un degré significatif.

Cette communication présentera les données qui prouvent ces revendications et la structure de la molécule dont son espaceur intelligent est au coeur du succès de cette technologie moléculaire. Des applications nombreuses peuvent être envisagées. La sonde peut être équipée avec n'importe quelle séquence peptidique afin de cibler un enzyme spécifique, que ce soit une aminopeptidase ou endoprotéase. Elle peut également comprendre tout autre fluorophore ESIPT, particulièrement ceux qui émettent dans le rouge voire proche infra-rouge afin d'améliorer l'imagerie d'organismes opaques.

ENABLING THE USE OF ESIPT FLUOROPHORES IN OFF-ON PROBES FOR THE MOLECULAR IMAGING OF PEPTIDASES

Thorn-Seshold Oliver, Vargas-Sanchez Monica, McKeon Sean, Hasserodt Jens

*Laboratoire de Chimie UMR CNRS UCBL 5182, Ecole Normale Supérieure de Lyon,
46 allée d'Italie, 69364 Lyon*

The in vivo molecular imaging of peptidases⁵ is particularly attractive in view of the (peptide sequence) specificity it can provide, the significant number of biomarkers for healthy and diseased states that belong to this family of enzymes, and the exploitation of catalytic amplification (as is found ex vivo in ELISA tests for example). While there are no known examples of probes or agents that operate in the off-ON mode for most imaging modalities, optical imaging allows for the design of molecules that change their spectral properties, in some cases starting from a probe that does not emit at all (off). However, most of these are based on water-soluble fluorophores (coumarins, fluoresceins, cyanines) that will diffuse away from the site of their release from the probe as triggered by the target enzyme; they also suffer greatly from the phenomenon of photobleaching that is accordingly frequently lamented by specialists in the field.⁶

We wished to respond to these deficiencies by choosing an unusual class of fluorophores often ignored on compilations of common fluorophores;⁷ the family of ESIPT-based fluorophores of which the most prominent example is found in the “ELF97 ultra-sensitive detection technology” by Invitrogen-Molecular Probes. This example is hydroxyphenyl-quinazolinone (HPQ) that is rare in being a solid-state fluorophore with an extremely bright and stunningly photostable emission in the yellow-green, and also an exceptional Stokes shift of 130 nm, that rules out any perturbation by tissue auto-fluorescence. As a solid-state fluorophore it has to be incorporated into a larger probe that is itself perfectly water-soluble. Upon its release it precipitates on site and thus effectively combats signal dilution by diffusion, amounting to the fixation of the signal. ESIPT stands for excited-state intramolecular proton transfer. Remarkably, when this transfer is inhibited, e.g. by replacing the proton by an enzyme-cleavable substituent, then fluorescence is simply suppressed. However, no fluorogenic probe (or “pro-fluorescent” probe, or “stealth” probe, or “off-On” probe) based on this class of ESIPT-based fluorophores other than for phosphatase has seen commercialization and/or imaging application.

We have lately succeeded in surmounting the technological obstacles that prevented the field to propose any enzyme-sensitive off-On probe based on this type of fluorophore.⁸ By designing a 3-component rather than a (classic) 2-component probe, we obtained a prototype molecule that fulfills all the specifications sought after : (a) water-soluble, (b) robust (no degradation in physiological media over extended time periods), (c) non-fluorescent initial state (off), (d) fast response kinetics to our model peptidase leucine aminopeptidase (complete conversion (!) in one hour at 200 μ M probe conc.), (e) release of brilliantly fluorescent solid microcrystals (ON), (f) not even 24 h of irradiation at the optimum (UV) exciting wavelength will reduce the fluorescence intensity to any significant degree.

This communication will present data backing up these claims and the structural design of the molecule whose intelligent spacer is at the heart of the success of this molecular technology. Numerous applications are envisaged and in part already under investigation. The probe can be equipped with any peptide sequence to target a specific enzyme, whether it be an exo- or endopeptidase. It can also incorporate any other ES IPT fluorophore, especially those that emit in the far red or near infrared in order to improve the imaging of opaque multi-cellular organisms.

