



HAL
open science

Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des cancers

Sandrine Dufort

► **To cite this version:**

Sandrine Dufort. Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des cancers. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00531238

HAL Id: tel-00531238

<https://theses.hal.science/tel-00531238>

Submitted on 2 Nov 2010

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

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

Université de Grenoble

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie cellulaire

Soutenue publiquement par

Sandrine DUFORT

Le 6 octobre 2010

Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des cancers

Thèse dirigée par Jean-Luc COLL

Membres du Jury :

Professeur Jean-Pierre BENOIT, Angers

Professeur Elias FATTAL, Châtenay-Malabry

Professeur Denis WOUESSIDJEW, Grenoble

Professeur Stéphane ROUX, Besançon

Professeur Jean-Luc LENORMAND, Grenoble

Docteur Jean-Luc COLL, Grenoble

Rapporteur

Rapporteur

Président du jury

Examineur

Examineur

Examineur

Professeur Marie-Christine FAVROT, Paris

Invité

REMERCIEMENTS

Ces remerciements sont pour moi l'occasion de témoigner ma gratitude à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse.

Je remercie Jean-Luc Coll pour m'avoir « supportée » pendant ces quatre années de thèse. Merci d'avoir accepté de diriger la thèse d'une petite Normande venue de l'autre bout de la France, pharmacienne de surcroit ...

Je te remercie pour ton encadrement, ta gentillesse, ta patience, ton soutien et ta disponibilité.

Je remercie les Professeurs Alain Favier et Patrice Faure pour m'avoir m'accueillie au Département de Biologie Intégrée du CHU de Grenoble au sein duquel j'ai réalisé tout mon internat en Pharmacie Spécialisée. Merci pour leur soutien, leur disponibilité et pour m'avoir permis de réaliser ma thèse de sciences au cours de mon internat. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.

Je remercie les Docteurs Marie-Jeanne Richard et Florence de Fraipont, pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité Fonctionnelle de Biologie des Cancers et Biothérapies. Merci pour votre aide, votre soutien et vos remarques toujours enrichissantes.

Merci à eux pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordée et pour la chance qu'ils ont su me donner.

Je remercie les Professeurs Jean-Pierre Benoit et Elias Fattal de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie les Professeurs Stéphane Roux, Denis Wouessidjewe, Jean-Luc Lenormand, Elisabeth Brambilla et Marie-Christine Favrot d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse pour juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Laurent Poulain pour m'avoir donné goût à la recherche, pour ton encadrement et pour tous tes conseils au cours de mes nombreux stages et de mon master 2. Merci de m'avoir supportée et de m'avoir « expédiée » à Grenoble... Tu trouveras ici toute ma gratitude.

Merci à tous les membres des équipes 2 et 5.

A mes collègues de bureau, Mélanie, Maxime, Benoit, Lucie, Laetitia, Christiane, Blaise et Corine, et à ceux des bureaux voisins, Claire, Michelle, Anastassia, Véronique, Amandine, Sylvie, Béatrice, Peggy, Valérie, Céline, Pascal, Romuald et Delphine. Avec une pensée pour Sandrine, Arnaud, Damien et Elodie. Merci à tous pour votre gentillesse, votre gaieté, pour vos conseils et votre aide.

Je ne saurais oublier les statisticiens, Molière, Aurélien, Sébastien, Sylvain.

Mais également Christian et Elodie pour les nombreuses heures passées ensemble à régler les problèmes de cytométrie !

Je remercie plus particulièrement Mélanie, pour tous les moments passés à l'animalerie et en imagerie, pour tous nos délires, nos coups de gueule, nos sacrifices en série,... , pour l'initiation à la pâte fimo, ... pour la vente de fromages sur le marché de Pierre-Châtel, pour tout ce que nous avons partagé et à ce que nous partagerons... Un grand merci pour ton aide, tes conseils, ta gentillesse et ta bonne humeur sans faille.

Je remercie Maxime qui a su prendre rapidement en mains les manip au moment où je devais rédiger... Merci pour ton efficacité et ta bonne humeur.

Je remercie Claire pour ses conseils et pour nos discussions. Merci à toi, ainsi qu'à Michelle, pour vos relectures attentives de mon manuscrit.

Une petite dédicace spéciale pour Céline, partenaires dans l'effort. Pour toutes ces heures passées à se dépenser, à suer à grosses gouttes, et devenir rouge (ou violette) à faire peur aux gens !! Mais le résultat est au rendez vous !! Merci aussi pour ta disponibilité au labo, pour tes conseils et ta bonne humeur.

Merci à tous les « chimistes » avec lesquels j'ai travaillé :

Merci à Stéphanie et Didier pour la synthèse en masse de RAFT-RGD-KLAKLAK !

Merci à Anne-Charlotte et Stéphane pour les nanoparticules d'oxyde de Gadolinium, pour vos nombreux allers-retours Lyon-Grenoble, pour venir voir des souris briller. Merci à Olivier pour ton éternel enthousiasme lors de nos réunions bilan.

Merci à Christophe pour les nanoparticules d'or, même si un petit PEG nous a donné du fil à retordre !

Merci à Mathieu, Julien, Isabelle, Samuli, Mr Benoit, Qiao, Audrey pour les LNC et LNE en tous genres.

Merci à Marie et Catherine pour les LNC ADN et les LNC paclitaxel.

Merci à Laurence, Anna, Laetitia, Gilles et May pour les manip siRNA/CPs.

Merci à tous pour ces collaborations et pour votre enthousiasme, même si cela n'a pas été facile à gérer tous les jours.

Je remercie les Aspiraliennes et les Aspiraliens pour faire vivre la filière Pharmacie Spécialisée dans la région Rhône Alpes. Je les remercie pour leur soutien et pour tous leurs conseils. A Sandrine, Paul, Soline, Caroline, Xavier, Delphine, Marie-Laurence, Julia, Céline, Séverine et les autres.

Je remercie mes parents pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour votre confiance et pour m'avoir laissé suivre ma route tout en m'épaulant, et ce malgré la distance qui nous sépare.

Je remercie ma famille et mes amis pour leur gentillesse, leur soutien et leurs encouragements. A ma grand-mère, Martine, Annick et Bernard, Agathe et Philippe, Sandrine et Emmanuel, Odile et tous ceux qui cherchent désespérément leur nom dans ces lignes.

Je remercie Mathieu, mon « frerot », pour son soutien et pour tous les bons moments passés, présents et à venir. Je serai toujours là pour toi.

A Vincent, toi qui est arrivé dans un moment délicat de ma vie et de ma thèse... Merci pour ton soutien sans faille, pour tes encouragements et pour tout ce que tu m'apportes jour après jour.

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Ce travail a été effectué au cours de mon internat en pharmacie spécialisée au CHU de Grenoble, dans le centre de recherche INSERM/UJF U823, au sein de l'équipe 5 « Cibles diagnostiques ou thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer du poumon », à l'institut Albert Bonniot.

Il a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

1 - **Dufort S*** and Sancey L*, Hurbin A., Foillard S, Boturn D, Dumy P, Coll J-L.

Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors *in vivo*.

Soumis dans Journal of Drug Targeting, 2010.

* co-premiers auteurs

2 - Morille M, Passirani C, **Dufort S**, Bastia G, Garcion E, Pitard B, Coll J-L, Benoit J-P. *In vivo* gene expression in tumor after systemic injection of PEGylated DNA lipid nanocapsules.

Soumis dans Nanoletters, 2010.

3 - Goutayer M* and **Dufort S***, Josserand V, Royere A, Heinrich E, Vinet F, Bibette J, Coll JL, Texier I. Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles : Assessment by *in vivo* fluorescence imaging. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 2010

Jun;75(2):137-47. Epub 2010 Feb 10. (IP : 3.344)

* co-premiers auteurs

4 - Faure AC* and **Dufort S***, Josserand V, Perriat P, Coll J-L, Roux S, Tillement O. Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. **Small**. 2009 Nov;5(22):2565-75.(IP : 6.024)

* co-premiers auteurs

5 - Crombez L, Morris MC, **Dufort S**, Aldrian-Herrada G, Nguyen Q, Mc Master G, Coll JL, Heitz F, Divita G. Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. **Nucleic Acids Research** 2009 Aug;37(14) : 4559-69. (IP : 6.878)

6 - Sancey L* and **Dufort S***, Josserand V, Keramidas M, Righini C, Rome C, Faure AC, Foillard S, Roux S, Boturyn D, Tillement O, Koenig A, Boutet J, Rizo P, Dumy P, Coll J-L. Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. **International Journal of Pharmaceutics** 2009 Sep 11; 379(2):309-16. (IP : 3.061)

* co-premiers auteurs

Publication de revue

Dufort S* and Sancey L*, Wenk C, Josserand V, Coll JL. Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Acceptée dans Biochimica and Biophysica Acta-Biomembranes, février 2010.*(IP :4.180)

* co-premiers auteurs

Communications orales

- **Dufort S**. Etude de la biodistribution de nanoparticules par imagerie optique *in vivo* : Influence de la taille et de la fonctionnalisation de surface. Nanohybrides, mai 2010, Porquerolles.

- **Dufort S**. Intérêt de l'imagerie optique pour le suivi de la biodistribution de nanoparticules. Congrès de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire (SPTC), mai 2008, Paris.

- **Dufort S**. Use of optical imaging for detection, medical imaging and treatment of cancer. TOPIM'08 : imaging of nano-objects, organisé par l'European Molecular Imaging Laboratory (EMIL), février 2008, Les Houches, France.

- **Dufort S**. Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs. Journées pour la Recherche Respiratoire (J2R), octobre 2007, Paris.

Communications affichées

- **Dufort S**, Roux S, Tillement O, Hirsjärvi S, Benoit JP, Boturyn D, Dumy P, Texier I, Josserand V, Coll JL. Etude de la biodistribution de nanoparticules par imagerie optique *in vivo* : Influence de la taille et de la fonctionnalisation de surface. Journées du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), mars 2010, Lyon.
- **Dufort S**, Roux S, Tillement O, Hirsjärvi S, Benoit JP, Boturyn D, Dumy P, Texier I, Josserand V, Coll JL. Influence de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules sur leur biodistribution *in vivo*. Journées du Groupe Thématique de Recherche sur le Vectorisation (GTRV), décembre 2009, Paris.
- **Dufort S**, Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Goutayer M, Texier I, Rizo P, Josserand V, Coll JL. Use of optical imaging to monitor the biodistribution of targeted nanoparticles. Pep-Vec, septembre 2009, Montpellier (congrès international).
- **Dufort S**, Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Goutayer M, Texier I, Rizo P, Josserand V, Coll JL. Etude de la biodistribution des nanoparticules par des techniques d'imagerie optique. Nanohybrides, juin 2009, Bastia.
- **Dufort S**, Faure AC, Roux S, Tillement O, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Goutayer M, Texier I, Rizo P, Josserand V, Coll JL. Etude de la biodistribution des nanoparticules par des techniques d'imagerie optique. Journées du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), mars 2009, Archamps.
- **Dufort S**, Faure AC, Roux S, Tillement O, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Goutayer M, Texier I, Rizo P, Josserand V, Coll JL. Utilisation de l'imagerie optique pour l'étude de la biodistribution des nanoparticules. Journées pour la Recherche Respiratoire (J2R), octobre 2008, Grenoble.
- **Dufort S**, Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Texier I, Josserand V, Coll JL. Interest of optical imaging to monitor the *in vivo* biodistribution of nanoparticles. World Molecular Imaging Congress, septembre 2008, Nice, (congrès international).
- Goutayer M, **Dufort S**, Josserand V, Coll JL, Bibette J, Texier I. Tumor targeted nanoemulsions for *in vivo* fluorescence imaging. World Molecular Imaging Congress, septembre 2008, Nice.

- **Dufort S**, Faure AC, Roux S, Tillement O, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Texier I, Josserand V, Coll JL. Suivi de la biodistribution des nanoparticules *in vivo* par des techniques d'imagerie optique. Nanohybrides, juin 2008, Porquerolles.
- **Dufort S**, Foillard S, Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Texier I, Josserand V, Coll JL. Intérêt de l'imagerie optique pour le suivi de la biodistribution de nanoparticules. Congrès de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire (SPTC), mai 2008, Paris.
- **Dufort S**, Foillard S, Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Texier I, Josserand V, Coll JL. Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs. Journées du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), mars 2008, Lyon.
- **Dufort S**, Foillard S, Faure AC, Roux S, Tillement O, Rizo P, Boturyn D, Dumy P, Josserand V, Coll JL. Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs. 15^{ème} Carrefours de la Fondation Rhône-Alpes Futur, novembre 2007, Lyon.
- **Dufort S**, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Josserand V, Favrot M, Coll JL. Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs. Journées pour la Recherche Respiratoire (J2R), novembre 2007, Paris.
- **Dufort S**, Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Favrot M, Coll JL. Utilisation des nanoparticules d'or pour le diagnostic et la thérapie des cancers. Journées du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), octobre 2007, Grenoble.

Prix et distinctions honorifiques

- **Lauréate du Prix du poster**, Pep-Vec (congrès international), septembre 2009.

Dufort S. Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Goutayer M, Texier I, Rizo P, Josserand V, Coll JL. Use of optical imaging to monitor the biodistribution of targeted nanoparticles.

- **Lauréate d'une Année Recherche**, au cours de l'internat en Pharmacie Spécialisée, pour l'année 2008-2009

- **Lauréate du Prix I. Chouroulinkov**, meilleure communication orale, Congrès de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire (SPTC), mai 2008.

Dufort S. Foilard S, Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Texier I, Josserand V, Coll JL. Intérêt de l'imagerie optique pour le suivi de la biodistribution de nanoparticules.

- **Lauréate du 1^{er} Prix Jeune Chercheur**, Journées du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), octobre 2007.

Dufort S. Faure AC, Roux S, Tillement O, Boturyn D, Dumy P, Favrot M, Coll JL. Utilisation des nanoparticules d'or pour le diagnostic et la thérapie des cancers.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Avant-propos

Index des illustrations

Abréviations

INTRODUCTION..... 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... 3

Chapitre I : Physiopathologie du processus tumoral..... 3

1. **Le processus de cancérisation 3**
2. Vascularisation des tumeurs..... 4
 - 2.1. *Structure des vaisseaux sanguins..... 4*
 - 2.2. *La vasculogénèse 5*
 - 2.3. *L'angiogénèse 6*
 - 2.4. *La lymphangiogénèse..... 7*
 - 2.5. *L'angiogénèse tumorale et structure des vaisseaux tumoraux..... 7*
3. Une pression interstitielle tumorale élevée : un obstacle pour la thérapie des tumeurs 10

Chapitre II : Prise en charge diagnostique et thérapeutique des cancers... 14

1. Les méthodes de diagnostic et les traitements actuels 14
 - 1.1. *Le diagnostic des cancers 14*
 - 1.2. *Principales options thérapeutiques..... 16*
 - 1.3. *Orientations futures pour la détection et le traitement des cancers..... 17*
2. Les thérapies ciblées..... 17
 - 2.1. *Les anticorps monoclonaux 18*
 - 2.2. *Les petites molécules..... 19*
 - 2.3. *Vectorisation de biomolécules 20*
 - 2.3.1. *Thérapie génique en cancérologie 20*
 - 2.3.2. *Les vecteurs développés 22*
 - 2.3.2.1. *Les vecteurs synthétiques 22*
 - 2.3.2.2. *Les vecteurs peptidiques..... 23*

3.	Développement de nouvelles thérapies : « targeted drug delivery ».....	25
3.1.	<i>Ciblage tumoral passif : effet EPR</i>	25
3.2.	<i>Ciblage tumoral actif : les cibles tumorales</i>	26
3.3.	<i>Angiogenèse, intégrine $\alpha_v\beta_3$ et motif RGD</i>	27
3.3.1.	Rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la formation des néo-vaisseaux	27
3.3.2.	Caractéristiques de la famille des intégrines	28
3.3.3.	Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	29
3.3.4.	Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	29
3.3.5.	Penta-peptides cycliques RGD : ligands spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	30
Chapitre III : Apport des nanoparticules		33
1.	Généralités.....	33
1.1.	<i>Définition des nanoparticules</i>	33
1.2.	<i>Les différentes générations de nanoparticules</i>	34
1.3.	<i>Les nanoparticules multifonctionnelles : vers des particules idéales ?</i>	35
2.	Les différentes nanoparticules développées	35
2.1.	<i>Les liposomes</i>	36
2.2.	<i>Les micelles</i>	36
2.3.	<i>Les nanoparticules polymériques</i>	37
2.4.	<i>Les nanoparticules lipidiques</i>	38
2.5.	<i>Les nanoparticules inorganiques</i>	39
3.	Applications des nanoparticules.....	40
4.	Paramètres pharmacocinétiques des nanoparticules	42
4.1.	<i>Administration</i>	42
4.2.	<i>Distribution</i>	42
4.3.	<i>Elimination</i>	43
5.	Importance des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules sur leur devenir en milieu biologique.....	44
5.1.	<i>Caractéristiques de surface</i>	44
5.2.	<i>Taille des nanoparticules</i>	46

Chapitre IV : Du développement préclinique aux applications cliniques :	
intérêt de l'imagerie optique de fluorescence	48
1. Les différentes techniques d'imagerie.....	49
1.1. L'imagerie moléculaire.....	49
1.2. Imagerie par rayons X	50
1.3. Imagerie par ultra-sons	51
1.4. Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	52
1.5. Imagerie nucléaire	53
1.6. Imagerie de fluorescence	54
2. L'imagerie optique de fluorescence	55
2.1. Principe.....	55
2.2. Applications de la fluorescence pour l'imagerie <i>in vivo</i>	56
2.2.1. Les limitations optiques <i>in vivo</i>	57
2.2.2. Les avantages de la fluorescence.....	57
2.2.3. Les dispositifs d'imagerie.....	58
2.2.3.1. Imagerie de fluorescence par réflectance	58
2.2.3.2. Tomographie de fluorescence.....	59
2.2.4. Les traceurs fluorescents	60
2.2.4.1. Les fluorophores organiques	60
2.2.4.2. Les protéines fluorescentes.....	60
2.2.4.3. Les nanocristaux semi-conducteurs.....	61
2.2.4.4. Vers de nouvelles sondes nanoparticulaires biocompatibles.....	61
2.2.4.5. Vers des systèmes multi-modaux	62
RESULTATS	64
I . Vectorisation ciblée de biomolécules uniques	7064
1. Vectorisation de peptides	64
1.1. Le RAFT-(cRGD) ₄ comme vecteur du peptide pro-apoptotique (KLAKLAK) ₂	64
1.2. Article 1.....	67
1.3. Conclusions.....	67
2. Vectorisation de siRNA par le RAFT-(cRGD) ₄	68
2.1. Le RAFT-(cRGD) ₄ comme vecteur du siRNA anti-luciférase (anti-pG13).....	68
2.2. Conclusions.....	69

II . D'un système monovalent vers un système multivalent : Exemple de la vectorisation de siRNA..... 70

1. Présentation de l'étude et principaux résultats	71
2. Article 2.....	72
3. Résultats complémentaires	73
3.1. Biodistribution des complexes siRNA-Cy5 / CAD2	73
3.2. Complexes ciblant : CAD2 / CAD2-RAFT-(cRGD) ₄	74
4. Conclusions	76

III . Développement de nanoparticules pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs..... 77

1. Nanoparticules d'oxyde de Gadolinium.....	77
2.1. Structure des nanoparticules d'oxyde de gadolinium.....	78
2.2. Importance de la fonctionnalisation de surface.....	79
2.2.1. But de l'étude et principaux résultats	80
2.3. Article 3.....	83
2.4. Conclusions.....	83
2.5. Résultats complémentaires : Nanoparticules ciblantes	84
2.5.1. Effet de la taille du PEG	84
2.5.2. Effet de la taille des particules.....	85
2.5.3. Conclusions sur les nanoparticules ciblantes.....	86
2. Les nanoparticules d'or	87
2.1. Structure des nanoparticules d'or.....	87
2.2. Biodistribution des nanoparticules d'or in vivo	88
3. Les nano-cargos lipidiques : nanocapsules lipidiques (LNC) et nanoémulsions lipidiques (LNE).....	89
3.1. Structure des LNC et des LNE	90
3.2. Influence de la taille des nano-cargos lipidiques	91
3.3. Influence de la fonctionnalisation de surface	94
3.4. Vers des particules ciblantes	98
3.4.1. Présentation de l'étude et principaux résultats	98
3.4.2. Article 4	100
3.4.3. Conclusions	100

4. Vers la thérapie.....	101
4.1. Les LNC : un vecteur prometteur pour la transfection de gène <i>in vivo</i>	101
4.1.1. But de l'étude et principaux résultats	101
4.1.2. Article 5	103
4.1.3. Conclusions	103
4.2. LNC paclitaxel	104
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	105
I . Vectorisation ciblée de molécules uniques	105
1. Vectorisation de peptides	105
2. Vectorisation de siRNA	107
II . Vectorisation multiple de biomolécules : le système des CPPs.....	108
III . Les nanoparticules	109
1. Optimisation de la biodistribution des différentes nanoparticules	111
1.1. Pour les nanoparticules inorganiques / solides.....	113
1.2. Pour les nanoparticules lipidiques : LNE et LNC	114
1.2.1. Effet de la taille des nanoparticules	114
1.2.2. Effet de la taille des PEG.....	115
1.2.3. Effet de la fonctionnalisation par le chitosan et le dextran.....	116
2. Les systèmes ciblant	118
3. Applications thérapeutiques et diagnostiques des nanoparticules.....	119
IV . Avantages et limites de notre système d'évaluation <i>in vivo</i>	120
CONCLUSION.....	122
MATERIEL ET METHODES.....	124
I . Culture cellulaire	124
II . Molécules et nanoparticules utilisées.....	125
III . Techniques de détection de l'apoptose	126
1. Etude de la morphologie nucléaire par coloration des noyaux par le Hoescht	126

2. Analyse de la caspase 3 clivée par cytométrie en flux	126
3. Etude de l'expression protéique de la caspase 3 et de la caspase 3 clivée par western-blots	127
3.1. Préparation de lysat protéique	127
3.2. Dosage des protéines	127
3.3. Electrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose.....	127
3.4. Immuno-détection	128
IV . Détermination du contenu cellulaire en ADN par cytométrie en flux	128
V . Transfection de siRNA.....	129
1. Formation des complexes siRNA/CPPs.....	129
2. Analyse de la transfection du siRNA anti-pG13 <i>in vitro</i>	129
VI . Test d'interaction des nanoparticules avec les cellules	129
1. Analyse par cytométrie en flux	130
2. Analyse par microscopie de fluorescence	130
VII . Analyse de la biodistribution et du ciblage tumoral par imagerie de fluorescence <i>in vivo</i>	131
VIII . Evaluation de l'activité luciférase <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	131
1. Evaluation de l'activité luciférase <i>in vivo</i>	131
2. Dosage de l'activité luciférase <i>in vitro</i>	132
IX . Etude de l'activité du RAFT-RGD-KLA <i>in vivo</i>	132
1. Traitement des animaux	132
2. Analyse de la prolifération cellulaire tumorale par marquage au Ki67	132
X . Etude de la transfection d'ADN <i>in vivo</i> à l'aide des LNC ADN	133
XI . Etude de l'activité des LNC paclitaxel <i>in vivo</i>.....	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	134

INDEX
DES
ILLUSTRATIONS

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Revue Bibliographique

Figure 1 : Structure des vaisseaux sanguins.....	4'
Figure 2 : Différenciation de l'endothélium.....	5'
Figure 3 : Les mécanismes de l'angiogenèse.....	6'
Figure 4 : Les étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	6'
Figure 5 : Structure des vaisseaux lymphatiques.....	7'
Figure 6 : Echanges entre les réseaux sanguin et lymphatique.....	7'
Tableau I : Exemples de facteurs pro- et anti-angiogéniques.....	8'
Figure 7 : Les différents mécanismes de vascularisation tumorale.....	9'
Figure 8 : Les vaisseaux tumoraux sont anormaux.....	10'
Figure 9 : Illustration des deux modes de transport transvasculaire de molécules.....	10'
Figure 10 : Schéma des forces régulant le transport transcapillaire dans les tissus.....	11'
Figure 11 : Différences structurales entre les tissus normaux et tumoraux affectant la pression interstitielle des fluides.....	11'
Figure 12 : Les barrières physiologiques rencontrées par les molécules avant d'accéder aux cellules tumorales au sein d'une tumeur solide.....	12'
Figure 13 : Gradients spatiaux de métabolites dans les tumeurs.....	12'
Tableau II : Anticorps utilisés en oncologie.....	18'
Figure 14 : Répartition des essais cliniques de thérapie génique par pathologies en 2008.....	20'
Figure 15 : Structure des différents lipides utilisés pour la thérapie génique.....	22'
Figure 16 : Structure des différents polymères cationiques utilisés pour la thérapie génique.....	22'
Tableau III : Récapitulatif des CPPs.....	24'
Figure 17 : Stratégies de ciblage tumoral les plus adaptés aux applications cliniques.....	26'
Tableau IV : Rôle des intégrines dans la progression tumorale.....	28'
Figure 18 : Récepteurs de la famille des intégrines.....	29'
Figure 19 : Représentation schématique des changements de conformation de l'intégrine $\alpha\beta3$ associés à la régulation de son affinité.....	29'
Figure 20 : Exemples de motif RGD développés pour des études précliniques et cliniques.....	30'
Figure 21 : Différentes nanoparticules utilisées en recherche biomédicale.....	33'
Figure 22 : Evolution des nanoparticules.....	34'

Figure 23 : Les nanoparticules multifonctionnelles.35'

Figure 24 : Représentation schématique d'un liposome développé pour le « drug delivery ». ...36'

Figure 25 : Représentation schématique d'une micelle.....36'

Figure 26 : Structure moléculaire des dendrimères de PAMAM.....37'

Figure 27 : Structure d'une nanoparticule lipidique.....38'

Figure 28 : Représentation schématique d'une nanoparticule inorganique fonctionnalisée.39'

Figure 29 : Structure des différents polymères utilisés pour la fonctionnalisation de surface des nanoparticules.44'

Figure 30 : Représentation schématique des interactions entre la surface des nanoparticules et les protéines.....45'

Figure 31 : Représentation schématique des interactions entre une structure en brosse et des protéines de grande ou de petite taille.45'

Figure 32 : Représentation des différentes modalités d'imagerie.49'

Figure 33 : Les traceurs utilisés pour l'imagerie moléculaire.50'

Tableau V : Résumé des caractéristiques des différents systèmes d'imagerie.51'

Figure 34 : Diagramme de Jablonski.....55'

Figure 35 : Spectres d'absorption des différentes composantes des tissus en fonction de la longueur d'onde.....57'

Figure 36 : Auto-fluorescence des organes de la souris dans les différentes conditions optiques.57'

Figure 37 : Système d'imagerie de fluorescence par réflectance (2D).58'

Figure 38 : Système d'imagerie de fluorescence par transmission (3D).....59'

Figure 39 : Exemples de traceurs fluorescents.60'

Résultats

Figure 40 : Structure du RAFT-(cRGD)₄ et du RAFT-(cRAD)₄.64'

Figure 41 : Structure des composés utilisés pour la vectorisation du peptide (KLAKLAK)₂. ...65'

Figure 42 : Analyse du cycle cellulaire après traitement par le RAFT-RGD-KLA.....66'

Figure 43 : Analyse de la caspase 3 et de la caspase 3 clivée par western blot sur les tumeurs traitées par le RAFT-RGD-KLA.66'

Figure 44 : Structure des composés utilisés pour la vectorisation de siRNA.....68'

Figure 45 : Evaluation de la transfection de siRNA anti-pGL3 vectorisés par le RAFT-(cRGD) ₄ <i>in vitro</i> sur des cellules TS/A-pc pGL3.	68'
Figure 46 : Formulation des complexes siRNA/CPP et séquence des CPPs utilisés.	70'
Figure 47 : Formulation des complexes siRNA/MPG-8-cholestérol.	71'
Figure 48 : Biodistribution des complexes siRNA/CAD2 <i>in vivo</i>	73'
Figure 49 : Structure du CAD2-RAFT-c(RGD) ₄ et formulation des complexes siRNA/CAD2/CAD2-RAFT-(cRGD) ₄	74'
Figure 50 : Evaluation de la transfection de siRNA anti-pGL3 complexés avec du CAD2 +/- CAD2-RAFT-(cRGD) ₄ <i>in vitro</i> sur des cellules HEK293(β3)-RVLuc et HEK293(β1)-RVLuc.	74'
Figure 51 : Comparaison des biodistributions des complexes SiRNA/CAD2 +/- CAD2-RAFT-(cRGD) ₄ <i>in vivo</i>	75'
Figure 52 : Représentation schématique des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium.	78
Tableau VI : Résumé des différentes nanoparticules d'oxyde de Gadolinium synthétisées.	80'
Figure 53 : Evaluation du potentiel zêta des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium en fonction du pH et de leur fonctionnalisation de surface.	80'
Figure 54 : Influence de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium sur leur interaction avec les cellules HEK293(β3).	81'
Figure 55 : Biodistribution des NpGd-PEG250-COOH 10X 144h après injection IV.	82'
Figure 56 : Etude du comportement des NpGd-PEG250-COOH-cRGD et -cRAD de 15 nm <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	84'
Figure 57 : Etude du comportement des NpGd-PEG1500-NH ₂ et -cRGD de 15 nm <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	84'
Figure 58 : Etude du comportement des NpGd-PEG250-COOH-cRGD et -cRAD de 5 nm <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	85'
Tableau VII : Résumé des résultats de ciblage obtenus <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> en présence de nanoparticules PEGylées fonctionnalisées ou non par du -cRGD.	86
Figure 59 : Représentation schématique des nanoparticules d'or.	87
Figure 60 : Biodistribution des nanoparticules d'or <i>in vivo</i>	88'
Figure 61 : Représentation schématique des nanocapsules lipidiques (LNC).	90
Tableau VIII : Composition et méthode d'obtention des LNE et des LNC.	90'
Tableau IX : Récapitulatif des différentes molécules utilisées pour modifier la surface des LNC et des LNE.	90'
Figure 62 : Représentation schématique des nanoémulsions lipidiques (LNE).	91

Figure 63 : Influence de la taille des LNE et des LNC sur leur internalisation cellulaire <i>in vitro</i>	91'
Figure 64 : Influence de la taille des LNE et des LNC sur l'activation du complément.....	91'
Figure 65 : Influence de la taille des LNC-solutol sur la biodistribution <i>in vivo</i>	92'
Figure 66 : Influence de la taille des LNE-PEG1800 sur la biodistribution <i>in vivo</i>	93'
Figure 67 : Influence de la fonctionnalisation de surface des LNE et des LNC sur leur internalisation cellulaire <i>in vitro</i>	94'
Figure 68 : Influence de la fonctionnalisation de surface des LNE et des LNC sur l'activation du complément.....	94'
Figure 69 : Influence de la fonctionnalisation de surface des LNC de 50 nm sur la biodistribution <i>in vivo</i>	95'
Figure 70 : Influence de la fonctionnalisation de surface des LNE de 50 nm sur la biodistribution <i>in vivo</i>	95'
Figure 71 : Influence de l'ajout de lipodextran ou de lipochitosan en surface des LNE 50 nm sur leur comportement <i>in vitro</i>	96'
Figure 72 : Influence de l'ajout de lipodextran ou de lipochitosan en surface des LNE 50 nm sur la biodistribution <i>in vivo</i>	96'
Figure 73 : Expérience de compétition de la fixation des LNP-cRGD sur les cellules HEK293(β3).....	98'
Figure 74 : Interaction des LNP (-OH, -cRGD et -cRAD) avec les cellules HEK293(β1) <i>in vitro</i>	99'
Figure 75 : Interaction des LNC-RAFT-(cRGD) ₄ et des LNC-RAFT-(cRAD) ₄ <i>in vitro</i> et biodistribution <i>in vivo</i>	100'
Figure 77 : Biodistribution <i>in vivo</i> des LNC ADN, LNC-DSPE-mPEG2000 ADN et des LNC-F108 ADN après administration intra-veineuse.....	102'
Figure 78 : Activité anti-tumorale des LNC-paclitaxel sur des tumeurs sous-cutanées induites par les cellules IGROV1.....	104'

Discussion

Figure 79 : Représentation schématique des différentes conformations observées à la surface des nanoparticules.....	112
--	-----

Tableau X : Récapitulatif du comportement *in vitro* et *in vivo* des LNC et des LNE en fonction des variations de la taille des nanoparticules114

Tableau XI : Récapitulatif du comportement *in vitro* et *in vivo* des LNC et des LNE en fonction des variations de la taille des PEG en surface des nanoparticules116

Matériel et Méthodes

Tableau XII : Références et dilutions des anticorps utilisés en western blot.128'

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

AA	Acides Aminés
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé
Arg	Arginine
ARN	Acide RiboNucléique
AS-ODN	Anti-Sens oligonucléotide
ATP	Adénosine TriPhosphate
APTES	AminoPropylTriEthoxySilane
a.u.	arbitrar unit
BGTC	Bis-Guanidium-Tren-Cholesterol
BH3	Bcl-2 Homology domain 3
CCD	Charge-Coupled Device
CLIO	CrossLinked Iron Oxide
COP	Capillary Osmotic Pressure
CPP	Cell Penetrating Peptide
CT	Computed Tomography
Cy5	Cyanine 5
Cy5.5	Cyanine 5.5
DC-Chol	[N-(N0,N0dimethylaminoethane)-carbomoyl]cholesterol
DiD	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate
DMRIE	N-(2hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy-1-propananium bromide)
DOGS	DiOctadecylamidoGlycylSpermine
DOTAP	1,2-DiOleoyl-3-TrimethylAmmonium-Propane
DOTIM	1-[2-(oleoyloxy)ethyl]-2oleyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium chloride
DOTMA	N[1-(2,3-DiOleoyloxy) propyl]-N,N,N-TrimethylAmmonium chloride
DOPE	1,2-DiOleoyl-snglycero-3-PhosphoEthanolamine
DSPE-PEG	1,2-distearoylglycero-3-phosphatidylethanolamine-N-polyethylene glycol
DTDTPA	DiamideéthaneThiolDiéthylèneTriaminePentAcétate
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR	Enhanced Permeabililty and Retention
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluoro-Desoxy-Glucose
FDOT	Fluorescence-enhanced Diffuse Optical Tomography
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLARE	Fluorescence-Assisted Resection and Exploration
FMT	Fluorescence Molecular Tomography
FRI	Fluorescence Reflectance Imaging
GFP	Green Fluorescent Protein
GIST	Gastro-Intestinal Stromal Tumor
hCT	human Calcitonine
HER-2	Human Epidermal Receptor-2
HSV	Herpes Simplex Virus
ICP	Inductively Coupled Plasma
IF	Interferin [®]
Ig	Immunoglobuline
IR	Infra-Rouge ou Infra-Red
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique

IV	Intra-Veineuse
kD	kilo Dalton
LED	Light-Emitting Diode
LNC	Lipid NanoCapsule
LNE	Lipid NanoEmulsion
LNP	Lipid NanoParticle
MFI	Mean Fluorescence Intensity
miRNA	Micro RNA
MMP	Matrix MetalloProteinase
MPS	Mononuclear Phagocyte System
NIR	Near Infra-Red
NLS	Nuclear Localization Sequence
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
PAMAM	PolyAmidoAmine
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEG	Poly Ethylène Glycol
PEI	PolyEthylène Imine
PET	Positron Emission Tomography (=TEP)
PGA	Poly Glycolic Acid
PLA	Poly Lactic Acid
PLGA	Poly Lactic- <i>co</i> -Glycolic Acid
PLL	Poly(L-Lysine)
PMMA	PolyMethyl MethAcrylate
PNA	Peptide Nucleic Acid
POE	Poly-Oxy-Ethylene
RAD	arginine-alanine-acide aspartique
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RES	Reticulo-Endothelial System
RGD	arginine-glycine-acide aspartique
RLU	Relative Light Unit
shRNA	short haipin RNA
siRNA	small interfering RNA
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
SPECT	Single Photon Emission Tomography (=TEMP)
SPIO	SuperParamagnetic Iron Oxide
TEP	Tomographie par Emission de Positron (= PET)
TEMP	Tomographie d'Emission MonoPhotonique (=SPECT)
TEOS	TétraEthOxySilane
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
UV	Ultra Violet
USPIO	Ultra-small SuperParamagnetic Iron Oxide
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficiency Humaine
Gp41	Glycoprotéine 41
SV40	Simian Virus 40
SVF	Sérum de Veau Fœtal
VP-22	Virus Protein-22

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, les progrès répétés, notamment en matière d'imagerie et de protocoles thérapeutiques, ont permis d'améliorer le traitement de nombreuses maladies. Cependant, ces progrès n'ont eu qu'un impact limité dans la lutte contre le cancer, incitant au développement de nouvelles stratégies. Parmi les stratégies proposées, la délivrance spécifique des agents d'intérêt (molécules de chimiothérapie ou biomolécules tels que des peptides, des oligonucléotides anti-sens, des siRNA, ...) au niveau des cellules tumorales constitue un défi majeur pour la prévention, le diagnostic et la thérapie des cancers.

En effet, les principes actifs anti-tumoraux présentent généralement des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des diverses barrières biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. De plus, un des obstacles majeurs à l'utilisation des biomolécules est la faible efficacité avec laquelle elles passent les barrières physiologiques. Ces limitations concernant l'adressage et la délivrance ont conduit au développement de vecteurs efficaces et non toxiques capables de délivrer de manière spécifique des molécules actives au niveau de leur site d'action.

Mon travail de thèse avait pour objectif d'évaluer, *in vitro* et *in vivo*, différents systèmes permettant la vectorisation ciblée de principes actifs et de biomolécules.

Dans la première partie de ce manuscrit, la revue bibliographique présente tout d'abord la physiopathologie tumorale, du processus de cancérisation aux paramètres influençant l'efficacité des traitements. Le second et le troisième chapitres sont consacrés à la prise en charge des cancers, au ciblage tumoral et à l'apport des nanoparticules dans le développement d'alternatives diagnostiques et thérapeutiques. Enfin, le dernier chapitre présente l'intérêt de l'imagerie optique de fluorescence *in vivo* pour le développement de telles approches.

Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans la seconde partie de la thèse.

Les travaux menés au laboratoire ont montré que le vecteur RAFT-(cRGD)₄ présentait une capacité de ciblage des cellules tumorales et endothéliales exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, à la fois *in vitro* et *in vivo*, permettant d'imager des tumeurs positives pour cette intégrine à l'aide de l'imagerie optique de fluorescence *in vivo*.

La première partie de mon travail a été consacrée à la vectorisation ciblée de biomolécules, dans les lignées cellulaires exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Dans un premier temps, nous avons vectorisé des molécules uniques (peptide pro-apoptotique ou siRNA) à l'aide du vecteur

RAFT-(cRGD)₄. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique, nous avons ensuite testé des systèmes de vectorisation multivalents, en vectorisant des siRNA à l'aide de CPPs (Cell Penetrating Peptides). Ces systèmes, de type particulaire, n'ayant pas de spécificité pour les cellules tumorales, nous avons tenté de les rendre ciblant par ajout de RAFT-(cRGD)₄ à leur surface.

La seconde partie de mon travail a porté sur l'évaluation de nouvelles nanostructures multifonctionnelles de différentes natures (nanoparticules d'oxyde de Gadolinium, nanoparticules d'or, nanoémulsions et nanocapsules lipidiques), alliant le ciblage de tumeurs, leur diagnostic ainsi que leur traitement. Nous avons d'abord étudié des paramètres influençant la biodistribution de ces systèmes par imagerie optique de fluorescence *in vivo*. Le but étant d'obtenir une biodistribution optimale, c'est-à-dire d'avoir une nanoparticule qui circule assez longtemps pour atteindre son site d'action, sans accumulation dans les organes vitaux et permettant une libération des principes actifs au niveau tumoral. Nous avons ensuite tenté d'améliorer le ciblage tumoral en greffant du cRGD ou du RAFT-(cRGD)₄ à leur surface. Dans un dernier temps, nous avons testé deux applications thérapeutiques : la vectorisation d'une molécule conventionnelle de chimiothérapie, le paclitaxel, et la vectorisation d'ADN plasmique par des nanocapsules lipidiques.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Physiopathologie du processus tumoral

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormale de cellules d'un tissu ou d'un organe, par leur pouvoir envahissant local et leur capacité à métastaser à distance du foyer primitif. Dans la majorité des cas, la tumeur est constituée d'un tissu « malade » et d'un tissu de soutien « influencé » qui en font une structure complexe. A côté des cellules tumorales organisées en structure plus ou moins caractéristiques, se trouve un tissu de soutien : le stroma tumoral (Delpech et coll., 1991). Il est constitué de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, d'un infiltrat de cellules immunitaires (macrophages, mastocytes et lymphocytes), inclus dans une matrice extra-cellulaire (Li et coll., 2006). Ainsi, comme la plupart des tissus normaux, le tissu tumoral est composé de trois compartiments (vasculaire, interstitiel et cellulaire) qui interagissent entre eux et influencent la distribution des molécules thérapeutiques.

1. Le processus de cancérisation

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme, qui échappent aux mécanismes normaux de la différenciation et de la régulation de leur prolifération. En outre, ces cellules peuvent acquérir des propriétés d'invasion et de migration leur permettant d'envahir le tissu normal avoisinant en le détruisant, puis de migrer à distance pour former des métastases.

La carcinogenèse, transformation d'une cellule normale en cellule tumorale, est un processus séquentiel qui fait intervenir l'accumulation progressive d'altérations génétiques, après exposition à un (des) carcinogène(s) d'origine chimique, physique ou virale, conduisant à l'activation de certains oncogènes et/ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (étapes d'initiation et de promotion du cancer). Parallèlement à ces modifications génétiques, les cellules tumorales induisent des changements profonds dans le tissu normal voisin (étape de progression). Ce tissu ainsi altéré, également appelé stroma tumoral, offre un environnement favorable permettant la croissance de la tumeur, l'invasion locale et la progression métastatique.

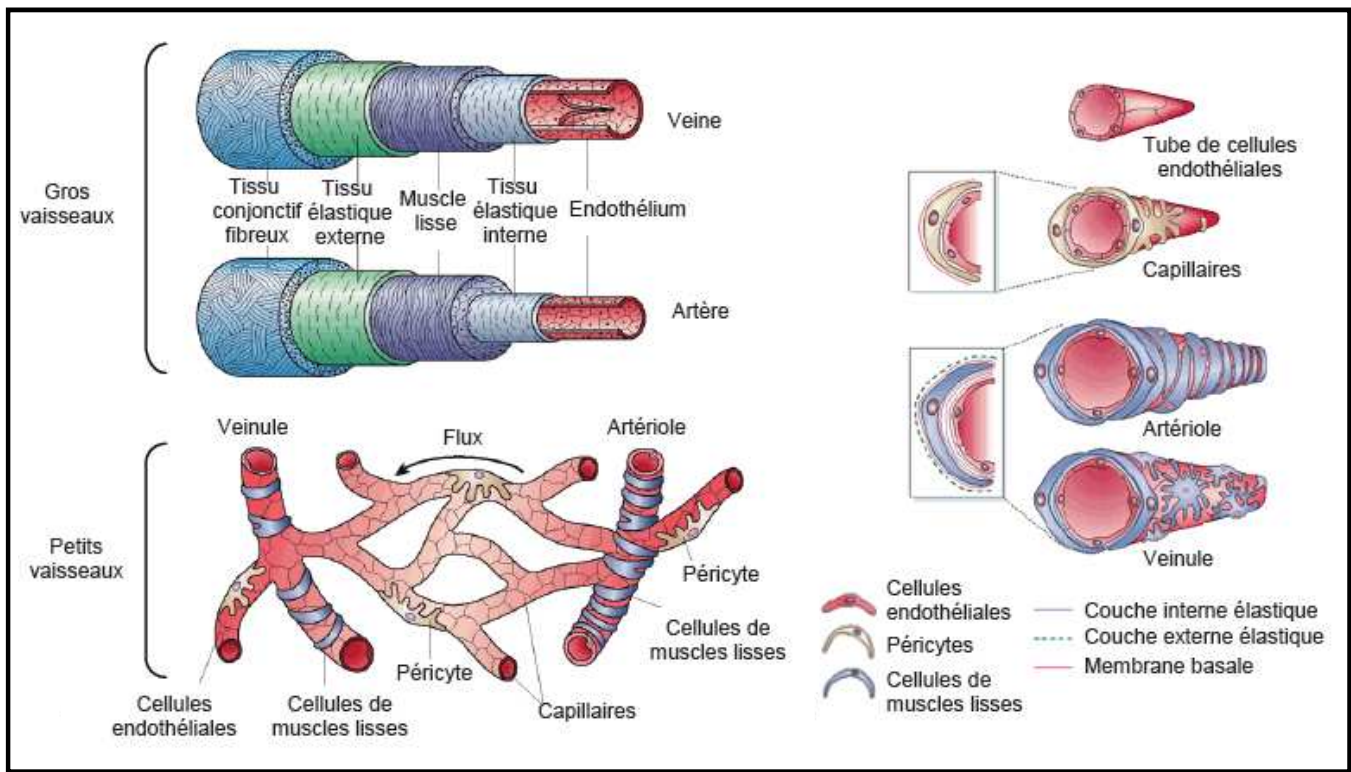


Figure 1. Structure des vaisseaux sanguins.

Selon le calibre des vaisseaux, la composition de la paroi vasculaire est hétérogène. Les gros vaisseaux présentent plusieurs couches de cellulaires et extracellulaires, alors que les capillaires sont recouverts par quelques péricytes. Ainsi les capillaires représentent le site principal des échanges en nutriments entre le sang et les tissus. Les veines possèdent des valves pour empêcher le reflux du sang, alors que les artères ont une paroi vasculaire fortement élastique pour résister aux fortes pressions artérielles en aval du cœur.

D'après Cleaver et Melton, 2003 et Jain, 2003.

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le stroma tumoral est un évènement décisif qui favorise la progression tumorale (par approvisionnement de la tumeur en nutriments et en oxygène, et élimination de ses déchets) et la dissémination des métastases, en augmentant la probabilité que les cellules cancéreuses puissent atteindre la circulation sanguine et se disséminer dans l'ensemble de l'organisme. La vascularisation permet également aux molécules thérapeutiques d'accéder à la tumeur.

Dans la suite de ce chapitre, je vais donc détailler le processus de vascularisation des tumeurs (structure des vaisseaux et processus impliqués dans la vascularisation), puis l'influence des modifications tumorales sur la distribution des molécules thérapeutiques.