- [1](#) Razgulin, A., Ma, N., and Rao, J. Strategies for in vivo imaging of enzyme activity: an overview and recent advances. *Chem. Soc. Rev.* *40*, 4186-4216.
- [2](#) Frangioni, J.V. (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Op. Chem. Biol.* *7*, 626-634.
- [3](#) Lavis, L.D., and Raines, R.T. (2008). Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* *3*, 142-155.
- [4](#) Hasserodt, J.; Thorn-Seshold, O. ; french patent application to be deposited mid-sept 2011.
- [5](#) Razgulin, A., Ma, N., and Rao, J. Strategies for in vivo imaging of enzyme activity: an overview and recent advances. *Chem. Soc. Rev.* *40*, 4186-4216.
- [6](#) Frangioni, J.V. (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Op. Chem. Biol.* *7*, 626-634.
- [7](#) Lavis, L.D., and Raines, R.T. (2008). Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* *3*, 142-155.
- [8](#) Hasserodt, J.; Thorn-Seshold, O. ; french patent application to be deposited mid-sept 2011.

NANOSYSTEMES MAGNETIQUES ET OPTIQUES POUR LA DETECTION DU GANGLION SENTINELLE

Truong Phuoc Lai, Kueny-Stotz Marie, Joughannaud Julien, Felder-Flesch Delphine,
Begin-Colin Sylvie, Pourroy Geneviève

*IPCMS, UMR 7504 CNRS – Université de Strasbourg, 23 rue du Loess, BP 43,
67034 Strasbourg Cedex 2, France*

Blé François-Xavier, Steibel Jérôme, Poulet Patrick
*Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC) Université de
Strasbourg-CNRS 4, rue Kirschleger 67085 Strasbourg Cedex*

Vazquez Manuel
Materials Science Institute of Madrid, CSIC, 28049 Madrid, Spain

Moersdorf Daniel, Bernhardt Ingolf
*Laboratory of Biophysics, Saarland University, Campus, Building A2.4, 66123
Saarbruecken, Germany*

Le traitement du cancer est un problème de santé publique majeur, mais aussi un problème économique car plusieurs millions de citoyens sont concernés dans le monde. La détection du ganglion sentinelle, c'est à dire le premier ganglion drainant la tumeur et contenant des cellules malignes si la tumeur est métastasée, est d'un apport majeur pour la thérapeutique. Une analyse histopathologique extemporanée positive de ce ganglion justifie une exérèse totale de la chaîne ganglionnaire, le drainage de la région tumorale pour en éradiquer les métastases, et l'institution d'un traitement adjuvant par radiothérapie ou chimiothérapie. La plupart des équipes utilisant cette technique dans le cancer du sein injecte un colloïde radioactif marqué au technétium 99 et/ou un colorant Bleu Vital autour de la tumeur pour marquer le ganglion sentinelle et pouvoir le détecter à l'œil nu et/ou avec une sonde gamma. Cependant, bien que l'injection de radioisotope soit largement utilisée, de nouvelles stratégies apparaissent aujourd'hui utilisant des nanoparticules magnétiques ou la détection de lumière.

Nous développons une nouvelle méthodologie clinique basée sur l'utilisation de nanosystèmes magnétiques capables de cibler le ganglion sentinelle quand ils sont injectés dans la région péri-tumorale. Ces nanosystèmes sont formés de nanoparticules magnétiques de taille et de composition contrôlées sur lesquelles sont greffées par un groupement phosphonate des dendrons pégylés portant un colorant bleu Vital. Le ganglion sentinelle sera détecté à l'aide d'une sonde magnétique et optique.

Des nanoparticules magnétiques de taille comprise entre 10 et 40 nm ayant une distribution en taille réduite ont été préparées et caractérisées. Le contrôle de la taille et de la composition nous permettra de choisir les nanoparticules les mieux adaptées aux performances de la sonde magnétique.

Un dendron de première génération portant des chaînes polyéthylèneglycol et le colorant bleu en périphérie, et un ou deux agents de couplage phosphanate au point focal a été greffé sur des nanoparticules de 10 nm. Le mécanisme de greffage a été étudié et les conditions de greffage ont été optimisées pour produire des suspensions de nano-objets stables à pH=6,8 utilisables pour des applications biomédicales. Nous avons montré que le greffage par un phosphonate améliore l'aimantation de l'oxyde de fer, suite aux interactions de super-super exchange Fe-O-P-O-Fe.

Ces suspensions sont aussi intéressantes pour l'imagerie par résonance magnétique. Les relaxivités molaires r_1 et r_2 ont été mesurées à des concentrations différentes par RMN à 4.7 T en utilisant les séquences CPMG (Carr-Purcell-Meiboon-Gill) et Inversion-Recovery respectivement. La relaxivité r_2 est égale à $114 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. Sa valeur est élevée par rapport à celle de l'Endorem® qui est de $76 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ dans nos conditions. De plus, le rapport r_2/r_1 est plus élevé que celui de l'Endorem®.

L'effet des nanoparticules, des dendrons et des nanosystèmes sur les hématies et les cellules Caco-2 a été étudié, en particulier trois paramètres physiologiques, la concentration de Ca^{2+} , le pH et l'effet de l'exposition à la phosphatidylserine. Des expérimentations sur des animaux seront aussi présentées.

Remerciements: Ce travail a été effectué dans le cadre d'un projet européen du 7ème PCRD (FP72007-2013 Grant Agreement No. NMP3-SL-2008-214032). Les auteurs remercient M. le Pr J. Chambron et le Dr. P. Siffert pour leurs conseils judicieux.

NANOSYSTEMES MAGNETIQUES ET OPTIQUES POUR LA DETECTION DU GANGLION SENTINELLE

Truong Phuoc Lai, Kueny-Stotz Marie, Joughannaud Julien, Felder-Flesch Delphine,
Begin-Colin Sylvie, Pourroy Geneviève

*IPCMS, UMR 7504 CNRS – Université de Strasbourg, 23 rue du Loess, BP 43,
67034 Strasbourg Cedex 2, France*

Blé François-Xavier, Steibel Jérôme, Poulet Patrick
*Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC) Université de
Strasbourg-CNRS 4, rue Kirschleger 67085 Strasbourg Cedex*

Vazquez Manuel
Materials Science Institute of Madrid, CSIC, 28049 Madrid, Spain

Moersdorf Daniel, Bernhardt Ingolf
*Laboratory of Biophysics, Saarland University, Campus, Building A2.4, 66123
Saarbruecken, Germany*

The treatment of cancer is a major health and economical problem since several millions of citizens are concerned around the world. The detection of the sentinel node (SN), which is any node receiving lymph drainage from the tumour site and containing most likely malignancy if the tumour has metastasized, has recently improved surgery strategies. Nowadays, most teams working on SN biopsy in the treatment of breast cancer inject either radioactive colloid (RuS labelled with ^{99m}Tc) or vital blue dye around the primary tumour to label the lymph node system for its peroperative detection. The detection is done by a visual colour inspection or with a gamma probe.

If radioisotope injection is widely used today for the detection of sentinel nodes in the most advanced countries, new strategies are being investigated that use non-nuclear detection and imaging methodologies, including the use of light photons and magnetic nanoparticles that receives increasing attention.

We developed a novel clinical methodology based on tailored and versatile magnetic nanosystems able to target the sentinel nodes when injected in cancer tumours. These nanosystems are comprised of magnetite nanoparticles with controlled size and composition, and pegylated dendrons bearing Vital Blue dye in their periphery grafted onto the oxide through a phosphonate entity. The detection of the sentinel node will be performed by a magnetic probe and an optical probe at once.

Magnetite nanoparticles with sizes between 10 and 40 nm and reduced size distribution were prepared and characterized. The control of the size and of the composition allows us to choose the best nanoparticles to adapt them to the magnetic probe performance.

First generation pegylated dendrons bearing Vital Blue dye have been grafted on the nanoparticles through one or two phosphonate coupling agents. The grafting mechanism has been investigated in order to produce biocompatible magnetic nano-

objects for biomedical applications. Grafting conditions have been optimized to obtain very stable water suspensions of iron oxide nanoparticles at pH=6.8. It has been shown that grafting through a phosphonate improves the magnetization of the iron oxide due to super–super exchange interactions through the phosphonate group.

Besides the interest for bimodal detection during surgery, these suspensions are also interesting for magnetic resonance imaging. r_1 and r_2 relaxivities were measured at different concentrations by NMR at 4.7 T using CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) and Inversion-Recovery sequences respectively. r_2 relaxivity values as high as $114 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ were obtained and can be compared to the r_2 value of Endorem® which was, in our conditions, $76 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. Moreover, r_2/r_1 ratios are higher than the clinical reference Endorem®.

Nano-particles, nano-objects, and dendrons used for the synthesis of the nano-objects have been investigated to determine their potential effect on 3 physiological parameters (intracellular Ca^{2+} content, intracellular pH, and, PS exposure) of Caco-2 cells and RBCs. Finally, experiments on animals will be presented.

Acknowledgments: The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP72007-2013) under Grant Agreement No. NMP3-SL-2008-214032. The authors thank Pr J. Chambron and Dr. P. Siffert for fruitful discussions.