2. Vascularisation des tumeurs

2.1. Structure des vaisseaux sanguins

Le sang exerce différentes fonctions, parmi lesquelles l'approvisionnement des organes en oxygène et en nutriments, l'élimination des déchets, l'homéostasie et la défense de l'organisme. Il est constitué d'une phase liquide, le plasma et d'éléments figurés (érythrocytes, leucocytes et thrombocytes).

Les vaisseaux sanguins permettent le transport de ces différents éléments au sein de l'organisme. Le système vasculaire est constitué du réseau artériel qui part du cœur vers les organes, et du réseau veineux qui ramène le sang au cœur. Il est composé de trois types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires (Claever and Melton, 2003 ; Jain, 2003). Les artères et les veines sont composées de trois tuniques, de la lumière vers la périphérie : (Figure 1).

- L'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale et d'une couche interne élastique. Elle est en contact direct avec la circulation sanguine.
- La média, qui entoure l'intima, est un revêtement concentrique de cellules musculaires qui participe au contrôle du diamètre des vaisseaux et contribue à la régulation du tonus vasculaire.
- L'adventice est constituée d'une couche de tissu conjonctif contenant des fibres de collagène et des fibroblastes permettant l'ancrage du vaisseau dans le tissu.

La vascularisation de l'organisme est assurée par un réseau complexe d'artérioles et de veinules, constituées d'une monocouche de cellules endothéliales et de cellules musculaires

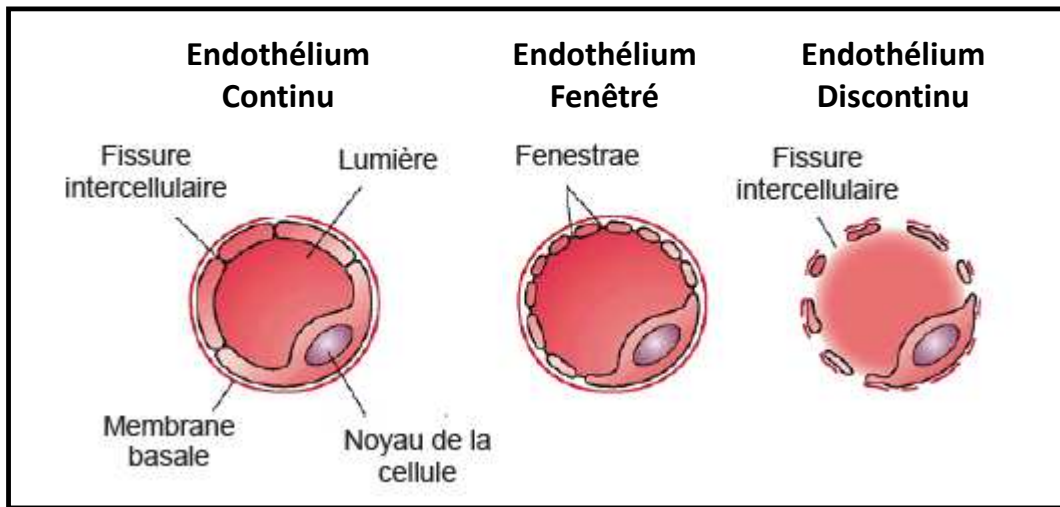


Figure 2. Différenciation de l'endothélium.

Les capillaires présentent des morphologies cellulaires variables selon les tissus. Les capillaires continus ne présentent pas d'ouvertures. Les capillaires fenêtrés présentent de petites ouvertures, appelées fenestrae, de 80 à 100 nm de diamètre. Ils sont entourés par un diaphragme perméable non membraneux, permettant le passage rapide des macromolécules. La membrane basale est continue. Les capillaires discontinus, aussi appelés sinusoides, possèdent une lumière large, de nombreuses fenestrations, pas de diaphragme et une membrane basale absente ou discontinue.

D'après Cleaver et Melton, 2003.

lisses plus ou moins éparées, implantées dans la lame basale des cellules endothéliales (Figure 1). Les capillaires, qui relient les artérioles et les veinules, forment un réseau complexe permettant les échanges avec le tissu environnant. Ils sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales (figure1). Lors de leur ramification en capillaires, les cellules de muscle lisse des artérioles et des veinules sont remplacées par des péricytes, qui ont la même origine ontogénique. Elles présentent des caractéristiques phénotypiques communes avec les cellules du muscle lisse, mais diffèrent essentiellement par leur forme étoilée.

Les capillaires eux-mêmes présentent des différences morphologiques importantes. Les besoins particuliers des différents tissus de l'organisme, en terme de qualité et de quantité d'échanges définissent un niveau particulier de différenciation en fonction des organes considérés : endothélium fenêtré dans les glandes endocrines du sein ou le rein, endothélium continu dans le cerveau (Figure 2).

La formation des vaisseaux sanguins se fait principalement selon deux mécanismes : la vasculogénèse et l'angiogénèse.

2.2. La vasculogénèse

La vasculogénèse correspond au processus par lequel des vaisseaux sanguins, constitués essentiellement de cellules endothéliales, sont formés par différenciation de précurseurs mésenchymateux (Risau et Flamme, 1995). La génération *de novo* de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs endothéliaux est un phénomène qui se produit essentiellement au cours de l'embryogénèse précoce. Il contribue pour une grande part à la mise en place de l'appareil cardio-vasculaire et à la formation des réseaux vasculaires propres à chaque organe. Toutefois chez l'adulte, des progéniteurs endothéliaux provenant de la moelle osseuse ont pu être isolés dans le sang périphérique. Il s'agit alors d'une vasculogénèse post-natale. Dans les néo-vaisseaux, l'incorporation de précurseurs endothéliaux issus de la moelle osseuse, contribuerait à la croissance vasculaire en complément des cellules endothéliales résidentes lors du bourgeonnement (Ferrara, 2005). La vasculogénèse post-natale pourrait ainsi être impliquée dans la vascularisation de certaines tumeurs (Asahara et coll., 1999 ; Lyden et coll., 2001). Cependant, les avis diffèrent sur la hauteur de la contribution de ce processus à la néo-angiogénèse.

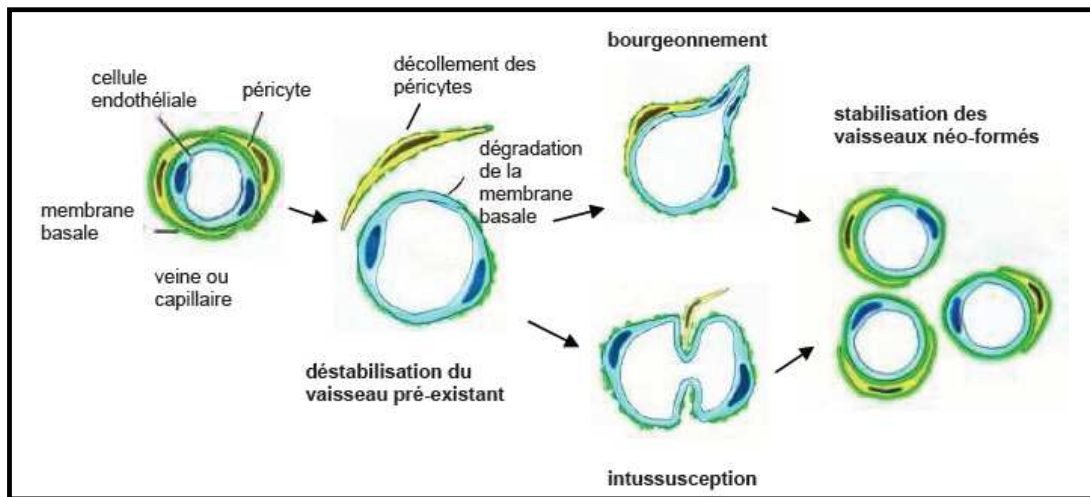


Figure 3. Les mécanismes de l'angiogénèse.

Il existe deux mécanismes d'angiogénèse : le bourgeonnement et l'intussusception.
D'après Pettersson et coll., 2000.

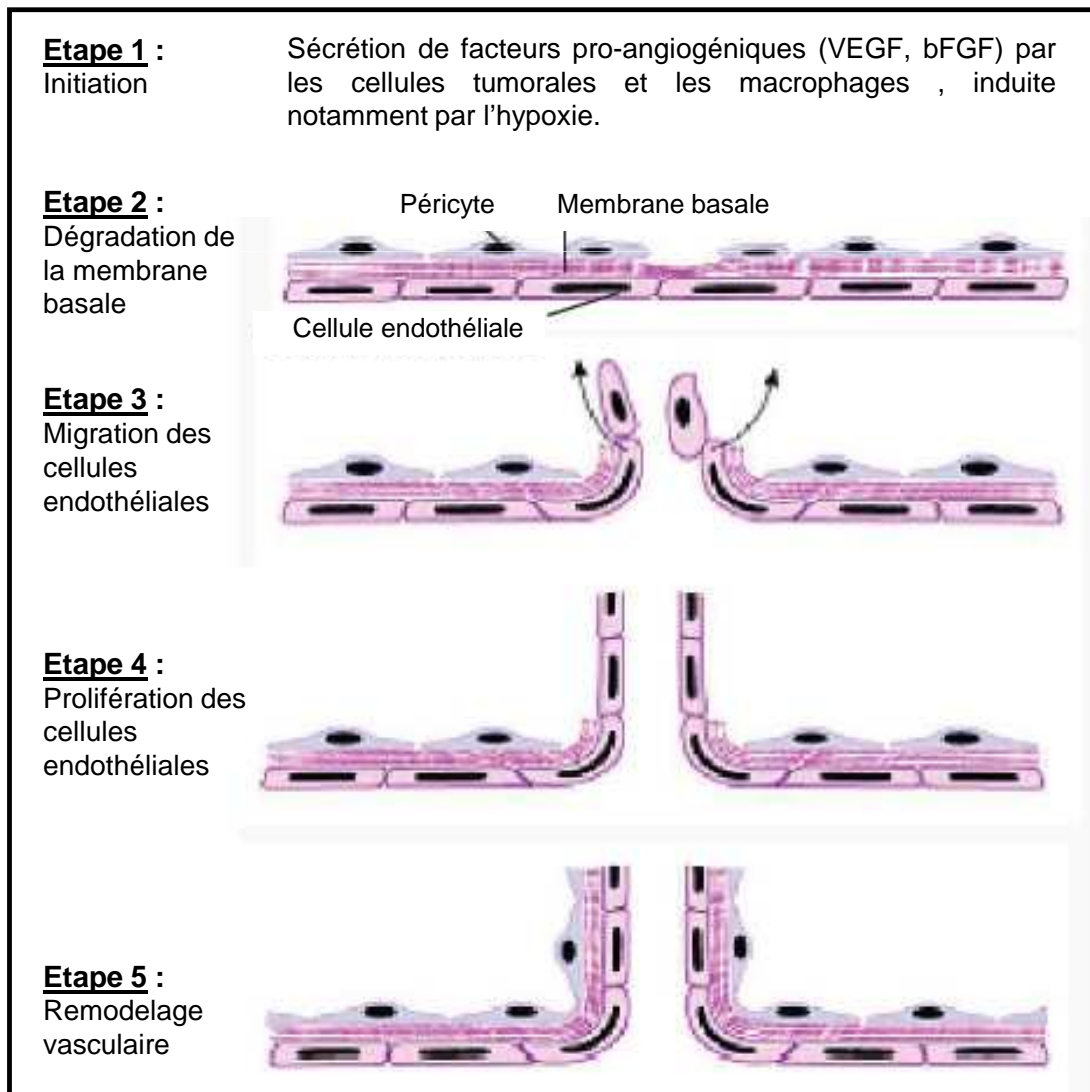


Figure 4. Les étapes de l'angiogénèse par bourgeonnement.

D'après <http://edumed.unige.ch>

2.3. L'angiogenèse

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Il existe deux mécanismes d'angiogenèse : le bourgeonnement ou l'intussusception, c'est-à-dire par scission des vaisseaux existants (Figure 3).

Au cours de l'angiogenèse par intussusception, les cellules endothéliales de la paroi du vaisseau s'invaginent et établissent une cloison divisant la lumière préexistante (Flamme et coll., 1997).

L'angiogenèse par bourgeonnement suit différentes étapes (Figure 4) : déstabilisation du vaisseau préexistant, puis morphogenèse du néo-vaisseau et enfin stabilisation des structures vasculaires nouvellement formées.

Au cours de la première étape, le vaisseau se dilate et devient perméable en réponse à un signal déclencheur tel que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). L'inhibition des interactions inter-cellulaires, associée à la dégradation locale de la matrice extra-cellulaire et de la membrane basale, va ensuite permettre la déstabilisation du vaisseau. Dans un second temps, les cellules endothéliales migrent vers l'espace péri-vasculaire où elles prolifèrent et s'associent pour former un néo-vaisseau. Au cours de cette étape, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, récepteurs de la matrice cellulaire, participent à la diffusion et la migration des cellules. Ensuite intervient une étape de maturation des vaisseaux, assurée par le recrutement de cellules péri-vasculaires (péricytes ou cellules musculaires lisses) et la synthèse de protéines matricielles. Enfin, les néo-vaisseaux sont stabilisés et reviennent à un stade quiescent. (Carmeliet et Jain, 2000 ; Yancopoulos et coll., 2000, pour revues sur l'angiogenèse).

Chez l'adulte, l'angiogenèse n'intervient que dans de rares situations physiologiques normales (cycle menstruel, développement embryonnaire, cicatrisation) (Carmeliet, 2003). Il s'agit d'un mécanisme indispensable et hautement régulé dans les conditions physiologiques (Risau, 1997). Lorsqu'un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle de l'angiogenèse survient, il peut être impliqué dans le développement et la progression de maladies variées comme les maladies inflammatoires ou les cancers (Folkman, 1995 ; Carmeliet, 2003).

L'angiogenèse joue un rôle prépondérant dans la vascularisation des tumeurs, mais dans ce contexte pathologique, elle présente des particularités qui seront développées dans le paragraphe *I.5. L'angiogenèse tumorale et structure des vaisseaux tumoraux.*

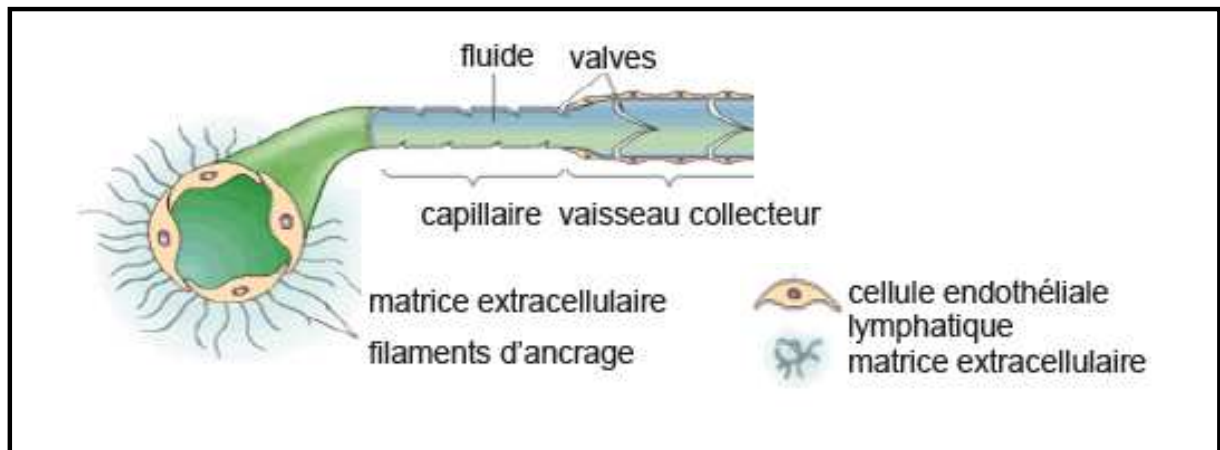


Figure 5. Structure des vaisseaux lymphatiques.

Les capillaires lymphatiques ne possèdent pas de péricytes, alors que les vaisseaux collecteurs sont recouverts d'une couche de cellules endothéliales lymphatiques et possèdent des valves, permettant la circulation de la lymphe dans une seule direction. Les capillaires lymphatiques possèdent des micro-valves. Les cellules endothéliales lymphatiques sont connectées au tissu environnant par des filaments d'ancrage très minces (4-10 nm). Ces filaments évitent l'effondrement des vaisseaux lymphatiques dans des conditions de forte pression interstitielle.

D'après Jain, 2003.

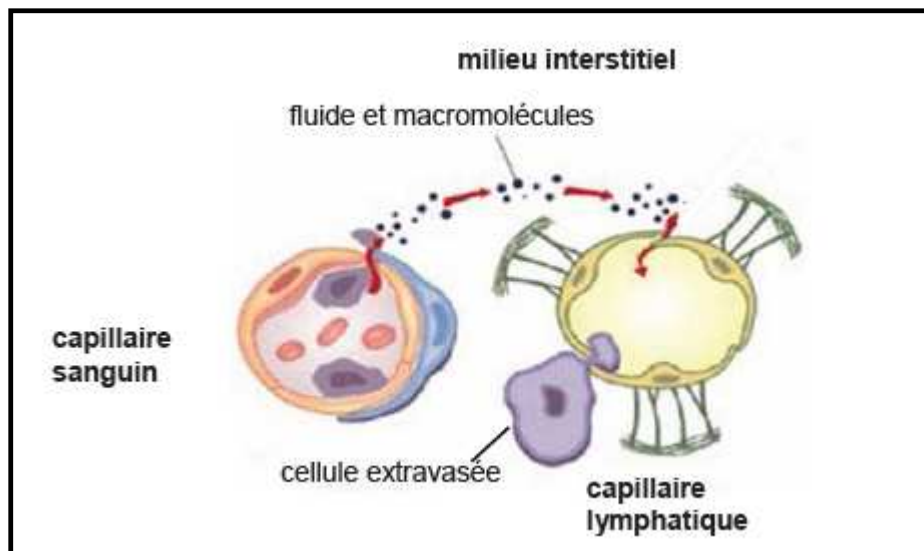


Figure 6. Echanges entre les réseaux sanguin et lymphatique.

Les macromolécules du plasma et les cellules immunitaires extravasées sont drainées par les vaisseaux lymphatiques.

D'après Alitalo et coll., 2005.

2.4. La lymphangiogenèse

Le réseau vasculaire lymphatique est constitué des vaisseaux parallèles au réseau sanguin. Les capillaires lymphatiques, composés d'une monocouche de cellules endothéliales, sont des vaisseaux à paroi fine. Ils ne présentent ni péricytes ni cellules musculaires lisses, et n'ont pas ou peu de membrane basale. A l'inverse, les vaisseaux lymphatiques collecteurs comportent une couche de cellules musculaires, une membrane basale et des valves (Figure 5).

La pression sanguine induit une diffusion de plasma continue dans l'espace interstitiel à partir des capillaires (Figure 6). La fonction principale du réseau lymphatique est de drainer ces fluides, très riches en macromolécules et en cellules extravasées, telles des leucocytes ou des cellules présentatrices d'antigènes, et de les réintégrer dans la circulation sanguine, permettant ainsi le maintien de l'homéostasie plasmatique et la régulation de la pression tissulaire. Au cours de ce trajet, les fluides sont filtrés au niveau des ganglions lymphatiques, les cellules présentatrices d'antigènes peuvent alors activer une réponse immunitaire spécifique. Ce système joue donc un rôle essentiel dans la défense immunitaire de l'organisme. Il est également impliqué dans la pathogenèse de nombreuses maladies et notamment du cancer. De plus, les cellules tumorales qui se détachent de la tumeur et constituent des métastases potentielles, transitent également par ce réseau. De manière intéressante, il a été établi que la présence de métastases dans le ganglion sentinelle d'une tumeur est un facteur de mauvais pronostic des carcinomes chez l'homme (Pepper et coll., 2001). De plus, des travaux semblent indiquer que l'évaluation du nombre et peut être de la taille des vaisseaux lymphatiques dans la tumeur et autour d'elle, est importante pour déterminer sa capacité à métastaser (Pepper et coll., 2001). Enfin, lorsqu'ils ne sont pas fonctionnels au sein des tumeurs, ils pourraient contribuer à une hypertension interstitielle et interférer avec la diffusion des agents thérapeutiques (Carmeliet et Jain, 2000).

(Alitalo et coll., 2005 ; Tammela et Alitalo, 2010, pour revues sur la lymphangiogenèse)

2.5. L'angiogenèse tumorale et structure des vaisseaux tumoraux

Lorsque sa taille est inférieure à $1-2 \text{ mm}^3$ (10^5 à 10^6 cellules), la tumeur est indépendante de l'angiogenèse, et l'apport des cellules tumorales en oxygène et en nutriments est assuré par diffusion simple (Folkman, 1990). C'est la phase dormante ou avasculaire. La limite de

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
VEGF	Thrombospondines 1 et 2
FGF (Fibroblast Growth Factor)	Interférons, notamment l'IFN α
PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)	Angiostatine
TNF- α (Tumor Necrosis Factor α)	Endostatine
	Facteur plaquettaire-4
	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases de la matrice extra-cellulaire (TIMPs)

Tableau I. Exemples de facteurs pro- et anti-angiogéniques.

diffusion simple de l'oxygène au sein d'un tissu est estimée à 100-150 µm entre le capillaire et les cellules, ce qui correspond à environ 3 à 5 couches de cellules autour du vaisseau.

L'initiation de l'angiogenèse tumorale est sous le contrôle de la balance entre les facteurs inducteurs et inhibiteurs de l'angiogenèse (Tableau I) (Bergers et Benjamin, 2003). Dans les conditions physiologiques ainsi que dans les tumeurs dormantes, les facteurs inhibiteurs dominent les activateurs. En réponse aux stimuli angiogéniques, la dérégulation de cette balance, appelée « switch angiogénique », conduit à la situation inverse dans laquelle les facteurs activateurs prédominent et les inhibiteurs sont réprimés. Les principaux facteurs à l'origine de ce processus sont :

- Les stress métaboliques : hypoxie, hypoglycémie, diminution du pH,
- Le stress mécanique : pression exercée par la prolifération des cellules tumorales,
- La réponse inflammatoire
- Et la dérégulation des gènes contrôlant les facteurs régulateurs de l'angiogenèse (Carmeliet et Jain, 2000).

Les facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés par les cellules tumorales, mais ils proviennent également des différents composants du stroma tumoral (fibroblastes, cellules musculaires lisses), des cellules inflammatoires ou de la matrice extra-cellulaire (Carmeliet et Jain, 2000).

L'hypoxie intra-tumorale induite par la forte prolifération des cellules tumorales semble être le principal initiateur de l'angiogenèse, en induisant une surexpression de gènes angiogéniques (Kerbel et Folkman, 2002 ; Pugh et Ratcliffe, 2003). Elle constitue également un stimulus attracteur pour les macrophages, qui vont alors produire des protéases facilitant la migration des cellules endothéliales.

En sécrétant des facteurs pro-angiogéniques, la tumeur peut induire sa propre vascularisation, permettant son développement et sa dissémination (Folkman, 1971 ; Folkman et Hanahan, 1991 ; Holash et coll., 1999). En effet, une corrélation entre la densité des micro-vaisseaux tumoraux, les métastases ganglionnaires et la survie des patients a été établie pour différents types tumoraux, telles que les tumeurs du sein (Weidner et coll., 1991 ; Horak et coll., 1992), du poumon (Macchiarini et coll., 1992), de la prostate (Wakui et coll., 1992) et du colon (Bigler et coll., 1993). Le nombre de vaisseaux sur une coupe tumorale a ainsi été proposé comme pouvant être un facteur pronostique pour les patients atteints d'un cancer.

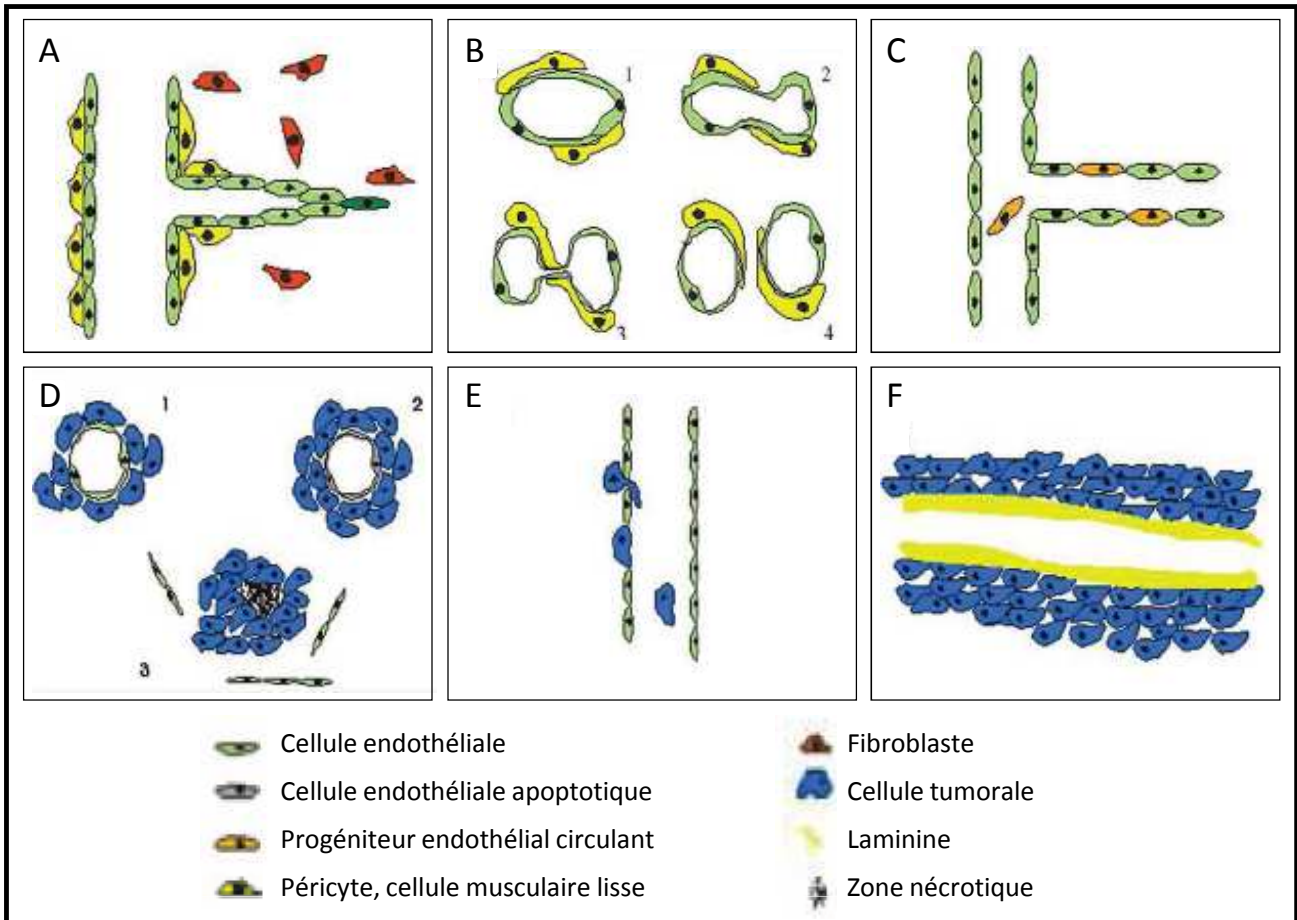


Figure 7. Les différents mécanismes de vascularisation tumorale.

[A] Angiogenèse par bourgeonnement. [B] Angiogenèse par intussusception. [C] Recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants. [D] Cooption. [E] Vaisseaux mosaïques. [F] Mimétisme vasculaire.

D'après Auguste et coll., 2005.

Néanmoins, l'angiogenèse tumorale est moins finement contrôlée que le processus physiologique, aboutissant à un réseau disproportionné, mimétique et peu fonctionnel (Carmeliet et Jain, 2000 ; Auguste et coll., 2005 ; Jain, 2005).

Dans la majorité des cas, les vaisseaux tumoraux proviennent du réseau vasculaire préexistant et sont induits par bourgeonnement ou intussusception (Carmeliet et Jain, 2000). L'incorporation de précurseurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse (mécanisme de vasculogenèse post-natale) a également été décrite (Asahara et coll., 1999). D'autre part, un processus de mimétisme vasculaire est évoqué : les cellules tumorales peuvent acquérir la capacité à exprimer un phénotype de cellules endothéliales et à former un réseau de pseudo-vaisseaux dépourvus de cellules endothéliales où les cellules tumorales sont directement en contact avec le sang (Maniotis et coll., 1999). Ce mécanisme de mimétisme vasculaire a été mis en évidence dans divers carcinomes comme ceux du sein, de la prostate, des ovaires, du chorion ou des poumons, dans les mélanomes agressifs, ainsi que dans les phéochromocytomes et plusieurs sarcomes (Hendrix et coll., 2003) (Figure 7).

Contrairement aux vaisseaux normaux, les réseaux vasculaires associés aux tumeurs sont structurellement et fonctionnellement anormaux (Carmeliet et Jain, 2000). Ils présentent des différences :

- **Architecturales** : les vaisseaux sont fragilisés, tortueux, dilatés, chaotiques et souvent hémorragiques. Ils présentent un diamètre irrégulier, dû à la compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération. Le réseau vasculaire a une structure généralement anarchique avec des branchements et des dérivations excessifs. Ce phénomène ne se limite pas aux tumeurs solides. En effet, les micro-vaisseaux d'une moelle osseuse leucémique présentent un réseau complexe de branchements, alors qu'ils sont simples et droits dans une moelle osseuse normale (Perez-Atayde et coll., 1997).
- **Histologiques** : la paroi des vaisseaux est anormale, comportant un grand nombre d'ouvertures et de fenestrations, et des jonctions inter-endothéliales élargies. La membrane basale est souvent incomplète voire absente. Les vaisseaux tumoraux possèdent peu ou pas de mécanismes protecteurs. En effet, les péricytes ne forment pas un manchon complet autour des cellules endothéliales, ce qui fragilise les vaisseaux et ne les protège pas contre les variations de l'équilibre en oxygène ou en hormones, équilibre qui leur permettrait un contrôle vaso-actif des besoins

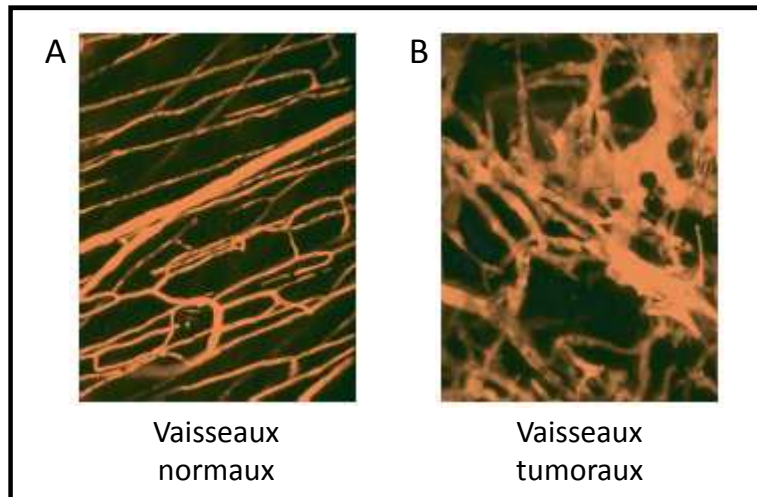


Figure 8. Les vaisseaux tumoraux sont anormaux.

[A] Capillaires normaux de souris. [B] Capillaires tumoraux au sein d'une xénogreffe de cellules humaines. Images obtenues par microscopie bi-photonique.

D'après Jain et Booth, 2003.

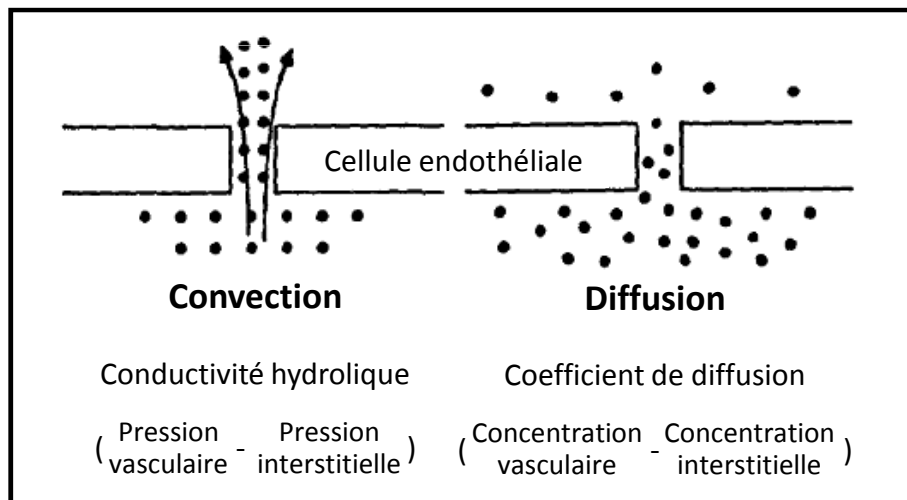


Figure 9. Illustration des deux modes de transport transvasculaire de molécules.

La diffusion est proportionnelle au gradient de concentration et la convection est proportionnelle aux gradients de pression.

D'après Jain, 1991.

métaboliques ou induirait une quiescence du vaisseau (Benjamin et coll., 1999). Enfin, la paroi vasculaire n'est pas toujours constituée d'une monocouche de cellules endothéliales. Les vaisseaux peuvent être bordés d'une couche homogène de cellules tumorales ou d'une mosaïque de cellules endothéliales et de cellules tumorales. Ainsi 15 % des vaisseaux d'une xélogreffe de carcinome colique ou d'un carcinome spontané chez l'homme sont composés d'une mosaïque de cellules tumorales et endothéliales (Chang et coll., 2000) (Figure 8).

- et **Hémodynamiques** : le flux sanguin est discontinu : il peut s'arrêter voire s'inverser. Les réseaux capillaires associés aux tumeurs sont dépourvus de sphincters pré-capillaires (Jain et Booth, 2003). Malgré la formation de néo-vaisseaux, une hypoxie, une acidification et une nécrose intra-tumorale peuvent être observées.

3. Une pression interstitielle tumorale élevée : un obstacle pour la thérapie des tumeurs

La structure anormale des vaisseaux tumoraux associée à l'organisation complexe de la tumeur peut affecter les paramètres physiologiques qui régissent la distribution des molécules thérapeutiques au sein des tissus. En effet, lorsqu'une molécule est injectée par voie intra-veineuse, elle doit franchir différentes barrières avant d'atteindre l'espace intra-cellulaire des cellules cibles :

- distribution dans l'espace vasculaire,
- franchissement de la paroi vasculaire,
- transport au sein de l'interstitium,
- transport à travers la membrane cellulaire.

Chaque transport est influencé par les phénomènes de diffusion et de convection. La diffusion correspond à un transfert passif de solutés et de molécules de faible poids moléculaire selon un gradient de concentration du milieu le plus concentré vers le moins concentré. La convection est, quant à elle, un transfert actif de soluté et de solvant (eau) selon un gradient de pression hydrostatique (Figure 9).

Le transport de solutés et de molécules dans l'interstitium est ainsi gouverné par des paramètres physiologiques du tissu (pression, flux sanguin) et des paramètres physico-chimiques des éléments à transporter (taille, charge, structure, composition).

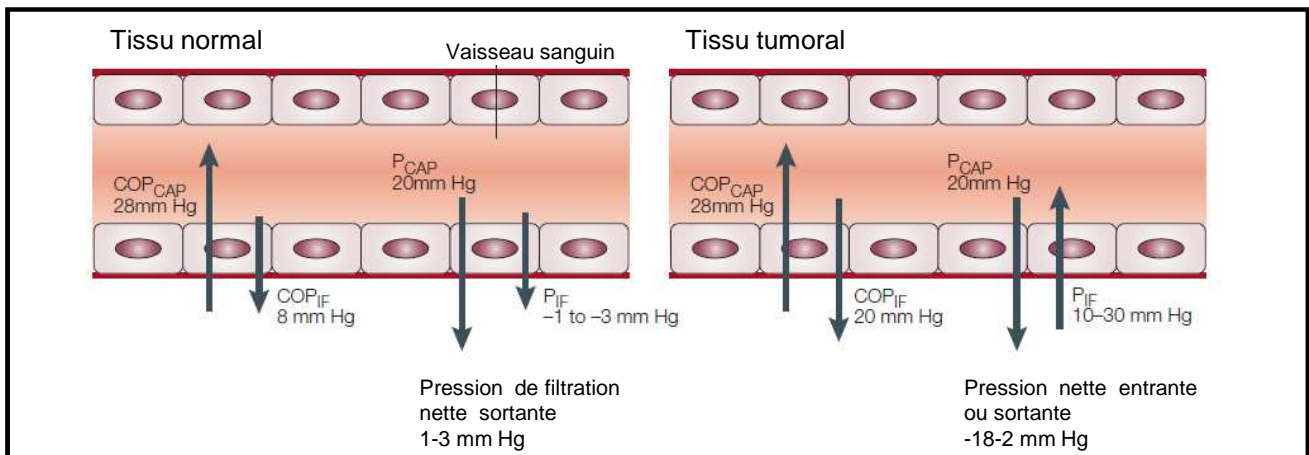


Figure 10. Schéma des forces régulant le transport transcapillaire dans les tissus.

Ce schéma montre les pressions hydrostatique et osmotique des capillaires (respectivement P_{CAP} et COP_{CAP}) et de l'interstitium environnant (P_{IF} et COP_{IF}) dans les tissus normaux et tumoraux. Les valeurs données sont des approximations. Dans les capillaires humains normaux, la COP_{CAP} est d'environ 28 mm Hg, ce qui permet de maintenir les fluides dans les capillaires. Les forces qui tendent à faire sortir les fluides des capillaires sont la P_{CAP} (~ 20 mm Hg), la COP_{IF} (~ 8 mm Hg) et la P_{IF} qui est normalement négative (-1 à -3 mm Hg). Ainsi, il en résulte une pression de filtration nette sortante, des capillaires vers l'interstitium, de 1 à 3 mm Hg. Cette pression contribue au transport des molécules des vaisseaux vers les cellules. Dans les tissus tumoraux, la COP_{IF} est augmentée (20 mm Hg) ainsi que la P_{IF} (10-30 mm Hg). Il en résulte une pression nette sortante de 2 mm Hg pour certaines tumeurs (pression similaire à celle du tissu normal), ou une pression nette entrante de 18 mm Hg pour les autres tumeurs.

D'après Heldin et coll., 2004.

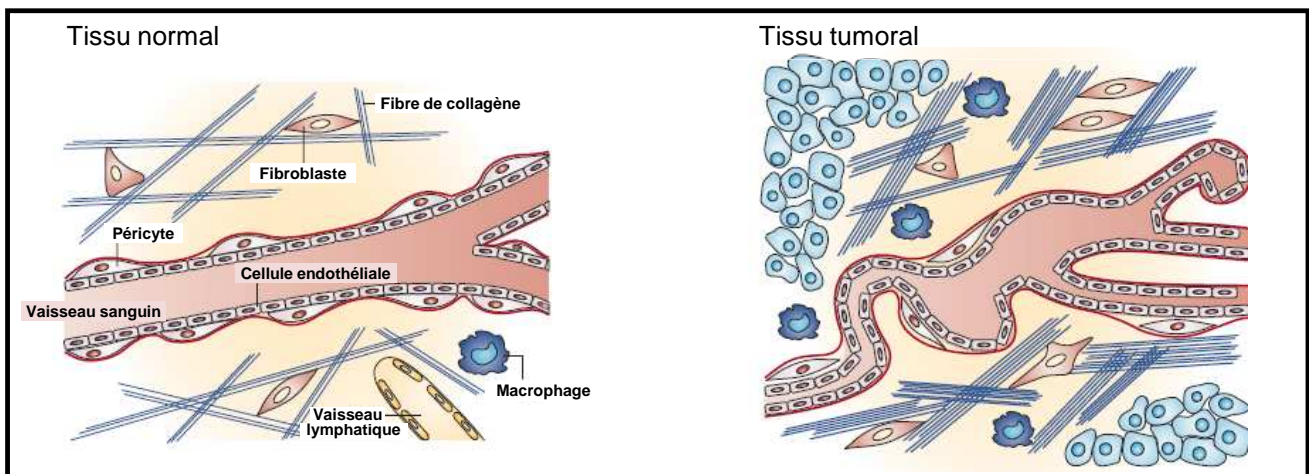


Figure 11. Différences structurales entre les tissus normaux et tumoraux affectant la pression interstitielle des fluides .

Le tissu normal contient des vaisseaux sanguins linéaires constitués d'une couche de cellules endothéliales et de péricytes maintenant leur intégrité. La matrice extracellulaire est composée d'un réseau lâche de collagène et de fibres, et contient quelques fibroblastes et quelques macrophages. Des vaisseaux lymphatiques sont également présents dans le tissu normal. Dans le tissu tumoral, les vaisseaux sanguins sont anormaux (perméables, irréguliers, recouverts par peu de péricytes, ...). Le flux sanguin est inefficace. La majorité des tumeurs ne présentent pas de vaisseaux lymphatiques. La matrice extracellulaire est constituée d'un réseau dense et épais de fibres de collagène. Ainsi, le tissu tumoral est plus rigide que le tissu conjonctif lâche normal. De plus, les tumeurs contiennent plus de fibroblastes, qui lient les fibres de collagène de manière intégrine-dépendante et exercent ainsi une augmentation des tensions entre les fibres. Le nombre de macrophages et de cellules inflammatoires est également augmenté ; ces cellules produisent des cytokines et des facteurs de croissance qui agissent sur les cellules endothéliales et les fibroblastes et augmentent alors la pression interstitielle des fluides.

D'après Heldin et coll., 2004.

L'espace interstitiel correspond à environ 60 % du volume du corps. Il permet les échanges en oxygène, en nutriments et l'élimination des déchets entre le système vasculaire et les cellules, par mise en jeu du flux transcapillaire. Ce flux, qui joue un rôle crucial pour l'homéostasie des tissus, est déterminé par la pression hydrostatique et la pression osmotique des capillaires et de l'interstitium, ainsi que par la conductivité hydraulique et le coefficient de réflexion des protéines dans le plasma. Les pressions transcapillaires résultantes sont légèrement négatives dans les tissus sains, conduisant à un flux transcapillaire sortant (Figure 10). A l'inverse dans les tumeurs, les pressions interstitielles osmotique et hydrostatique sont souvent augmentées, comme cela a été montré dans les carcinomes mammaires (Less et coll., 1992), les mélanomes métastatiques (Curti et coll., 1993 ; Boucher et coll., 1991), les carcinomes de la tête et du cou (Gutmann et coll., 1992) et les carcinomes colo-rectaux (Less et coll., 1992). Ainsi, la majorité des tumeurs présentent une augmentation de la pression interstitielle (ou IFP pour Interstitial Fluid Pressure), qui constitue une barrière au transport transcapillaire, donc un obstacle pour le traitement des tumeurs dû à une absorption inefficace des molécules thérapeutiques. L'IFP varie au sein de la tumeur : il est uniforme et élevé au centre de la tumeur et diminue très rapidement en périphérie.

Les mécanismes qui favorisent l'augmentation de l'IFP dans les tumeurs ne sont pas totalement compris, ils font intervenir la perméabilité accrue des vaisseaux tumoraux, l'anormalité des vaisseaux lymphatiques, la fibrose interstitielle et la contraction de l'espace interstitiel médiée par les fibroblastes du stroma (Figure 11). L'hypoxie ne semble pas contribuer à une augmentation de l'IFP dans les tumeurs (Boucher et coll., 1995). L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux augmente le flux sortant de protéines et des petites molécules, et augmente ainsi la pression osmotique interstitielle. D'autre part, la croissance rapide des cellules tumorales peut comprimer les vaisseaux et réduire le flux sanguin (Griffon-Etienne et coll., 1999 ; Padera et coll., 2004).

Les drogues utilisées pour la thérapie anti-tumorale, généralement de haut poids moléculaire, sont transportées par convection des vaisseaux vers l'espace interstitiel, alors que les molécules de faible poids moléculaire, comme l'oxygène ou le glucose, sont transportées par simple diffusion. L'augmentation de l'IFP dans les tumeurs diminuant le transport transcapillaire, les cellules tumorales sont alors exposées à des concentrations effectives en agents anti-tumoraux plus faibles que les cellules saines, diminuant ainsi l'efficacité de la thérapie.

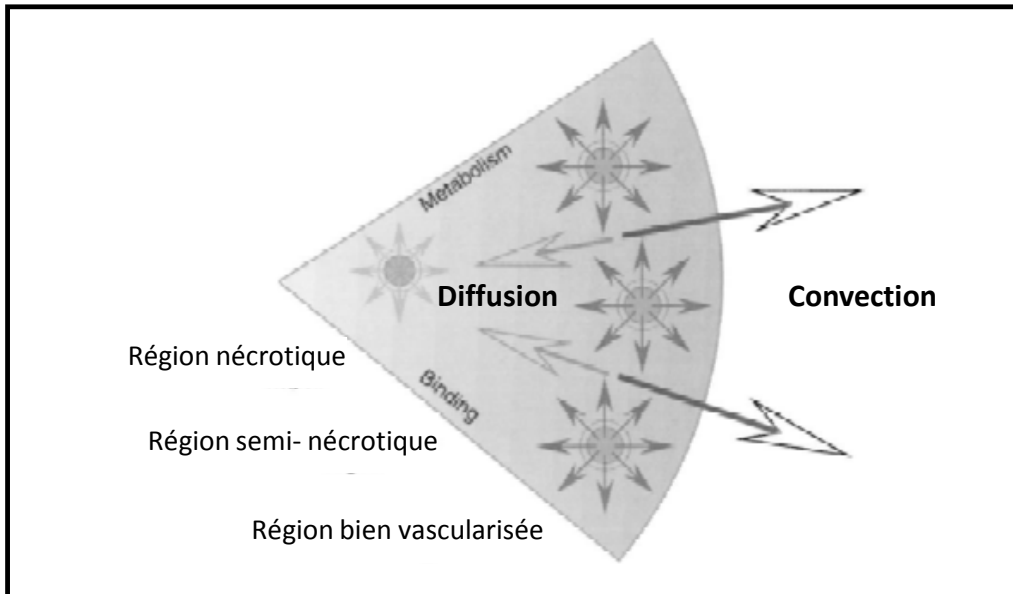


Figure 12. Les barrières physiologiques rencontrées par les molécules avant d'accéder aux cellules tumorales au sein d'une tumeur solide.

La perfusion des tumeurs est hétérogène, avec une région bien vascularisée en périphérie, une région semi-nécrotique intermédiaire et une région nécrotique centrale. La faible pression interstitielle en périphérie de la tumeur permet l'extravasation des fluides et des macromolécules. Ces macromolécules diffusent lentement jusqu'au centre la tumeur et passent dans le tissu normal environnant par convection.

D'après Jain, 1998.

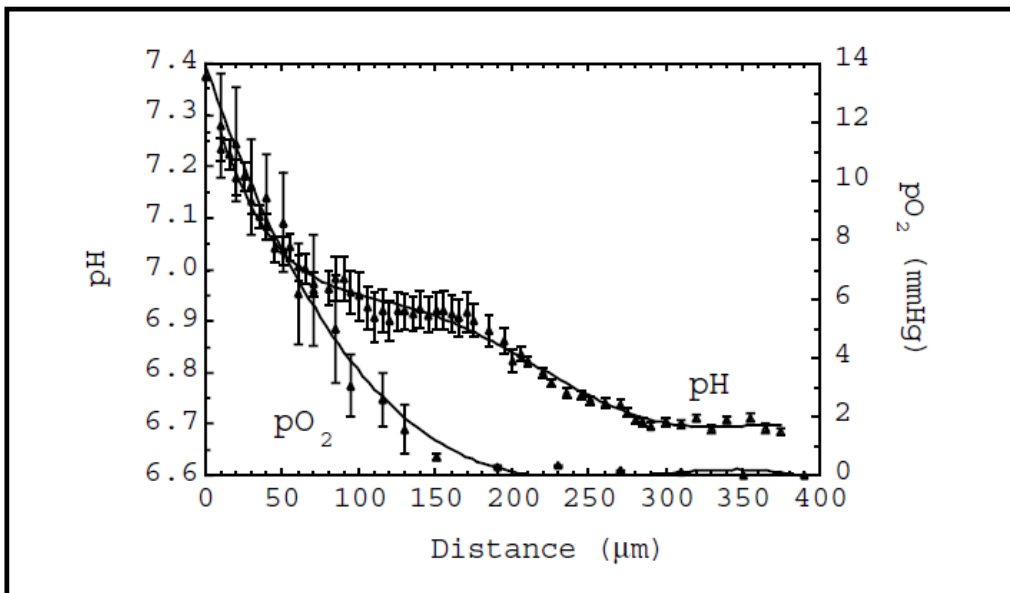


Figure 13. Gradients spatiaux de métabolites dans les tumeurs .

Les gradients de pH sont déterminés en utilisant un ratio de fluorescence mesuré par microscopie. Les gradients de pO₂ sont mesurés par quenching de phosphorescence. L'axe des abscisses correspond à la distance par rapport à la paroi du vaisseau.

D'après Jain, 1999.

Différentes études indiquent qu'une forte IFP dans les tumeurs est corrélée à un mauvais pronostic. Dans une étude portant sur des patients porteurs d'un mélanome ou d'un lymphome, chez les patients répondant à la chimiothérapie, l'IFP de la tumeur diminue progressivement alors qu'elle augmente pour les patients non répondeurs (Curti et coll., 1993).

D'autre part, le système vasculaire tumoral est très hétérogène en termes de densité, de longueur et de diamètre des vaisseaux, et la répartition des vaisseaux dépend de la localisation dans la tumeur et de la taille de celle-ci. Quatre régions tumorales sont identifiées en fonction de leur vascularisation (Figure 12) :

- la région avasculaire nécrotique,
- la région semi-nécrotique caractérisée par la présence de capillaires,
- la région ayant une microvasculature stabilisée,
- et le front de la tumeur.

Ainsi, les cellules tumorales ne recevront pas la même dose d'agent thérapeutique en fonction de leur localisation au sein de la tumeur. La distance entre les capillaires va alors dépendre du statut de la vascularisation, lui-même dépendant de la taille de la tumeur (Endrich et coll., 1979). Par exemple, la distance intercapillaire est de 49 μm dans les régions bien vascularisées d'un adénocarcinome mammaire (Less et coll., 1991) et de 304 μm dans des carcinomes du col de l'utérus de stade IIb et III (Awwad et coll., 1986).

Enfin, l'hétérogénéité temporelle et spatiale des flux sanguins (flux sanguin faible au centre de la tumeur, et comparable à celui des tissus environnants en périphérie (Endrich et coll., 1979 ; Beaney et coll., 1984)) compromet le microenvironnement métabolique des tumeurs. Le pH et la pression partielle en oxygène ($p\text{O}_2$) diminuent à distance des vaisseaux, conduisant à une acidification et à l'hypoxie de certaines régions tumorales (Figure 13). Les faibles pH et $p\text{O}_2$ sont délétères pour la réponse à certaines thérapies comme la radiothérapie, mais elles peuvent également améliorer l'effet de certaines drogues (Jain, 1999).

En conclusion, l'angiogenèse et le microenvironnement tumoral apparaissent comme des éléments cruciaux de la tumorigenèse, permettant à la tumeur à la fois de se développer au-delà d'une certaine taille, mais également d'émettre des métastases qui vont coloniser d'autres

tissus. Une approche intéressante serait donc de cibler le microenvironnement tumoral et plus particulièrement les cellules endothéliales *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ plutôt que de cibler les cellules tumorales elles-mêmes. D'autre part, la structure anormale des vaisseaux (sanguins et lymphatiques) ainsi que les interactions entre les différents éléments du stroma tumoral modifient des paramètres physico-chimiques de la tumeur (flux sanguin, pressions, taille des fenestrations,...) qui pourront altérer l'efficacité des thérapies administrées.

Chapitre II : Prise en charge diagnostique et thérapeutique des cancers

A l'heure actuelle, la cancérologie est face à un double enjeu : le diagnostic précoce des tumeurs et le développement de nouvelles thérapies ciblées. D'un point de vue diagnostique, le développement d'outils permettant la détection des étapes précoces des cancers favorisera leur repérage à des stades où les différents traitements (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie) à la disposition des cliniciens offrent une plus grande efficacité et de meilleures chances de guérison. D'un point de vue du traitement des tumeurs, la mise au point d'agents anti-tumoraux ciblés, agissant spécifiquement sur les mécanismes de la cancérogenèse, permettra d'en améliorer l'efficacité thérapeutique ainsi que la tolérance.

1. Les méthodes de diagnostic et les traitements actuels

1.1. Le diagnostic des cancers

La détection précoce des cancers est primordiale pour permettre une thérapie efficace. En effet, aux stades précoces le nombre de cellules tumorales à éradiquer est relativement faible et ces cellules ne possèdent pas toutes les anomalies génétiques qui leur permettront de s'adapter et de résister aux traitements.

A l'heure actuelle, le diagnostic des cancers repose sur des techniques d'imagerie traditionnelles et sur la détection de marqueurs tumoraux circulants. Ces derniers, sécrétés en grande quantité par les cellules tumorales, ne présentent pas de spécificité absolue, mais permettent de suspecter la présence d'un cancer.

Les techniques d'imagerie utilisées, la radiographie (rayons X), l'échographie (ultra-sons), l'IRM (résonance magnétique), les techniques nucléaires (radioactivité) et l'endoscopie sont des méthodes adaptées et performantes pour la détection de tumeurs de quelques millimètres. Elles sont particulièrement utiles pour la prévention du cancer du sein, du poumon et du colon. Ces différentes techniques d'imagerie médicale ont fait d'énormes progrès au cours des trente dernières années. Par exemple, le CT-scan (ou tomodensitométrie) utilisant les rayons X, permet d'obtenir des images précises d'un organe, en réalisant des coupes transversales du corps humain. Le PET Scan (Positron Emission Tomography), basé sur la

détection de radionucléides émetteurs de positrons, permet la localisation des tumeurs avec une grande précision (forme et contours exacts).

La plupart de ces techniques d'imagerie utilise des agents de contraste pour obtenir un meilleur contraste et une meilleure sélectivité par rapport à un processus donné. Ainsi, le traceur le plus utilisé en PET est le ^{18}F -FDG (^{18}F -fluoro-desoxy-glucose). Cet analogue de glucose s'accumule spécifiquement au niveau des zones à forte activité métabolique, tels les tumeurs, les métastases et le cerveau, et permet la détection des micro-métastases invisibles sur les clichés radiographiques. Cependant, cette technique présente certaines contraintes comme la courte demi-vie du ^{18}F (110 minutes), qui implique une utilisation rapide du traceur après fabrication. De plus, le PET Scan ne permet pas la visualisation de tumeurs dans les organes à fort métabolisme, tel le cerveau, ou dans les organes d'élimination du traceur.

Les produits de contraste les plus souvent utilisés en IRM sont des chélates de Gadolinium. Ils permettent d'améliorer le contraste et de rendre ainsi les lésions plus apparentes. Ils peuvent aussi être utilisés pour permettre une meilleure visualisation des vaisseaux. La quantité d'agent de contraste et la synchronisation de l'injection avec l'acquisition des images sont critiques pour obtenir l'effet recherché. Des nanoparticules d'oxyde de fer (Endorem[®] et Resovist[®]) sont également utilisées comme agent de contraste pour l'IRM. Malgré une bonne tolérance, leur utilisation est limitée à la visualisation d'altérations hépatiques.

Ces techniques d'imagerie médicale représentent une avancée considérable pour la détection précoce des tumeurs, mais elles pourraient encore être améliorées par l'utilisation d'agents de contraste, notamment nanoparticulaires, permettant la détection de phénomènes plus spécifiques du processus tumoral.

Après localisation de la tumeur, son étude histologique sera réalisée sur la pièce d'exérèse, afin d'affirmer le diagnostic (détermination du caractère malin et du stade tumoral). L'examen histologique associé à l'imagerie permet le diagnostic d'extension et la réalisation du bilan pré-thérapeutique précédant le choix du protocole thérapeutique le plus adapté.

La recherche de marqueurs génétiques, analysant les gènes défectueux ou délétés (cancers « héréditaires »), peut également être réalisée. L'analyse du statut mutationnel de certains gènes peut être réalisée afin de prédire la réponse ou non à certaines thérapies ciblées, par exemple la réponse aux TKIs anti-EGFR et les mutations de l'*EGFR* (Carlson et coll., 2009 ; Linardou et coll., 2009) dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules ou la

réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR et les mutations de *KRAS* (Soulieres et coll., 2010) dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques.

Ces différentes techniques permettent aux cliniciens de diagnostiquer et de surveiller une tumeur, mais dans la majorité des cas elles ne sont réalisées qu'à un stade avancé de la maladie : de nombreux cas de cancers ne sont pas décelés avant l'apparition des métastases. L'amélioration du diagnostic des cancers viendra du développement de sondes capables de détecter les stades précoces de la progression tumorale et de visualiser les micro-métastases.

1.2. Principales options thérapeutiques

Une fois le cancer diagnostiqué, différentes options thérapeutiques sont à la disposition des cliniciens. Malgré les récents progrès réalisés pour les autres moyens de traitements, la chirurgie demeure la thérapeutique pivot du traitement de la majorité des tumeurs (en dehors des cancers immuno-hématologiques). L'exérèse de la tumeur primaire est efficace pour les petits foyers tumoraux sans métastases. Cependant, elle reste problématique car l'élimination de l'intégralité des cellules tumorales et la prévention de la dissémination lors de l'opération chirurgicale peuvent être difficiles. Toujours pour les traitements locaux, la radiothérapie, basée sur l'utilisation de rayonnements ionisants (X, alpha, beta ou gamma) est également utilisée pour le traitement anti-tumoral, mais pose le problème de la toxicité des rayonnements ionisants sur les tissus sains environnants. Le fractionnement des doses et une meilleure connaissance de la répartition de dose entre le tissu cible et les tissus sains avoisinants permettent de limiter ces effets secondaires. L'utilisation de nanoparticules radio-sensibilisantes pourrait également limiter cette toxicité, en réduisant les doses administrées. Un peu à part, l'hormonothérapie est prescrite dans le cas de cancers hormono-sensibles, afin de réduire le taux d'hormones circulantes. Enfin, les chimiothérapies agissent sur toutes les cellules qui prolifèrent. Elles sont très efficaces, mais ne sont pas sélectives des cellules tumorales et sont à l'origine de nombreux effets secondaires (toxicité hématologique, cardiaque, gonadique, digestive, alopecie). De nouvelles formulations ont été développées pour certaines molécules. Ainsi, la forme liposomale PEGylée de la doxorubicine (Caelyx[®]) réduit les effets secondaires, notamment cardiaques, de cette molécule, en diminuant sa vitesse de dégradation, en augmentant sa demi-vie plasmatique et en la concentrant au niveau de la tumeur (Allen et coll., 2006). L'Abraxane (nanoparticule d'albumine) améliore

également l'activité du paclitaxel, tout en limitant ses effets sur les tissus sains (Hawkins et coll., 2008).

1.3. Orientations futures pour la détection et le traitement des cancers

Aujourd'hui encore, la majorité des cancers sont diagnostiqués à un stade avancé et sont incurables, d'où la nécessité de développer de nouvelles techniques de plus en plus précises pour détecter les cancers le plus précocement possible. Les recherches actuelles s'orientent vers l'imagerie moléculaire avec le développement de sondes capables de détecter les stades précoces de la progression tumorale et de visualiser les métastases de taille inférieure au millimètre. Ces sondes reconnaissent des processus biologiques spécifiques des cancers et permettent de les imager au moyen de techniques d'imagerie médicale de plus en plus performantes (cf chapitre IV : *Du développement préclinique aux applications cliniques : intérêt de l'imagerie optique de fluorescence*).

En ce qui concerne les traitements, la chimiothérapie, malgré ses nombreux effets secondaires, apparaît comme la seule thérapie pour le traitement des tumeurs métastatiques, mais ne permet que rarement la guérison des patients. Dans ce cadre, les recherches s'orientent vers le développement de molécules ciblant spécifiquement des anomalies des cellules tumorales pour limiter leur croissance et les détruire, ainsi que pour limiter la toxicité des traitements.

A l'heure actuelle, l'oncologie a donc une forte demande en méthodes de détection plus précoces et en thérapies plus efficaces et moins toxiques. Des stratégies ciblées, autant diagnostiques que thérapeutiques, sont donc en cours de développement.

2. Les thérapies ciblées

Les nombreux progrès réalisés au cours des vingt dernières années dans les domaines de la biologie moléculaire, cellulaire et de la génomique ont contribué à la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la progression tumorale. Ces progrès se sont traduits par le développement de nouvelles molécules ciblant des anomalies spécifiques des cellules tumorales.

Différentes approches ciblées ont été développées afin de bloquer les mécanismes impliqués dans le développement et la progression tumorale. Les cibles sont intra-cellulaires (kinases,

Anticorps	Cible	Type	Expression	Indication principale
Rituximab (Mabthera®)	CD20	Chimérique	Lymphocytes B	Lymphome non-hodgkinien Lymphome folliculaire
Yttrium-90 Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin®)				
Trastuzumab (Herceptin®)	HER2	Humanisé	Différents tissus, notamment le myocarde	Cancer du sein
Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®)	CD33	Humanisé	Cellules immatures de la lignée myéloïde	Leucémie myéloïde aiguë
Alemtuzumab (MabCampath®)	CD52	Humanisé	Lymphocytes B et T	Leucémie lymphatique chronique
Cetuximab (Erbix®)	EGFR	Chimérique		
Panitumumab (Vectibix®)	EGFR	Humanisé	Différents tissus, notamment la peau	Cancer du colon Tumeurs ORL
Bevacizumab (Avastin®)	VEGF	Humanisé	Cellules endothéliales	Cancer du colon Hypernéphrome (carcinome du rein) Cancer du sein Carcinome bronchique non à petites cellules

Tableau II. Anticorps utilisés en oncologie.

transférases, gènes) et extra-cellulaires (récepteurs aux facteurs de croissance, antigènes à la surface des cellules tumorales, facteurs de croissance du milieu extra-cellulaire tumoral). Les plus grands succès de ces thérapies ciblées ont été obtenus avec les anticorps monoclonaux.

2.1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux possèdent des mécanismes d'action uniques en leur genre : d'une part, ils bloquent ou activent la transduction de signaux ; d'autre part, ils dirigent le système immunitaire adaptatif contre certaines cellules cibles, comme par exemple les cellules tumorales. Ces anticorps peuvent par exemple bloquer un facteur de croissance, comme ceci est le cas du bevacizumab (Avastin[®]) (Mukherji, 2010) qui bloque le VEGF. Ils peuvent également bloquer des récepteurs aux facteurs de croissance, l'EGFR pour le cetuximab (Erbix[®]) (Rosell et coll., 2008) et le panitumumab (Vectibix[®]) (Wu et coll., 2008) ou HER2 pour le trastuzumab (Herceptin[®]). Le rituxumab (Mabthéra[®]) (Grillo-Lopez et coll., 2002) et l'alemtuzumab (Mabcampathcetuximab[®]) (Cheson, 2010), respectivement dirigé contre les antigènes CD20 et CD52, sont utilisés pour les traitements des lymphomes et des leucémies (Tableau II).

Par leur propriété de reconnaissance de structures spécifiques des cellules tumorales, ils peuvent être utilisés comme agents de ciblage et être couplés à des toxines, à des isotopes radioactifs, à des molécules de chimiothérapie, à des cytokines ou à des nanoparticules. Les anticorps permettent de concentrer de manière spécifique les agents thérapeutiques au niveau tumoral diminuant ainsi leur toxicité (Schrama et coll., 2006).

Par exemple, le Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg[®]) (antibiotique anti-tumoral couplé à un anticorps humanisé) après liaison avec le récepteur (CD33) et endocytose, libère la drogue active dans les cellules tumorales. Ce système est efficace dans certaines leucémies, avec une toxicité acceptable (Stasi, 2008). Le couplage de l'anticorps avec un élément radioactif permet une irradiation ciblée de plusieurs couches de cellules au sein de la tumeur. Les émetteurs β qui ont un rayon d'action de 1 à 7 mm sont principalement utilisés. L'efficacité de la radio-immunothérapie (Bexxar[®] et Zevalin[®]) a été montrée pour les lymphomes récidivants et résistants à la chimiothérapie (Sharkey et coll., 2005). Cependant, malgré cette efficacité, ces composés présentent une toxicité hématologique liée à la présence du radio-isotope (⁹⁰Yttrium).

Les anticorps peuvent également être greffés à la surface de nanoparticules pour permettre leur ciblage. De manière générale, l'accumulation tumorale des liposomes PEGylés ciblés avec un anticorps est comparable à celle des liposomes non ciblés (Torchilin, 2008). Cependant le ciblage des liposomes améliore l'efficacité thérapeutique *via* une meilleure internalisation dans les cellules tumorales, ce qui permet d'obtenir des concentrations intracellulaires en drogues plus importantes, comme cela a été montré avec des liposomes ciblant HER2 (Kirpotin et coll., 2006).

Au cours des dernières années, les anticorps monoclonaux ont fait la preuve de leur tolérance et leur efficacité pour le traitement de différents cancers, et ont émergé comme une nouvelle classe d'agents thérapeutiques. Ils présentent une activité anti-tumorale propre et leur capacité à reconnaître des cibles tumorales permet également d'améliorer la sélectivité de divers agents anti-tumoraux. Toutefois, ils présentent certaines limitations, telles leur immunogénicité et leur faible pénétration dans les tumeurs solides. Le problème de l'immunogénicité des anticorps monoclonaux murins et chimériques a été rapidement résolu avec les progrès de l'ingénierie des anticorps qui ont permis la génération d'anticorps humanisés ou totalement humains (Holliger et Hudson, 2005 ; Sidhu et Fellouse, 2006). D'autre part, leur grande taille réduit leur pénétration intra-cellulaire et leur diffusion intratumorale (Jain, 1990). En effet, pour agir, ils doivent franchir un certain nombre de barrières, comme l'endothélium vasculaire, le stroma, les barrières épithéliales et la forte pression interstitielle (Stohrer et coll., 2000). De plus, les tumeurs sont hétérogènes et il est difficile de les cibler entièrement. Ainsi, le développement d'anticorps monoclonaux de petite taille permet une meilleure pénétration dans les tumeurs, qui est contre-balançée par une élimination plus rapide (Schrama et coll., 2006).

2.2. Les petites molécules

Par ailleurs, plusieurs petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase de récepteurs surexprimés dans certains cancers ont été validées. L'erlotinib (Tarceva[®]) et le gefitinib (Iressa[®]) inhibent l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'EGF. L'imatinib (Glivec[®]) quant à lui inhibe l'activité tyrosine kinase abl. D'autres composés capables d'inhiber l'angiogenèse tumorale ont été validés ou sont en cours d'études cliniques, telles les petites molécules de synthèse (sorafenib (Nexavar[®]), sunitinib (Sutent[®]), vatalanib), un peptide (cilengitide), des

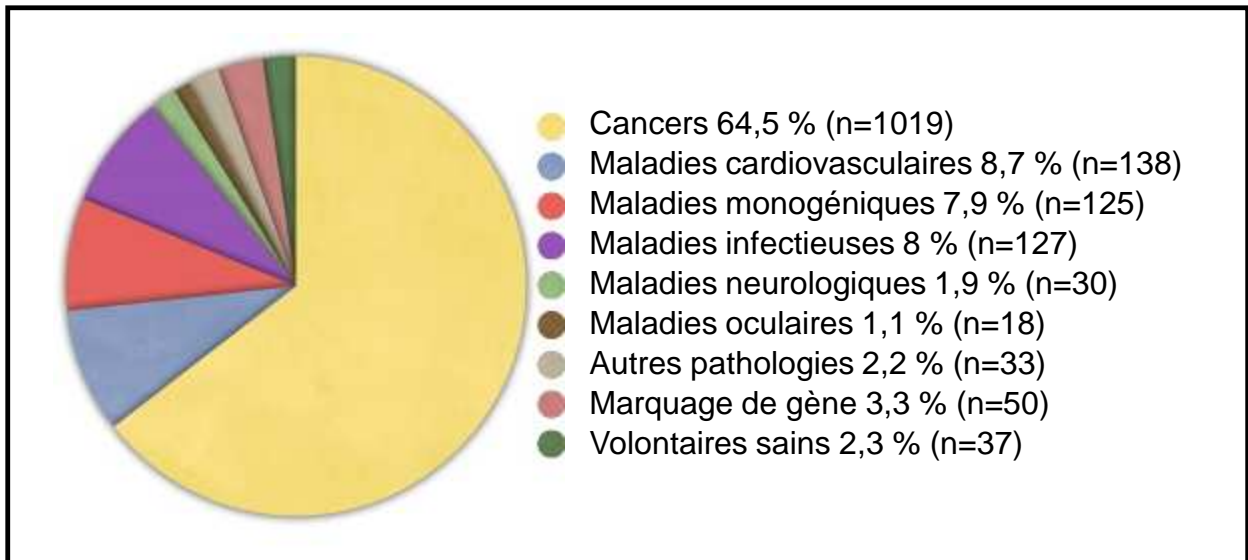


Figure 14. Répartition des essais cliniques de thérapie génique par pathologies en 2008.
D'après www.wiley.co.uk/genmed/clinical (20/06/2010).

protéines recombinantes (Endostatine et Angiostatine) et un ribozyme (Angiozyme) (Lippert, 2007). D'autres molécules inhibitrices de l'activité kinase ou transférase spécifiquement impliquées dans le cycle cellulaire et la transduction du signal sont en cours de développement (Hinnen et Eskens, 2007).

Ainsi, les molécules actuellement validées en oncologie sont majoritairement des molécules agissant sur des cibles extra-cellulaires ou sur des cibles intra-cellulaires, après diffusion à travers la membrane cellulaire. Ces molécules ont une action directe sur les anomalies des cellules tumorales et induisent leur mort cellulaire ou limitent leur croissance. Cependant, du fait de leur petite taille, ces molécules diffusent dans l'ensemble de l'organisme, pouvant alors engendrer une toxicité sur les tissus sains.

2.3. Vectorisation de biomolécules

Une autre stratégie envisagée est la vectorisation de macromolécules (ADN, siRNA, peptides, ...). Les stratégies ciblant directement les anomalies géniques des cellules tumorales font l'objet de nombreuses recherches, mais posent le problème de l'absence de vecteurs permettant une transfection efficace (Edelstein et coll., 2004). C'est pourquoi des systèmes associant les macromolécules d'intérêt, des éléments effecteurs et des agents de ciblage sont en cours de développement.

2.3.1. Thérapie génique en cancérologie

Parallèlement aux thérapies conventionnelles, qui traitent les symptômes de la maladie, le concept de thérapie génique, imaginé il y a une trentaine d'années, consiste à traiter la base de l'anomalie génétique en utilisant le gène comme agent thérapeutique.

D'abord développée pour le traitement des maladies héréditaires, la thérapie génique a rapidement montré un grand intérêt pour le traitement des cancers. Ainsi, depuis le premier essai clinique, 10 % des essais se sont focalisés sur des affections diverses comme les infections, 20 % sur le traitement des maladies héréditaires classiques, et presque 70 % sur le traitement du cancer (Edelstein et coll., 2004) (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>) (Figure 14).

La compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogenèse montre qu'il est illusoire de vouloir corriger les défauts génétiques d'une cellule cancéreuse. Le consensus actuel

s'oriente donc vers l'utilisation de gènes capables de tuer la cellule tumorale transfectée (et si possible les cellules voisines) et/ou de stimuler une réaction du système immunitaire contre la tumeur. L'inhibition de l'expression d'un gène peut également être envisagée par l'utilisation de différents types d'outils, comme les oligonucléotides antisens ADN (AS-ODN) ou ARN (ARN antisens), les ribozymes, l'interférence ARN (siRNA, miRNA, shRNA) (Pelletier et coll., 2006). A ce jour, les siRNA sont les plus utilisés pour éteindre un gène, ou plutôt son ARNm.

Enfin, contrairement aux pathologies génétiques comme la mucoviscidose, la thérapie génique anti-tumorale ne nécessite pas obligatoirement une correction à long terme des cellules (Anson et coll., 2006). Des essais ont démontré une efficacité anti-tumorale suite, par exemple, à l'apport d'un plasmide codant pour le gène suppresseur de tumeur p53 (Coll et coll., 1999 ; Xu et coll., 2001 ; Brignole et coll., 2005) ou par inhibition de certains oncogènes (Santel et coll., 2006 ; Zimmermann et coll., 2006), ou encore en prévenant l'expression de facteurs stimulant l'angiogenèse (Kommareddy et Amiji, 2007).

Malgré quelques réussites, dans la majorité des cas, la thérapie génique reste un échec. En effet, son succès repose en grande partie sur l'efficacité du transfert du gène médicament (transgène) vers son site d'action. Pour cela, il doit traverser efficacement et sans dégradation les nombreuses barrières biologiques jusqu'au noyau, afin de s'insérer en lieu et place du gène défaillant. Cependant, quelle que soit la voie d'administration (locale ou intra-veineuse), le gène seul franchit difficilement les obstacles physiologiques rencontrés avant d'atteindre sa cible. En effet, les acides nucléiques sont des molécules polyanioniques hydrophiles de grande taille qui ne sont pas aptes à traverser les membranes plasmiques des cellules constituées d'une bicouche lipidique, hydrophobe et chargée négativement (Felgner et coll., 1994). Ainsi, le gène doit être associé à un système de vectorisation capable de le protéger des agressions du milieu biologique (en particulier des nucléases) et de le véhiculer au travers des différentes barrières physiologiques vers son site d'action. Enfin, le complexe vecteur/gène doit adhérer aux cellules, y pénétrer et délivrer le gène dans le noyau, tout en ciblant préférentiellement les cellules tumorales et non les cellules saines. Le vecteur est donc indispensable au succès d'une thérapie génique.

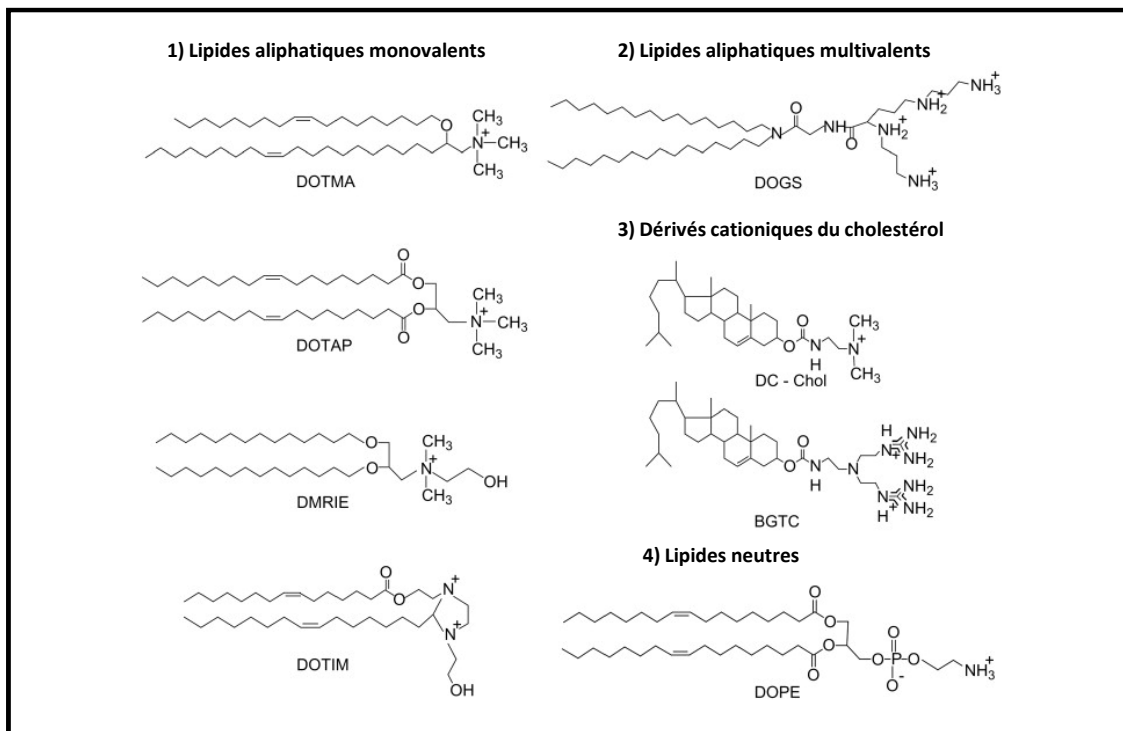


Figure 15. Structure des différents lipides utilisés pour la thérapie génique.

DOTMA: N[1-(2,3dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, **DOTAP:** 1,2-dioleyl-3-trimethylammonium-propane, **DMRIE:** N-(2hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy-1-propanium bromide), **DOTIM:** 1-[2-(oleoyloxy)ethyl]-2oleyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolinium chloride, **DOGS:** dioctadecylamidoglycylspermine, **DC-Chol:** [N-(N0,N0dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol, **BGTC:** bis-guanidium-tren-cholesterol, **DOPE:** 1,2-dioleyl-snglycerol-3-phosphoethanolamine.

D'après Morille et coll., 2008.

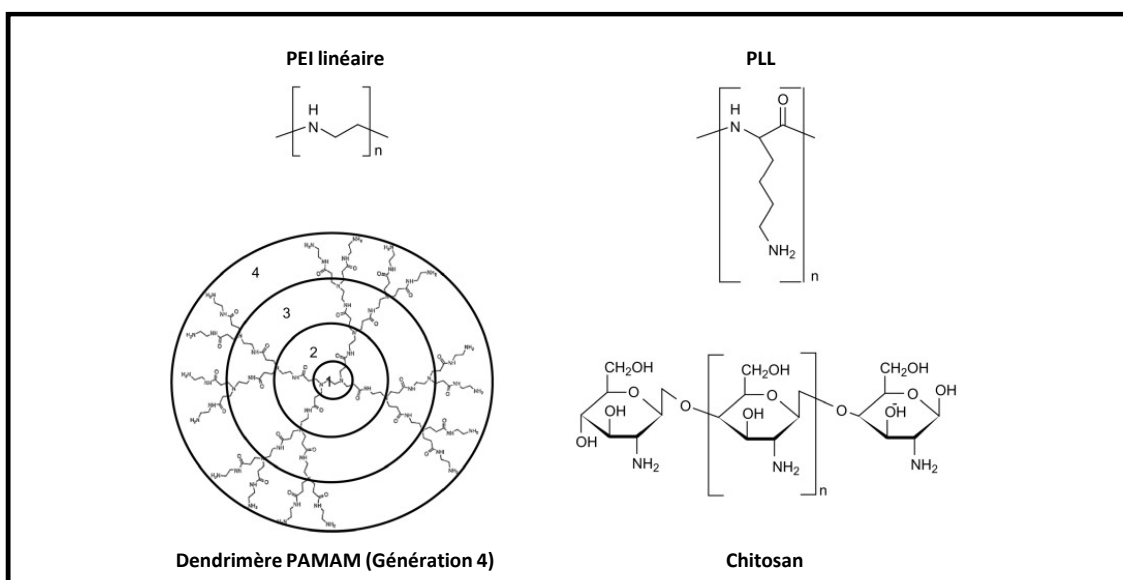


Figure 16. Structure des différents polymères cationiques utilisés pour la thérapie génique.

PEI : Poly(éthylène imine) ; PLL : poly(L-lysine) ; PAMAM : poly(amidoamine).

D'après Morille et coll., 2008.

2.3.2. Les vecteurs développés

La faible perméabilité de la membrane des cellules eucaryotes pour les médicaments et l'ADN, et la faible efficacité de l'ADN et des siRNA à atteindre leurs cibles cellulaires, constituent les deux obstacles majeurs pour le développement de thérapies ciblées utilisant des macromolécules. Ainsi, au cours des dix dernières années, d'importants progrès ont été réalisés dans la conception de nouvelles technologies capables d'améliorer l'internalisation cellulaire de composés thérapeutiques (Järver et Langel, 2004 ; Torchilin, 2005 ; Kong et Mooney, 2007). Cette évolution a été directement liée à l'accélération spectaculaire de la production de nouvelles molécules thérapeutiques.

Pour être efficaces et utilisables en clinique, les vecteurs doivent répondre à un certain nombre de règles :

- Etre biodégradable et biocompatible,
- Ne pas présenter de toxicité ou être immunogène,
- Maintenir l'activité biologique du cargo et la spécificité pour sa cible,
- Permettre une libération efficace des cargos dans différentes lignées cellulaires,
- Permettre une libération rapide des endosomes,
- Etre facilement utilisable pour des applications thérapeutiques.

Un certain nombre de stratégies non-virales ont été développées : des systèmes synthétiques (lipides ou polymères cationiques), des systèmes nanoparticulaires et des systèmes peptidiques (Ogris et Wagner, 2002 ; Järver et Langel, 2004 ; Torchilin, 2005). Mais seul un petit nombre de ces stratégies sont efficaces pour des applications *in vivo*. Leurs limitations principales sont la faible stabilité des complexes et la dégradation rapide du cargo, ainsi que leur faible capacité à atteindre leur cible cellulaire.

2.3.2.1. Les vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques sont basés sur le principe de la complexation de l'ADN, chargé négativement, par des molécules cationiques. Ils sont classés en deux grandes familles : les systèmes lipidiques et les systèmes polymériques, nommés respectivement lipoplexes et polyplexes. Un grand nombre de molécules a été développé, comme le DOTMA (lipofectamine[®]), le DOTAP ou le DOPE pour les lipides (Figure 15), et le PEI, le chitosan ou les dendrimères pour les polymères (Figure 16). Parmi les polymères cationiques, le PEI est

largement étudié. Il permet de condenser de grandes molécules d'ADN sous forme de complexes d'environ 100 nm qui pénètrent dans les cellules principalement par endocytose non spécifique. Le PEI présente aussi la particularité de pouvoir sortir des endosomes, ce qui lui confère une forte efficacité de transfection. Après injection intra-veineuse, les complexes ADN/PEI présentent un tropisme très marqué pour les poumons mais transfectent très mal les tumeurs (Coll et coll., 1999). De plus, ils possèdent une certaine toxicité en interagissant avec les protéines sériques (Ogris et coll., 1999) et ils peuvent provoquer une agrégation plaquettaire (Chollet et coll., 2002).

Ces différents vecteurs cationiques permettent de compacter l'ADN dans des particules globalement positives qui présentent une bonne capacité de transfection *in vitro*, par les biais d'interactions électrostatiques. Cependant, cette charge positive présente un inconvénient pour leur application *in vivo*. En effet, une particule chargée positivement est plus facilement reconnue par les cellules du système immunitaire après adsorption des protéines sériques à sa surface, aboutissant à la déstabilisation et/ou à l'élimination du vecteur. De ce fait, une dissimulation de la charge de surface des vecteurs est essentielle pour envisager une injection par voie systémique.

Ainsi, malgré une synthèse relativement facile permettant de créer des systèmes modulables, adaptables à chaque type de thérapie, de voie d'administration et de cible visée, le transfert optimal de gène par ce type de vecteurs est tributaire de nombreux obstacles. Ces vecteurs synthétiques ne représentent qu'environ 8 % des vecteurs utilisés pour les essais cliniques de thérapie génique. A ce jour, de nouvelles stratégies pour vectoriser les acides nucléiques sont donc attendues.

2.3.2.2. Les vecteurs peptidiques

Les CPPs (Cell Penetrating Peptide) constituent un outil prometteur pour la libération de molécules biologiquement actives dans les cellules et pourraient donc jouer un rôle dans le traitement futur de certaines maladies (Järver et Langel, 2004). Les CPPs sont généralement des peptides de moins de 30 acides aminés, dérivant de protéines naturelles ou non, ou de séquences chimériques. Ils ont été découverts dans les années 1980 sur l'observation que certaines protéines (homéodomaine d'Antennapedia, protéine Tat du VIH et la protéine de structure VP-22 du virus Herpes simplex1) étaient capables de traverser les membranes des cellules eucaryotes. Les CPPs sont aussi capables d'améliorer la libération intra-cellulaire, *in vitro* et *in vivo*, de biomolécules aussi différentes que des plasmides, des oligonucléotides, des

Peptides	Origine	Séquence	Types de cargos	références
Peptides dérivant de domaines de transduction de protéines				
Tat	Protéine Tat du VIH	PGRKKRRQRRPPQ	Protéine/peptides/ siRNA/liposome/ nanoparticule	Snyder et Dowdy (2005) Schwarze et coll. (1999)
Pénétratine	Homéodomaine	RQIKIWFAQNRRMKWKK	Peptides/siRNA/ liposome	Joliot et Prochiantz (2004)
Transportan	Galanine-mastoparan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Protéines:PNA/ siRNA	Pooga et coll. (1998)
VP-22	Protéine structurale de HSV-1	DAATATRGRSAASRPTERPRAPAR- SASRPRRPVD	Protéines	Elliott et O'Hare (1997)
Peptides amphipathiques				
MPG	HIV Gp41-SV40 NLS	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRV	siRNA/ODN/ plasmide	Morris et coll. (2008)
Pep-1	Trp-rich motif-SV40 NLS	KETWWETWWTEXSQPKKRV	Protéines/peptides	Gros et coll. (2006)
MAP	Chimérique	KALAKALAKALA	Petites molécules: plasmid	
SAP	Motif riche en proline	VRLPPPVRLLPPP	Protéines/peptides	Pujals et coll. (2006)
PPTG1	Chimérique	GLFRALLRLLRSLWLLLLRA	Plasmide	Rittner et coll. (2002)
Autres CPPs : peptides cationiques				
Oligoarginie	Chimérique	8-Arg ou 9-Arg	Protéines/peptides/ siRNA/ODN	Wender et coll. (2000) Futaki et coll. (2001)
hCT (9-32)	Calcitonine humaine	LGTYTQDFNKTFFPQTAIGVGAP	Protéines/plasmide	Schmidt et coll. (1998)
SynB	protégrine	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	Doxorubicine	Rousselle et coll. (2001)
Pvec	VE-cadhérine murine	LLIILRRRIRKQAHASK	Protéines/peptides	Elimquist et coll. (2001)
Maurocalcine	Venin de scorpion	GDCLPHLKLCKENKCCSKKCKRRGTNIEK RCR	Petites molécules	Boisseau et coll. (2006)
Crotamine	Venin de Crotale	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMD CRWRWKCKCKGSG	Plasmide	Nascimento et coll. (2007)

Tableau III. Récapitulatif des CPPs.

CPP :Cell Penetrating Peptide ; NLS : Nuclear Localization Sequence ; PNA : Peptide-Nucleic Acid ; Tat : transcription-transactivating ; ODN : Oligonucléotide.
D'après Heitz et coll., 2009.

siRNA (short interfering RNA), des PNA (peptide nucleic acid), des protéines, des peptides, mais aussi des liposomes ou des nanoparticules. Les petits CPPs synthétiques ont été conçus pour déclencher le passage à travers la membrane cellulaire des cargos dans le cytoplasme et pour améliorer leur trafic intra-cellulaire, facilitant ainsi l'accès à leur cible (Järver et Langel, 2004).

Deux stratégies ont été décrites : la liaison covalente du cargo au CPP, et la formation d'un complexe non covalent entre le cargo et le CPP (Tableau III). Les CPPs covalents (Tat, VP-22, homéodomaine d'Antennapedia, séquence polyarginine, ...) permettent d'améliorer la libération de peptides et de protéines dans les cellules (Wadia et Dowdy, 2005). La conjugaison du peptide au CPP apporte divers avantages pour les applications *in vivo*, comme la rationalisation et le contrôle du CPP-cargo. Ainsi, les nombreuses études menées sur l'utilisation de Tat, donnent des résultats prometteurs pour le traitement de différents cancers (prostate, sein, mélanome et gliome) (Kim et coll., 2007), notamment avec la vectorisation de la protéine p53. Cependant, les CPPs covalents sont limités d'un point de vue chimique et peuvent altérer les propriétés biologiques des cargos. L'alternative est l'utilisation de vecteurs peptidiques amphipathiques, tels que le MPG et Pep-1 (Morris et coll., 1997 ; Simeoni et coll., 2003). Le MPG comprend deux domaines distincts : un domaine hydrophobe, dérivant de la séquence de fusion Gp41 du HIV, et un domaine hydrophile, dérivant de la séquence de localisation nucléaire SV40. Pep-1 diffère du MPG principalement par son domaine hydrophobe qui contient un cluster riche en tryptophane. Les domaines hydrophiles et hydrophobes sont nécessaires pour les interactions avec les acides aminés et les acides nucléiques, le transport intra-cellulaire du cargo et la solubilité du peptide vecteur. Pour ces deux peptides, la flexibilité entre les deux domaines est assurée par un domaine linker (WSQP) (Morris et coll., 1997 ; Simeoni et coll., 2003). Ces peptides forment des nanoparticules stables avec les cargos, sans réticulation ni modifications chimiques.

Du fait de leurs compositions respectives, le MPG est utilisé pour la vectorisation d'acides nucléiques (ADN plasmidique, oligonucléotides, siRNA), alors que Pep-1 est plus adapté pour la vectorisation de peptides et de protéines. Ils libèrent des molécules biologiques actives dans diverses lignées cellulaires *in vitro* mais sont également fonctionnels *in vivo* (Morris et coll., 2001 ; Simeoni et coll., 2003 ; Crombez et coll., 2007). Cette stratégie présente de nombreux avantages, comme une libération rapide et efficace des cargos dans les cellules, une stabilité dans des conditions physiologiques et une absence de toxicité. De plus, l'absence de lien covalent entre le CPP et le cargo favorise la libération de celui-ci et son trafic intra-

cellulaire. Ainsi, les CPPs non covalents constituent une excellente alternative aux stratégies covalentes et seront des outils essentiels pour l'utilisation thérapeutique des siARN, des protéines et de peptides. Ils constituent également de puissants outils pour la recherche fondamentale et pour le ciblage spécifique d'événements cellulaires à la fois *in vitro* et *in vivo*, ainsi que pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. De plus, leur fonctionnalisation sera d'un intérêt majeur pour un ciblage rationnel et l'application systémique de molécules thérapeutiques *in vivo* (Sugahara et coll., 2009).

3. Développement de nouvelles thérapies : « targeted drug delivery »

Au cours des dernières années, les recherches se sont orientées vers le développement de systèmes multifonctionnels combinant le ciblage tumoral et des propriétés effectrices (diagnostic et thérapie). Le ciblage peut être assuré par des molécules reconnaissant des anomalies caractéristiques des cellules tumorales (antigènes cellulaires, récepteurs membranaires) ou de son environnement (néo-vascularisation tumorale). Ces ligands permettent d'améliorer les propriétés de pharmaco-guidage des systèmes de vectorisation assurant le transport ciblé des molécules effectrices.

3.1. Ciblage tumoral passif : effet EPR

L'exploitation des anomalies anatomiques et physiopathologiques des tissus tumoraux, en particulier, la perméabilité vasculaire accrue et le faible drainage lymphatique, permet le développement de stratégies plus efficaces en terme de « drug delivery ». En effet, la structure anormale des vaisseaux engendre une fuite importante des composés plasmatiques, comme les macromolécules, les nanoparticules ou les particules lipidiques. De plus, du fait du faible retour veineux et de la faible clairance lymphatique, les macromolécules sont retenues dans la tumeur et en même temps l'extravasation dans l'interstitium tumoral continue. Ce phénomène, appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) et décrit il y a une vingtaine d'années, est mis à profit pour permettre la libération sélective de macromolécules au sein des tumeurs solides. Il est ainsi possible, en un à deux jours, d'atteindre de fortes concentrations locales en principe actif (polymères), 10 à 50 fois supérieures à celles obtenues dans les tissus sains (Matsumura et Maeda, 1986). Plus récemment, des résultats similaires ont été obtenus avec des nanoparticules polymériques, des micelles ou des liposomes

encapsulant des drogues anti-tumorales, mais également avec des anticorps. L'effet EPR est devenu un élément essentiel, pris en compte pour le développement des nouvelles thérapies anti-tumorales. Le ciblage passif nécessite l'utilisation de systèmes stables, non agrégés, furtifs et présentant un temps de circulation suffisamment long pour conduire à l'accumulation du système dans les tumeurs.

L'effet EPR est prédominant pour les composés de poids moléculaire supérieur à 40 kDa, et négligeable pour les petites molécules qui peuvent se redistribuer dans la circulation sanguine par diffusion et/ou convection. Ces petites molécules sont éliminées préférentiellement par voie rénale (Iyer et coll., 2006 pour revue).

Enfin, l'effet EPR est influencé par la taille de la tumeur, avec un meilleur effet EPR dans les tumeurs de petite taille, probablement lié à une meilleure densité de vaisseaux par rapport aux tumeurs de grande taille présentant une région avasculaire (Jang et coll., 2003).

3.2. Ciblage tumoral actif : les cibles tumorales

En plus du ciblage passif par effet EPR, un ciblage actif des tumeurs peut être réalisé par greffage d'un motif de ciblage sur les molécules d'intérêt ou sur les vecteurs, qui permettra la reconnaissance des récepteurs au niveau du tissu cible (Figure 17).

Le choix de la cible biologique doit répondre à différents critères qui sont les suivants :

- La cible doit être accessible : elle doit être exprimée à la surface des cellules et si possible être en contact avec la circulation sanguine.
- Elle doit être spécifique de la zone tumorale ou, au moins, être exprimée plus fortement au sein des tumeurs que dans les autres tissus.
- Il doit exister un ligand ou un anticorps ayant une grande sélectivité et une forte affinité pour la cible.

Les cellules tumorales expriment de nombreux récepteurs à leur surface constituant des cibles potentielles. Ainsi, l'utilisation d'anticorps ciblant par exemple, les récepteurs CD20 (lymphome de Hodgkin), CD25 (lymphome à cellules T) ou CD33 (leucémie myéloïde aigüe), a permis de délivrer des radionucléides (Zevalin[®]), des immunotoxines (Ontak[®]) et des antibiotiques anti-tumoraux (Mylotarg[®]) de manière sélective dans les cellules tumorales.

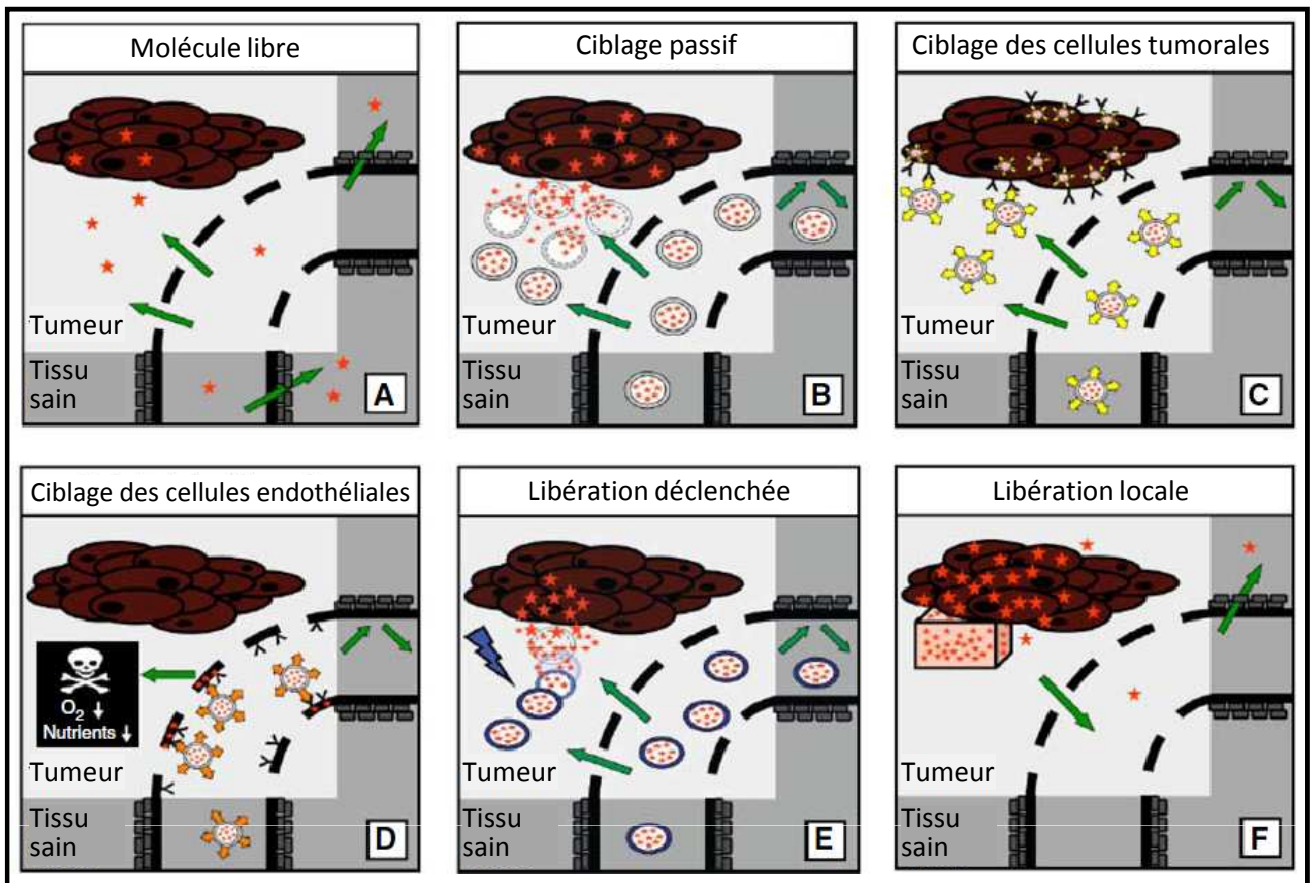


Figure 17. Stratégies de ciblage tumoral les plus adaptées aux applications cliniques.

[A] Après injection intra-veineuse, les molécules de faible poids moléculaire, qui sont rapidement éliminées du sang, sont retrouvées à de faibles concentrations dans les cellules tumorales, alors que des taux plus importants sont détectés dans les tissus sains.

[B] Le développement des vecteurs a permis d'améliorer l'accumulation passive des molécules dans les cellules tumorales, *via* l'effet EPR.

[C] Le ciblage de récepteurs (sur)exprimés sur les cellules tumorales permet d'améliorer la libération cellulaire de nano-systèmes, et en particulier la libération de macromolécules comme de l'ADN, des siRNA ou des peptides.

[D] Le ciblage de récepteurs (sur)exprimés sur les cellules endothéliales permet de réduire l'apport sanguin au sein de la tumeur, la privant ainsi d'oxygène et de nutriments.

[E] Les nano-structures sensibles aux stimuli peuvent être injectée par voie systémique puis activée au niveau de la tumeur (par les ultra-sons, un laser ou des ondes magnétiques) pour permettre, par exemple, la libération de drogues, la thérapie photodynamique ou l'hyperthermie.

[F] Dans le cas où la tumeur est accessible, par exemple par chirurgie, des systèmes de libération prolongée peuvent être implantés à proximité de celle-ci.

D'après Lammers et coll., 2008.

Le grand nombre d'études précliniques réalisées sur le ciblage actif des tumeurs a permis de faire émerger différents principes généraux. Dans la majorité des cas, les nanoparticules ciblant des récepteurs (sur-)exprimés à la surface des cellules tumorales améliorent l'efficacité anti-tumorale, en augmentant leur internalisation cellulaire plutôt qu'en augmentant l'accumulation tumorale (Park et coll., 2004 ; Kirpotin et coll., 2006). Ceci résulte, notamment, du ciblage de récepteurs qui sont endocytés, comme le récepteur à la transferrine, le récepteur au folate ou l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Allen, 2002 ; Torchilin, 2005 ; Duncan, 2006).

Enfin, la destruction de l'endothélium des tumeurs solides peut provoquer la mort des cellules tumorales par manque d'oxygène et de nutriments. De plus, l'accessibilité des récepteurs à la surface des vaisseaux a conduit au développement de nombreuses thérapies ciblant les cellules endothéliales tumorales. Les ligands utilisés peuvent être le fragment d'anticorps L19 (Neri et Bicknell, 2005), qui cible un domaine de la fibronectine, ou différents dérivés cycliques ou linéaires des peptides RGD et NGR qui se lient respectivement aux intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$, et à la N-aminopeptidase.

3.3. Angiogenèse, intégrine $\alpha_v\beta_3$ et motif RGD

Comme cela a été décrit précédemment, l'angiogenèse requiert la migration et l'adhésion des cellules endothéliales sur la matrice extra-cellulaire pour la formation des néo-vaisseaux. Ces deux phénomènes sollicitent l'intervention de molécules d'adhésion spécialisées, parmi lesquelles l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle important. Son rôle exact est malgré tout, encore incomplètement compris et le mécanisme d'action des molécules ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ non élucidé. Ainsi, le ciblage de la vascularisation tumorale *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée par les cellules endothéliales néoformées, est apparu très intéressant. D'autant plus qu'une grande partie des tumeurs, généralement les plus agressives, expriment également cette intégrine.

3.3.1. Rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la formation des néo-vaisseaux

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a tout d'abord été identifiée comme un marqueur spécifique des zones d'angiogenèse. Des niveaux d'expression élevés de ce récepteur spécifiquement sur l'endothélium des vaisseaux en formation ont été mis en évidence dans différents modèles d'angiogenèse (Brooks et coll., 1994) et par analyse immuno-histochimique des néo-

Type tumoral	Intégrines exprimées	Phénotypes associés
Mélanome	$\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$	Phase de croissance verticale et métastases dans les ganglions lymphatiques
Sein	$\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_v\beta_3$	Augmentation de la taille et du grade de la tumeur et diminution de la survie ($\alpha_6\beta_4$). Augmentation des métastases osseuses ($\alpha_v\beta_3$)
Prostate	$\alpha_v\beta_3$	Augmentation des métastases osseuses
Pancréas	$\alpha_v\beta_3$	Métastases dans les ganglions lymphatiques
Ovaire	$\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$	Augmentation des métastases péritonéales ($\alpha_4\beta_1$) de la prolifération tumorale ($\alpha_v\beta_3$)
Col de l'utérus	$\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_6$	Diminution de la survie des patients
Glioblastome	$\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$	Les deux intégrines sont exprimées à la limite entre la tumeur et le tissu normal et joueraient un rôle dans l'invasion
Cancer du bronchique non à petites cellules	$\alpha_5\beta_1$	Diminution de la survie des patients (ganglions lymphatiques non envahis)
Colon	$\alpha_v\beta_6$	Diminution de la survie des patients

Tableau IV. Rôle des intégrines dans la progression tumorale.

D'après Desgrosellier et Cheresh, 2010.

vaisseaux et de lignées cellulaires (plus de 100 000 intégrines $\alpha_v\beta_3$ par cellules contre moins de 10 000 pour les tissus normaux) (Carlson et coll., 2007 ; Max et coll., 1997). De plus, l'inhibition de l'intégrine par l'anticorps monoclonal LM609 bloque l'angiogenèse induit par les facteurs angiogéniques, alors qu'aucun effet n'est observé sur les vaisseaux quiescents. Ces résultats tendent à conférer des propriétés pro-angiogénique à l'intégrine.

Pourtant, l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, ainsi que celle de sa proche parente $\alpha_v\beta_5$, dans le processus d'angiogenèse est soumis à controverse. En effet, Reynolds et coll. ont observé une angiogenèse accrue et une croissance tumorale largement favorisée chez des animaux génétiquement modifiés dépourvus des sous-unités β_3 ou β_5 . Ces résultats suggèrent que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ ne sont pas essentielles ni pour le développement vasculaire, ni pour l'angiogenèse tumorale.

Ces résultats contradictoires suggèrent que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pourrait avoir un rôle beaucoup plus complexe que celui de seul inducteur de l'angiogenèse (Hynes, 2002). Elle pourrait avoir un rôle pivot et réguler tantôt des activités pro-angiogéniques, tantôt des activités anti-angiogéniques.

De plus, ce nouveau modèle, conférant une activité d'inhibition de l'angiogenèse à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, suggère que les molécules décrites pour leur effet anti-angiogénique et inhibiteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, pourraient s'avérer être des agonistes et non des antagonistes de ce récepteur.

3.3.2. Caractéristiques de la famille des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs cellulaires responsables des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extra-cellulaire (Luo et Springer., 2006). Elles jouent donc un rôle important dans le rattachement des cellules à leur environnement et plus particulièrement aux protéines de la matrice extra-cellulaire (collagène, laminine, fibronectine, vitronectine). Elles sont également impliquées dans le transfert des signaux à partir de la membrane plasmique, *via* leur rattachement au cytosquelette, et régulent de nombreuses fonctions dont la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou la cicatrisation.

L'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_6$ est généralement faible voire indétectable dans les épithéliums chez l'adulte et elle est fortement augmentée dans un grand nombre de tumeurs. De plus, l'expression de certaines intégrines ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_v\beta_6$) par les cellules tumorales est corrélée à la progression des tumeurs (Tableau IV). Cependant, il est difficile de connaître précisément la répartition des intégrines au sein des tumeurs. Leur

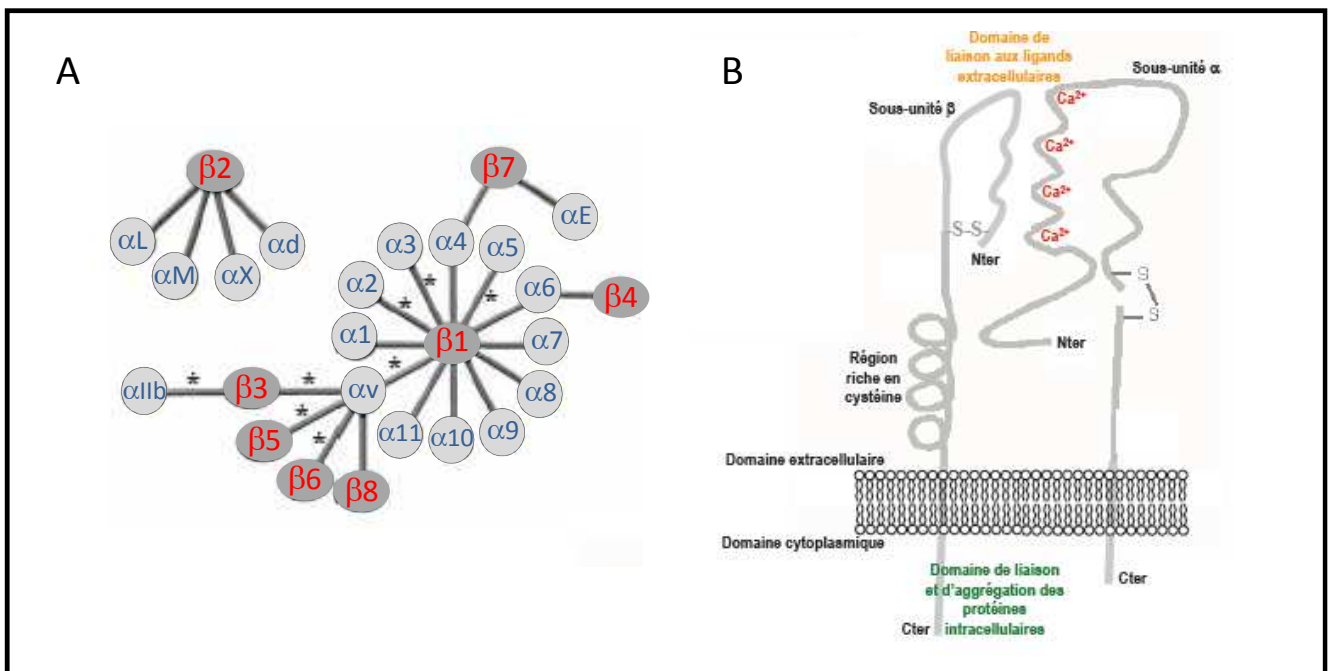


Figure 18. Récepteurs de la famille des intégrines.

[A] Schéma des différentes associations entre les sous-unités α et β pour la formation des hétérodimères. Les intégrines de la famille βA se lient à leur substrat par l'intermédiaire du motif RGD sont indiquées par une étoile. [B] Représentation schématique d'une intégrine.

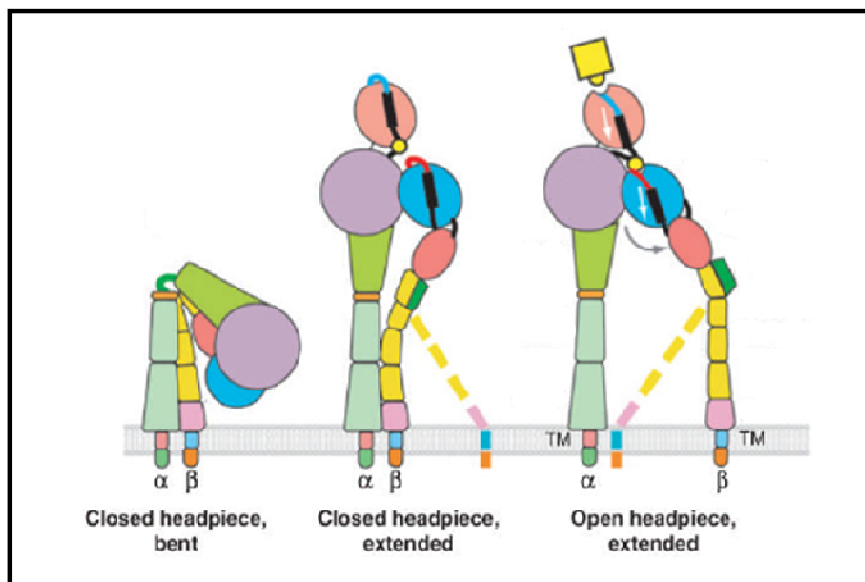


Figure 19. Représentation schématique des changements de conformation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ associés à la régulation de son affinité.

D'après Luo et coll., 2007.

localisation semble hétérogène, avec une présence préférentielle au niveau de zones de prolifération et des métastases.

Les intégrines sont constituées de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires α et β , associées de façon non-covalente. Ainsi, 24 récepteurs hétérodimériques peuvent être formés à partir des 18 sous-unités α et de 8 sous-unités β . Le domaine extra-cellulaire, proche de l'extrémité N-terminale, des sous-unités α présente des régions capables de lier des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) (Haubner et coll., 1997) (Figure 18). Sa sous-unité β possède des régions riches en cystéine dans son domaine extra-cellulaire et une partie N-terminale repliée, formant une large boucle. Leurs régions intra-cellulaires sont dépourvues d'activité enzymatique.

3.3.3. Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'étude par diffraction aux rayons X de la partie extra-cellulaire cristallisée de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a permis la description de sa structure (résolution de 3,1Å) (Xiong et coll., 2001). La partie extra-cellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ présente une structure en V où chaque sous-unité est repliée (Closed headpiece bent) (Figure 19). Cette conformation correspond à un état physiologique de faible affinité, alors que la liaison d'un ligand induit un changement de conformation : l'intégrine se déploie et présente un état physiologique de haute affinité (Tagaki et coll., 2002 ; Kim et coll., 2003). Ce déploiement augmente l'affinité de l'intégrine pour ses ligands (Closed headpiece extended). La liaison du ligand conduit ensuite à une forme activée du récepteur (Open headpiece extended) (Luo et Springer, 2006), pour laquelle les domaines cytoplasmiques sont éloignés. Par ailleurs, la distribution membranaire de l'intégrine et la formation de « clusters » de récepteurs dépend de la présence de substrats présentant les ligands de manière multivalente (Buensucesco et coll., 2003).

3.3.4. Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

La séquence tripeptidique -RGD- (Arginine – Glycine – Acide aspartique) est un motif commun présent dans la plupart des protéines de la matrice extra-cellulaire. Environ la moitié des intégrines reconnaissent et interagissent avec leurs substrats protéiques *via* le motif RGD (Figure 18). C'est particulièrement le cas des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ (récepteur plaquettaire du

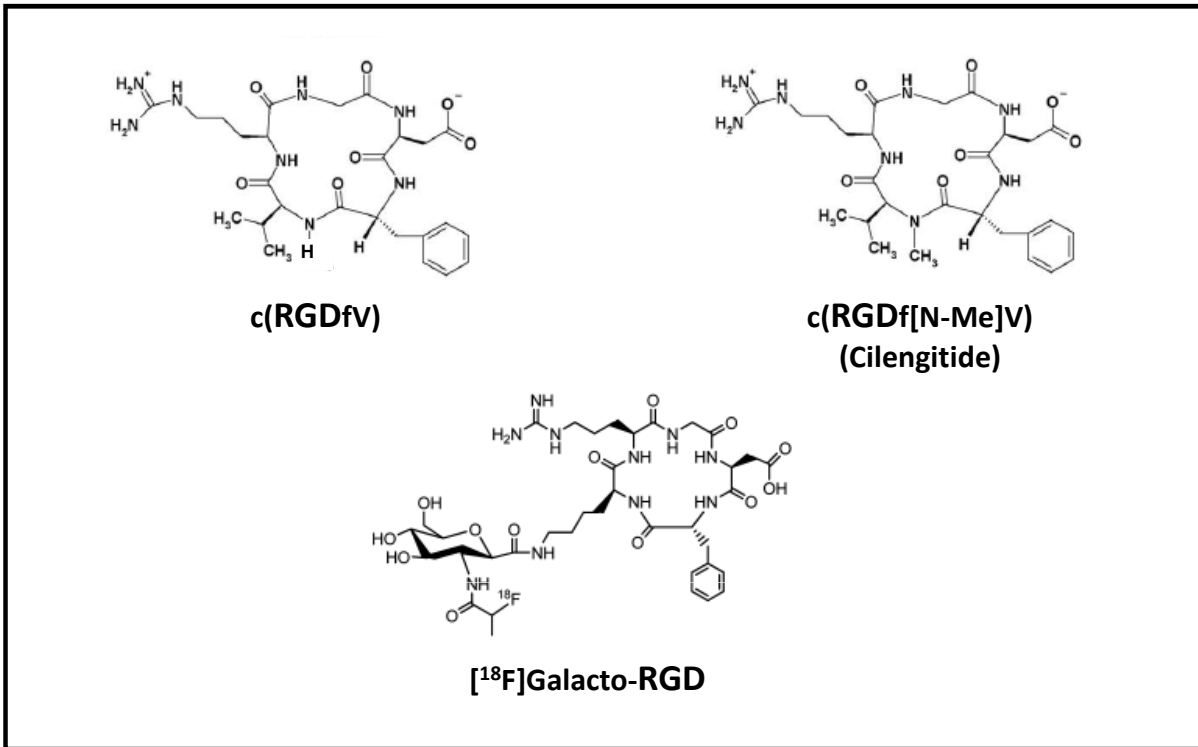


Figure 20. Exemples de motifs RGD développés pour des études précliniques et cliniques.

D'après Liu et coll., 2009 et Temming et coll., 2005.

fibrinogène), $\alpha_5\beta_1$ (récepteur endothéliale de la fibronectine) et $\alpha_v\beta_3$ (récepteur endothélial de la vitronectine). Toutefois, leur affinité pour les protéines porteuses de cette séquence diffère. La spécificité d'une intégrine pour un substrat est attribuée à la conformation du motif RGD dans la protéine, ainsi qu'aux séquences de résidus adjacentes. Ainsi, le ligand endogène de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est la vitronectine. Mais elle peut également se lier à diverses protéines extracellulaires par l'intermédiaire de la séquence RGD, notamment la fibronectine, le fibrinogène, le collagène, le facteur de Willebrand et la thrombospondine (Haubner et coll., 1997). Ces observations sont à l'origine du développement de ligands peptidiques synthétiques « RGD » spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

3.3.5. Penta-peptides cycliques RGD : ligands spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

De nombreux systèmes présentant la séquence RGD ont été développés, dont des peptides linéaires. Malgré des études *in vitro* encourageantes montrant leur efficacité à bloquer l'adhésion cellulaire à de faibles concentrations (20 μM), les études cliniques ont montré une forte accumulation hépatique sans accumulation spécifique dans la tumeur (Sutcliffe-Goulden et coll., 2002). De plus les peptides linéaires peuvent adopter de nombreuses conformations diminuant l'affinité pour l'intégrine et sont plus sensibles aux dégradations protéolytiques. Afin de limiter ces inconvénients, de petits peptides cycliques de conformation contrainte ont été développés.

Les premiers travaux de conception de ligands présentant une haute affinité et une bonne spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été initiés par l'équipe de H. Kessler au début des années 1990. Ils consistaient à incorporer le motif RGD au sein de séquences contraintes de penta- ou d'hexapeptides cycliques et à évaluer leur affinité pour différentes intégrines (tests d'affinité) et leur capacité à inhiber l'interaction entre l'intégrine et son substrat naturel (tests de compétition) (Gurrath et coll., 1992). Ces études ont conduit à la sélection du cyclopentapeptide c-[-RGDfV] (Figure 20) qui s'est avéré être un ligand sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Son affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ purifiée ($\text{IC}_{50} = 50\text{nM}$ (= concentration en peptide nécessaire pour inhiber 50 % de la liaison entre l'intégrine et son ligand)) libre ou immobilisée, est comparable à celle de son ligand endogène, la vitronectine ($\text{IC}_{50} = 25\text{ nM}$) (Pfaff et coll., 1994). Il est en revanche bien moins efficace dans les compétitions avec le fibrinogène ou la fibronectine, réalisées avec les récepteurs immobilisés $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ($\text{IC}_{50} = 29\ \mu\text{M}$) et $\alpha_5\beta_1$ ($\text{IC}_{50} = 6,4\ \mu\text{M}$).

Son dérivé méthylé (c-[RGDf(N-Me)V] (Figure 20) présente une activité 1500 fois supérieure pour l'inhibition de la fixation de la vitronectine sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (IC50 = 0,58 nM) que pour l'inhibition de la fixation du fibrinogène sur l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (IC50 = 860 nM). Une IC50 relativement faible (37 nM) est également détectée dans la compétition avec la vitronectine sur l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Goodman et coll., 2002). Cet inhibiteur des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ est actuellement testé dans des essais cliniques, sous le nom de cilengitide, comme agent anti-angiogénique. Des essais de phase II sont réalisés dans les cancers de la prostate, du pancréas et du poumon, ainsi que des études de phase II et III pour le traitement des glioblastomes. Ces études ont montré des stabilisations de la maladie et une réduction de la propagation des métastases chez certains patients. Elles ont également permis de déterminer une élimination principalement rénale du produit, une absence de toxicité hématologique et des effets secondaires tolérables (nausées, fatigue, vomissements, éruptions cutanées). Cependant, à ce jour, le cilengitide n'a pas montré d'efficacité thérapeutique contre les tumeurs solides de stades avancés. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'utilisées à de faibles concentrations (nanomolaires) les molécules RGD-mimétiques présentent une activité pro-angiogénique et non anti-angiogénique, qui favorise la croissance et l'angiogénèse tumorale (Reynolds et coll., 2009).

D'autre part, les propriétés des cyclopentapeptides RGD ont largement été étudiées grâce à des analogues du Cilengitide radio-marqués. L'ajout d'une partie saccharidique permet d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ces composés. Ainsi, le remplacement de la valine méthylée du cilengitide par une lysine portant un galactose radio-marqué au ^{18}F (Figure 20), modifie peu son affinité et sa sélectivité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et coll., 2001a ; Haubner et coll., 2001b). La biodistribution montre une élimination majoritairement rénale et une accumulation rapide et importante au niveau des tumeurs (3-4 % de la dose injectée/gramme, en 10 minutes). Les différentes études cliniques portant sur les glioblastomes (Schnell et coll., 2009), les cancers du sein primaires ou métastatiques (Beer et coll., 2008) ou les cancers squameux de la tête et du cou (Beer et coll., 2007) montrent ainsi que le ^{18}F -galacto-RGD est un outil prometteur pour l'imagerie des tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, ainsi que pour le suivi individualisé de la réponse aux thérapies anti-tumorales.

Par ailleurs, des études ont montré que la présentation dimérique du cyclopentapeptide RGD (supportée par un acide aspartique et marqué au ^{18}F) augmente l'accumulation et la rétention tumorale par rapport aux composés monovalents. De plus son élimination est principalement

rénale alors que celle du monomère est hépatique (Chen et coll., 2004). Des résultats comparables sont obtenus avec le RAFT qui propose une présentation tétramérique du cyclopentapeptide RGD (Garanger et coll., 2007). Divers autres présentations multivalentes ont été développées (Liu et coll., 2006).

Enfin, les cyclopentapeptides RGD sont largement utilisés pour la vectorisation d'éléments thérapeutiques ou diagnostiques, notamment pour le ciblage des nanoparticules (Cai et Chen, 2008 ; Chen et coll., 2009 ; Gao et coll., 2010 ; Chen et coll., 2010 ; Han et coll., 2010).

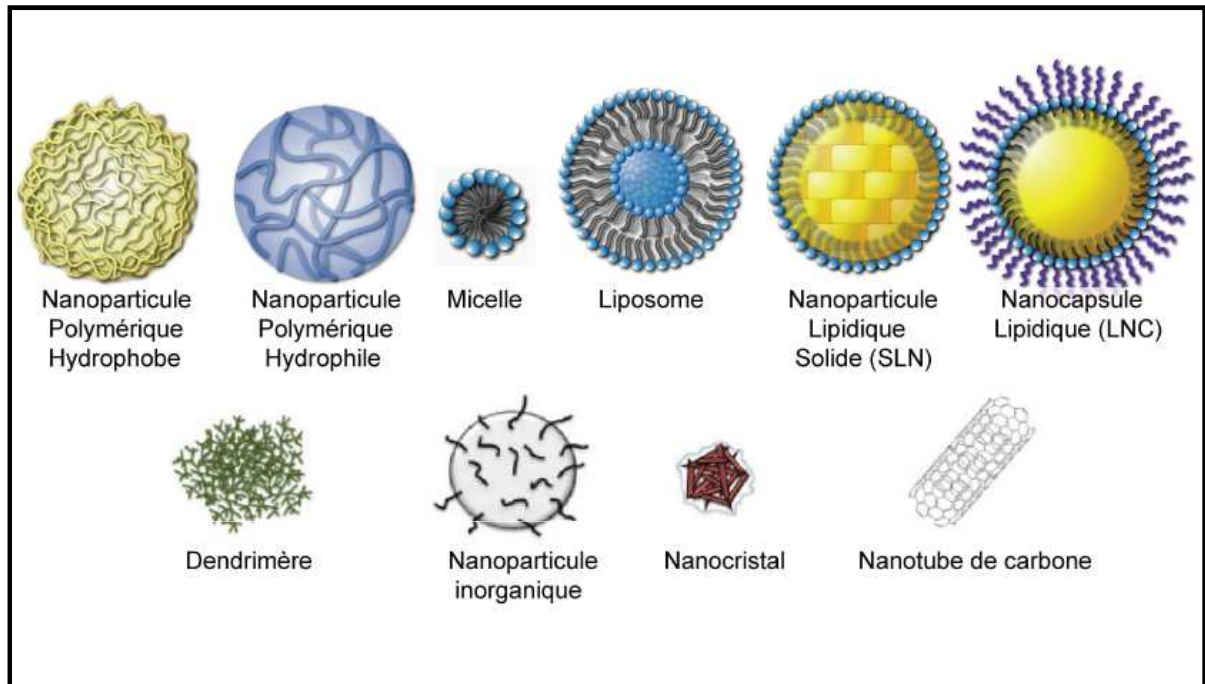


Figure 21. Différentes nanoparticules utilisées en recherche biomédicale.
D'après Faraji et Wipf 2009, et Kabanov et Vinogradov, 2009.

Chapitre III : Apport des nanoparticules

La nanomédecine se réfère aux applications des nanotechnologies pour le traitement, le diagnostic, le suivi et le contrôle des systèmes biologiques.

Le concept de « magic bullet », précédemment illustré par les anticorps monoclonaux, pourrait aujourd'hui être incarné par les nanotechnologies à visées médicales. Comme les « magic bullets » imaginées par Paul Ehrlich (Strebhardt et Ullrich, 2008), les nanoparticules ou nanovecteurs ont pour objectif d'augmenter l'efficacité, la spécificité et la sécurité biologique des principes actifs, en améliorant leur administration. Extrêmement modulables, ces nanoparticules restent néanmoins définies par leur taille comprise entre 5 et 300 nm (Faraji et Wipf, 2009), leur capacité à accroître la concentration d'un principe actif dans une solution administrable et leur faculté à en améliorer l'efficacité.

Certaines nanoparticules sont déjà utilisées en clinique. Il s'agit des liposomes encapsulant de l'amphotéricine B (Ambisome[®]), de la doxorubicine (Doxil[®]) ou du paclitaxel (Abraxane[®]). Cependant, leur manque de stabilité au cours de la conservation ou lors de l'administration, et leur coût élevé réduisent leur utilisation. Ceci a conduit au développement d'une grande variété de nanoparticules de compositions et de structures très diverses (Figure 21).

1. Généralités

1.1. Définition des nanoparticules

Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm. Cette définition exclue donc tous les objets dont la plus petite dimension est comprise entre 100 et 1000 nm.

En taille, les nanoparticules sont du même ordre de grandeur que les anticorps, les récepteurs membranaires, les acides nucléiques et les protéines.

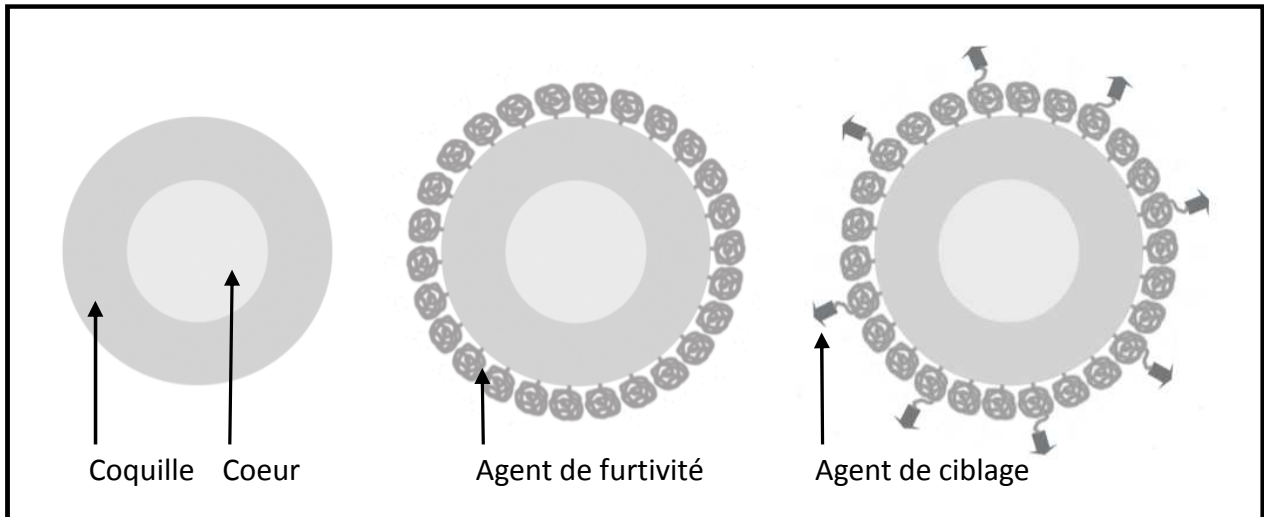


Figure 22. Evolution des nanoparticules.

Première génération : nanoparticule « nue » (à gauche)

Deuxième génération : nanoparticules furtives (au centre)

Troisième génération : nanoparticules ciblantes (à droite).

1.2. Les différentes générations de nanoparticules

Dans le but d'améliorer le comportement biologique des nanoparticules, les modifications apportées aux nanoparticules ont conduit à définir trois générations de particules successives (Figure 22).

La première génération correspond à l'encapsulation de principes actifs au sein de colloïdes stables en milieu aqueux, l'intérêt principal étant de ralentir leur élimination (notamment par voie rénale) et de prolonger leurs effets. Cependant, même si la faible taille des particules permet de ralentir l'élimination, elle n'est pas suffisante pour permettre une longue circulation dans le compartiment sanguin. En effet, celles-ci sont considérées comme des éléments étrangers, sont reconnues par les défenses immunitaires (plus particulièrement par le système réticulo-endothélial) et sont rapidement prises en charge par les macrophages.

Afin d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique et de pouvoir atteindre la zone d'intérêt, la surface des nanoparticules a été modifiée pour obtenir des nanoparticules dites « furtives », de seconde génération. Les agents de furtivité, généralement des polymères, créent une « couche protectrice » permettant d'échapper à la capture par les cellules du système immunitaire en limitant la fixation des opsonines (Moghimi et coll., 2001a ; Moghimi et coll., 2003). Le PEG (polyéthylène glycol) est le plus couramment utilisé car il est biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique et faiblement immunogène. De plus, son injection à l'homme est approuvée par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire Produits de Santé) et par la FDA (Food and Drug Administration). Les particules ainsi obtenues permettent une libération lente du principe actif dans le sang et une accumulation passive dans les tissus par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).

Cependant, afin de pouvoir cibler un tissu donné, leur surface a été fonctionnalisée avec des ligands biologiques reconnus spécifiquement par les cellules d'intérêt. Les ligands pouvant être greffés sur les nanoparticules sont aussi différents que des anticorps (Tada et coll., 2007 ; Yang et coll., 2008), des peptides (Cai et coll., 2006), des oligonucléotides (Farokhzad et coll., 2006) ou d'autres molécules telles que des saccharides ou des folates (Zhang et coll., 2007 ; Schroeder et coll., 2007 ; Chen et coll., 2007). Ces nanoparticules « furtives et ciblantes » sont dites de troisième génération.

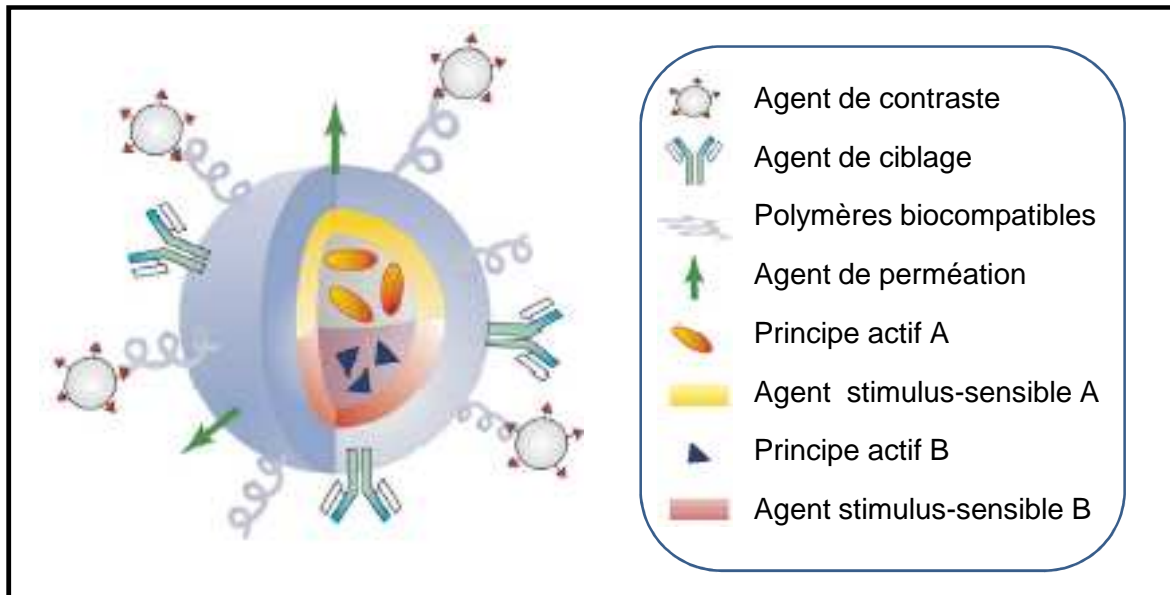


Figure 23. Les nanoparticules multifonctionnelles.

L'avantage des nanoparticules est que dans une seule entité, elles peuvent transporter des drogues et des agents de contraste, permettant leur suivi après administration. Les agents de furtivité évitent la capture par les macrophages et augmentent la demi-vie plasmatique. Les agents de perméation favorisent la traversée des membranes biologiques et les agents de ciblage favorisent un ciblage actif des zones d'intérêt.

D'après Ferrari, 2005.

1.3. Les nanoparticules multifonctionnelles : vers des particules idéales ?

Au fur et à mesure du développement de la nanomédecine, la représentation de la nanoparticule idéale, c'est-à-dire un agent injectable ciblant combinant le diagnostic et la thérapie, s'est affinée (Figure 23).

En 2005, Mauro Ferrari faisait l'état des opportunités et des challenges à relever par les nanotechnologies dans le cadre de la lutte contre le cancer. En 2008, Sanvicens et Marco dressaient un bilan des différentes nanoparticules commercialisées ou en cours de développement pour des applications médicales. Dans les deux cas, la nanoparticule peut être schématisée comme une nano-plateforme sur laquelle viennent prendre place : les agents thérapeutiques, des agents de contraste, des agents de furtivité, des agents de ciblage et des agents de perméation. Des agents d'activation peuvent également être ajoutés. Ces agents favorisent la libération localisée et contrôlée, au sein de la zone ciblée, des agents thérapeutiques en réponse à un stimulus extérieur, comme une modification de pH ou une activation par les ultra-sons. Ainsi, une même nano-plateforme de base permet l'obtention d'un grand nombre de nanoparticules possédant des propriétés différentes en fonction des agents choisis.

2. Les différentes nanoparticules développées

La définition des nanoparticules étant uniquement basée sur leur taille (au moins une dimension inférieure à 100 nm), leur composition n'est pas limitée. Il existe donc une grande variété de nanoparticules, allant des liposomes aux nanoparticules d'or en passant par des systèmes polymériques. Cependant, leurs propriétés intrinsèques conditionneront leur devenir après administration. Le choix du cœur, qui peut être organique ou inorganique, est primordial pour protéger puis aider à la libération des agents d'intérêt, alors que les propriétés de la surface influenceront la distribution des agents thérapeutiques et diagnostiques vers la zone ciblée.

Seules les nanoparticules les plus prometteuses, à notre avis, pour des applications médicales seront détaillées.

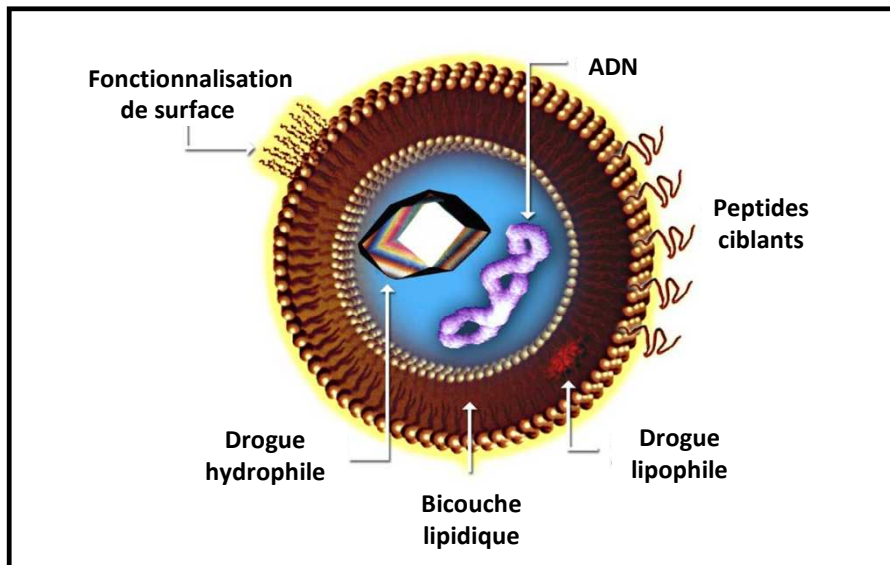


Figure 24. Représentation schématique d'un liposome développé pour le « drug delivery ».

Leur cœur aqueux permet l'encapsulation de drogues hydrophiles ou de biomolécules (ADN, ...), et des drogues lipophiles peuvent être dissoutes dans leur membrane.

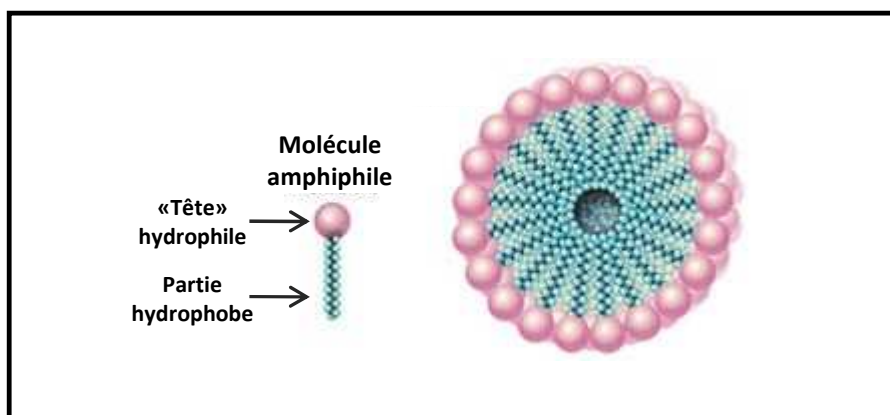


Figure 25. Représentation schématique d'une micelle.

2.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules, constituées de phospholipides, qui ont une structure membranaire en bicouche comparable à celle des membranes biologiques, avec une phase interne aqueuse. Leur taille varie de 10 nm à quelques μm . Les liposomes sont classés, selon leur taille et le nombre de couches de phospholipides en multi-, oligo- ou uni-lamellaires. Leur nature amphiphile leur permet de véhiculer des drogues hydrophiles dans leur cœur aqueux et des drogues lipophiles dissoutes dans leur membrane. Du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques, ils présentent d'excellentes propriétés de circulation, pénétration et diffusion. De plus, leur surface peut être modifiée par des ligands et/ou des polymères capables d'améliorer la spécificité du « drug delivery » (Figure 24) (Torchilin, 2005).

Cependant, ils présentent également certaines limitations : leur capacité d'encapsulation est relativement faible (notamment pour les molécules lipophiles piégées dans la couche de phospholipides), leur production est délicate, leur stabilité est modérée et la libération des principes actifs hydrophiles dans le sang est précoce (Pinto-Alphandary et coll., 2000).

Parallèlement aux liposomes, différents autres systèmes vésiculaires sont développés. Ainsi, les liposomes sont constitués de phospholipides, les niosomes de tensioactifs non anioniques (Uchegbu et coll., 1998), et les polymerosomes de copolymères amphiphiles (Rameez et coll., 2008).

2.2. Les micelles

Les micelles sont des auto-assemblages de molécules amphiphiles formant des structures de type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) en milieu aqueux. La partie hydrophile des molécules amphiphiles est dirigée vers l'eau et la partie hydrophobe vers l'intérieur formant le cœur de la particule (Figure 25). Les micelles ne se forment qu'au dessus de la concentration micellaire critique, correspondant à la concentration en tensioactifs en dessous de laquelle il n'y a pas d'auto-assemblage des tensioactifs sous forme de micelles. Les principes actifs transportés par les micelles peuvent être greffés sur la partie hydrophile ou solubilisés dans la partie hydrophobe, selon leur affinité. Composées historiquement de phospholipides, les micelles peuvent être constituées de diverses molécules amphiphiles, comme les copolymères

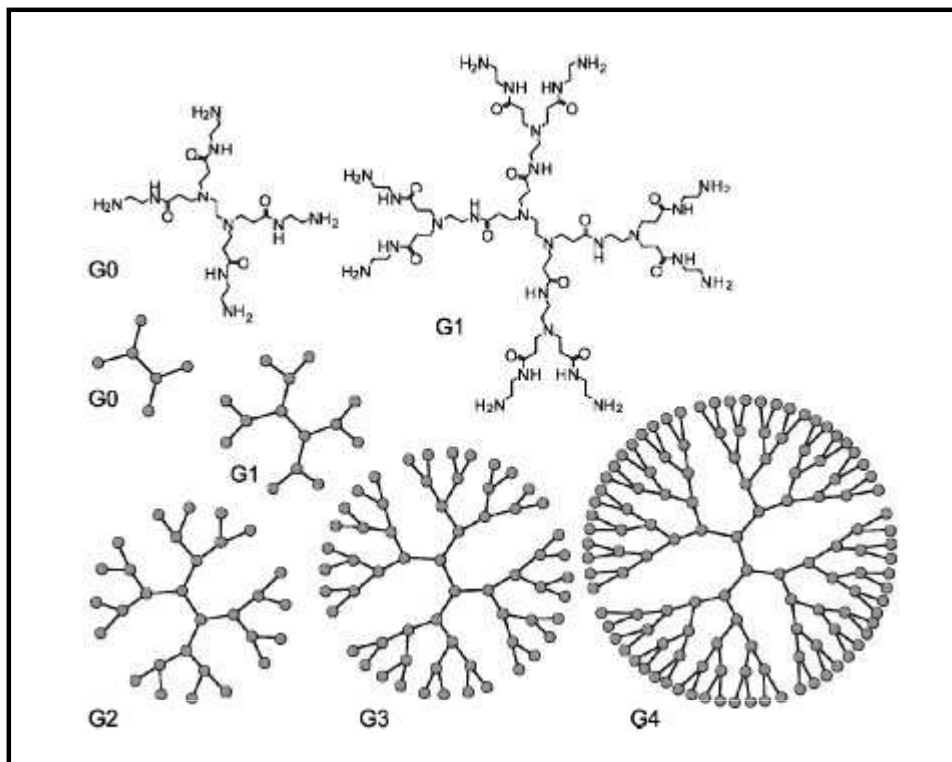


Figure 26. Structure moléculaire des dendrimères de PAMAM.

Les polymères de PAMAM (poly (amido amine)) sont très ramifiés. Leur diamètre moléculaire dépend de leur génération, c'est-à-dire du nombre d'embranchements dans leur structure.

très étudiés actuellement (Nasongkla et coll., 2004 ; Oishi et coll., 2006 ; Sawant et coll., 2006).

2.3. Les nanoparticules polymériques

Le terme de nanoparticules polymériques désigne généralement les nanoparticules de polymères hydrophobes telles que les nanoparticules de PLGA (Poly(lactic-*co*-glycolic acid), mais il en existe d'autres catégories, comme les dendrimères (système polymériques réticulé macroscopique), les nanoparticules faites de polymères hydrophiles (PEI, chitosan, alginate, polysaccharides, etc.) et les micelles polymériques faites de copolymères (voir 2.2. *Les micelles*).

Les premières nanoparticules polymériques développées par P. Couvreur dans les années 1980 étaient à base de polyalkylcyanoacrylates (Couvreur et coll., 1979). Actuellement, les polymères les plus utilisés sont le poly(acide lactique), le poly(acide glycolique) et le poly(acide lactic-*co*-glycolique), respectivement abrégés PLA, PGA et PLGA en anglais. Ces polymères sont biocompatibles et biodégradables dans l'organisme. Ils sont utilisés pour la fabrication de dispositifs médicaux et d'implants sous-cutanés. De plus, les nanoparticules polymériques offrent une meilleure stabilité que les liposomes à la fois *in vivo* et durant le stockage.

Cependant, même si la biocompatibilité des polymères est bonne, une fois structurés en nanoparticules, ils ne sont pas dénués de toxicité. D'autre part la présence résiduelle de solvants organiques au sein des nanoparticules est problématique. Enfin, l'industrialisation de la fabrication de ces particules est délicate et aboutit généralement à des milieux peu concentrés en particules (~ 2 %).

Des polymères à base de polypeptides, des polynucléotides ou de polysaccharides sont également employés pour l'obtention de nanoparticules.

Enfin, les dendrimères sont des constructions polymériques synthétiques fortement branchées, mais ayant une structure bien contrôlée. A partir d'un monomère possédant au moins trois sites réactifs et constituant le cœur de la particule, cette structure se construit par l'ajout contrôlé de couches successives de monomères (Figure 26). Leur taille n'excède pas 15 nm. Les dendrimères sont utilisés comme éléments de soutien pour la réparation des tissus. De

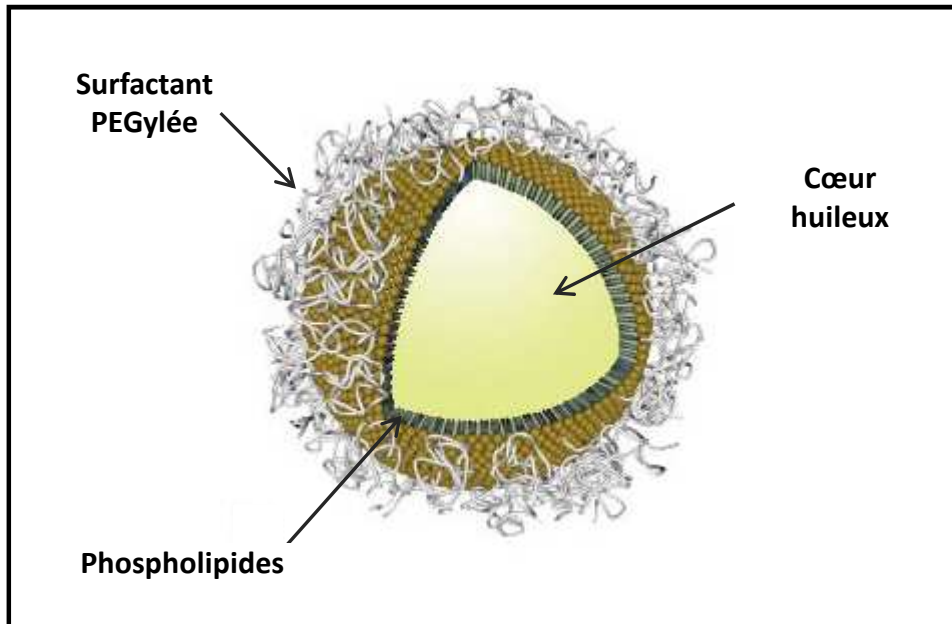


Figure 27. Structure d'une nanoparticule lipidique.

En fonction de leur composition, les nanoparticules lipidiques présentent des propriétés physico-chimiques différentes. Elles sont classées en nanoparticules lipidiques solides, nanoémulsions et nanocapsules lipidiques.

plus, ce sont de bons vecteurs de drogues ou d'agents de contraste par modification chimique de leurs multiples groupements terminaux (Lee et coll., 2005). Malheureusement, leur synthèse est délicate.

2.4. Les nanoparticules lipidiques

Afin de pallier les inconvénients des nanoparticules polymériques (présence résiduelle de solvants organiques, possible cytotoxicité, production reproductible à grande échelle délicate) et des liposomes (faible stabilité, processus complexe de fabrication, faible taux d'encapsulation de principes actifs lipophiles), de nouvelles nanoparticules structurées autour d'un cœur lipidique ont été développées (Figure 27).

Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur lipidique, généralement à base de triglycérides biodégradables, bio-assimilables et non toxiques. Parmi ces particules, les plus étudiées sont les nanoparticules lipidiques solides ou SLN (Solid Lipid Nanoparticles) (Muller et coll., 2000 ; Mehnert et Mader, 2001 ; Wong et coll., 2007). Le cœur de ces particules est composé d'une matrice de lipides qui est solide à température ambiante, mais également à 37°C. Cette matrice plus ou moins cristallisée est stabilisée par une couche de surfactants. Les lipides utilisés sont des triglycérides hautement purifiés ou des mélanges de glycérides ou de cires. Ces particules possèdent une stabilité et une capacité d'encapsulation de molécules lipophiles supérieure à celle des liposomes, et peuvent être synthétisées en absence de solvants organiques. Elles présentent cependant divers inconvénients comme l'augmentation de leur taille au cours du temps, une tendance à gélifier de manière imprévisible et une faible capacité d'encapsulation due à la structure cristalline du cœur lipidique.

Parmi les nanoparticules lipidiques, se trouvent également les nanocapsules lipidiques ou LNC (Lipid NanoCapsules). Elles sont constituées d'un cœur lipidique entouré d'une coque solide (Heurtault et coll., 2003). Leur taille est maîtrisée et ajustable entre 20 et 100 nm. Les lipoprotéines d'origine naturelle (Chen et coll., 2007) ou synthétique (Nikanjam et coll. 2007) font également partie des nanoparticules lipidiques. Enfin, l'ensemble des nanoparticules lipidiques est parfois regroupé sous l'appellation de nanoémulsions (Anton et coll., 2008), bien que ce terme soit généralement utilisé pour décrire des dispersions d'huile dans l'eau, pour lesquelles les globules de phase dispersée non cristallisée sont stabilisés par une couche de surfactants (LNE pour Lipid NanoEmulsions).

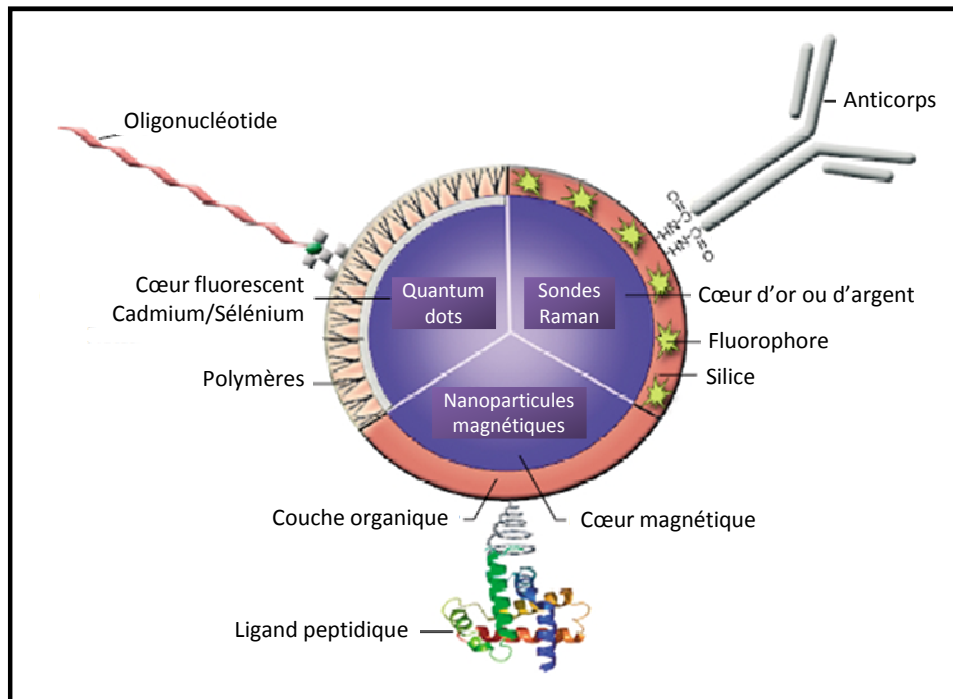


Figure 28. Représentation schématique d'une nanoparticule inorganique fonctionnalisée.

Le cœur des nanoparticules inorganiques peut être de différentes natures : métaux semi-conducteurs pour les quantum dots, oxyde de fer pour les nanoparticules magnétiques, ... Ces nanoparticules peuvent présenter diverses fonctionnalisations de surface (polymères, couche organique, silice) et être fonctionnalisées avec des ligands spécifiques (peptides, anticorps, oligonucléotides) afin de pouvoir cibler des cellules d'intérêt.

D'après Yezhelyev et coll., 2006.

2.5. Les nanoparticules inorganiques

A côté des nanoparticules organiques, des nanoparticules inorganiques ont également été développées. Il s'agit de nanoparticules d'or (Liu et coll., 2007 ; Alric et coll., 2008), d'argent (Rai et coll., 2009), d'oxyde de gadolinium (Faure et coll., 2009 ; Ahrèn et coll., 2010), des nanoparticules magnétiques (Cheon et Lee, 2008), des nanoparticules de silice (Vallet-Regi et coll., 2007) et des nano-cristaux semi-conducteurs (ou quantum dots) (Michalet et coll., 2005 ; Cai et coll., 2006) (Figure 28).

Les quantum dots sont des nanocristaux de métaux semi-conducteurs (Cadmium, Sélénium, ...) dont l'émission de fluorescence peut être adaptée en fonction de leur taille et de leur composition. Ils peuvent ainsi être utilisés sur un large spectre, de l'ultra-violet au proche infra-rouge. Ils sont photostables et présentent une forte brillance (Mahler et coll., 2008). Cependant leur toxicité, liée à leur composition, limite leur utilisation.

La majorité des nanoparticules magnétiques se base sur l'utilisation de particules de maghémite (Fe_2O_3) ou de magnétite (Fe_3O_4), de quelques nanomètres de diamètre. Ces particules peuvent être encapsulées dans une matrice de silice, de polymère ou de polysaccharide (dextran). Les particules magnétiques sont désignées par le terme SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxide) lorsque leur taille est comprise entre 50 et 500 nm et USPIO (Ultra small SuperParamagnetic Iron Oxide) si leur diamètre est inférieur à 50 nm. Leur surface peut être fonctionnalisée par des molécules ciblantes pour une utilisation, *in vitro* et *in vivo*, à visée diagnostique (Lu et coll., 2007).

Les nanoparticules inorganiques peuvent également être constituées d'oxyde de Gadolinium, d'oxyde de titane (TiO_2) ou d'or, par exemple. Les nanoparticules d'or, dont la taille n'excède pas 50 nm, peuvent présenter plusieurs géométries, comme des nanosphères, des nanobatonnets (nanorods), des nanocages ou des structures cœur-coquille. Les nanoparticules d'or sont d'excellents marqueurs pour les biosenseurs, car elles peuvent être détectées par divers techniques, telles la fluorescence ou la conductivité électrique (Huang et coll., 2007).

3. Applications des nanoparticules

Le développement des nanoparticules à visée médicale permet d'envisager de nombreuses applications pour la détection et le traitement de diverses pathologies. L'un des domaines d'application le plus prometteur, mais également le plus avancé actuellement, est la délivrance de molécules thérapeutiques (ou « drug delivery »), et en particulier, le développement de thérapies ciblées pour le traitement des cancers.

Les liposomes ont été les premiers systèmes nanoparticulaires développés et approuvés pour l'encapsulation de principes actifs. Ainsi, des liposomes encapsulant de la daunorubicine (DaunoXome[®]) ont été commercialisés en 1997 pour le traitement de certains cancers du sein et de l'ovaire. La doxorubicine est également commercialisée sous forme liposomale dans différentes spécialités : Myocet[®] et Doxil[®] (USA) / Caelyx[®] (Europe). Pour ces deux dernières spécialités, les liposomes sont PEGylés afin d'améliorer leur biodistribution.

En 2005, la FDA approuvait l'injection intra-veineuse de la première nanoparticule autre que les liposomes : l'Abraxane[®]. Il s'agit d'une nanoparticule protéique, à base d'albumine, encapsulant du paclitaxel.

De nombreuses autres nanoparticules sont actuellement en cours d'études précliniques ou cliniques pour la délivrance de médicaments. Il s'agit principalement de liposomes encapsulant des molécules hydrophiles et de nanoparticules solides à base de lipides, de protéines ou de polymères biodégradables encapsulant des molécules lipophiles, par exemple, l'encapsulation de 5-fluoro-uracile dans des particules polymériques (Li et coll., 2008) ou des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la gemcitabine et un anticorps monoclonal anti-EGFR pour le ciblage des cancers pancréatiques (Patra et coll., 2008).

En parallèle de la délivrance de principes actifs, tels que les agents de chimiothérapie, des nanoparticules sont développées pour la délivrance d'agents thérapeutiques biologiques, tels que des protéines, des peptides, mais également des siRNA, des oligonucléotides (Fattal et Barratt, 2009 ; Schroeder et coll., 2010) ou de l'ADN dans le cadre de la thérapie génique des cancers (Hart, 2010).

Outre les applications pour la délivrance de principes actifs ou de biomolécules au sein d'un tissu ciblé, les nanoparticules peuvent être utilisées pour d'autres thérapies, comme la radiothérapie, la thermothérapie ou la thérapie photodynamique.

Dans le cadre d'une utilisation en radiothérapie, les nanoparticules peuvent soit véhiculer une source radioactive et cibler la zone d'intérêt (Li et coll., 2004), soit être utilisées comme agents radio-sensibilisants, comme c'est le cas des nanoparticules d'or ou d'oxyde de Gadolinium pour une irradiation par rayons X (Hainfeld et coll., 2010).

La thermothérapie ou hyperthermie consiste à provoquer, par un signal extérieur (magnétique ou laser, par exemple), un échauffement local par activation des nanoparticules situées dans la zone à traiter, de manière à ce que l'énergie dissipée soit suffisante pour élever la température de quelques degrés (autour de 45°C), et permette la destruction des cellules. Cette thérapie fait intervenir des nanoparticules magnétiques (Ito et coll., 2005 ; Wust et coll., 2006) ou des nanoparticules d'or (Huang et coll., 2010).

Enfin, la thérapie photodynamique est basée sur l'utilisation d'agents photo-sensibilisateurs capables de produire de l'oxygène singulet et des radicaux libres après absorption d'un rayonnement lumineux, conduisant à la destruction des cellules. Les nanoparticules jouent un rôle de transporteur en véhiculant le photo-sensibilisateur dans la zone d'intérêt (Chatterjee et coll., 2008).

Le diagnostic, et plus particulièrement l'imagerie médicale, constitue également un domaine d'application pour lequel les nanoparticules, utilisées comme traceurs ou agents de contraste, peuvent apporter de réelles améliorations.

Ainsi, des nanoparticules inorganiques sont déjà approuvées par la FDA comme agents de contraste pour l'IRM ; il s'agit des SPIO et des USPIO. L'Endorem[®], SPIO commercialisé en 1995, est composé de particules d'oxyde fer de 5 à 6 nm de diamètre, enrobées par une couche de dextrans (diamètre final de 100 nm). Après administration intra-veineuse, il est utilisé pour visualiser des lésions hépatiques (tumeurs et métastases hépatiques notamment). Le Resovist[®] est également utilisé dans cette indication. Il est constitué de carbodextran encapsulant des nanoparticules d'oxyde de fer de 4 nm (diamètre final de 60 nm).

Le métabolisme et l'élimination de ces nanoparticules inorganiques ont été étudiés. Après administration intra-veineuse, elles sont rapidement captées par le système réticulo-endothélial (principalement par les cellules de Kupffer, mais également par les cellules de la rate, des ganglions lymphatiques, et de la moelle osseuse) (Morana et coll., 2007). Après avoir été phagocytées, elles sont lentement dégradées puis intégrées dans le pool de fer de l'organisme. Elles ne sont donc pas détectables dans les voies d'élimination biliaires et rénales.

4. Paramètres pharmacocinétiques des nanoparticules

4.1. Administration

Avant d'étudier le comportement d'une nanoparticule, il convient de déterminer la voie d'administration. Le système sanguin irriguant l'ensemble des organes et tissus de l'organisme, la voie sanguine semble adaptée pour atteindre l'ensemble des tissus et cellules ciblées. Il existe différentes voies pour atteindre le système sanguin : la voie entérale, la voie percutanée, la voie pulmonaire et les voies parentérales (sous-cutanée, intra-musculaire et intra-veineuse). L'administration intra-veineuse permet de s'affranchir des problèmes d'absorption liés aux autres voies d'administration et permet ainsi de maîtriser la quantité administrée.

4.2. Distribution

Après administration intra-veineuse, différents paramètres vont influencer la distribution des nanoparticules dans l'organisme. Le premier paramètre mis en jeu est le flux sanguin. En effet, les organes ayant un flux sanguin élevé (cerveau, foie, cœur, intestins, poumons, rate, reins, etc.) seront exposés à des concentrations plus élevées en nanoparticules. Ensuite, la distribution des nanoparticules peut être modifiée par l'altération des vaisseaux : l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux tumoraux permet à un ciblage passif de ces tissus par effet EPR.

La distribution des nanoparticules peut également être influencée par des paramètres propres aux nanoparticules comme leur taille ou leur fonctionnalisation de surface. Ainsi, les nanoparticules de petite taille, comprise entre 1 et 20 nm, présentent un temps de circulation plus long dans le sang et une extravasation lente vers les espaces interstitiels (Winter et coll., 2003). Ceci peut altérer le volume de distribution des particules lors d'une administration intra-veineuse. Les injections locales nécessitent, quant à elles, des nanoparticules de taille légèrement supérieure, de l'ordre de 30 à 100 nm. Cette taille est suffisante pour éviter la fuite dans les capillaires, mais suffisamment petite pour empêcher l'élimination par le système réticulo-endothélial (Moghimi et coll., 2003).

Enfin, la modification de la surface des nanoparticules permet de contrôler leur distribution et de limiter leur élimination. Par exemple, l'ajout de PEG (molécules hydrophiles) à la surface des nanoparticules augmente leur temps de circulation dans le sang (Torchilin et coll., 1995).

4.3. Elimination

Avant d'atteindre le tissu cible, les nanoparticules, administrées par voie intra-veineuse, sont confrontées à différentes barrières biologiques, la première étant la barrière sanguine et la captation par le système réticulo-endothélial (RES). Ce système également appelé système phagocytaire mononucléé (MPS), participe à une réponse immunitaire non spécifique, par reconnaissance des éléments étrangers à l'organisme. Au cours de la première étape appelée opsonisation, les nanoparticules vont être recouvertes *via* des interactions non spécifiques par des opsonines (Vonarbourg et coll., 2006). Ces molécules sont des protéines plasmatiques, telles que les protéines du complément (Protéines C3 et C4), des immunoglobulines (IgG et IgM), la fibronectine, l'albumine et des apolipoprotéines. Ce sont principalement les protéines du complément qui rendent les nanoparticules plus visibles pour les macrophages, notamment ceux qui résident dans le foie (cellules de Kupffer), la rate ou la moelle osseuse, et permettre leur phagocytose. L'opsonisation est un processus rapide (de quelques secondes à quelques jours) conduisant à une accumulation des nanoparticules dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques, en vue d'une élimination ultérieure.

Il n'existe pas de règle générale pour contourner l'opsonisation des nanoparticules (Owens et Peppas, 2006). Cependant les molécules hydrophiles (tels que les PEG) semblent être opsonisées moins rapidement que les molécules hydrophobes. Elle est également plus rapide pour les molécules chargées ou les nanoparticules de grande taille (> 200 nm). La modification de la surface des nanoparticules est donc un paramètre crucial pour augmenter leur temps de circulation et obtenir des nanoparticules furtives, qui seront moins reconnues par le RES.

L'élimination des nanoparticules est également conditionnée par la perméabilité vasculaire qui est variable selon que l'endothélium soit continu (sans pore), fenêtré (pores entre 50 et 70 nm) ou sinusoïde (pores de 0,1 à 0,3 μm). Les capillaires fenêtrés sont notamment présents dans les reins et l'intestin grêle, alors que les capillaires sinusoides sont présents dans le foie, la rate et les os. L'élimination des nanoparticules sera donc plutôt hépatique ou plutôt rénale selon leur taille. Une étude portant sur des nanoparticules d'or montre que les petites particules chargées positivement sont à la fois moins captées par le foie et éliminées plus rapidement par voie rénale, que des particules plus grosses ou chargées négativement voire neutres (Balogh et coll., 2007). Une autre étude portant sur les quantum dots s'est focalisée sur les critères indispensables à une élimination rénale satisfaisante (Choi et coll., 2007). Elle

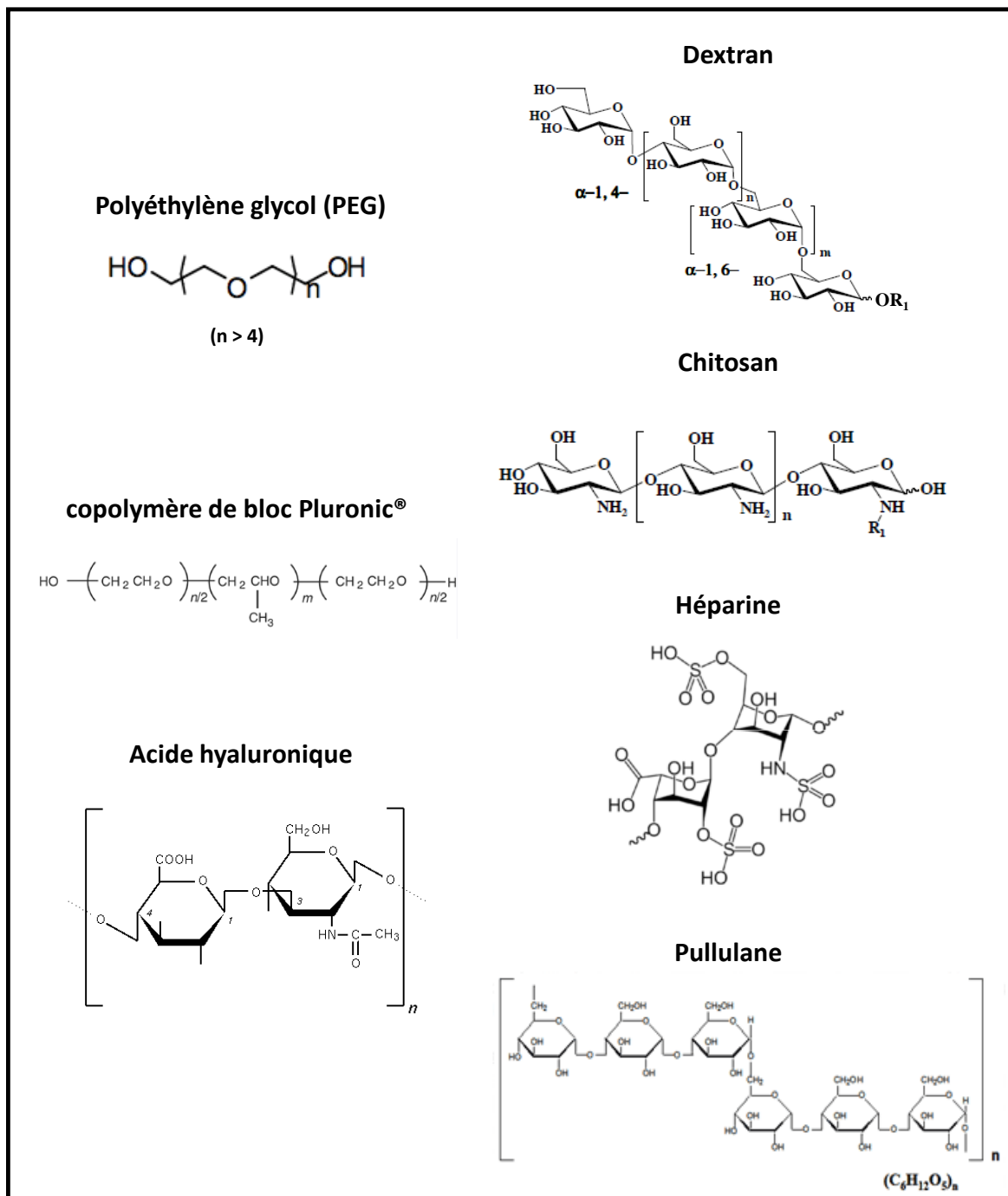


Figure 29. Structures des différents polymères utilisés pour la fonctionnalisation de surface des nanoparticules.

conclut que le diamètre hydrodynamique des nanoparticules ne doit pas dépasser 5,5 nm pour qu'elles soient filtrées par les reins.

5. Importance des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules sur leur devenir en milieu biologique

Comme nous venons de le voir, la clairance et l'opsonisation sont fortement liées aux différentes caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules, telles leur taille, leur géométrie, leur charge et les groupements présents à leur surface.

5.1. Caractéristiques de surface

La modification de la surface des nanoparticules est un paramètre important pour éviter leur reconnaissance par le RES. Les particules hydrophobes sont rapidement captées par le RES puis stockées dans le foie et la rate, alors que les nanoparticules hydrophiles sont plus furtives et présentent un temps de circulation plus long dans le sang.

Différents polymères sont couramment utilisés pour augmenter le caractère hydrophile des nanoparticules. Il s'agit des PEG, de divers polysaccharides comme les dextrans, le chitosan ou les héparines (Lemarchand et coll., 2004), ou de divers copolymères comme les copolymères pluronic (Batrakova et Kabanov, 2008), etc. (Figure 29).

Le PEG (polyéthylène glycol) est le plus couramment utilisé. Il est biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique, faiblement immunogène et approuvé pour injection à l'homme. Le PEG réduit l'opsonisation et la reconnaissance par les macrophages, conduisant à une augmentation de la demi-vie plasmatique des nanoparticules (Gref, 2002). Il favorise une meilleure accumulation passive dans les tumeurs par effet EPR, permettant une meilleure efficacité thérapeutique de drogues encapsulées dans les nanoparticules (Barratt et coll., 2003).

Les oligo- et poly-saccharides sont également utilisés. Leur biocompatibilité et leur biodégradation sont documentées, et ils présentent de nombreuses propriétés (anti-virale, anti-bactérienne ou anti-tumorale) non retrouvées pour les autres polymères naturels (Na et coll., 2000). Ils peuvent également être utilisés pour leurs propriétés de ciblage des tissus, car ils présentent des récepteurs sur certaines cellules. Le dextran, le pullulane et les glycoprotéines

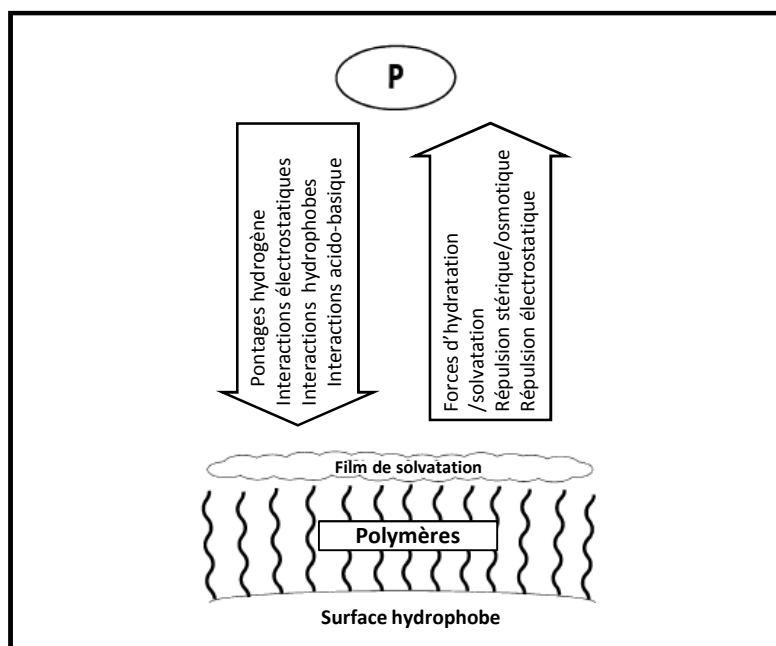


Figure 30. Représentation schématique des interactions entre la surface des nanoparticules et les protéines.

(P : Protéine)

D'après Vonarbourg et coll., 2006.

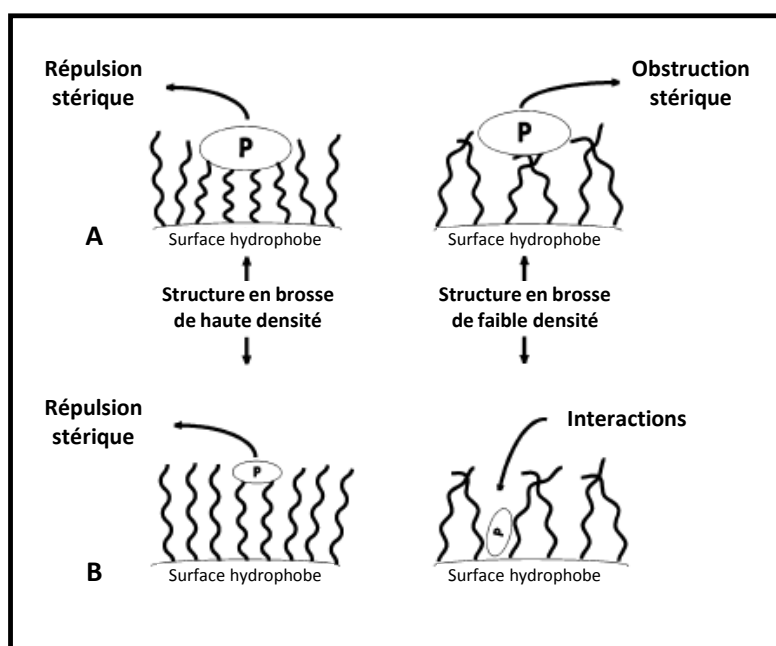


Figure 31. Représentation schématique des interactions entre une structure en brosse et des protéines de grande [A] ou de petite [B] taille.

(P : Protéine)

D'après Vonarbourg et coll., 2006.

diminuent la captation par le RES (Woddle et Lasic, 1992 ; Allen, 1994), alors que l'acide hyaluronique confère des propriétés bioadhésives pour l'administration locale de drogues (Lehr et coll., 1992). Ainsi, le greffage d'héparine à la surface de nanoparticules polymériques de PMMA améliore significativement la demi-vie plasmatique (de quelques minutes pour les particules nues à plus de cinq heures pour les particules-héparine). Ceci suggère que le fort encombrement stérique amené par l'arrangement en brosse dure de polysaccharides contribuerait à l'augmentation du temps de circulation (Passirani et coll., 1998). Le greffage de dextran améliore également la demi-vie plasmatique des SPIO. Cependant, la captation des particules par les cellules peut induire une perte du recouvrement de PEG due à l'activité enzymatique lysosomale de digestion des dextrans. Enfin, le chitosan peut interagir avec les acides nucléiques (oligonucléotides, ADN, ...), améliorant la capacité de charge des nanoparticules en acides nucléiques, leur stabilité dans les fluides biologiques et leurs propriétés de transfection.

Il semble également que la masse moléculaire des molécules utilisées pour augmenter l'hydrophilicité, ainsi que leur densité de greffage influencent le devenir des nanoparticules dans les milieux biologiques (Vonarbourg et coll., 2006) (Figures 30 et 31).

Ainsi, différentes études montrent que l'adsorption des protéines à la surface des nanoparticules est diminuée lorsque le poids moléculaire des molécules de recouvrement augmente (Moghimi et coll., 2001b) et préconise l'utilisation de PEG de taille comprise entre 1500 et 3500 Da. De plus, Pavey et coll., suggère qu'il serait plus adapté de mélanger des PEG à chaînes courtes et à chaînes longues, ces dernières étant plus flexibles, alors que les chaînes courtes permettent un recouvrement optimal de la nanoparticule (Pavey et coll., 1999). Enfin, l'adhésion cellulaire et la phagocytose sont d'autant plus réduites que les chaînes des PEG ou des chitosans sont longues (Mosqueira et coll., 1999 ; Huang et coll., 2004).

De plus, l'adsorption des protéines dépend de l'accessibilité de la surface de la nanoparticule (Osterberg et coll., 1995). Ainsi, recouvrir les nanoparticules avec une faible densité de PEG à longues chaînes ne prévient pas l'adsorption des protéines (Vittaz et coll., 1996), alors qu'une forte densité de PEG à chaînes courtes semble plus efficace (Mosqueira et coll., 2001 ; Gombotz et coll., 1991). La densité de chaînes PEG de 2000 Da suffisante serait d'au moins 0,2 molécules / nm² ou une distance de 2,2 nm entre deux molécules pour une nanoparticule de PLA de 100 nm (Vittaz et coll., 1996). En revanche, pour une nanoparticule de PLA de

200 nm, la distance optimale entre deux PEG de 5000 Da serait de 1,4 nm (Gref et coll., 2000). La densité de molécules à la surface des nanoparticules est reliée à leur rayon de courbure.

Enfin, il a été mis en évidence que la charge de surface des nanoparticules et les groupements fonctionnels modulent leur prise en charge par le RES (Alexis et coll., 2008). Il a d'abord été montré que des microparticules de polystyrène présentant des amines primaires à leur surface sont plus phagocytées que des microparticules ayant des groupements sulfate, hydroxyle ou carboxyle. Les nanoparticules chargées positivement présentent un fort taux d'internalisation non spécifique et une demi-vie plasmatique courte, alors que les nanoparticules neutres ou chargées négativement sont moins internalisées (Yamamoto et coll., 2001).

5.2. Taille des nanoparticules

En se basant sur les paramètres physiologiques telles que la filtration hépatique, l'extravasation et la diffusion dans les tissus, et l'élimination rénale, il semble évident, qu'avec les caractéristiques de surface, la taille des nanoparticules est un facteur clé de la biodistribution des nanoparticules et l'obtention d'un effet thérapeutique.

Une étude de la biodistribution de nanoparticules de polystyrène, dont la taille variait entre 50 et 500 nm, a montré une forte agglomération hépatique des particules de grande taille (Nagayama et coll., 2007). Ceci suggère donc que la captation hépatique est médiée par l'adsorption des protéines conduisant à l'opsonisation. De plus, les tests réalisés *in vitro* montrent une faible adsorption des protéines sur les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm, celle-ci est moyenne pour les nanoparticules de 100 à 200 nm et forte si leur taille dépasse 200 nm (Fang et coll., 2006). L'effet de la taille des particules sur l'adsorption des protéines a ensuite été confirmé par un test de capture par des macrophages et l'étude de la cinétique de la clairance sanguine. La clairance sanguine est deux fois plus lente pour les particules de grande taille. De plus, de la même manière que pour les liposomes, les micelles inférieures à 100 nm s'accumulent dans la peau (Rijcken et coll., 2007).

En conclusion, les nanoparticules représentent un réel espoir pour la médecine. En effet, elles favorisent la délivrance d'agents thérapeutiques au sein de la zone à traiter en limitant leur capture par les tissus sains. Ceci réduit les effets secondaires, et redonne de l'intérêt à des principes actifs ayant des propriétés physiques et une biodistribution insatisfaisantes. D'un point de vue diagnostique, elles améliorent le contraste des modalités d'imagerie actuelles et favorisent donc la détection précoce des cancers.

Chapitre IV : Du développement préclinique aux applications cliniques : intérêt de l'imagerie optique de fluorescence

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la nanomédecine permet d'espérer d'importantes avancées pour la détection et le traitement des cancers.

L'imagerie s'est imposée comme un outil indispensable pour la recherche en oncologie, les essais cliniques et la pratique médicale. Ces différentes techniques d'imagerie médicale sont régulièrement utilisées afin d'établir un diagnostic précis, de préparer une opération chirurgicale ou de contrôler les effets d'un traitement ou d'un acte chirurgical.

Au cours des trente dernières années, des évolutions importantes ont été réalisées sur les systèmes d'imagerie et leurs applications, mais certains challenges persistent. Jusqu'à présent, les techniques d'imagerie permettent de localiser la tumeur dans l'organisme. Mais, actuellement, les développements s'orientent vers la visualisation par ces systèmes de l'expression ou de l'activité de molécules particulières des processus cellulaires ou moléculaires influençant le devenir des tumeurs et leur capacité à répondre ou non au traitement (Weissleder, 2002) : il s'agit de l'imagerie moléculaire.

Ce chapitre présentera le fonctionnement, les avantages et les inconvénients des différentes techniques d'imagerie médicale et biomédicale existantes. Il s'intéressera plus particulièrement à leur potentiel pour l'imagerie moléculaire, ainsi qu'aux agents de contraste couramment utilisés pour mettre en évidence des processus donnés. Enfin, ce chapitre se focalisera plus précisément sur l'imagerie de fluorescence et l'intérêt de son utilisation pour le développement de nouvelles drogues et de nouveaux agents de contraste pour l'imagerie moléculaire.

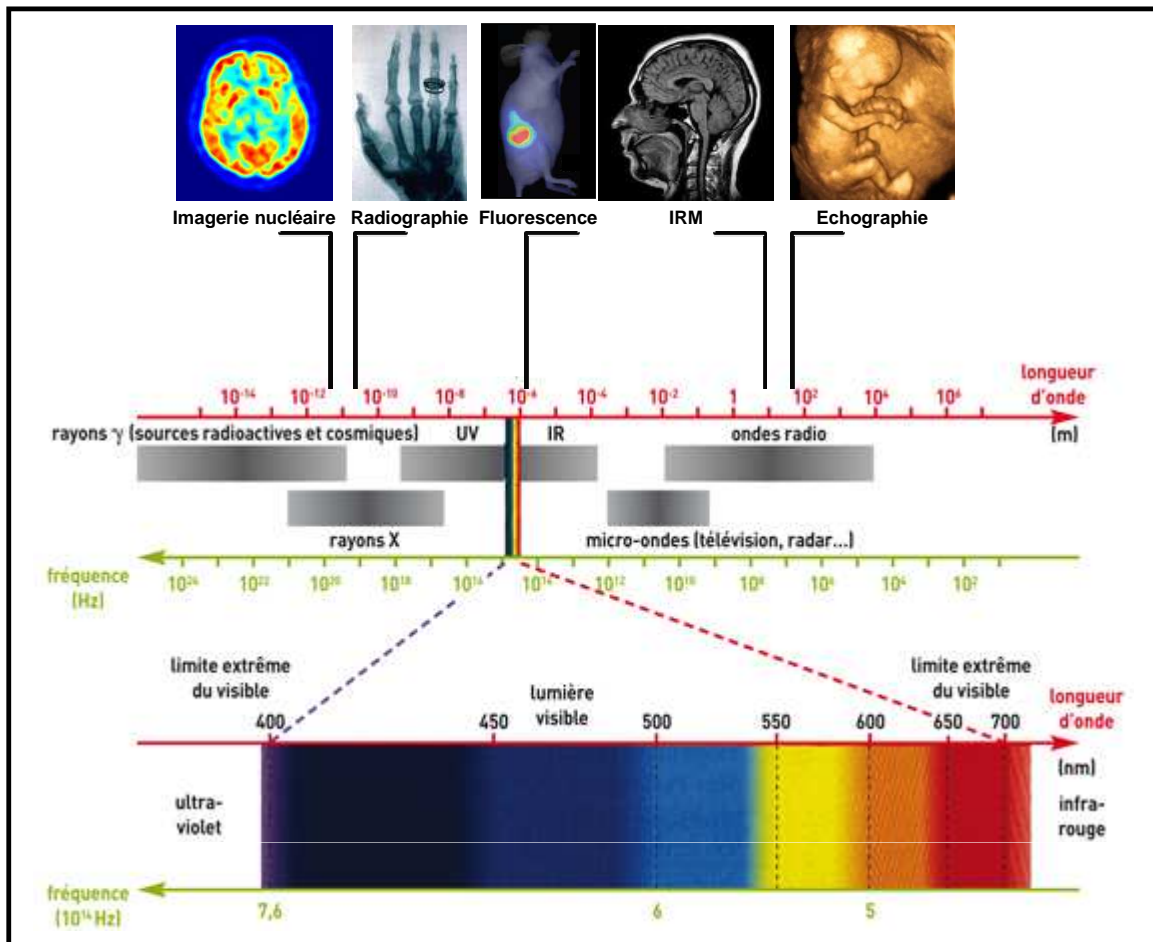


Figure 32. Représentation des différentes modalités d'imagerie.

1. Les différentes techniques d'imagerie

Les techniques d'imagerie médicale et biomédicale sont dites non invasives et non traumatisantes. En effet, hormis l'injection de traceurs pour certaines modalités, aucun prélèvement (biopsie) ni aucune atteinte des barrières de l'organisme n'est nécessaire à leur mise en œuvre.

Ainsi, les différentes méthodes d'imagerie sont basées sur l'utilisation de rayons électromagnétiques permettant l'obtention des renseignements désirés, sans effectuer de prélèvements. Les rayonnements utilisés sont répartis sur l'ensemble du spectre électromagnétique : des rayons gamma dans le cadre de l'imagerie nucléaire (pour les rayonnements les plus énergétiques), aux ultra-sons lors des échographies, en passant par les rayons X, les ondes radio dans le cas des IRM (en complément d'un champ magnétique constant) et enfin les rayonnements infra-rouges dans le cadre de l'imagerie de fluorescence *in vivo* (Figure 32).

Les techniques d'imagerie peuvent être divisées en deux catégories en fonction de leurs applications :

- L'imagerie structurelle, qui renseigne sur l'anatomie des organes (position, volume, présence éventuelle de lésions, ...)
- L'imagerie fonctionnelle, qui permet l'obtention d'informations sur le fonctionnement de l'organisme (physiologie, métabolisme, ...)

Toutes les techniques d'imagerie ne sont pas adaptées pour l'imagerie moléculaire. Cependant la combinaison de ces différentes techniques améliore la qualité des informations que l'on peut obtenir, et améliore ainsi le diagnostic du cancer et le suivi de la réponse au traitement.

Avant de présenter ces différentes méthodes d'imagerie, nous rappellerons l'intérêt de l'imagerie moléculaire.

1.1. L'imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire est une discipline de la recherche biomédicale en pleine expansion, qui peut être définie comme la représentation visuelle, la caractérisation et la quantification de processus biologiques cellulaires, sub-cellulaires et moléculaires, de manière non invasive au

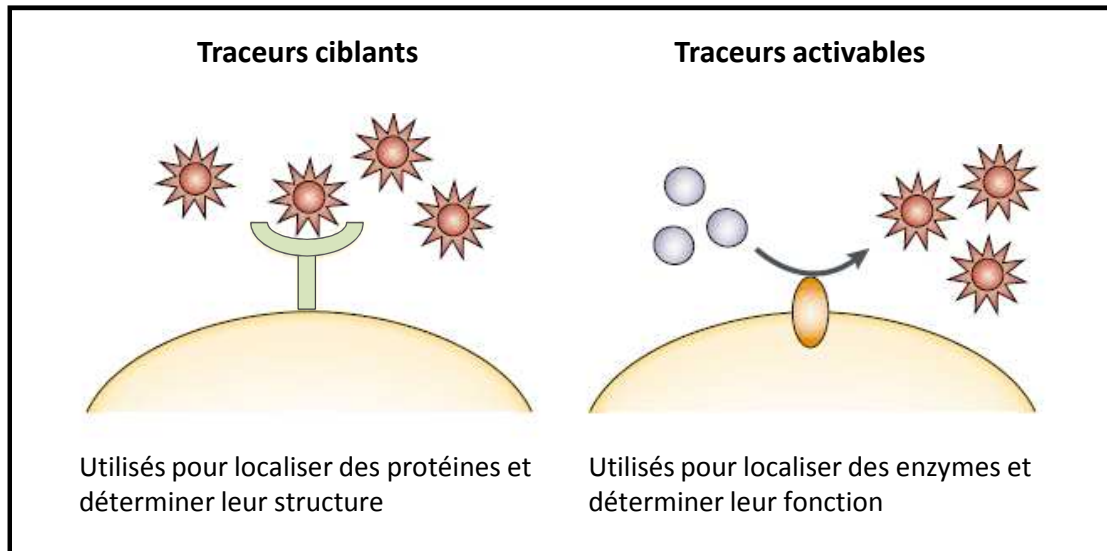


Figure 33. Les traceurs utilisés pour l'imagerie moléculaire.

- a. Traceur ciblant : l'agent de contraste est lié à la molécule (biomarqueur) qui est reconnue ou qui reconnaît spécifiquement une cible biologique donnée (par exemple, un traceur lié à un anticorps reconnaissant une protéine exprimée à la surface de certaines cellules).
- b. Traceur activable : l'agent de contraste est inhibé et sous l'action d'un processus biologique, ses propriétés sont restituées permettant ainsi sa détection (par exemple un traceur dont les propriétés physiques sont modifiées par l'action d'une enzyme)

D'après Weissleder, 2002.

sein d'organismes vivants (Weissleder, 2002 ; Massoud et Gambhir, 2003 ; Willmann et coll., 2008).

Elle présente divers avantages, dont une meilleure compréhension des processus biologiques, mais également un diagnostic plus précoce des tumeurs ou de maladies neurologiques, cardiovasculaires ou auto-immunes. D'autre part, elle favorise le développement de nouvelles thérapies pour ces pathologies grâce à des tests précliniques et cliniques permettant l'optimisation des traitements.

Ainsi, l'imagerie moléculaire est basée sur l'utilisation d'agents de contraste (ou traceurs). Chaque traceur permet la mise en évidence d'un processus biologique donné. Ils peuvent être classés en deux catégories : les traceurs ciblant et les traceurs activables. Les premiers sont détectés après fixation au niveau de leur cible, alors que les seconds ne sont détectables qu'après avoir « réagi » avec la cible, permettant ainsi la réduction du bruit de fond et une amélioration du contraste final (Figure 33).

L'imagerie moléculaire permet la détection précoce de certains marqueurs tumoraux, alors que la tumeur est encore indétectable à l'aide des techniques d'imagerie structurale, et sans réaliser de prélèvement.

1.2. Imagerie par rayons X

La radiographie par rayons X est la plus ancienne technique d'imagerie médicale. Elle est utilisée depuis les années 1900, après la découverte en 1895 des rayons X par W.C. Röntgen. A côté de la radiographie « classique », les différents développements technologiques ont permis l'apparition de la tomodensitométrie (ou scanner ou tomographie rayons X (en anglais, CT pour Computed Tomography)) dans les années 1970. Après reconstruction, les scanners permettent de réaliser des vues en coupe et des vues en trois dimensions. Cette technique est très couramment utilisée en médecine humaine.

Les rayons X sont absorbés à différents degrés par les différents tissus biologiques. Cette technique mesure la différence d'absorption des rayons X à travers les tissus.

Les microCT haute résolution permettent d'imager des souris et ont été utilisés pour la détection des tumeurs pulmonaires (Kennel et coll., 2000) et des métastases osseuses (Borah et coll., 2001).

Technique	Résolution	Profondeur	Temps d'acquisition	Quantitatif	Agents de contraste	Type d'imagerie	Coût	Utilisation clinique
IRM	10-100 μm	Pas de limite	Minutes-heures	Oui	<ul style="list-style-type: none"> •Gadolinium (Gd^{3+}) •Nanoparticules d'oxyde de fer (SPIO, USPIO) 	Anatomique, fonctionnelle, moléculaire	\$\$\$	Oui
CT	50 μm	Pas de limite	Minutes	Oui	<ul style="list-style-type: none"> •Iode 	Anatomique, fonctionnelle	\$\$	Oui
Ultrasons	50 μm	Cm	Secondes-minutes	Oui	<ul style="list-style-type: none"> •Micro-bulles 	Anatomique, fonctionnelle	\$\$	Oui
PET	1-2 mm	Pas de limite	Minutes-heures	Oui	<ul style="list-style-type: none"> •^{11}C •^{18}F •^{64}Cu 	Fonctionnelle, moléculaire	\$\$\$	Oui
SPECT	1-2 mm	Pas de limite	Minutes - heures	Oui	<ul style="list-style-type: none"> •$^{99\text{m}}\text{Tc}$ •^{123}I •^{111}In 	Fonctionnelle, moléculaire	\$\$	Oui
FRI	2-3 mm	< 1cm	Secondes	Non (semi-quantitatif)	<ul style="list-style-type: none"> •Protéines fluorescentes et fluorophores •Nanoparticules fluorescentes 	Fonctionnelle, moléculaire	\$	Oui
FMT	1mm	< 10cm	Minutes-heures	Oui	<ul style="list-style-type: none"> •Protéines fluorescentes et fluorophores •Nanoparticules fluorescentes 	Fonctionnelle, moléculaire	\$\$	En développement

Tableau V. Résumé des caractéristiques des différents systèmes d'imagerie.

Les valeurs de résolution correspondent à celle des dispositifs utilisés en préclinique. Les coûts sont basés sur les prix des systèmes d'imagerie aux Etats-Unis : \$ < 100 000 ; \$\$ 100 000 – 300 000 ; \$\$\$ > 300 000.

D'après Weissleder et Pittet, 2008 et Pysz et coll., 2010.

L'agent de contraste le plus utilisé pour cette technique est l'iode, car il a la propriété de fortement absorber les rayons X. Il est notamment utilisé pour l'imagerie du système vasculaire par angiographie, permettant, après injection, de repérer les organes fortement vascularisés et en particulier certaines tumeurs. D'autres agents de contraste pour l'imagerie X sont également développés, comme les nanoparticules métalliques (par exemple les nanoparticules d'or) du fait de la présence d'atomes lourds absorbants les rayons X. Toutefois, ces traceurs (iode et nanoparticules) possèdent un faible pouvoir contrastant, nécessitant d'importantes quantités injectées. Ceci limite le développement de nouveaux agents de contraste ciblant utilisables pour l'imagerie moléculaire.

L'imagerie par rayons X est une méthode d'imagerie structurale efficace et rapide, possédant une bonne résolution spatiale de l'ordre de 10 à 100 μm , sans limite de profondeur (Tableau V). Cette technique offre un excellent contraste entre les os et les tissus mous, cependant le contraste entre les différents tissus mous est faible. La localisation des tumeurs peut ainsi être rendue difficile. De plus, les rayons X sont des rayonnements ionisants qui nécessitent des mesures d'utilisation et de protection adéquates. Ceci limite également l'utilisation de cette technique pour la réalisation de suivis longitudinaux qui exposeraient à de trop fortes doses de rayonnements.

1.3. Imagerie par ultra-sons

L'ultrasonographie est une méthode d'imagerie non irradiante fondée sur la détection de la réflexion des ultra-sons par les différents tissus de l'organisme. Elle est dédiée à l'analyse des tissus « mous ». C'est une imagerie principalement structurale, mais elle peut également permettre une imagerie fonctionnelle, notamment pour la mesure du flux sanguin grâce à l'échographie Doppler.

Cette technique est très utilisée pour une détection rapide de pathologies, comme les tumeurs de la vessie (Rooks et coll., 2001).

Le contraste de l'imagerie ultrasonore peut être amélioré par l'utilisation de microbulles. En milieu aqueux, elles sont fortement échogènes grâce à la grande différence de densité entre le gaz contenu dans les microbulles et les tissus environnants. Ce sont généralement des émulsions d'huiles perfluorocarbonées stabilisées par une couche de phospholipides (Lanza et

Wickline, 2001 ; Unger et coll., 2004). Ces huiles permettent de dissoudre d'importantes quantités de gaz. Différentes formes commerciales sont disponibles : Luminity[®]/Definity[®] (Bristol Myers Squibb), Optison[™] (GE Healthcare), Sonovue[®] (Bracco), et Sonozoid[™] (Amersham Health) (Weskott, 2008).

Du fait de leur nature, de leur efficacité et des possibilités de fonctionnalisation, l'utilisation des microbulles est envisageable pour l'imagerie moléculaire ou pour la délivrance de médicaments (Pysz et coll. 2010a ; Deshpande et coll., 2010), par exemple pour l'imagerie de l'angiogénèse (Pochon et coll., 2010 ; Pysz et coll., 2010b) ou pour l'imagerie de l'activité des MMP2 dans l'ischémie/reperfusion (Su et coll., 2010).

L'échographie est une modalité d'imagerie largement utilisée en clinique car elle est rapide, peu coûteuse et peu encombrante. La résolution peut être très précise (10 à 500 μm selon la sonde utilisée), mais elle diminue rapidement lors de l'observation des zones profondes (Tableau V). De plus, les os ne laissent pas passer les ondes ultra-sonores. Enfin, cette technique nécessite un contact entre le patient et le dispositif, et elle est opérateur-dépendante.

1.4. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Développée au début des années 1980, l'IRM est une méthode couramment utilisée en clinique, adaptée pour la visualisation des tissus mous.

Le principe de l'IRM repose sur le fait qu'en appliquant une combinaison d'ondes électromagnétiques à haute fréquence sur une partie du corps et en mesurant le signal réémis par l'hydrogène, il est possible de déterminer la composition chimique et donc la nature des tissus biologiques en chaque point du volume imagé. La force du signal est fonction du nombre de protons. Le processus de relaxation, correspondant au retour à l'état basal des spins, peut être décrite par deux constantes fondamentales : T1 (relaxation longitudinale) et T2 (relaxation transversale). L'IRM est très utile pour la détection des tumeurs et la mesure des paramètres morphologiques. Elle permet également un suivi longitudinal de la croissance de la tumeur, car plusieurs sessions d'imagerie peuvent être effectuées en toute sécurité.

Traditionnellement utilisée pour la visualisation des tissus mous (par exemple, localisation et taille des tumeurs), l'imagerie par résonance magnétique permet de réaliser de l'imagerie moléculaire grâce à l'injection d'agents de contraste : nanoparticules superparamagnétiques,

nanoparticules d'oxyde de Gadolinium ou chélates de Gadolinium (Morana et coll., 2007 ; Tripathi et coll., 2009). Ces agents de contraste influencent les temps de relaxation T1 et T2. Dans les années 1990, le développement de l'IRM fonctionnelle a permis d'importantes avancées dans la compréhension de phénomènes biologiques, notamment dans la compréhension du fonctionnement du cerveau. La technique de spectroscopie par résonance magnétique permet d'imager l'activité métabolique des tumeurs (marqueurs d'agressivité de tumeurs prostatiques (Koutcher et coll., 2000), angiogénèse (Sipkins et coll., 1998), ..).

Contrairement à l'imagerie par rayons X, l'IRM n'est pas basée sur l'utilisation de rayonnements ionisants, ce qui en fait une technique sans danger. Elle offre un excellent contraste au niveau des tissus mous, bien meilleur que celui obtenu en tomographie, mais ne permet pas la visualisation des tissus durs (os). La sensibilité de la méthode est faible (de l'ordre du mM), mais sa résolution spatiale est très bonne (de l'ordre de 100 μm) (Tableau V). Cette technique est sans doute la méthode d'imagerie structurelle la plus performante, mais la durée d'acquisition est relativement longue et son coût est important.

1.5. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire repose sur la détection de la désintégration d'atomes radioactifs entrant dans la structure de molécules dites radiopharmaceutiques, préalablement administrées au patient. La médecine nucléaire se distingue de la plupart des autres techniques d'imagerie médicale par l'obtention d'images physiologiques plutôt qu'anatomiques. Des molécules dont le comportement biologique est connu sont administrées au patient et leur comportement est étudié par le biais de l'imagerie d'émission. Les images obtenues peuvent être statiques, mais il est également possible d'obtenir des images dynamiques afin d'étudier divers processus vitaux (circulation et perfusion sanguine, métabolisme du glucose, taux de liaison ligand-récepteur, utilisation de l'oxygène...).

Deux technologies basées sur l'utilisation de radioéléments différents sont actuellement utilisées : la tomographie à émission de positrons (TEP ou PET pour « Positron Emission Tomography ») et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP ou SPECT pour « Single Photon Emission Tomography »).

La TEP est basée sur l'utilisation d'isotopes émettant des positrons, tels le fluor 18 (^{18}F), l'oxygène 15 (^{15}O), le carbone 11 (^{11}C) et l'azote 13 (^{13}N). Ces éléments ont une durée de vie courte, inférieure à deux heures. La TEMP utilise des traceurs émetteurs gamma ou émettant des photons X de haute énergie comme le technétium 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), l'indium 111c ($^{111\text{c}}\text{In}$) et l'iode 123 (^{123}I). Les traceurs étant spécifiques pour chaque cible étudiée, le nombre de processus étudiés sera limité par la production et la conservation du radiopharmaceutique.

Le 2-fluor-2-deoxy-D-glucose, un analogue du glucose dans lequel le groupement hydroxyle en 2 est remplacé par un atome de fluor radioactif (^{18}F -FDG), est le principal traceur utilisé en TEP. Il permet de suivre le métabolisme du glucose, et ainsi de localiser les cellules présentant un fort métabolisme du glucose telles les cellules tumorales. Il permet également de suivre la réponse à un traitement anti-tumoral, comme c'est le cas pour les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) en réponse à un traitement par Glivec® (Sullivan et Kelloff, 2005). L'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut également être imagée *in vivo* avec le ^{18}F -RGD (Haubner et coll., 2001a).

L'imagerie nucléaire est une méthode très sensible (10^{-14} - 10^{-15} M pour la TEP et 10^{-14} pour la TEMP) et présentant une bonne résolution spatiale (1.3 mm pour la PET et sub-millimétrique pour la TEMP) (Tableau V). Cependant, elle nécessite l'injection d'un radiopharmaceutique qui doit être synthétisé juste avant l'administration du fait de sa courte durée de vie. Cette dépendance en atomes radioactifs difficiles à produire (production en cyclotron pour la TEP et en générateur pour la TEMP), rend cette technique onéreuse. De plus, l'utilisation de sources radioactives en fait une technique lourde à utiliser en termes de mesures de sécurité et de protection.

1.6. Imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une technique utilisant les photons comme source d'information. Elle a fait ses preuves pour les applications *in vitro*, et est fortement répandue dans le domaine biomédical, notamment à l'échelle moléculaire (ADN, protéines) ou cellulaire (cytométrie en flux, marquages histologiques). *In vivo*, malgré de bons résultats précliniques et quelques applications cliniques, elle est encore peu employée, essentiellement par manque de traceurs. Cette technique présente de nombreux avantages et notamment sa large gamme d'applications allant des études au niveau moléculaire aux études cliniques.

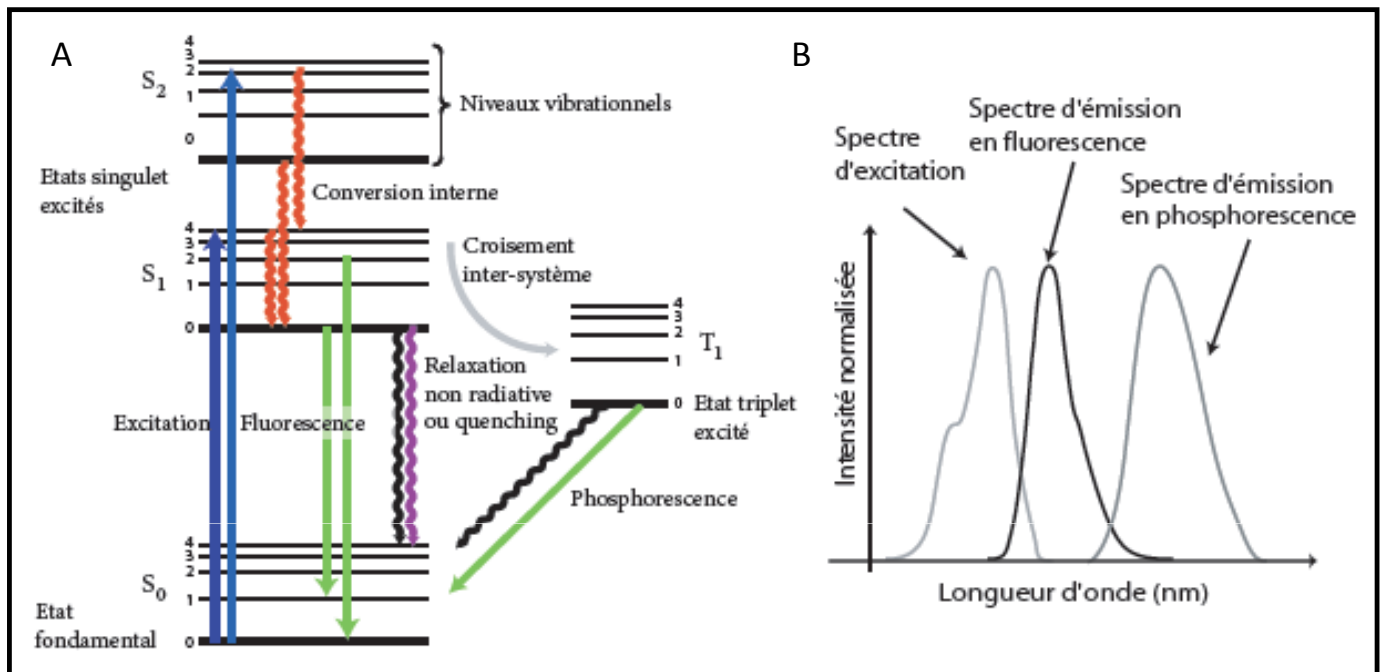


Figure 34. Diagramme de Jablonski.

[A] Ce diagramme illustre les différentes transitions électroniques et les différents phénomènes de désexcitation possibles. Une molécule possédant des propriétés de phosphorescence aura également des propriétés de fluorescence.

[B] Spectre de fluorescence d'une molécule avec son spectre d'émission de fluorescence et de phosphorescence.

La partie suivante rappellera le principe de la fluorescence, les avantages et les inconvénients de son utilisation en imagerie *in vivo*, et présentera les différents dispositifs d'imagerie ainsi que les principaux traceurs existants.

2. L'imagerie optique de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une méthode non invasive, rapide, peu coûteuse et très sensible, mais qui présente deux inconvénients *in vivo* : une faible résolution spatiale et une profondeur de détection limitée. Elle constitue cependant une méthode complémentaire de l'IRM ou de la médecine nucléaire (Frangioni, 2003). De plus, les temps d'acquisition courts en font la technique d'imagerie moléculaire la mieux adaptée aux méthodes de « screening ».

2.1. Principe

La fluorescence correspond à la lumière émise par une substance (molécule ou matériau) lorsqu'elle passe d'un état électronique excité à l'état fondamental.

Les différents processus électroniques engendrés par l'absorption de lumière par une substance fluorescente (également appelée fluorophore ou fluorochrome) sont représentés par le diagramme de Jablonski (Figure 34).

A température ambiante, l'énergie thermique n'est pas suffisante pour peupler les états excités singulet S1 et S2. C'est l'absorption de l'énergie lumineuse apportée par un photon qui permet de peupler ces états excités. Un fluorophore est généralement excité jusqu'aux niveaux vibrationnels élevés, avant de se relaxer rapidement jusqu'au niveau vibrationnel le plus faible de S1, par conversion interne. Le retour à l'état fondamental S0 peut alors avoir lieu par émission d'un photon, correspondant à la fluorescence, ou par désexcitation non radiative (principalement par dégagement de chaleur lors des collisions avec les molécules environnantes).

L'énergie libérée lors de l'émission de la fluorescence est inférieure à celle ayant permis l'excitation, une partie de l'énergie étant dissipée lors des phénomènes de conversion interne, après l'absorption. Les longueurs d'onde étant inversement proportionnelles à l'énergie du photon, la longueur d'onde d'émission sera décalée vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport à la longueur d'onde d'excitation. La différence entre les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission de fluorescence correspond au déplacement de Stokes.

Pour certaines molécules, une conversion inter-système autorise le peuplement de l'état excité triplet T1 depuis l'état excité singulet S1. Dans ce cas, le retour à l'état fondamental peut s'effectuer soit par émission de lumière (phosphorescence), soit par désexcitation non radiative. L'énergie libérée par la phosphorescence est plus faible que celle liée au processus de fluorescence, car l'état excité T1 est moins énergétique que S1.

La fluorescence est également caractérisée par différentes grandeurs caractéristiques qui sont les suivantes :

- **Longueurs d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence** : elles correspondent aux longueurs d'onde pour lesquelles l'absorption et l'émission sont maximales. Elles sont caractéristiques d'un fluorophore donné.
- **Rendement quantique de fluorescence** : c'est le rapport entre le nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés. Il correspond donc à l'efficacité relative de la fluorescence par rapport aux autres voies de désintégration.
- **Durée de vie de fluorescence** ou durée de vie de l'état excité S1 : c'est la durée moyenne pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de revenir à l'état fondamental. Elle est de l'ordre de la nanoseconde pour un fluorophore organique.
- **Photo-blanchiment** : à l'état excité, la molécule peut participer à diverses réactions chimiques (réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène. Ainsi, lorsqu'une solution de fluorophores est excitée, une certaine proportion d'entre eux peut être détruite à chaque instant par photo-blanchiment, engendrant une diminution de l'intensité de fluorescence au cours du temps pour une irradiation continue

2.2. Applications de la fluorescence pour l'imagerie in vivo

In vivo, il est possible de suivre des traceurs fluorescents en observant leur émission de fluorescence après les avoir excités par une source lumineuse. Cependant, pour que l'imagerie de fluorescence soit possible *in vivo*, il a fallu s'affranchir des limitations optiques existantes liées aux tissus vivants.

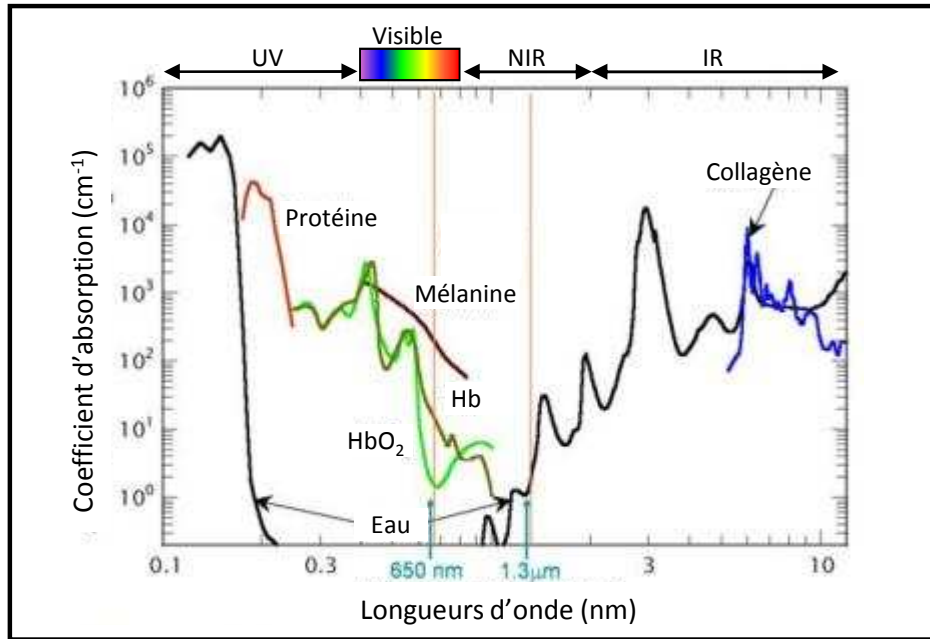


Figure 35. Spectres d'absorption des différentes composantes des tissus en fonction de la longueur d'onde.

D'après Mobley et Vo-Dinh, 2003.

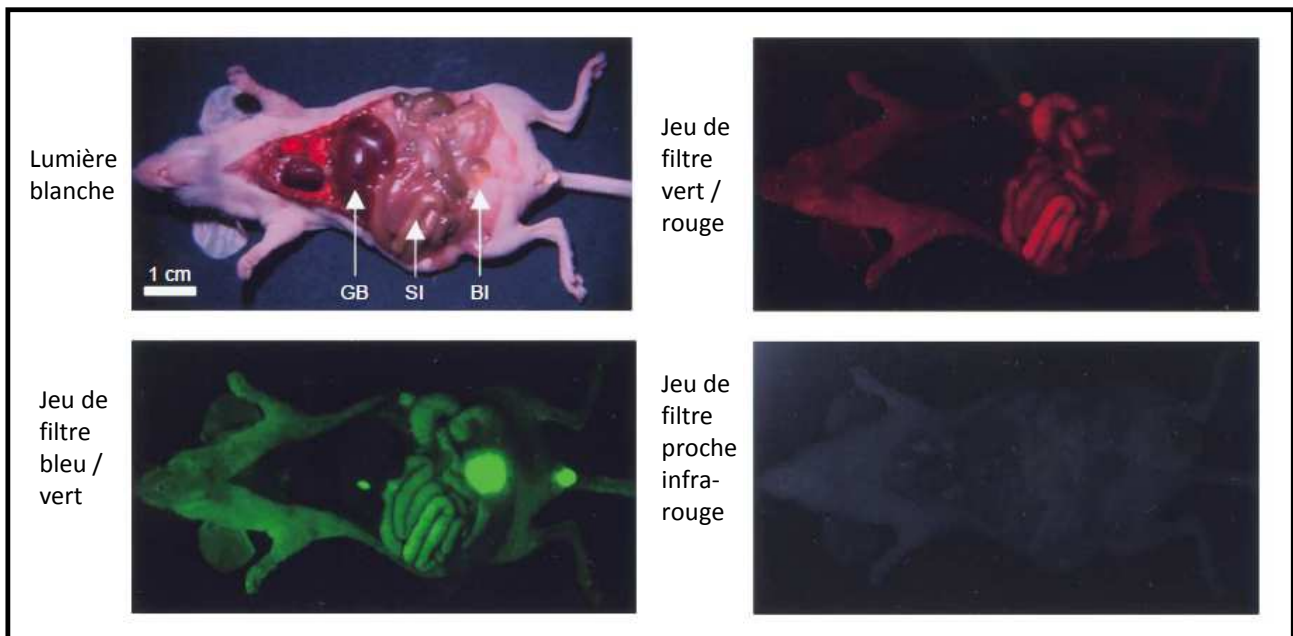


Figure 36. Auto-fluorescence des organes de la souris dans les différentes conditions optiques.

L'auto-fluorescence des tissus a été imagée en utilisant trois jeux de filtres (excitation / émission) différents : bleu/vert (460-550 nm/505-560 nm), vert/rouge (525-555 nm/590-650 nm) et proche infra-rouge (725-775 nm/790-830 nm). Toutes les images ont été normalisées de la même manière.

(GB : vésicule biliaire, SI : intestin, BI : vessie)

D'après Frangioni, 2003.

2.2.1. Les limitations optiques *in vivo*

In vivo, l'utilisation de fluorophores engendre un certain nombre de contraintes liées à la traversée des tissus par les rayonnements d'excitation et d'émission de fluorescence. Les principaux problèmes rencontrés sont les suivants :

- La **diffusion** des rayonnements d'excitation et d'émission de fluorescence au cours de la traversée des tissus provoque une perte importante d'intensité ainsi qu'une perte d'information, rendant difficile la localisation exacte du fluorophore dans l'organisme.
- L'**absorption** de la lumière d'excitation et de celle émise par le fluorophore conduit également à une perte de l'intensité de fluorescence.
- L'**auto-fluorescence des tissus**, correspondant à la fluorescence naturelle émise par de nombreux constituants des tissus (hémoglobines, porphyrines, ...), diminue le contraste de manière importante.

Afin de limiter ces inconvénients, il est important d'augmenter la sensibilité de détection des appareils utilisés, et de filtrer le rayonnement d'excitation diffusé. D'autre part, un rendement quantique de fluorescence et un déplacement de Stokes du traceur doivent être les plus élevés possibles.

Ces phénomènes gênants peuvent également être réduits par le choix de longueurs d'onde d'absorption et d'émission adéquates (dans le proche infra-rouge). En effet, le phénomène d'absorption du rayonnement par les tissus est fortement diminué avec l'utilisation de longueurs d'ondes comprises entre 650 et 900 nm. Cette fenêtre, située entre l'absorption de l'hémoglobine et celle de l'eau, semble être optimale (Figure 35). Enfin, l'auto-fluorescence est considérablement diminuée dans la fenêtre proche infra-rouge. Aux longueurs d'onde visibles, un certain nombre d'organes sont fluorescents (peau, intestin, vessie), alors que dans le domaine proche infra-rouge ils émettent très peu de fluorescence, permettant la visualisation des fluorophores injectés avec un contraste plus important (Figure 36) (Frangioni, 2003).

2.2.2. Les avantages de la fluorescence

En dépit de limitations liées aux propriétés optiques des tissus, l'imagerie de fluorescence présente de nombreux avantages lorsqu'elle est utilisée dans un domaine de longueurs d'onde donné allant de 650 à 900 nm. En effet, cette technique présente de nombreux intérêts en

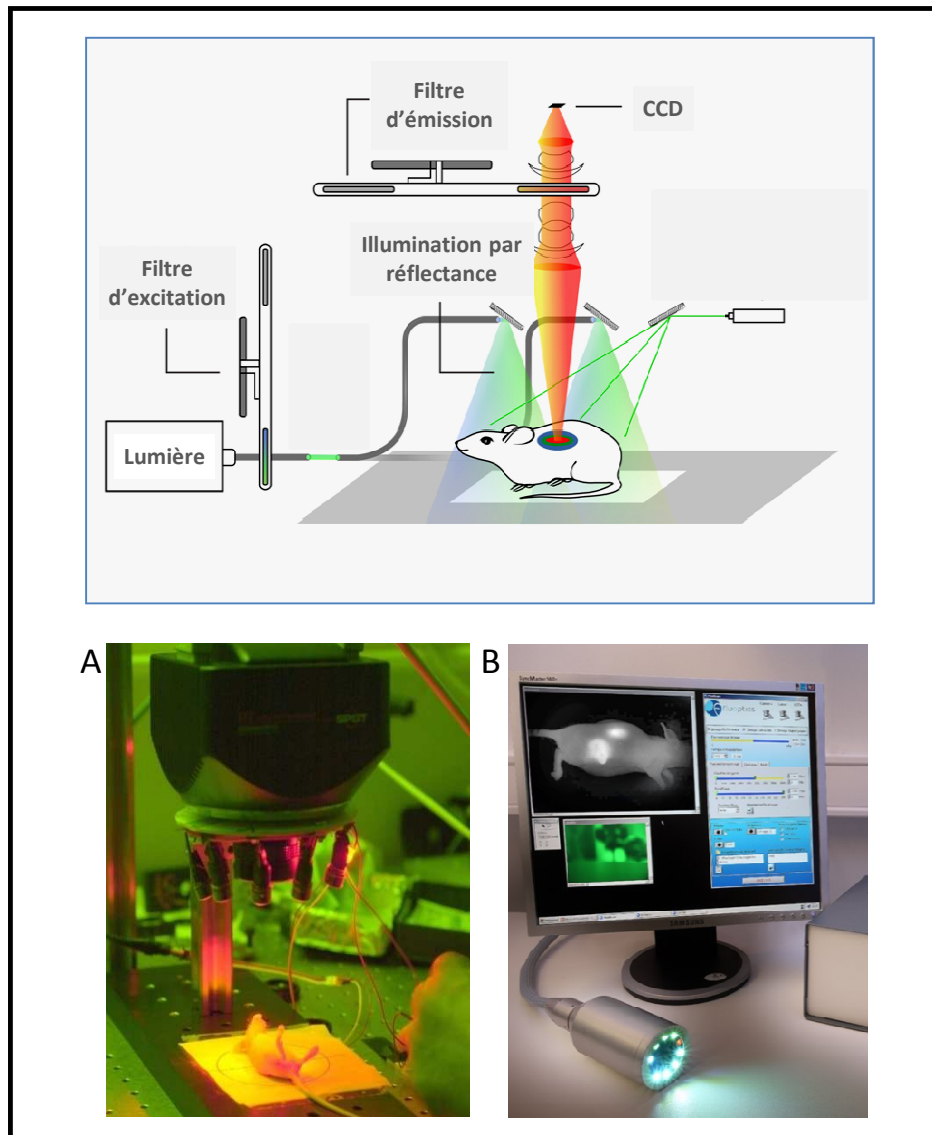


Figure 37. Système d'imagerie de fluorescence par réflectance (2D). Les traceurs fluorescents injectés sont excités à une longueur d'onde donnée. Le signal émis est capté par une caméra CCD, équipée de filtres capables de séparer le rayonnement d'excitation diffusé des signaux de fluorescence émis par les traceurs.
 [A] Système d'imagerie en 2D.
 [B] Sonde per-opératoire (Fluobeam[®], Fluoptics).

alliant une bonne sensibilité, un faible encombrement, des agents de contraste stables et elle n'utilise pas de radiations ionisantes. De plus cette technique est peu onéreuse à l'achat et au fonctionnement, ce qui en fait une modalité d'imagerie moléculaire de choix pour le petit animal.

Diverses applications sont envisagées. Tout d'abord chez le petit animal, l'imagerie de fluorescence est un outil pour la découverte de nouveaux biomarqueurs (ciblage des tumeurs, ...), mais également pour la découverte et l'évaluation de nouvelles thérapeutiques.

Des applications chez l'homme sont également envisagées, notamment en dermatologie, comme outil de diagnostic du cancer du sein, de détection de métastases ou de ganglions sentinelles en per-opératoire, de polypes précancéreux par endoscopie du colon, ou comme outil aidant à la chirurgie avec une meilleure délimitation des berges tumorales ou la détection de nodules non détectables visuellement et à la palpation.

2.2.3. Les dispositifs d'imagerie

L'imagerie de fluorescence *in vivo* nécessite l'illumination de l'animal afin d'exciter les fluorophores de façon continue. Il existe deux grandes techniques d'acquisition des données *in vivo* : acquisition par réflectance et par transillumination.

2.2.3.1. Imagerie de fluorescence par réflectance

L'imagerie de fluorescence (FRI en anglais pour « Fluorescence Reflectance Imaging ») est un système utilisant le principe de la réflexion du signal. Il permet l'obtention de clichés en deux dimensions. Le système est constitué d'une rampe ou d'une couronne d'illumination, dans notre cas une couronne de LED émettant à 633 ou 660 nm (Figure 37). La lumière pénètre à l'intérieur de l'animal et excite les traceurs préalablement injectés. Le signal émis est capté par une caméra CCD, équipée de filtres capables de séparer le rayonnement d'excitation diffusé (et d'éliminer les photons réfléchis directement par l'animal) des signaux de fluorescence émis par les traceurs. En effet, ces filtres laissent uniquement passer les longueurs d'onde supérieures à 665 ou 690 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation (633 ou 660 nm). Le temps d'acquisition d'une image est compris entre quelques millisecondes et quelques secondes. En se plaçant dans la fenêtre proche infra-rouge, la profondeur de détection est de 1 à 2 cm (contre 1 à 2 mm entre 450 et 650 nm), la sensibilité

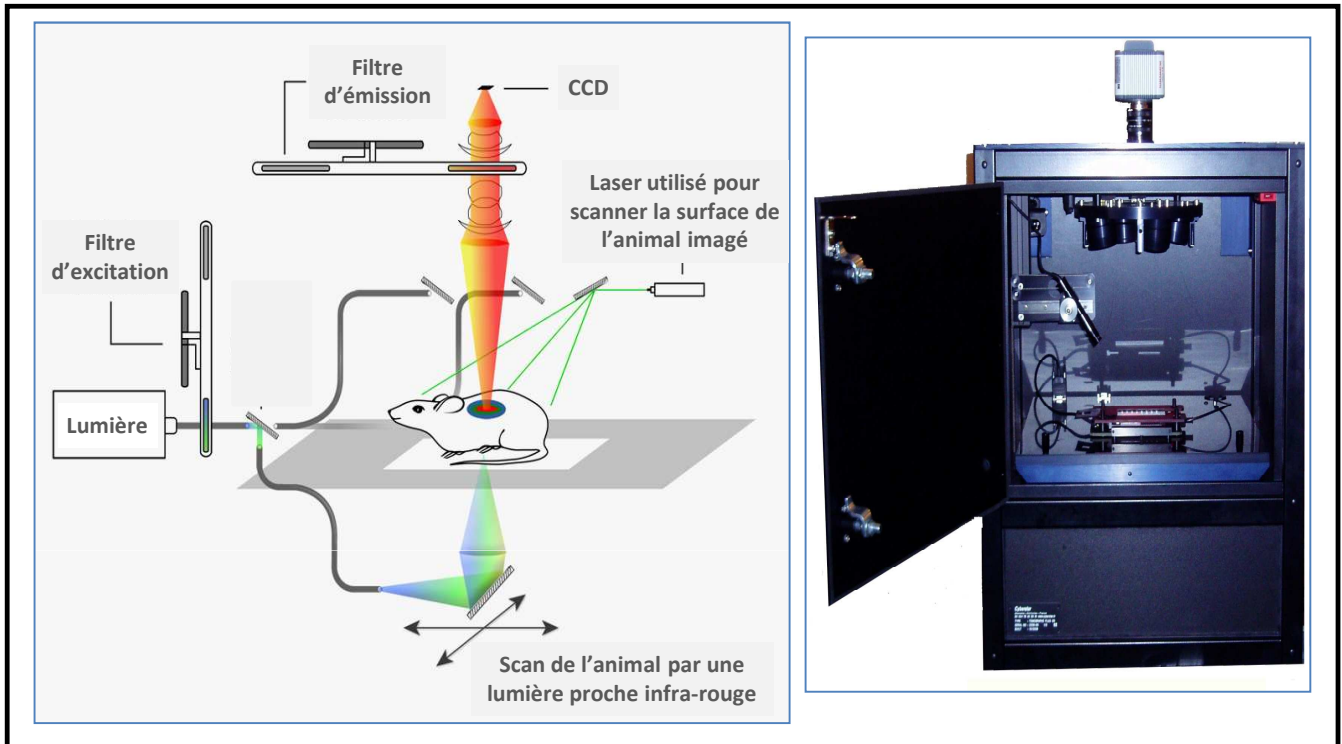


Figure 38. Système d'imagerie de fluorescence par transmission (3D).

L'acquisition est réalisée par transillumination. La souris est scannée par le dessous à l'aide d'un laser proche infra-rouge, la lumière transmise et la fluorescence émise sont recueillies par une caméra CCD. Après balayage précis de la surface d'intérêt par un laser et utilisation d'un algorithme de traitement du signal, il est possible d'obtenir des reconstructions en 3D incluant la localisation spatiale des sources fluorescentes.

est bonne (10^{-12} M) et la résolution spatiale varie entre 100 μm *in vitro* et 2 mm *in vivo*. Cette technique permet d'obtenir des informations semi-quantitatives (Tableau V).

Aux vues des développements récents de la 2D-FRI, des applications cliniques sont envisagées pour l'aide à la chirurgie des tumeurs. Le système Fluobeam[®] (Fluoptics, Grenoble) est un système portatif de 2D-FRI, fonctionnant sous la lumière scialytique du bloc opératoire (Kéramidas et coll., 2010). Un autre système per-opération a déjà été utilisé pour des essais précliniques (système FLARE, Fluorescence-assisted resection and exploration) (Trojan et coll., 2009).

A cause des problèmes d'auto-fluorescence et d'absorption, les organes profonds ou absorbants comme le foie, les poumons ou la rate ne peuvent pas être investigués par imagerie 2D-FRI. L'analyse de ces tissus nécessite l'utilisation d'un tomographe moléculaire de fluorescence (FMT pour Fluorescence Molecular Tomography) (Ntziachristos et coll., 2002).

2.2.3.2. Tomographie de fluorescence

La tomographie donne accès à des images en trois dimensions, permettant une vraie quantification du signal (indépendamment de la profondeur), tout en améliorant le contraste par diminution de l'auto-fluorescence (Koenig et coll., 2008).

Avec ce système, l'acquisition est réalisée par transillumination. La souris est scannée par le dessous à l'aide d'un laser proche infra-rouge, la lumière transmise et la fluorescence émise sont recueillies par une caméra CCD (Figure 38). En balayant de manière précise la surface d'intérêt et en utilisant un algorithme de traitement du signal, il est possible d'obtenir des reconstructions en trois dimensions incluant la localisation dans l'espace des sources de fluorescence.

Une imagerie plus profonde peut être réalisée, mais nécessite l'utilisation de lasers pulsés femtoseconde utilisé en mode FDOT temps résolu, qui sont relativement coûteux. En résumé, ce processus calcule et analyse le temps que chaque photon met pour être capté par la caméra après avoir traversé les tissus. Cette méthode sera bientôt transférée en clinique (Boutet et coll., 2009). En effet des travaux récents suggèrent qu'un signal fluorescent peut être obtenu pour des échantillons de 2 à 5 cm d'épaisseur, ce qui pourrait être suffisant pour réaliser une imagerie de la prostate.

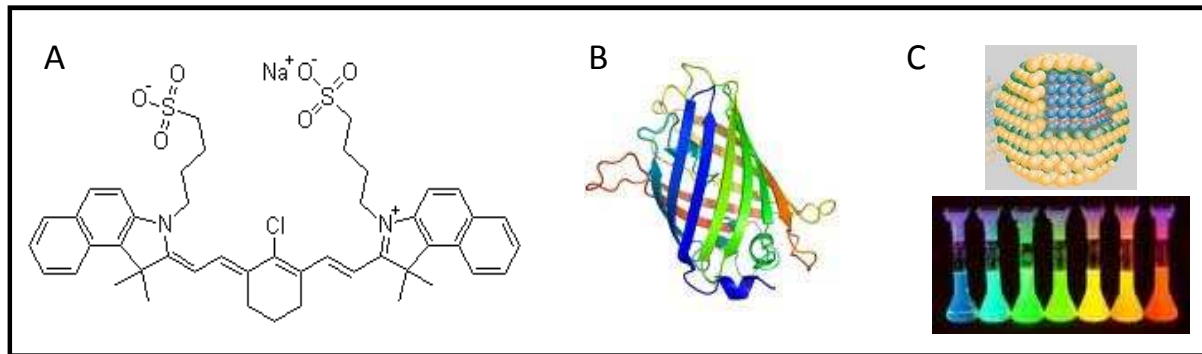


Figure 39. Exemples de traceurs fluorescents.

[A] Fluorophore organique (vert d'indocyanine ou ICG, « IndoCyanine Green »)

[B] Protéine fluorescente (« Green Fluorescent Protein » ou GFP)

[C] Nanocristaux semi-conducteurs ou quantum dots

2.2.4. Les traceurs fluorescents

Comme toutes les techniques d'imagerie moléculaire, l'imagerie de fluorescence nécessite l'injection de traceurs, qui sont dans le cas présent des fluorophores.

Les molécules et matériaux fluorescents utilisés couramment en imagerie de fluorescence sont classés en trois catégories, les fluorophores organiques, les protéines fluorescentes et les nanocristaux semi-conducteurs (Figure 39).

2.2.4.1. Les fluorophores organiques

Les fluorophores organiques sont des molécules possédant le plus souvent de nombreuses insaturations conjuguées dans leur structure.

Par exemple, le vert d'indocyanine (ICG en anglais pour « IndoCyanine Green ») est un fluorophore largement utilisé pour les expérimentations chez la souris, mais aussi chez l'homme puisqu'il fait partie des rares molécules fluorescentes autorisées par la FDA. L'ICG est utilisé dans le cadre d'études vasculaires, que ce soit dans l'œil, le cerveau ou le poumon (Frangioni, 2003).

Les marqueurs organiques fluorescents peuvent également être employés pour la visualisation des cellules tumorales *in vivo* chez le petit animal. Ainsi, des dérivés du glucose, comme le Cypate-mono-2-deoxy-glucose peuvent être utilisés. Ils sont rapidement absorbés par les cellules tumorales qui ont une forte consommation en glucose. Le cypate est un dérivé de l'ICG. Enfin, l'utilisation de fluorophores organiques de la famille des cyanine, couplés à des peptides ou des anticorps permettent de cibler spécifiquement certaines tumeurs (Hassan et Klaunberg, 2004).

2.2.4.2. Les protéines fluorescentes

A côté des fluorophores synthétiques, certaines protéines possédant naturellement des propriétés fluorescentes peuvent être utilisées en imagerie de fluorescence, comme par exemple la « Green Fluorescent Protein » ou GFP (Verkhusha et Lukyanov, 2004 ; Yang et coll., 2000). Cette protéine issue de la méduse (*Aequoria victoria*) émet dans le vert lorsqu'elle est excitée par une lumière bleue. Le gène codant pour cette protéine peut être utilisé comme gène rapporteur. La GFP est donc considérée comme un traceur activable. Elle permet l'étude du développement de diverses tumeurs chez la souris, mais également son développement embryonnaire (Hassan et Klaunberg, 2004). Cependant la GFP présente

l'inconvénient d'absorber dans le bleu et d'émettre dans le vert, longueurs d'ondes pour lesquelles les tissus absorbent fortement, rendant difficile sa détection au sein d'un animal vivant.

Au cours des dernières années, d'autres protéines fluorescentes ont été développées pour être compatibles avec l'imagerie de fluorescence *in vivo*, ainsi que pour élargir la palette de couleurs. La production de différentes protéines fluorescentes par différents gènes d'intérêt permet la visualisation simultanée de plusieurs processus biologiques.

Cette technique reste néanmoins difficilement applicable à l'homme car elle nécessite l'utilisation de cellules ou d'animaux transgéniques.

2.2.4.3. Les nanocristaux semi-conducteurs

Les nanocristaux semi-conducteurs ou boîtes quantiques (Michalet et coll., 2005) (ou « quantum dots » en anglais) sont des fluorophores très performants, dont le principal avantage réside dans le contrôle de la longueur d'onde d'émission, l'important déplacement de Stokes et leur faible photo-blanchiment. Leur taille est comprise entre 2 et 10 nm et ils sont constitués de matériaux semi-conducteurs tels que les couples cadmium/sélénium, cadmium/tellure, indium/arsenic ou indium/phosphore.

Du fait du confinement du semi-conducteur dans la nanoparticule, les électrons des nanocristaux ont des niveaux d'énergie discrets et quantifiés, qui peuvent être contrôlés par le changement de la taille et par la nature des atomes composant le nanocristal. Les propriétés de fluorescence découlant directement de ces niveaux d'énergie, le maximum d'émission de fluorescence peut ainsi être contrôlé.

2.2.4.4. Vers de nouvelles sondes nanoparticulaires biocompatibles

Les quantum dots possèdent d'excellentes propriétés optiques, cependant leur biocompatibilité, liée à leur composition et à leur métabolisation après injection, est au cœur de nombreuses interrogations. D'autres traceurs optiques nanoparticulaires ont été développés, telles les nanoparticules de silice (Yan et coll., 2007) ou de polymères (Pan et coll., 2004) qui encapsulent plusieurs molécules de fluorophores. Ces particules soulèvent néanmoins les mêmes questions que les quantum dots en termes de biocompatibilité et d'élimination.

Malgré tout, les avantages liés à l'utilisation des nanoparticules incitent à les développer pour l'imagerie de fluorescence. En effet, en véhiculant un grand nombre de fluorophores par

particule, ces systèmes peuvent augmenter la sensibilité de l'imagerie optique. La reconnaissance d'un récepteur par un ligand présent à la surface de la nanoparticule est ainsi associée à un nombre important de fluorophores, facilitant la détection de cette reconnaissance. De plus, encapsulés au sein de ces particules, les fluorophores présentent généralement une meilleure photostabilité. Enfin, une structure nanoparticulaire permet une plus grande versatilité et une approche multifonctionnelle associant diverses modalités d'imagerie et/ou d'agents thérapeutiques.

2.2.4.5. Vers des systèmes multi-modaux

Il existe aujourd'hui une véritable volonté de faire converger les différentes techniques d'imagerie dans le but d'améliorer le diagnostic, en couplant les informations anatomiques et biologiques (Cherry, 2006). Ainsi, le couplage d'une technique d'imagerie structurale à une technique fonctionnelle présente un grand intérêt : l'une possède une bonne résolution spatiale (CT, IRM) et l'autre une grande sensibilité (PET, SPECT et imagerie optique). Le but étant l'obtention d'un diagnostic aussi précis et précoce que possible.

Différentes études relatent le développement de nanoparticules « multi-modales ». En 2008, Chen et coll. synthétisaient des quantum dots marqués au cuivre 64 (^{64}Cu) capables de reconnaître le VEGF. L'imagerie de fluorescence et la TEP montraient un ciblage spécifique du récepteur au VEGF et une capture par le système réticulo-endothélial, avec une bonne corrélation des mesures réalisées *ex vivo* sur les organes. Dans une autre étude, la biodistribution de quantum dots marqués au fluor 18 (^{18}F) et encapsulés dans des micelles, a été réalisée par PET et l'internalisation intra-cellulaire a été évaluée à l'aide d'un système de fibre confocale (fluorescence) (Ducongé et coll., 2008). Les quantum dots sont captés lentement par le RES et présentent une demi-vie plasmatique d'environ 2h.

Des systèmes permettant une triple modalité d'imagerie ont également été développés (Devaraj et coll., 2009). Ces nanoparticules, constituées d'une coque de dextrans, sont marquées au fluor 18 contenant un cœur d'oxyde de fer superparamagnétique (^{18}F -CLIO). Elles sont visualisables par l'imagerie de fluorescence, l'imagerie nucléaire et l'IRM, dans le cadre d'études précliniques.

En conclusion, nous venons de montrer l'intérêt de l'imagerie moléculaire pour l'étude et la compréhension des pathologies, mais également pour leur détection et leur traitement. Parmi les diverses modalités d'imagerie, la fluorescence semble très avantageuse avec sa sensibilité, sa rapidité d'acquisition, son faible coût et son encombrement réduit. Toutefois, l'imagerie moléculaire est indissociable de l'administration de traceurs, qui seraient facilement modifiables pour pouvoir imager différents processus biologiques.

D'autre part, l'imagerie de fluorescence est un outil précieux pour la compréhension de la biodistribution et du comportement de nanoparticules *in vivo*. Elle permet d'évaluer rapidement les différentes modifications apportées, l'objectif étant d'obtenir un vecteur biocompatible et versatile capable de véhiculer un (ou des) agent(s) de contraste et/ou un agent thérapeutique.

Optical small animal imaging in the drug discovery process.

Dufort S.* and Sancey L.*, Wenk C., Josserand V., Coll J-L.

Biochimica and Biophysica Acta 2010 Mar

* co-premiers auteurs

Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging.

Sancey L.* and **Dufort S.***, Josserand V., Keramidas M., Righini C., Rome C., Faure A-C., Foillard S., Roux S., Boturyn D., Tillement O., Koenig A., Boutet J., Rizo P., Dumy P., Coll J-L.

International Journal of Pharmaceutics 2009 Sep 11; 379(2):309-16.

* co-premiers auteurs

Optical small animal imaging in the drug discovery process.

Dufort S* and Sancey L*, Wenk C, Josserand V, Coll JL.

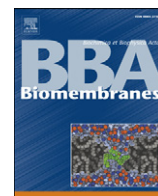
Acceptée dans *Biochimica and Biophysica Acta-Biomembranes*, février 2010.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

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

Review

Optical small animal imaging in the drug discovery process

S. Dufort^{a,b,c,1}, L. Sancey^{a,b,1}, C. Wenk^{a,b}, V. Josserand^{a,b}, J.L. Coll^{a,b,*}^a CRI-INSERM U823, Cibles diagnostiques ou thérapeutiques et vectorisation de drogues dans les cellules tumorales, Institut Albert Bonniot, BP 170, 38 042 Grenoble cedex 9, France^b Université Joseph Fourier, BP 53, 38 041 Grenoble cedex 9, France^c UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, pôle de biologie et pathologie, CHU de Grenoble, BP 217, 38 043 Grenoble cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2009

Received in revised form 15 March 2010

Accepted 17 March 2010

Available online xxxx

Keywords:

Drug delivery

Optical imaging

Tumor targeting

ABSTRACT

Molecular imaging of tumors in preclinical models is of the utmost importance for developing innovative cancer treatments. This field is moving extremely rapidly, with recent advances in optical imaging technologies and sophisticated molecular probes for *in vivo* imaging. The aim of this review is to provide a succinct overview of the imaging modalities available for rodents and with focus on describing optical probes for cancer imaging.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	0
2. Commonly used small animal imaging technologies	0
2.1. X-ray computed tomography (CT)	0
2.2. Magnetic resonance imaging (MRI)	0
2.3. PET and SPECT	0
2.4. Optical imaging	0
3. Fluorescent optical probes	0
3.1. Receptor-targeted probes	0
3.2. Activatable molecules for fluorescent imaging	0
3.3. Nanoparticles developed for <i>in vivo</i> applications	0
4. Conclusion	0
References	0

1. Introduction

Molecular imaging can be used as a non-invasive means to evaluate pathophysiological processes, such as cancer, in rodents.

Indeed, these techniques provide real-time information for early diagnosis, allow longitudinal follow-up of tumor development, and facilitate studies of therapeutic activity and antitumor efficacy of new anti-cancer drugs. Because drug development is an expensive and

Abbreviations: CT, X-ray computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; PET, positron emission tomography; SPECT, single photon emission computed tomography; ¹⁸F, fluorine-18; ¹⁵O, oxygen-15; ¹³N, nitrogen-13; ¹¹C, carbon-11; ¹²³I, iodide-123; ¹²⁵I, iodide-125; ^{99m}Tc, technetium-99m; NIR, near-infrared; BLI, bioluminescence; 2D-FRI, two-dimension fluorescence reflectance imaging; GFP, green fluorescent protein; CCD, charge-coupled device; FMT, fluorescence molecular tomography; FDOT, fluorescence diffuse optical tomography; EGF, epidermal growth factor; EGFR, EGF receptor; HER-2, epidermal growth factor receptor 2; RGD, Arg-Gly-Asp peptide; RAFT, regioselectively addressable functionalized template; cRGD, cyclic RGD; SNR, signal-to-noise ratio; ICG, indocyanine green; MMP, matrix metalloproteinases; AOMK, acyloxymethyl ketone; RTK, receptor tyrosine kinase; EPR, enhanced permeability and retention; ROS, reactive oxygen species; uPA, urokinase plasminogen activator; uMUC-1, underglycosylated mucin 1; siRNA, small interfering RNA; PAT, Process Analytical Technologies

* Corresponding author. INSERM U823, Equipe 5, Institut Albert Bonniot, BP 170, 38 042 Grenoble cedex 9, France. Tel.: +33 4 76 54 95 53; fax: +33 4 76 54 94 13.

E-mail address: Jean-Luc.Coll@ujf-grenoble.fr (J.L. Coll).

¹ These authors contributed equally to this work.

0005-2736/\$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.016

Please cite this article as: S. Dufort, et al., Optical small animal imaging in the drug discovery process, *Biochim. Biophys. Acta* (2010), doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.016

complicated process with an extremely slim chance of success for any given molecule, molecular imaging can play an important role in drug discovery in the laboratory, during the translation phase from *in vitro* assays to preclinical systems, and eventually in evaluating the biodistribution, pharmacokinetics and biological activity of potential therapeutics molecules [1].

These applications necessitate the generation of suitable imaging devices and imaging probes. This review presents the most commonly used methods for small animal imaging. We will focus mainly on optical imaging techniques and probes that are actively being developed for their sensitivity, inherent biological safety, and relative ease of use (see Table 1). In addition, we will present the translation of novel optical devices, methods and techniques into the clinic, which are areas of increased interest.

2. Commonly used small animal imaging technologies

2.1. X-ray computed tomography (CT)

CT is very commonly used on human patients, but until recently its application in rodents has been limited by its spatial resolution. X-rays are absorbed to varying degrees by different biological tissues. Recently, micro-CT devices have been developed to image rodents with a spatial resolution ranging from 10 to 100 μm [2]. Micro-CT is a powerful and cost-effective method for imaging soft-tissue structures, skeletal abnormalities and tumors. Micro-CT systems provide excellent sensitivity for skeletal tissue (Table 1).

2.2. Magnetic resonance imaging (MRI)

MRI is another standard method of clinical imaging, and recent improvements and adaptations have expanded its use to specialized animal facilities. ^1H -MRI is based on the fact that when a sample lying within a magnetic field is subjected to a radio-frequency pulse its protons absorb energy and generate a detectable signal during the relaxation phase. The strength of the signal is a function of the number of protons. The relaxation process can be described by two fundamental rate constants: T1 (longitudinal relaxation) and T2 (transverse relaxation) [3]. The sensitivity of this method is low (mM concentrations) but its spatial resolution is extremely good (μm). MRI is very useful for detecting tumors and measuring morphologic parameters. Because there is no damaging radiation, multiple imaging sessions can be performed safely, allowing longitudinal follow-up of tumor growth. Finally, contrast agents influencing either the T1 or T2 relaxation time constants are being developed to allow functional imaging [4–7].

2.3. PET and SPECT

Positron emission tomography (PET) requires the use of radioactive isotopes that emit positrons, such as ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N , and ^{11}C [8], while SPECT (single photon emission computed tomography) uses tracers that emit gamma ray or high-energy X-ray photons, such as ^{123}I , ^{125}I , and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Positrons move a short distance through tissues, losing energy as they collide with other molecules, and eventually

combine with electrons (“annihilation”), producing two high-energy gamma rays or photons traveling outward and in opposite directions. In SPECT, a single photon per event is directly emitted, and this photon interacts with electrons and nuclei of nearby atoms within the tissue. Unlike positrons, these energetic photons do not “slow down” but are attenuated. Because there is only one photon per event, electronic collimation is not possible, and a physical collimator must be added. Sensitivities are on the order of 10^{-14} – 10^{-15} M for PET and 10^{-14} M for SPECT, and spatial resolution can reach 1.3 mm for PET and is sub-millimetric for SPECT [9]. PET and SPECT give information about physiological functions at the molecular level and are thus well suited to monitoring many vital processes, such as glucose metabolism, blood flow and perfusion, receptor-ligand binding rates, and oxygen utilization.

2.4. Optical imaging

Optical imaging is based on the detection of light passing through the tissues. Several major obstacles must be resolved for optical imaging, including surface reflectance, absorption, scattering (deviation of the photon from its original path) and autofluorescence. Absorption and autofluorescence are important factors in fluorescence imaging in the visible wavelengths (400–650 nm) but are less problematic in the near-infrared (NIR) (650–900 nm). Above 900 nm, however, water absorption is an issue because it prevents deep penetration of the light. Absorption is affected by the thickness and optical properties of the tissues. The body heterogeneity will compromise the linearity of measurements. *In vivo*, scattering of far-red photons affects the spatial resolution, which is dependent on the depth of observation. Spatial resolution is mainly affected by an animal's skin, which reflects light, but intravital microscopy greatly improves the resolution [1].

Light can be produced in live animals by two main types of reaction: bioluminescence (BLI) and fluorescence (for reviews see [10,11]). BLI is based on the self-emission of green to yellow light due to the oxidation of luciferin in the presence of luciferase enzymes (Firefly, Renilla, Aequoria...). BLI has minimal background signal and an excellent signal-to-noise ratio (SNR). Acquisition times range from seconds to minutes.

Two-dimensional fluorescence reflectance imaging (FRI) uses fluorescent probes to produce detectable signals (Fig. 1). In FRI, the sample is submitted to an NIR light (excitation) that can be absorbed by the fluorescent probe, which then emits light (fluoresces) at a longer wavelength as it returns from an excited electronic state to its ground level. The probe could be a protein (e.g., green fluorescent protein (GFP) or DsRed) present in genetically modified animals or cells or an exogenous fluorophore. Because these fluorescent proteins are not excitable in the far-red or NIR spectrum, but only in the 450–650 nm window, they are not well adapted to whole-body small animal imaging, and their detection is limited by depth (typically 1–2 mm). In contrast, some other fluorophores (such as cyanines, quantum dots, and lanthanides) can be excited in the far-red window, allowing deeper detection (typically 1–2 cm). Sensitivity is very good (10^{-12} M), spatial resolution varies from 100 μm *in vitro* to 2 mm *in vivo* and temporal resolution is in the range of milliseconds to seconds. However, 2D-FRI is highly surface-weighted, and quantification is at best semi-quantitative.

Recent development of 2D-FRI may allow its application in the clinic for improving cancer surgery. The Fluobeam® system (Fluoptics, Grenoble, France) uses a laser and small charge-coupled device (CCD) camera within a portable 2D-FRI system. It can function under the normal light of an operating room [12]. Another intraoperative device, the FLARE system (fluorescence-assisted resection and exploration), has already been used in preclinical trials [13–15].

Because of problems with absorption and autofluorescence, deep and absorbing tissues like lung, spleen or liver cannot be investigated

Table 1
Characteristics of the different imaging devices.

Technique	Resolution	Depth	Time	Quantitative	Clinical use
CT	20 μm	No limit	Minutes	Yes	Yes
MRI	10 μm	No limit	Minutes to hours	Yes	Yes
PET	1–2 mm	No limit	Minutes to hours	Yes	Yes
SPECT	1 mm	No limit	Minutes to hours	Yes	Yes
FRI	μm to mm	<1 cm	Seconds	No	Yes
FMT	1 mm	<5 cm	Minutes to hours	Yes	Soon
BLI	1 mm	<1.5 cm	Minutes	No	No

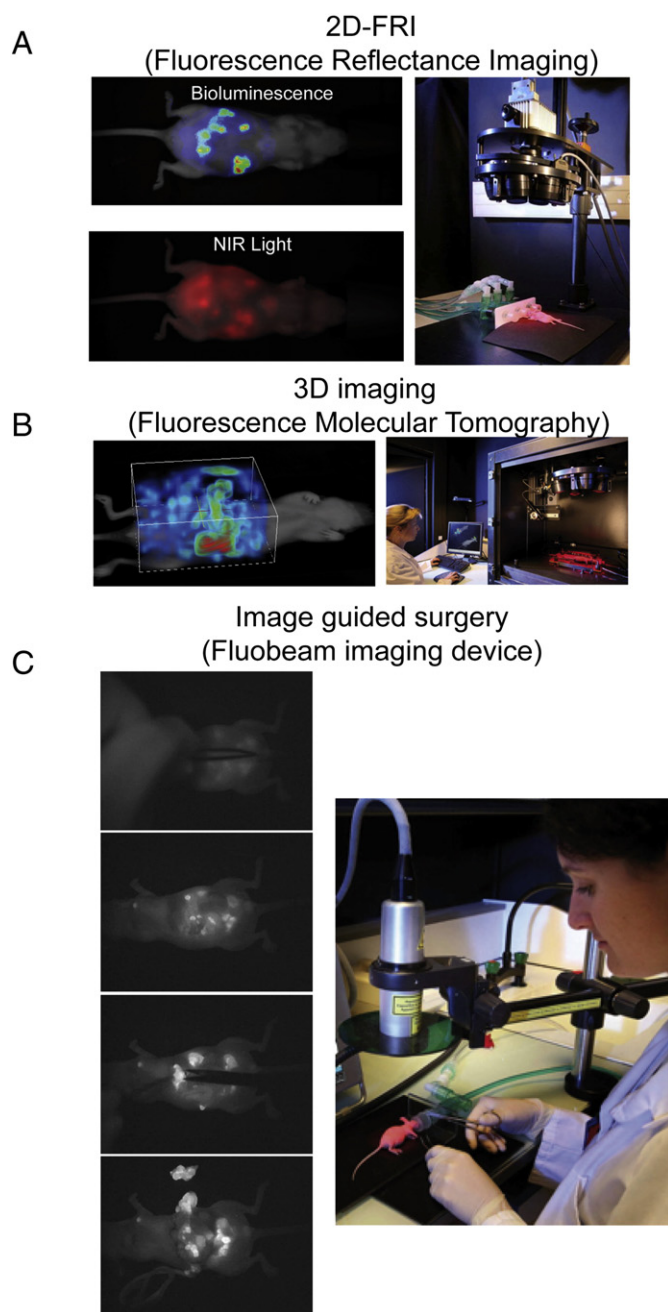


Fig. 1. Optical imaging of peritoneal carcinomatosis. (A) Tumor cells stably transfected with a luciferase reporter gene are injected into the peritoneal cavity of the mouse (top left image). The presence of small nodules is detected 12 days later using bioluminescence. The same nodules are also detected using 2D near-infrared fluorescence (bottom left image) due to the intravenous injection of 10 nmol Angiostamp (multimeric RGD compound described in [34–39,63–65]) the day before imaging using the 2D-FRI imaging system presented on the right. (B) Angiostamp-labeled nodules of the same animal can also be visualized in 3D using the tomographic system. (C) Optic-guided surgery can then be performed under near-infrared excitation using the Fluobeam device even when the surgical white light is illuminating the field of operation, allowing the surgeon to detect easily and remove all the labeled tumors as presented in the 4 consecutive images on the left.

non-invasively using 2D-FRI. Imaging these tissues requires the use of fluorescence molecular tomography (FMT) [16]. FMT provides 3D volumetric imaging, true quantification independent of depth, tissue optical properties and heterogeneity, and augmentation of the contrast by reducing the autofluorescence. Detecting deep events requires transillumination to avoid autofluorescence [17]. Transillumination can be done using a simple optical bench adapted to

continuous wave acquisitions [18–20]. The mouse is scanned with an NIR laser light, and the transmitted and emitted fluorescence are recorded allowing construction of a 3-D fluorescence map. Deeper imaging can be obtained using time-resolved imaging. Deeper imaging necessitates the use of expensive femtosecond pulsed lasers and must be used in the time-resolved FDOT mode. Briefly, this process calculates and analyzes the time that each photon travels, whereas the photons are “simply” captured by the CCD as they arrive in continuous acquisition. This method will soon be transferred to the clinic for imaging deep events [21]. Recent work suggests that a fluorescent signal can be obtained in samples 2 to 5-cm thick, which could be sufficient, for example, for prostate imaging.

3. Fluorescent optical probes

As mentioned above, optical imaging of small animals requires the use of imaging devices and of fluorescent probes adapted to functional imaging. Several types of probes can be classified into three different categories, as summarized by R Weillsleider [22]. The simplest probes are usually large molecules that remain in circulation in the blood and can provide information about physiological processes, such as changes in blood volume, perfusion and angiogenesis. The second probe category targets a specific molecule, including receptors for somatostatin, epidermal growth factor (EGF), integrins, folate, or antigen-targeted antibodies, and can be used to visualize pathological tissues and/or monitor the expression level of a target. The third group of probes is composed of “smart probes” that undergo a change in optical properties when in contact with their targets (Fig. 2). These activatable probes are well adapted for detecting thio-reductases, proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs), cathepsins, caspases, or other enzymes and physicochemical parameters. In this chapter, we will focus on “targeted” and “activatable” probes; finally, we will describe the use of nanoparticles as optical imaging tools.

3.1. Receptor-targeted probes

Early diagnostics and image-guided tumor surgery are two key objectives of optical imaging. Kobayashi and colleagues developed several activatable probes and multicolor and multimodality imaging systems to enhance surgical outcomes. They demonstrated the feasibility of simultaneous visualization of two fluorophores using either a transfected cell line and an anti-HER2 antibody coupled with rhodamine G, or two antibodies labeled with two different fluorophores [23–25]. The next stage of development for this technique will concern the fluorophores themselves, as only one compound, indocyanin green (ICG), is currently approved for medical use.

Probes containing the Arg-Gly-Asp motif (RGD) have been intensively developed to follow expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ [26], a protein that is expressed by the neo-endothelial cells that form tumor blood vessels and is also frequently overexpressed on tumor cells themselves, such as in lung cancers [27,28], melanomas [29,30], brain tumors [31] or breast cancers [32]. Because of the extraordinary potential of RGD derivatives as tumor targeting ligands, several teams have developed probes with improved receptor specificity and affinity. The first example, c(-RGDf[NMe]V), known as cilengitide, was developed through extensive work by Kessler et al. and has entered phase II trials for patients with glioblastoma. More recently, this group designed new molecules that could be even more specific and are capable of recognizing the $\alpha_v\beta_3$ or $\alpha_5\beta_1$ integrins [33]. RGD utility has also been greatly improved with the construction of scaffolds or polymers that allow multimeric presentation of the RGD triad. For example, our group developed a scaffold containing four copies of c(-RGDfK-) and compared its specificity *in vitro* and *in vivo* as well as its accumulation in tumors in $\alpha_v\beta_3$ -positive tumor-bearing mice. The tetrameric RGD-probe showed a better affinity toward $\alpha_v\beta_3$, improved active internalization into the target cells and an

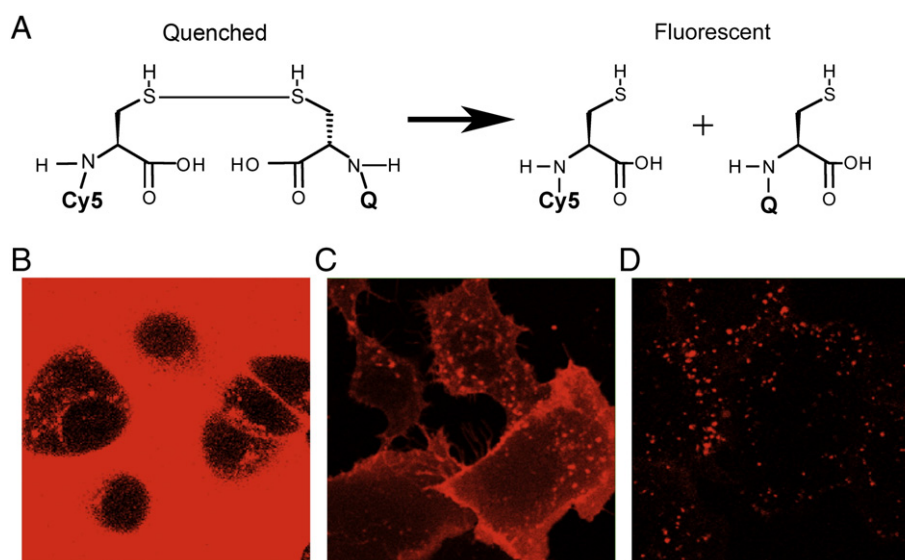


Fig. 2. Use of a quenched probe. (A) Schematic representation of the quenching system, containing a disulfide bridge to separate the quencher from the fluorescent cyanine 5 (Cy5) molecule. When the distance between the quencher and the Cy5 increases, the molecule becomes visible. (B) When the RAFT-RGD-Cy5 [35,37,39] probe is present in the culture medium without the quenching system, the cells are barely visible under the confocal microscope due to the surrounding fluorescence. (C) After removing the excess of RAFT-RGD-Cy5 from the medium, the cells are visible because the probes are attached to and internalized within the cell. (D) However, when a quenched probe is used, only the signal coming from the probe that is reduced during its internalization is visible, and the live cells can be observed even with a large excess of invisible quenched probe in the culture medium.

augmented SNR *in vivo* compared to the monomeric molecule [34–39]. Because of their specific targeting properties, RGD probes can be used to monitor the efficacy of an anti-integrin or anti-angiogenic treatment non-invasively and in real time, as demonstrated in an orthotopic glioblastoma model [40]. In our laboratory, we also showed the utility of visualizing the multimeric RAFT-cRGD molecule using the portable intraoperative Fluobeam® imaging device to improved the quality and outcome of tumor surgery (Fig. 1) [12].

Monitoring the efficacy of recently developed anti-EGF receptor (EGFR) cancer treatments is of the utmost importance. To assess EGF binding/anti-EGF treatments efficacy and cell viability, anti-EGFR coupled with IRDye® 800 CW (LI-COR, NIR800) and annexin-V coupled with IRDye® 700DX (LI-COR, NIR700) were used to follow EGFR expression in colorectal tumors-bearing mice [41]. This study showed that anti-EGF-NIR800 accumulated more actively in tumors expressing high levels of EGFR and, annexin-V-NIR700 staining intensity was elevated in sensitive tumors treated with cetuximab compared to control groups. These imaging approaches may prove useful for serial, non-invasive monitoring of the biological effects of EGFR inhibition in preclinical studies and may also be adapted for clinical use. As described for cRGD, cyanine 5.5-labeled cetuximab has also been used to improve tumor resection and margin prevention in head and neck carcinomas [42].

3.2. Activatable molecules for fluorescent imaging

Optical imaging is the method of choice for functional, real-time, *in vivo* monitoring because it provides an “easy” approach for measuring enzymatic activities, thus enabling researchers to follow, for example, the activation of signal transduction pathways, target gene expression and drug–target interactions [43]. It also allows the *in vivo* analysis of drug efficacy and pharmacodynamic properties.

Several proteases are overexpressed or activated during cancer progression and are thus attractive targets for the so-called “smart” probes, also known as activatable molecules (Fig. 2). Activatable means that a change in signal intensity or wavelength can be detected in response to the interaction of the probe with its target [19,44]. Activatable molecules have several advantages, including minimal non-specific background and improved contrast in the targeted organ [43,45,46]. Proteases were the first enzymes to be targeted in this way,

as described for cathepsins (cathepsin B and cathepsin D for cancer progression and cathepsin K for the detection of osteoclasts), caspases-1 and -3 (indicators of apoptosis) and MMPs 2, -7, -9, and -14 (inflammation and cancer) [22,47–49]. Because the signals produced by these probes are a direct function of their biological activity, smart probes can be used to measure the activity of a drug on its target [50–54].

One of the first NIR activatable probes, described by Weissleder et al., is a polymer of poly-L-lysine and methoxypolyethylene glycol succinate [55]. This probe has a long circulation time, and its fluorescence is quenched in the presence of a high concentration of fluorescent molecules. A detectable NIR signal is (re)-generated when these self-quenched molecules are digested by lysosomal proteases after internalization in the target tumor cells, allowing the detection of sub-millimeter-sized nodules. A similar strategy was used to detect cathepsins B, K, L, and S in cardiac pathologies [56] and image cancer in mouse model of adenoma of the gastrointestinal track [57], or rhabdomyosarcoma [58].

In vivo monitoring of apoptosis is also of great interest. Using a self-quenched caspase-activatable peptide (TcapQ647), Bullok et al. measured *in vivo* apoptosis that was induced by bacterial infection. Activation of the probe was confirmed by *ex-vivo* TUNEL analysis of the tissues and by detection of activated caspase-3 [59]. However, good enzymatic specificity is still an issue facing this technique. For example, it is difficult to design a caspase-specific probe that has low cross-reactivity for cathepsins or legumain. To circumvent this problem, Edgington et al. developed NIR activity-based molecules that form permanent covalent bonds with target proteases, based on acyloxymethyl ketone (AOMK) probes. These probes can be used to monitor early stages of apoptosis using whole-body, non-invasive optical imaging, as demonstrated in human colorectal tumor-bearing mice [60].

The search for new drugs capable of inhibiting receptor tyrosine kinases (RTK) such as EGFR is currently a major issue for cancer treatment. To assess drug efficiency against EGFR, a novel bioluminescent-based approach using a bifragment luciferase reconstitution system was recently reported [61]. EGFR and its interacting partner proteins were fused to the NH₂- and COOH-terminal fragments of firefly luciferase. This method allowed the identification and quantification of EGFR activation in mice before and after anti-EGFR

treatments, such as gefitinib or radiotherapy. This technique is a promising tool that could enhance the preclinical evaluation of novel RTK-targeted therapeutics.

Other activatable compounds have been developed to target viable cancer cells. Urano et al. made a pH-activatable probe coupled to the anti-HER-2 monoclonal antibody trastuzumab. In mice bearing subcutaneous tumors, the probe was highly specific for HER-2-positive tumors with a minimal background signal. Because the energy-consuming proton pumps maintain an acidic pH in lysosomes, only viable HER-2-positive cancer cells showed a high signal [62]. The intracellular redox environments of viable cells can also be used to design probes in which fluorescence will be released after rupture of a disulfide bridge during following internalization. Our group used this method to design RGD-based targeted probes that allow the tracking of a pro-apoptotic toxic peptide released within the target cells [63–66].

3.3. Nanoparticles developed for *in vivo* applications

During the last few years, a wide variety of nanoparticles were developed as contrast agents for *in vivo* fluorescence imaging applications. Due to their size, these particles offer new structural and optical properties. They have better signal intensity than organic fluorophores, enabling detection of weakly expressed targeted biomarkers. In addition, because of their relatively large surface area, nanoparticles can accommodate multiple probes, enabling multivalent targeting of several biomarkers and thus increasing the affinity of each individual probe. All of these properties make nanoparticles good candidates for biomedical imaging, therapeutic applications or a combination of both (theranostics).

Quantum dots (QDs) are the most extensively described and studied nanoparticles [67–76]. These small nanocrystals are made of semiconductive material and have an emission color that can be precisely tuned by adjusting their composition and size [77]. They can thus be used across a wide spectrum, from the ultraviolet to the NIR and are also photostable and extremely bright [78]. Recently, QDs were also encapsulated in phospholipid micelles to image tumors [79,80]. The encapsulation of QDs enhanced their biodistribution and their passive accumulation in tumors. Various nanoparticles have also been developed for *in vivo* fluorescence imaging applications: these nanoparticles include gold nanoparticles [81,82], hybrid nanoparticles [83–86], C dots [87], lipid nanoparticles [88], liposomes [89], polymeric nanoparticles [90,91], and biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles [92].

Several applications have been developed using these new contrast agents. In 2004, Kim et al. demonstrated that QDs translocated to sentinel lymph nodes after intra-dermal injection, likely due to a combination of passive flow in lymphatic vessels and active migration of dendritic cells that had engulfed the nanoparticles [70]. This application could have a great clinical impact, enabling surgeons to rapidly identify and excise draining lymph nodes from tumors for staging cancer using optical guided surgery [93]. The major limitation of QDs is their possible toxicity, which thus far precludes their use in humans. A recent study found no appreciable toxicity of QD, even after their breakdown *in vivo* [94]; however, because of their different chemical formulations and nanoparticle structures, the absence of toxicity of each type of QD, as well as that of each of its byproducts, must be very carefully investigated. Currently, this technique has been used to localize various cancers in animal models, including subcutaneous tumors [95], lungs [71,72], esophagus [73], and head and neck [76].

The key challenge for *in vivo* imaging applications is to develop nanoparticles with an optimized biodistribution. Several studies have shown the particular importance of particle size, PEGylation and surface coating. These properties affect the mean of accumulation in and elimination from tumors through the enhanced permeability and retention (EPR) effect (Fig. 3) [83,95,96]. Indeed, during tumor-

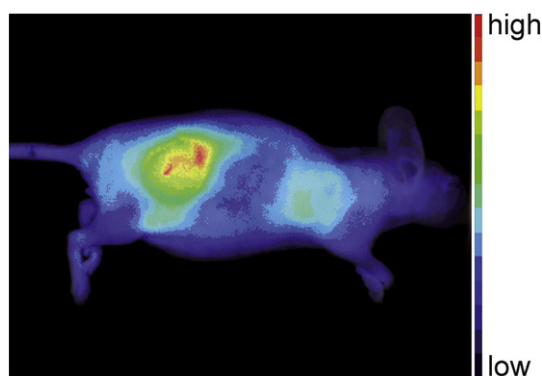


Fig. 3. The EPR effect allows passive targeting of a nanoparticle into a subcutaneous tumor. Intravenous injection of a solid PEG2000-coated particle in a *nude* mouse bearing a subcutaneous tumor. Fluorescence image obtained 24 h after injection shows the accumulation of the nanoparticle in the tumor, due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect.

induced angiogenesis, blood vessels are abnormal and present large pores, allowing the extravasation of macromolecules up to 400 nm in size, that can accumulate in the tumor microenvironment [97]. This EPR effect has inspired the development of a variety of nanoparticles to treat and image tumors. Several groups have studied the biodistribution of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles loaded with cisplatin, camptothecin or paclitaxel by *in vivo* NIR imaging [98–100]. These groups have found a passive but specific accumulation in subcutaneous tumors due to the EPR effect, as well as increased effectiveness of encapsulated drugs compared to free drugs.

To improve the tumor targeting selectivity, specific ligands can be grafted onto the surface of nanoparticles. Again, one of the most commonly described ligands for tumor targeting is the RGD peptide [69,75,101], though several specific other tumor ligands have also been investigated. *In vivo* targeted imaging was demonstrated in a mouse model, using a copolymer functionalized QD conjugated to an antibody that targets a prostate-specific membrane antigen [68]. Gold nanoparticles labeled with anti-EGFR monoclonal antibodies also have a large range of potential applications, from the cellular to the animal levels [81]. Lee et al. [102] recently developed a multifunctional gold nanoprobe for sensitive detection of reactive oxygen species (ROS) and hyaluronidase, which could be used for localized detection of hyaluronic acid degradation due to the diseases such as rheumatoid arthritis and metastatic tumors. Yang et al. described iron oxide nanoparticles that target urokinase plasminogen activator (uPA) receptor and demonstrated their usefulness in detecting breast and pancreatic cancer [91,103].

Finally, nanoprobe can also be powerful tools for evaluating the efficiency of targeted cancer therapies. Medarova et al. [104] described a tumor-specific contrast agent (iron oxide nanoparticles labeled with Cy5.5 dye) targeting underglycosylated mucin 1 (uMUC-1), a tumor antigen present on more than 90% of breast cancers and predictive of chemotherapeutic response. After doxorubicin treatment, nanoparticle probes were present at a lower level in the treated tumors compared to untreated tumors, reflecting the reduced expression of uMUC-1. To confirm these findings, similar results were obtained using *in vivo* fluorescence imaging and MRI. The same kind of nanoparticle was also used to deliver small interfering RNA (siRNA) *in vivo* and track their successful delivery by non-invasive imaging [105].

In conclusion, nano-sized contrast agents offer several advantages over conventional agents because they can be passively targeted to the tumors via the EPR effect or actively targeted by specific ligands. Most importantly, nanoparticles offer multifunctionality, such as combining imaging and drug (or siRNA) delivery or, providing dual-modality imaging that combines NIR and either MRI or PET [106].

Thus, these nanoparticles promise great versatility in the detection and treatment of diseases.

4. Conclusion

Optical imaging is an inexpensive, easy-to-use, and non-radiative tool that can provide rapid semi-qualitative (2D), quantitative (3D), and functional information from the cellular to the several centimeter scale. Fluorescence molecular tomography is the preferred method for quantifying protein levels and enzymatic activities. 2D-fluorescent reflectance optical imaging is poised to be the premier approach in molecular imaging, especially for researchers who are not specialists in medical imaging or who do not have access to a nuclear medicine facility or very expensive magnets. However, the future of cancer imaging in mice will rely on the development of a large collection of highly specific tracers or smart contrasting agents. Coupling high-resolution methods like micro-CT or MRI with highly sensitive techniques adapted to functional imaging, such as PET, SPECT or optical imaging, will soon open new frontiers in the study of cancer in small animals and will provide efficient tools for evaluating new treatments. Importantly, a major bottleneck that inhibits the widespread application and generation of these probes concerns the use of NIR fluorophores in human clinical trials by legal agencies. In response to this issue, the FDA recently established the Process Analytical Technologies initiative, which will certainly facilitate the manufacture and use of NIR probes.

References

- [1] M. Baker, Whole-animal imaging: the whole picture, *Nature* 463 (2010) 977–980.
- [2] D.W. Holdsworth, M.M. Thornton, Micro-CT in small animal and specimen imaging, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) s34–s39.
- [3] P.J. Cassidy, G.K. Radda, Molecular imaging perspectives, *J. R. Soc. Interface* 2 (2005) 133–144.
- [4] A. Louie, Design and characterization of magnetic resonance imaging gene reporters, *Methods Mol. Med.* 124 (2006) 401–417.
- [5] T. Barrett, H. Kobayashi, M. Brechbiel, P.L. Choyke, Macromolecular MRI contrast agents for imaging tumor angiogenesis, *Eur. J. Radiol.* 60 (2006) 353–366.
- [6] M. Beaumont, B. Lemasson, R. Farion, C. Segebarth, C. Remy, E.L. Barbier, Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using iron-based vessel size index MRI in combination with gadolinium-based dynamic contrast-enhanced MRI, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29 (2009) 1714–1726.
- [7] C.A. Cuenod, L. Fournier, D. Balvay, J.M. Guinebreteire, Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MRI and CT assessment, *Abdom. Imaging* 31 (2006) 188–193.
- [8] C.S. Levin, Primer on molecular imaging technology, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32 (Suppl 2) (2005) S325–S345.
- [9] A.F. Chatziioannou, S.R. Cherry, Y. Shao, R.W. Silverman, K. Meadors, T.H. Farquhar, M. Pedarsani, M.E. Phelps, Performance evaluation of microPET: a high-resolution lutetium oxyorthosilicate PET scanner for animal imaging, *J. Nucl. Med.* 40 (1999) 1164–1175.
- [10] D.K. Welsh, S.A. Kay, Bioluminescence imaging in living organisms, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 (2005) 73–78.
- [11] C. Bremer, V. Ntziachristos, R. Weissleder, Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications, *Eur. Radiol.* 13 (2003) 231–243.
- [12] M. K eramidas, V. Jossierand, C.A. Righini, C. Wenk, C. Coll, J.L. Faure, Intraoperative near-infrared image-guided surgery of peritoneal carcinomatosis in a preclinical mouse model, *British Journal of Surgery* (2010) (Mar. 22, Electronic publication ahead of print), doi:10.1002/bjs.6986.
- [13] S.L. Troyan, V. Kianzad, S.L. Gibbs-Strauss, S. Gioux, A. Matsui, R. Oketokoun, L. Ngo, A. Khameene, F. Azar, J.V. Frangioni, The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping, *Ann. Surg. Oncol.* 16 (10) (2009) 2943–2952.
- [14] A. Nakayama, F. del Monte, R.J. Hajjari, J.V. Frangioni, Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy, *Mol. Imaging* 1 (2002) 365–377.
- [15] J.V. Frangioni, New technologies for human cancer imaging, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 4012–4021.
- [16] V. Ntziachristos, C. Bremer, E.E. Graves, J. Ripoll, R. Weissleder, In vivo tomographic imaging of near-infrared fluorescent probes, *Mol. Imaging* 1 (2002) 82–88.
- [17] A. Koenig, L. Herve, V. Jossierand, M. Berger, J. Boutet, A. Da Silva, J.M. Dinten, P. Peltie, J.L. Coll, P. Rizo, In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography, *J. Biomed. Opt.* 13 (2008) 011008.
- [18] A. Da Silva, J.M. Dinten, J.L. Coll, P. Rizo, From bench-top small animal diffuse optical tomography towards clinical imaging, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* (2007) 526–529.
- [19] V. Ntziachristos, C.H. Tung, C. Bremer, R. Weissleder, Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo, *Nat. Med.* 8 (2002) 757–760.
- [20] X. Montet, V. Ntziachristos, J. Grimm, R. Weissleder, Tomographic fluorescence mapping of tumor targets, *Cancer Res.* 65 (2005) 6330–6336.
- [21] J. Boutet, L. Herve, M. Debourdeau, L. Guyon, P. Peltie, J.M. Dinten, L. Saroul, F. Dubouef, D. Vray, Bimodal ultrasound and fluorescence approach for prostate cancer diagnosis, *J. Biomed. Opt.* 14 (2009) 064001.
- [22] R. Weissleder, V. Ntziachristos, Shedding light onto live molecular targets, *Nat. Med.* 9 (2003) 123–128.
- [23] M. Longmire, N. Kosaka, M. Ogawa, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Multicolor in vivo targeted imaging to guide real-time surgery of HER2-positive micrometastases in a two-tumor coincident model of ovarian cancer, *Cancer Sci.* 100 (2009) 1099–1104.
- [24] M. Ogawa, C.A. Regino, P.L. Choyke, H. Kobayashi, In vivo target-specific activatable near-infrared optical labeling of humanized monoclonal antibodies, *Mol. Cancer Ther.* 8 (2009) 232–239.
- [25] M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, H. Kobayashi, In vivo molecular imaging of cancer with a quenching near-infrared fluorescent probe using conjugates of monoclonal antibodies and indocyanine green, *Cancer Res.* 69 (2009) 1268–1272.
- [26] X. Chen, P.S. Conti, R.A. Moats, In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin alphavbeta3 in brain tumor xenografts, *Cancer Res.* 64 (2004) 8009–8014.
- [27] X. Chen, E. Sievers, Y. Hou, R. Park, M. Tohme, R. Bart, R. Bremner, J.R. Bading, P.S. Conti, Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer, *Neoplasia* 7 (2005) 271–279.
- [28] T. Sato, K. Konishi, H. Kimura, K. Maeda, K. Yabushita, M. Tsuji, A. Miwa, Vascular integrin beta 3 and its relation to pulmonary metastasis of colorectal carcinoma, *Anticancer Res.* 21 (2001) 643–647.
- [29] K.R. Gehlsen, G.E. Davis, P. Sriramarao, Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties, *Clin. Exp. Metastasis* 10 (1992) 111–120.
- [30] R.E. Seftor, E.A. Seftor, K.R. Gehlsen, W.G. Stetler-Stevenson, P.D. Brown, E. Ruoslahti, M.J. Hendrix, Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 1557–1561.
- [31] C.L. Gladson, D.A. Cheresh, Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells, *J. Clin. Invest.* 88 (1991) 1924–1932.
- [32] M. Rolli, E. Fransvea, J. Pilch, A. Saven, B. Felding-Habermann, Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9482–9487.
- [33] D. Heckmann, A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, Probing integrin selectivity: rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrin receptor, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (2007) 3571–3574.
- [34] D. Boturyn, J.L. Coll, E. Garanger, M.C. Favrot, P. Dumy, Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5730–5739.
- [35] L. Sancey, E. Garanger, S. Foillard, G. Schoehn, A. Hurbin, C. Albiges-Rizo, D. Boturyn, C. Souchier, A. Grichine, P. Dumy, J.L. Coll, Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide, *Mol. Ther.* 17 (2009) 837–843.
- [36] Z.H. Jin, V. Jossierand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M.C. Favrot, J.L. Coll, In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors, *Mol. Cancer* 6 (2007) 41.
- [37] Z.H. Jin, V. Jossierand, J. Razkin, E. Garanger, D. Boturyn, M.C. Favrot, P. Dumy, J.L. Coll, Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c-(RGDFK)-4, *Mol. Imaging* 5 (2006) 188–197.
- [38] L. Sancey, V. Ardisson, L.M. Riou, M. Ahmadi, D. Marti-Batlle, D. Boturyn, P. Dumy, D. Fagret, C. Ghezzi, J.P. Vuillez, In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer 99mTc-RAFT-RGD, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 34 (2007) 2037–2047.
- [39] L. Sancey, S. Dufort, V. Jossierand, M. Keramidias, C.A. Righini, C. Rome, A.C. Faure, S. Foillard, S. Roux, D. Boturyn, O. Tillement, A. Koenig, J. Boutet, P. Rizo, P. Dumy, J.L. Coll, Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 309–316.
- [40] A.R. Hsu, L.C. Hou, A. Veeravagu, J.M. Greve, H. Vogel, V. Tse, X. Chen, In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin alphavbeta3 in an orthotopic glioblastoma model, *Mol. Imaging Biol.* 8 (2006) 315–323.
- [41] H.C. Manning, N.B. Merchant, A.C. Foutch, J.M. Virostko, S.K. Wyatt, C. Shah, E.T. McKinley, J. Xie, N.J. Muttic, M.K. Washington, B. LaFleur, M.N. Tantawy, T.E. Peterson, M.S. Ansari, R.M. Baldwin, M.L. Rothenberg, D.J. Bornhop, J.C. Gore, R.J. Coffey, Molecular imaging of therapeutic response to epidermal growth factor receptor blockade in colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 7413–7422.
- [42] E.L. Rosenthal, B.D. Kulbersh, T. King, T.R. Chaudhuri, K.R. Zinn, Use of fluorescently labeled anti-epidermal growth factor receptor antibody to image head and neck squamous cell carcinoma xenografts, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 1230–1238.
- [43] S.B. Raymond, J. Skoch, I.D. Hills, E.E. Nesterov, T.M. Swager, B.J. Backskai, Smart optical probes for near-infrared fluorescence imaging of Alzheimer's disease pathology, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35 (Suppl 1) (2008) S93–S98.
- [44] M.C. Pierce, D.J. Javier, R. Richards-Kortum, Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer, *Int. J. Cancer* 123 (2008) 1979–1990.

- [45] M. Ogawa, C.A. Regino, J. Seidel, M.V. Green, W. Xi, M. Williams, N. Kosaka, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Dual-modality molecular imaging using antibodies labeled with activatable fluorescence and a radionuclide for specific and quantitative targeted cancer detection, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 2177–2184.
- [46] D.R. Elias, D.L. Thorek, A.K. Chen, J. Czupryna, A. Tsourkas, In vivo imaging of cancer biomarkers using activatable molecular probes, *Cancer Biomark.* 4 (2008) 287–305.
- [47] C. Bremer, V. Ntziachristos, R. Weissleder, Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications, *Eur. Radiol.* 13 (2003) 231–243.
- [48] J.L. Figueiredo, H. Alencar, R. Weissleder, U. Mahmood, Near infrared thoracoscopy of tumoral protease activity for improved detection of peripheral lung cancer, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 2672–2677.
- [49] G. Blum, G. von Degenfeld, M.J. Merchant, H.M. Blau, M. Bogoy, Noninvasive optical imaging of cysteine protease activity using fluorescently quenched activity-based probes, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 668–677.
- [50] F. Zhou, D. Xing, S. Wu, W.R. Chen, Intravital imaging of tumor apoptosis with FRET probes during tumor therapy, *Mol. Imaging Biol.* 12 (1) (2010) 63–70.
- [51] A. Sierra, Animal models of breast cancer for the study of pathogenesis and therapeutic insights, *Clin. Transl. Oncol.* 11 (2009) 721–727.
- [52] J. Ripoll, V. Ntziachristos, C. Cagnet, A.L. Babin, R. Kneuer, H.U. Gremlich, N. Beckmann, Investigating pharmacology in vivo using magnetic resonance and optical imaging, *Drugs R D* 9 (2008) 277–306.
- [53] D.A. Torigian, S.S. Huang, M. Houseni, A. Alavi, Functional imaging of cancer with emphasis on molecular techniques, *CA Cancer J. Clin.* 57 (2007) 206–224.
- [54] R.L. Scherer, M.N. VanSaun, J.O. McIntyre, L.M. Matrisian, Optical imaging of matrix metalloproteinase-7 activity in vivo using a proteolytic nanobeacon, *Mol. Imaging* 7 (2008) 118–131.
- [55] R. Weissleder, C.H. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov Jr., In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 375–378.
- [56] M. Nahrendorf, D.E. Sosnovik, P. Waterman, F.K. Swirski, A.N. Pande, E. Aikawa, J. L. Figueiredo, M.J. Pittet, R. Weissleder, Dual channel optical tomographic imaging of leukocyte recruitment and protease activity in the healing myocardial infarct, *Circ. Res.* 100 (2007) 1218–1225.
- [57] H. Zhang, D. Morgan, G. Cecil, A. Burkholder, N. Ramocki, B. Scull, P.K. Lund, Biochromoendoscopy: molecular imaging with capsule endoscopy for detection of adenomas of the GI tract, *Gastrointest. Endosc.* 68 (2008) 520–527.
- [58] S. Kossodo, M. Pickarski, S.A. Lin, A. Gleason, R. Gaspar, C. Buono, G. Ho, A. Blusztajn, G. Cuneo, J. Zhang, J. Jensen, R. Hargreaves, P. Coleman, G. Hartman, M. Rajopadhye, L.T. Duong, C. Sur, W. Yared, J. Peterson, B. Bednar, Dual in vivo quantification of integrin-targeted and protease-activated agents in cancer using fluorescence molecular tomography (FMT), *Mol. Imaging Biol.* (2009) (Dec. 4, Electronic publication ahead of print), doi:10.1007/s11307-009-0279-z.
- [59] K.E. Bullock, D. Maxwell, A.H. Kesarwala, S. Gammon, J.L. Prior, M. Snow, S. Stanley, D. Piwnica-Worms, Biochemical and in vivo characterization of a small, membrane-permeant, caspase-activatable far-red fluorescent peptide for imaging apoptosis, *Biochemistry* 46 (2007) 4055–4065.
- [60] L.E. Edgington, A.B. Berger, G. Blum, V.E. Albrow, M.G. Paulick, N. Lineberry, M. Bogoy, Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes, *Nat. Med.* 15 (2009) 967–973.
- [61] W. Li, F. Li, Q. Huang, B. Frederick, S. Bao, C.Y. Li, Noninvasive imaging and quantification of epidermal growth factor receptor kinase activation in vivo, *Cancer Res.* 68 (2008) 4990–4997.
- [62] Y. Urano, D. Asanuma, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, M. Kamiya, T. Nagano, T. Watanabe, A. Hasegawa, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes, *Nat. Med.* 15 (2009) 104–109.
- [63] S. Foillard, L. Sancey, J.L. Coll, D. Boturyn, P. Dumy, Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 221–224.
- [64] Z.H. Jin, J. Razkin, V. Jossierand, D. Boturyn, A. Grichine, I. Texier, M.C. Favrot, P. Dumy, J.L. Coll, In vivo noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDFK)(4), *Mol. Imaging* 6 (2007) 43–55.
- [65] J. Razkin, V. Jossierand, D. Boturyn, Z.H. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.L. Coll, I. Texier, Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice, *ChemMedChem* 1 (2006) 1069–1072.
- [66] I. Texier-Nogues, J. Razkin, V. Jossierand, D. Boturyn, P. Dumy, J.L. Coll, P. Rizo, Activatable probes for non-invasive small animal fluorescence imaging, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* (2007) 165–168.
- [67] B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science* 298 (2002) 1759–1762.
- [68] X. Gao, Y. Cui, R.M. Levenson, L.W. Chung, S. Nie, In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 969–976.
- [69] W. Cai, D.W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q. Cao, S.X. Wang, S.S. Gambhir, X. Chen, Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects, *Nano Lett.* 6 (2006) 669–676.
- [70] S. Kim, Y.T. Lim, E.G. Soltesz, A.M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J.A. Parker, T. Mihaljevic, R.G. Laurence, D.M. Dor, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 93–97.
- [71] E.G. Soltesz, S. Kim, R.G. Laurence, A.M. DeGrand, C.P. Parungo, D.M. Dor, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, T. Mihaljevic, Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots, *Ann. Thorac. Surg.* 79 (2005) 269–277 discussion 269–277.
- [72] C.P. Parungo, Y.L. Colson, S.W. Kim, S. Kim, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Sentinel lymph node mapping of the pleural space, *Chest* 127 (2005) 1799–1804.
- [73] C.P. Parungo, S. Ohnishi, S.W. Kim, S. Kim, R.G. Laurence, E.G. Soltesz, F.Y. Chen, Y. L. Colson, L.H. Cohn, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, Intraoperative identification of esophageal sentinel lymph nodes with near-infrared fluorescence imaging, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129 (2005) 844–850.
- [74] B. Ballou, L.A. Ernst, S. Andreko, T. Harper, J.A. Fitzpatrick, A.S. Waggoner, M.P. Bruchez, Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 389–396.
- [75] W. Cai, X. Chen, Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 89–96.
- [76] H. Kobayashi, M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, Y. Urano, Multicolor imaging of lymphatic function with two nanomaterials: quantum dot-labeled cancer cells and dendrimer-based optical agents, *Nanomedicine* 4 (2009) 411–419.
- [77] L.A. Bentolila, Y. Ebensteinn, S. Weiss, Quantum dots for in vivo small-animal imaging, *J. Nucl. Med.* 50 (2009) 493–496.
- [78] B. Mahler, P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, J.P. Hermier, B. Dubertret, Towards non-blinking colloidal quantum dots, *Nat. Mater.* 7 (2008) 659–664.
- [79] O. Carion, B. Mahler, T. Pons, B. Dubertret, Synthesis, encapsulation, purification and coupling of single quantum dots in phospholipid micelles for their use in cellular and in vivo imaging, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2383–2390.
- [80] A. Papagiannaros, T. Levchenko, W. Hartner, D. Mongayt, V. Torchilin, Quantum dots encapsulated in phospholipid micelles for imaging and quantification of tumors in the near-infrared region, *Nanomedicine* 5 (2009) 216–224.
- [81] J. Aaron, N. Nitin, K. Travis, S. Kumar, T. Collier, S.Y. Park, M. Jose-Yacamán, L. Coghlan, M. Follen, R. Richards-Kortum, K. Sokolov, Plasmon resonance coupling of metal nanoparticles for molecular imaging of carcinogenesis in vivo, *J. Biomed. Opt.* 12 (2007) 034007.
- [82] P. Puvanakrishnan, J. Park, P. Diagaradjane, J.A. Schwartz, C.L. Coleman, K.L. Gill-Sharp, K.L. Sang, J.D. Payne, S. Krishnan, J.W. Tunnell, Near-infrared narrow-band imaging of gold/silica nanoshells in tumors, *J. Biomed. Opt.* 14 (2009) 024044.
- [83] A.C. Faure, S. Dufort, V. Jossierand, P. Perriat, J.L. Coll, S. Roux, O. Tillement, Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly (ethylene glycol) coatings, *Small* 5 (2009) 2565–2575.
- [84] C. Chen, J. Peng, H.S. Xia, G.F. Yang, Q.S. Wu, L.D. Chen, L.B. Zeng, Z.L. Zhang, D.W. Pang, Y. Li, Quantum dots-based immunofluorescence technology for the quantitative determination of HER2 expression in breast cancer, *Biomaterials* 30 (2009) 2912–2918.
- [85] C. Yang, N. Ding, Y. Xu, X. Qu, J. Zhang, C. Zhao, L. Hong, Y. Lu, G. Xiang, Folate receptor-targeted quantum dot liposomes as fluorescence probes, *J. Drug Target.* 17 (2009) 502–511.
- [86] C.H. Yang, S.H. Yang, C.S. Hsu, Solution-processable phosphorescent to organic light-emitting diodes based on chromophoric amphiphile/silica nanocomposite, *Nanotechnology* 20 (2009) 315601.
- [87] A.A. Burns, J. Vider, H. Ow, E. Herz, O. Penate-Medina, M. Baumgart, S.M. Larson, U. Wiesner, M. Bradbury, Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine, *Nano Lett.* 9 (2009) 442–448.
- [88] I. Texier, M. Goutayer, A. Da Silva, L. Guyon, N. Djaker, V. Jossierand, E. Neumann, J. Bibette, F. Vinet, Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging, *J. Biomed. Opt.* 14 (2009) 054005.
- [89] K.C. Weng, C.O. Noble, B. Papahadjopoulos-Sternberg, F.F. Chen, D.C. Drummond, D. B. Kirpotin, D. Wang, Y.K. Hom, B. Hann, J.W. Park, Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo, *Nano Lett.* 8 (2008) 2851–2857.
- [90] A. Almutairi, R. Rossin, M. Shokeen, A. Hagooley, A. Ananth, B. Capoccia, S. Guillaudeu, D. Abendschein, C.J. Anderson, M.J. Welch, J.M. Frechet, Biodegradable dendritic positron-emitting nanoprobes for the noninvasive imaging of angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 685–690.
- [91] L. Yang, H. Mao, Z. Cao, Y.A. Wang, X. Peng, X. Wang, H.K. Sajja, L. Wang, H. Duan, C. Ni, C.A. Staley, W.C. Wood, X. Gao, S. Nie, Molecular imaging of pancreatic cancer in an animal model using targeted multifunctional nanoparticles, *Gastroenterology* 136 (2009) 1514–1525 e1512.
- [92] J.H. Park, L. Gu, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, M.J. Sailor, Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications, *Nat. Mater.* 8 (2009) 331–336.
- [93] E. Pic, T. Pons, L. Bezdetnaya, A. Leroux, F. Guillemin, B. Dubertret, F. Marchal, Fluorescence imaging and whole-body biodistribution of near-infrared-emitting quantum dots after subcutaneous injection for regional lymph node mapping in mice, *Mol. Imaging Biol.* (2009) (Nov. 21, Electronic publication ahead of print), doi:10.1007/s11307-009-0288-y.
- [94] T.S. Hauck, R.E. Anderson, H.C. Fischer, S. Newbigging, W. Chan, In vivo quantum-dot toxicity assessment, *Small* 6 (2010) 138–144.
- [95] B. Ballou, B.C. Lagerholm, L.A. Ernst, M.P. Bruchez, A.S. Waggoner, Noninvasive imaging of quantum dots in mice, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004) 79–86.
- [96] M.L. Schipper, G. Iyer, A.L. Koh, Z. Cheng, Y. Ebenstein, A. Aharoni, S. Keren, L.A. Bentolila, J. Li, J. Rao, X. Chen, U. Banin, A.M. Wu, R. Sinclair, S. Weiss, S.S. Gambhir, Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice, *Small* 5 (2009) 126–134.
- [97] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release* 65 (2000) 271–284.
- [98] J.H. Kim, Y.S. Kim, K. Park, S. Lee, H.Y. Nam, K.H. Min, H.G. Jo, J.H. Park, K. Choi, S.Y. Jeong, R.W. Park, I.S. Kim, K. Kim, I.C. Kwon, Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice, *J. Control. Release* 127 (2008) 41–49.

- [99] K.H. Min, K. Park, Y.S. Kim, S.M. Bae, S. Lee, H.G. Jo, R.W. Park, I.S. Kim, S.Y. Jeong, K. Kim, I.C. Kwon, Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy, *J. Control. Release* 127 (2008) 208–218.
- [100] G. Saravanakumar, K.H. Min, D.S. Min, A.Y. Kim, C.M. Lee, Y.W. Cho, S.C. Lee, K. Kim, S.Y. Jeong, K. Park, J.H. Park, I.C. Kwon, Hydrotropic oligomer-conjugated glycol chitosan as a carrier of paclitaxel: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution, *J. Control. Release* 140 (2009) 210–217.
- [101] K. Chen, J. Xie, H. Xu, D. Behera, M.H. Michalski, S. Biswal, A. Wang, X. Chen, Triblock copolymer coated iron oxide nanoparticle conjugate for tumor integrin targeting, *Biomaterials* 30 (2009) 6912–6919.
- [102] H. Lee, K. Lee, I.K. Kim, T.G. Park, Synthesis, characterization, and in vivo diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanopores, *Biomaterials* 29 (2008) 4709–4718.
- [103] L. Yang, X.H. Peng, Y.A. Wang, X. Wang, Z. Cao, C. Ni, P. Karna, X. Zhang, W.C. Wood, X. Gao, S. Nie, H. Mao, Receptor-targeted nanoparticles for in vivo imaging of breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 4722–4732.
- [104] Z. Medarova, L. Rashkovetsky, P. Pantazopoulos, A. Moore, Multiparametric monitoring of tumor response to chemotherapy by noninvasive imaging, *Cancer Res.* 69 (2009) 1182–1189.
- [105] Z. Medarova, M. Kumar, S.W. Ng, A. Moore, Development and application of a dual-purpose nanoparticle platform for delivery and imaging of siRNA in tumors, *Methods Mol. Biol.* 555 (2009) 1–13.
- [106] F. Duconge, T. Pons, C. Pestourie, L. Herin, B. Theze, K. Gombert, B. Mahler, F. Hinnen, B. Kuhnast, F. Dolle, B. Dubertret, B. Tavitian, Fluorine-18-labeled phospholipid quantum dot micelles for in vivo multimodal imaging from whole body to cellular scales, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 1921–1926.

Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging.

Sancey L* and **Dufort S***, Josserand V, Keramidas M, Righini C, Rome C, Faure AC, Foillard S, Roux S, Boturyn D, Tillement O, Koenig A, Boutet J, Rizo P, Dumy P, Coll J-L.
International Journal of Pharmaceutics 2009 Sep 11; 379(2):309-16.



Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging

L. Sancey^{a,b,1}, S. Dufort^{a,b,c,1}, V. Josserand^{a,b}, M. Keramidas^{a,b}, C. Righini^{a,b}, C. Rome^{a,b}, A.-C. Faure^d, S. Foillard^{b,e}, S. Roux^d, D. Boturyn^{b,e}, O. Tillement^d, A. Koenig^f, J. Boutet^f, P. Rizo^f, P. Dumy^{b,e}, J.L. Coll^{a,b,*}

^a CRI-INSERM U823, Cibles diagnostiques ou thérapeutiques et vectorisation de drogues dans les cellules tumorales, Institut Albert Bonniot, BP 170, 38 042 Grenoble cedex 9, France

^b Université Joseph Fourier, BP 53, 38 041 Grenoble cedex 9, France

^c UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, pôle de biologie et pathologie, CHU de Grenoble, BP 217, 38 043 Grenoble cedex 9, France

^d CNRS-UMR 5620, Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, France

^e CNRS, UMR-5250, Département de Chimie Moléculaire, BP 53, 38 041 Grenoble cedex 9, France

^f CEA, Laboratoire d'Electronique de Technologie de l'Information, MINATEC, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2009

Received in revised form 27 April 2009

Accepted 18 May 2009

Available online 23 May 2009

Keywords:

Drug delivery
Optical imaging
Tumor targeting

ABSTRACT

Early and accurate detection of tumors, like the development of targeted treatments, is a major field of research in oncology. The generation of specific vectors, capable of transporting a drug or a contrast agent to the primary tumor site as well as to the remote (micro-) metastasis would be an asset for early diagnosis and cancer therapy. Our goal was to develop new treatments based on the use of tumor-targeted delivery of large biomolecules (DNA, siRNA, peptides, or nanoparticles), able to induce apoptosis while dodging the specific mechanisms developed by tumor cells to resist this programmed cell death. Nonetheless, the insufficient effectiveness of the vectorization systems is still a crucial issue. In this context, we generated new targeting vectors for drug and biomolecules delivery and developed several optical imaging systems for the follow-up and evaluation of these vectorization systems in live mice. Based on our recent work, we present a brief overview of how noninvasive optical imaging in small animals can accelerate the development of targeted therapeutics in oncology.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is a major public health problem. It is the leading cause of death in the world, before cardiovascular diseases. Significant progress has been made in the last decade, but the improvement of diagnosis, with early and accurate detection of tumors, as well as the development of innovative targeted therapies continue to be researched intensely (Cho et al., 2008; Clift et al., 2008; Owens et al., 2006; Pierce et al., 2008).

The generation of specific vectors, capable of addressing a toxic drug and/or a contrast agent to the primary tumor site and remote metastases would therefore be a fundamental asset for early diagnosis and cancer therapy. In collaboration with chemists and physicists, we developed targeted delivery vectors as well as optical imaging systems for tracking them once they have been injected in tumor-bearing mice.

Optical imaging was chosen among the different imaging methods currently available because optics can be applied to a wide range of applications (from cells to animals) as well as to humans (Anandasabapathy, 2008; Tromberg et al., 2005). Indeed, optical imaging is a noninvasive method that can be used to follow the molecules in real time at good spatial (the nanometer to millimeter range) and temporal resolution (microseconds to a few minutes), with high sensitivity (the femto- to picomolar range), and from the whole-body to the subcellular scale (Kumar and Richards-Kortum, 2006).

However, the use of molecular imaging, especially fluorescence imaging in live animal models is limited by the poor transmission of visible light through biological tissues and by the autofluorescence of the tissues because of the presence of natural fluorophores. However, longer wavelengths can be used in a near-infrared (NIR) optical window (650–900 nm). In this spectrum, the problems caused by absorption and autofluorescence are reduced, but others are amplified because of the diffusion and scattering of these photons in biological tissues (Ripoll et al., 2005). In addition, the recent description of increasing amounts of organic or inorganic NIR fluorochromes has also contributed to the development of optical imaging methods for the investigation of deep tissues

* Corresponding author at: INSERM U823, Equipe 5, Institut Albert Bonniot, BP 170, 38 042 Grenoble cedex 9, France. Tel.: +33 04 76 54 95 53; fax: +33 04 76 54 94 13.

E-mail address: Jean-Luc.Coll@ujf-grenoble.fr (J.L. Coll).

¹ These authors contributed equally to this work.

(Weissleder, 2001; Weissleder and Ntziachristos, 2003). This type of fluorochrome can be used for labeling molecules of interest and will significantly accelerate the preclinical study of various kinds of therapeutic, diagnostic, or ultimately theranostic tools (multifunctional nano-carriers with both functions).

Optics can also be used to detect subtle spectral variations in biological tissues and thus will help discriminate between normal and pathologic tissues. For example, diffuse NIR imaging was applied for the detection of tumors and the biological evaluation of the response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer (Tromberg et al., 2005).

The aim of this article is to illustrate how different optical fluorescence imaging systems can be used to improve the study of macromolecules from the cellular to the small animal scales. This will be exemplified for two kinds of drug carriers: targeted peptides and nanoparticles, visualized with several homemade 2D and 3D optical imaging systems.

The target peptide we developed, called RAFT(c[-RGDfK-])₄ (RAFT-RGD), is a 10-Å large cyclic peptide able to target the transmembrane protein integrin $\alpha_v\beta_3$. This protein is overexpressed on neofomed endothelial cells, such as those forming the tumor blood vessels, where it plays a role in cellular adhesion, proliferation, and migration (Rupp et al., 2004; Stupack and Cheresh, 2002). Furthermore, integrin $\alpha_v\beta_3$ is also frequently overexpressed on several tumor cells themselves, as observed in lung cancers (Chen et al., 2005; Sato et al., 2001), melanomas (Gehlsen et al., 1992; Seftor et al., 1992), brain tumors (Gladson and Cheresh, 1991) and breast cancers (Rolli et al., 2003). Coupled to an optical or nuclear imaging agent, RAFT-RGD can detect metastatic tumors engrafted in mice (Ahmadi et al., 2008; Garanger et al., 2007, 2005; Jin et al., 2007, 2006; Sancey et al., 2007) and deliver a toxic (KLAKLAK)₂ (KLA) peptide (Foillard et al., 2008). We will illustrate the interest of functional imaging using optics to follow the subcellular release of these peptides.

We have also been involved in the development of various multifunctional nanoparticles (NPs). NPs are very well suited for imaging and/or therapy because of their small size, which is sufficiently large, however, to allow the multiplexing and fine-tuning of several biological functions in a single object. Extensive studies focused on liposomes or polymeric particles have demonstrated how modifying the surface of the particles by adding shielding polymers such as polyethylene glycol (PEG) improve their pharmacodynamic properties (Alexis et al., 2008; Lukyanov and Torchilin, 2004; Owens et al., 2006). The derivatization by PEG chains limits the uptake of the particles by Kupfer cells, macrophages, or B cells and their opsonization by various blood proteins (Alexis et al., 2008; Clift et al., 2008). In this study, we will also illustrate the advantage of using optical systems to rapidly evaluate such modifications.

2. Material and methods

2.1. RGD-peptides synthesis and fluorescent labeling

Compounds were synthesized according to previously reported procedures (Boturyn et al., 2004; Foillard et al., 2008): the chemical structures are presented in Fig. 1. Briefly, RAFT is a cyclic decapeptide (c [-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-]) with two orthogonally addressable domains pointing to either side of the cyclopeptide backbone. On the upper side, four copies of the c[-RGDfK-] peptide were grafted via an oxime bond (R1-O-N=C-R2) for recognition of the integrin $\alpha_v\beta_3$. On the other side of the RAFT, a peptidic sequence (KLAKLAK)₂-NH₂ (KLA) was grafted via a disulfide bridge and a short linker on the lysine chain (c [-KKKPGKAKPG-]) (Garanger et al., 2005). From both parts of this disulfide bridge, a quencher

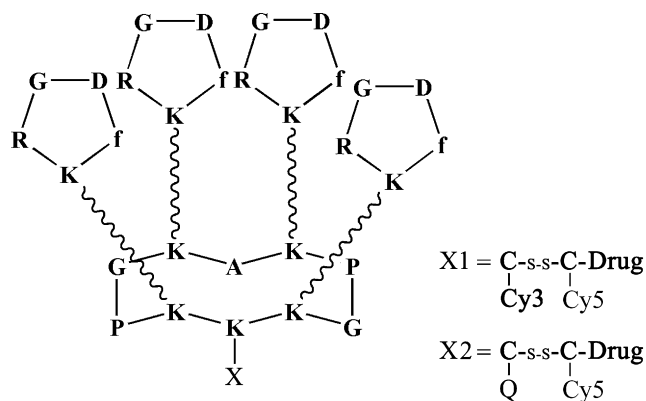


Fig. 1. Representation of the RAFT-RGD drug carrier. The disulfide bridge is represented by "S-S". Here, the drug is the pro-apoptotic (KLAKLAK)-NH₂ peptide.

(QSH21[®]) or a Cy3 mono-NHS (N-hydroxysuccinimide) ester was added on the first cysteine and a Cy5 mono-NHS-ester (all from Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was added on the second cysteine, as described in Fig. 1. As a negative control probe, RAFT(c[-RβADfK-])₄ (RAFT-RAD) was also synthesized in a similar way.

2.2. Nanoparticles

The nanoparticles (diameter ≤ 15 nm) were as described previously (Bridot et al., 2007). They are made up of a metallic heart (Gadolinium oxide) embedded in a polysiloxane shell (Fig. 2). This shell, containing fluorescent dyes (Cy5, Amersham Biosciences) for imaging, is coated with polyethylene-glycol chains (PEG) to optimize their *in vivo* biodistribution. PEG can be functionalized with biological ligands to target tumor cells (Bridot et al., 2007).

2.3. Cell lines and culture conditions

HEK293(β_3), stable transfectants of human β_3 from the human embryonic kidney cell line (kindly provided by J-F. Gourvest, Aventis, France), were cultured as described in Jin et al. (2007) in DMEM supplemented with 1% glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, and 700 μ g/mL Geneticin (G418 sulfate, Gibco, Paisley, UK). IGROV-1, human ovarian carcinoma cells, TS/A-pc, mice mammary carcinoma cells, and TS/A-pc-pGL3 subclone were cultured in RPMI 1640 supplemented with 1% glutamine, 10% fetal bovine serum, 25 nM β -mercaptoethanol, 50 units/mL penicillin, and 50 μ g/mL strepto-

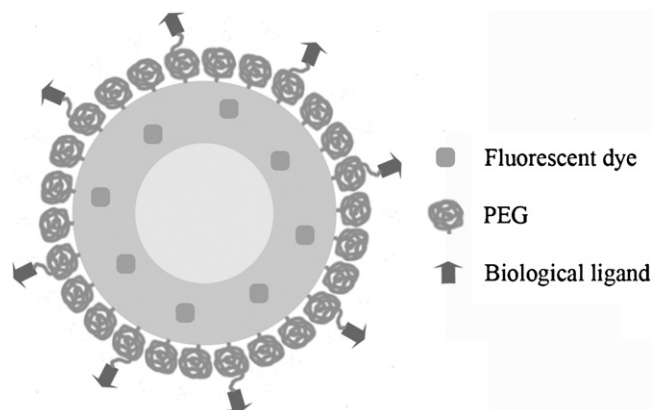


Fig. 2. Schematic representation of functionalized nanoparticles for imaging and targeted therapies.

mycin. Stable transfections of TS/A-pc (pGL3) cells were performed using Jet-PEI (Polyplus-transfection, Illkirch, France) with a 4:1 ratio of pCMV-luc and pcDNA3 plasmids, followed by G418 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selection and cloning of positive cells. All cell lines were cultured at 37 °C in a humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere. All the cells used here are integrin $\alpha_v\beta_3$ -positive (Jin et al., 2007, 2006; Sancey et al., 2007).

2.4. FRET experiment

HEK293(β_3) cells were grown as described. Fresh warm DMEM without red phenol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was added to the cells previously stained with 5 μ M Hoechst (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) for 10 min. Then, 1 μ M of RAFT-RGD-X1 was added to the medium. Confocal microscopy was performed on the Axiovert 200 LSM510 LNO Meta microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 40 \times water immersion objective. The FRET signal was obtained after excitation at 543 nm and recovered at 651–716 nm. The Cy3 and Cy5 spectral bleed-through were subtracted from the FRET images.

2.5. Colocalization studies

Cells were cultured in four-well Lab-Tek I chambered coverglass (Thermo Fisher, Illkirch, France) in the appropriate medium and kept at 37 °C. The medium was removed and RAFT-RGD-X2 was added at 2 μ M for 1 h in DMEM without FBS and red phenol. Then, 100 nM mito-tracker red (M7512, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was added to the cell medium for 10 min together with 5 μ M Hoechst. Cells were carefully rinsed and the medium was replaced for several hours. The cells were observed through confocal microscopy as previously described at 37 °C, 5% CO₂. Confocal slices were 0.5 or 1 μ m deep. Images (8-bit color) were treated with ImageJ software 1.37 v (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.6. *In vivo* fluorescence imaging

2.6.1. Fluorescence reflectance imaging (2D-FRI)

Female NMRI nude mice (6–8 weeks old, Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were injected subcutaneously with human HEK293(β_3) cells (2×10^7 cells per mouse). After tumor growth (~6 weeks), anesthetized mice (isoflurane/oxygen 3.5/4% for induction and 1.5/2% thereafter, CSP, Cournon, France) were injected intravenously with 200 μ L of nanoparticle suspension (50 μ M of dye). Depending on the fluorescent dye used, mice were illuminated by 633- or 660-nm light-emitting diodes equipped with interference filters. Fluorescence images as well as black and white pictures were acquired by a back-thinned CCD camera at –80 °C (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu, Massy, France) (Jin et al., 2007, 2006; Josserand et al., 2007) fit with a colored glass long-pass RG 665 filter (Melles Griot, Voisins Le Bretonneaux, France) or the high-pass RG 9 filter (Schott, Clichy, France). At the end of the experiment, mice were euthanized to quantify the biodistribution in the different organs.

2.6.2. Fluorescence tomography with fDOT 3D imaging system

Female NMRI nude mice (6–8 weeks old, Janvier) were injected with 5×10^5 TS/A-pc-pGL3 cells, intraperitoneally. After tumor growth (~7 days), anesthetized mice were injected intravenously with RAFT-RGD-Alexa700 (200 μ L at 50 μ M of dye). Three hours after injection, the anesthetized mouse was put in the dark chamber and was lightly constrained by a glass plate. The imaging setup consists of a laser source (690 nm, 26 mW, Powertech, St Nom La Brette, France) and a CCD camera (ORCA ER, Hamamatsu) fit with a colored glass high-pass RG 9 filter (Schott). The 3D map of fluorescence in the mice was computed by means of an ART-based reconstruction algorithm described previously (Herve et al., 2007).

After the tomographic acquisition, a FRI as well as a black and white picture were acquired (Koenig et al., 2008; Da Silva et al., 2007).

2.6.3. Bioluminescence imaging

Five minutes after luciferin (Promega, Charbonnières, France) intraperitoneal injection (150 μ g/g), the mice were anesthetized and bioluminescence images as well as black and white pictures were acquired using a back-thinned CCD camera at –80 °C (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu).

2.6.4. Fluobeam

The mice bearing TS/A-pc subcutaneous tumor were injected twice intradermally, close to the tumor with 5 + 5 μ L of nanoparticles (500 μ M of dye). Mice were imaged with the Fluobeam (Fluoptics, Grenoble, France) 15 min, 1 h and 3 h after injection. The optical system consists of a 690-nm laser and a pixelfly camera fitted with a high-pass RG 9 filter (Schott).

3. Results

3.1. Optical imaging of drug internalization

In our previous work, we studied the *in vivo* optical imaging of RAFT-RGD-Cy5-SS-Q in nude mice bearing subcutaneous tumors (Jin et al., 2007). Because of the presence of a quencher, no fluorescence can be detected ($0.5 \pm 0.1\%$ of the quantum yield efficiency as compared with the similar molecule without a quencher). This molecule is therefore nearly completely devoid of background fluorescence before the disulfide bridge is disrupted. This provides an excellent SNR (signal-to-noise ratio), which is a major asset in microscopy as well as in whole-body imaging. After intravenous administration of 10 nmol of RAFT-RGD-Cy5-SS-Q, good tumor contrasts were observed from 3 to 24 h after injection (see supplementary data S1). The kidneys were also visualized. Tumor samples obtained at 3 h showed that RAFT-RGD-Cy5-SS-Q was actively internalized by tumor cells and produced a much stronger fluorescence signal in tumor cells or in the stroma than RAFT-RGD-Cy5. This study also suggested that RAFT-RGD-Cy5-SS-Q bound to endothelial cells.

To demonstrate that RAFT-RGD could also target deep metastasis, similar studies were conducted in which RAFT-RGD-Alexa700 was intravenously injected in mice bearing intraperitoneal, luciferase-positive breast cancer nodules (obtained after intraperitoneal injection of TS/A-pc-pGL3 cells). Bioluminescence imaging was used to visualize scattered metastasis in the peritoneal cavity. Three hours after intravenous injection of RAFT-RGD-Alexa700, the binding on the tumor nodules was confirmed by 2D-FRI. This was more precisely evaluated using the fDOT system, as shown in Fig. 3. As expected, the metastases were not detectable using the negative control molecule RAFT-RAD-Alexa700, which do not bind the integrin.

The RAFT-RGD molecule is thus capable of targeting the cell surface receptor and inducing an active internalization in clathrin-coated vesicles (Sancey et al., 2009). To demonstrate that the RAFT-RGD vector can deliver an active toxic peptide in the appropriated subcellular compartment, we synthesized various “smart” molecules containing internally quenched FRET probes surrounding a cleavable disulfide link. In the first molecule, the FRET pair was made of Cy3 and Cy5. In the second molecule, Cy3 was replaced with a fluorescence quencher QSY21[®] as shown previously. In both cases, the disulfide bridge can be cleaved after reduction, which occurs during the internalization process. The use of Cy3 instead of QSY21[®] allowed us to simultaneously track each molecule separated after disruption of the disulfide bridge. Cy3 will stay attached to the RAFT-delivery vector while Cy5 will stay with the drug (KLA) (Fig. 1). This KLA peptide is toxic only when in contact with the

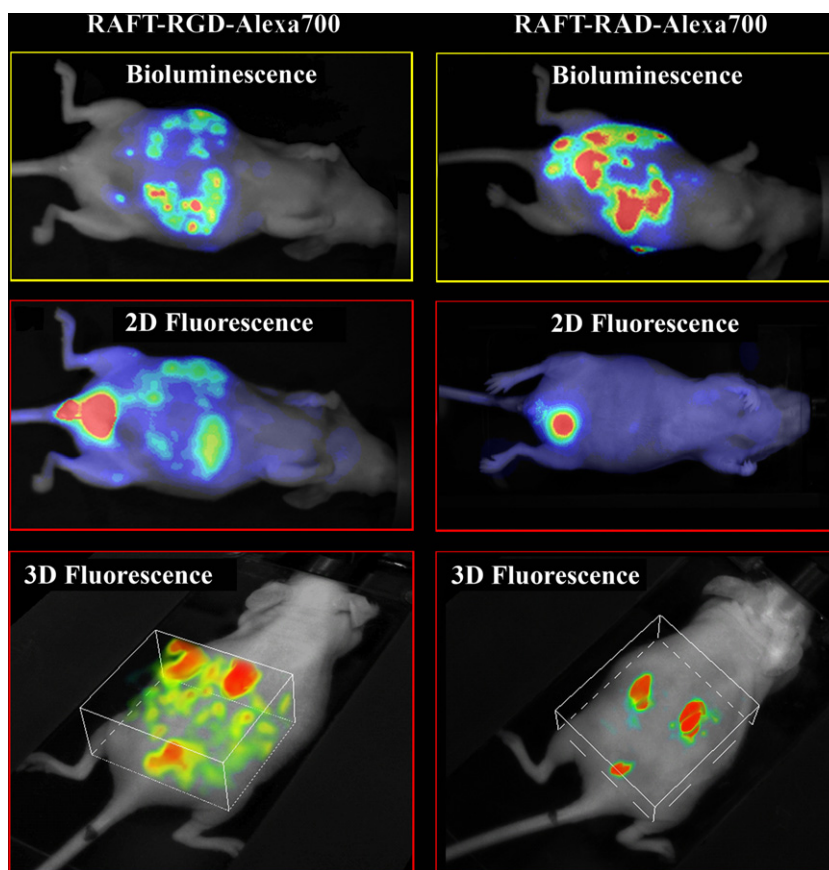


Fig. 3. Optical imaging of intraperitoneal TS/A-pc-pGL3 tumor-bearing mice. The tumor cells were detected noninvasively using different modalities and the positive RAFT-RGD-Alexa700 molecule (Left) or the negative control molecule RAFT-RAD-Alexa700 (Right). Bioluminescence imaging, 5 min after luciferase injection allowed the detection and localization of the peritoneal nodules because the injected tumor cells are Luciferase positive. 2D-fluorescence and 3D fluorescence imaging performed 3 h after intravenous injection of RAFT-RGD-Alexa700 and RAFT-RAD-Alexa700 demonstrated that RAFT-RGD but not RAFT-RAD was targeting these nodules.

mitochondria. It is thus necessary for the delivery system to release it in an active form into the cytoplasm of the cell after endocytosis. Only then can KLA reach the mitochondrion and destabilize it, leading to cell apoptosis.

Using RAFT-RGD-X1, we followed the targeting and release of KLA on $\alpha_v\beta_3$ -expressing cells. As demonstrated in Fig. 4, the pseudo-colored “green” signal obtained by the Cy3 linked to the RAFT-RGD part was mainly localized at cell junctions but was also found in small vesicles, as previously described for RAFT-RGD alone (Sancey et al., 2009). Most of the KLA, pseudo-colored in “red” was in the close vicinity of the vector RAFT-RGD or detached into the medium near the cell membranes. During the first half-hour, the FRET signal was weak, principally found at cell junctions and in some large speckles (upper panels). A weak FRET signal is the expected signature obtained when the two dyes are separated after degradation of the disulfide bridge during internalization. After 2 h, KLA was mostly internalized but a large amount was still linked to the RAFT-RGD vector: a positive FRET signal was found in subcellular organelles such as the nucleus. Usually, RAFT-RGD stayed on the cell membrane or was internalized in small clathrin-coated vesicles, but it was never observed in the nucleus (Sancey et al., 2009). This suggests that after partial release of the KLA toxic peptide, the nuclear membrane may be more permeable or that addition of KLA onto the RAFT-RGD could provide an NLS-like property to the molecule. FRET intensity was stronger at $T=2$ h than at $T=30$ min but the Cy3 signal decreased during the same period: this indicated that the release of the KLA decreased with time, while the accumulation of the intact molecule was still ongoing.

3.2. Drug release

Drug release could be observed with the RAFT-RGD-X2 (Fig. 5). Depending on the cell type, the time of release varied, but in three different cell types, the red signal resulting from KLA release was observed first in small vesicles (Fig. 5A) and then around the mitochondria (Fig. 5B) and labeled with the mito-tracker (green). This experiment demonstrated the efficiency of RAFT-RGD to carry and deliver this drug into three different cell types.

3.3. Optical imaging for in vivo study of the biodistribution of nanoparticles

Whole-body 2D-FRI can be used to compare the distribution of various surface modified nanoparticles 24 h after intravenous injection (Fig. 6). As demonstrated in Fig. 6A and C, these nanoparticles present distinct biodistributions (see supplementary data S2 and S3). In one case (Fig. 6A), the biodistribution seemed to be homogenous with a predominant hepatic elimination route. In the second case (Fig. 6C), the kidneys were highly fluorescent. Semi-quantification of fluorescence intensities of the corresponding isolated organs (Fig. 6B and D) was correlated with whole-body noninvasive imaging.

Biodistribution quantification estimated the circulation times in mice as well as the routes and time of elimination. In the first case (Fig. 6A and B), we observed a long-lasting hepatic fluorescence signal 24 h after injection. Indeed, the massive accumulation of fluorescence in the liver and the significant level of fluorescence in the intestine indicated that these nanoparticles were probably

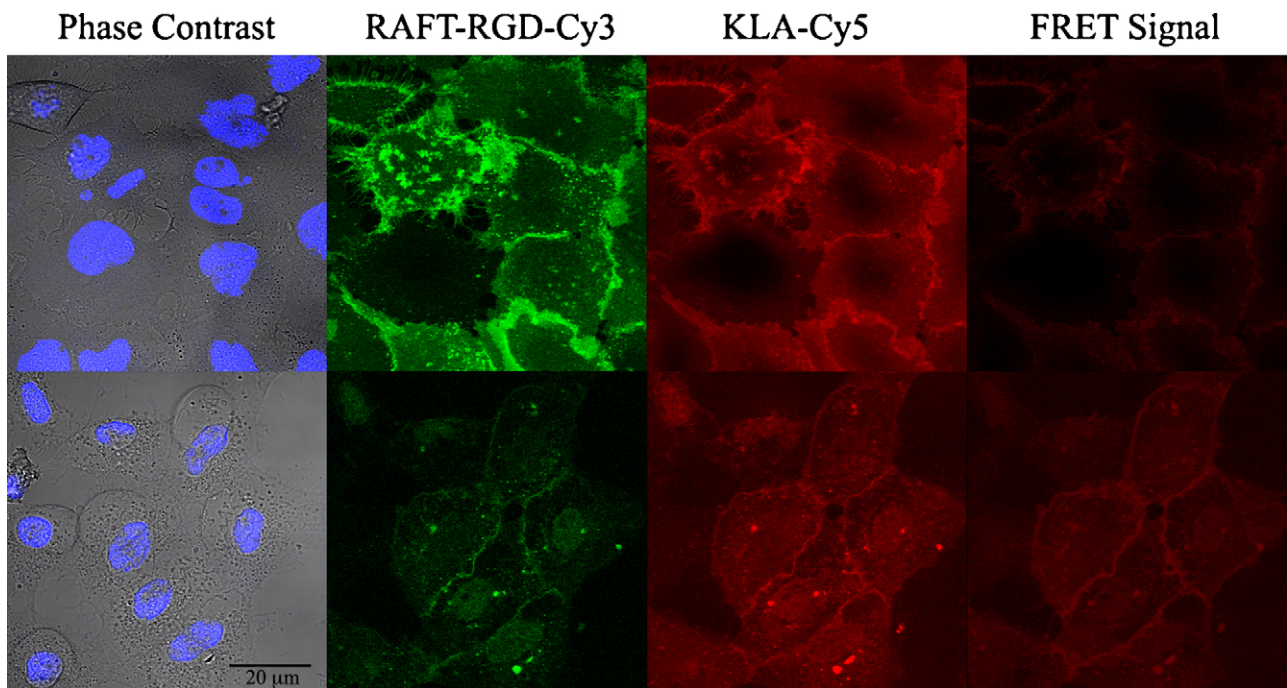


Fig. 4. Confocal imaging of RAFT-RGD-X1 on live $\alpha_v\beta_3$ -expressing cells, HEK293- β_3 . From left to right: phase contrast and nucleus staining (blue), RAFT-RGD-Cy3 (green), KLA-Cy5 (red), and FRET signal obtained from KLA linked to RAFT-RGD (dark red). The images were obtained at 30 min (upper panel) and 2 h (lower panel). Scale bar: 20 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

degraded and excreted through feces. This elimination mode is slower than the urinary route, increasing the circulation time of the compound in the mouse, thus favoring specific targeting or passive uptake. In the second case presented (Fig. 6C and D), nanoparticles freely circulated in the blood and were quickly cleared from the body through the kidneys; no fluorescence was detected except in this organ. It is therefore likely that these nanoparticles were degraded and the fluorescence released and eliminated through the urinary route. The integrity of the nanoparticles in the different compartments is difficult to control. To address this problem, we are currently working on the introduction of a FRET system instead

of a single dye. This should help determine whether the particle is still intact at the end.

Moreover, whole-body scans and quantifications allowed us to evaluate the tumoral uptake. For one of the two nanoparticles (Fig. 6A and B), we observed a weak accumulation in the tumor due to passive and nonspecific targeting.

As demonstrated by Frangioni and Mawad's teams (Kim et al., 2004; Sevick-Muraca et al., 2008), such nanoparticles have the capacity to accumulate passively in draining lymph nodes. This is an interesting application since it may help identify draining lymph nodes associated with tumors. We therefore injected untar-

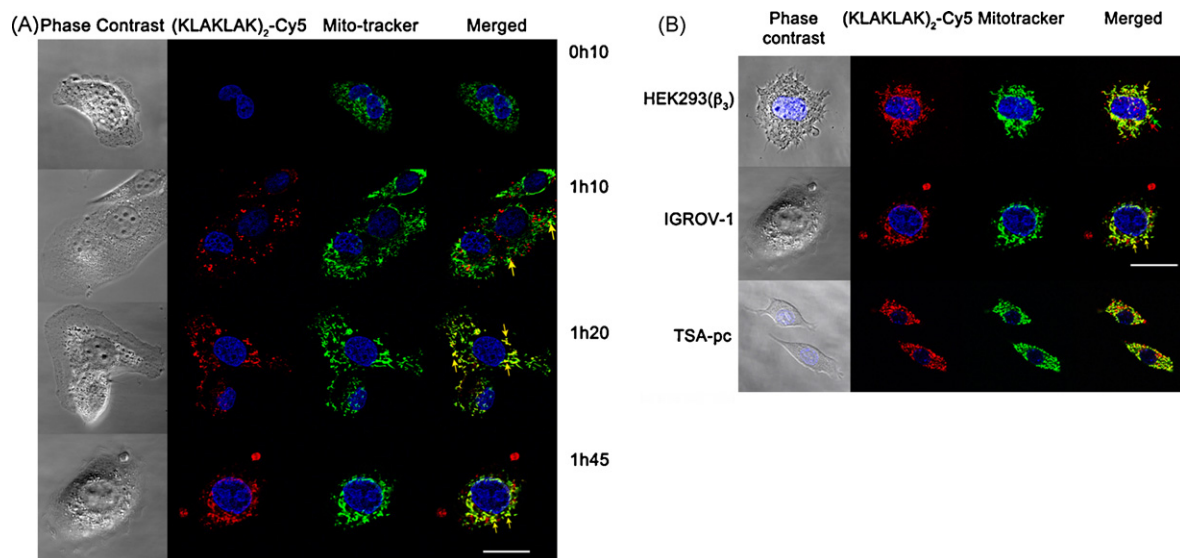


Fig. 5. Drug release. (A) IGROV-1 cells were incubated with RAFT-RGD-X2 and observed by confocal microscopy (40 \times). Red signal corresponding to the drug release appeared 1 h after addition to the cell culture medium. As demonstrated by the mitochondria labeling (green signal), the KLA massively reached its target. (B) Similar results were obtained on three different cell types expressing the integrin $\alpha_v\beta_3$. Scale bar: 10 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

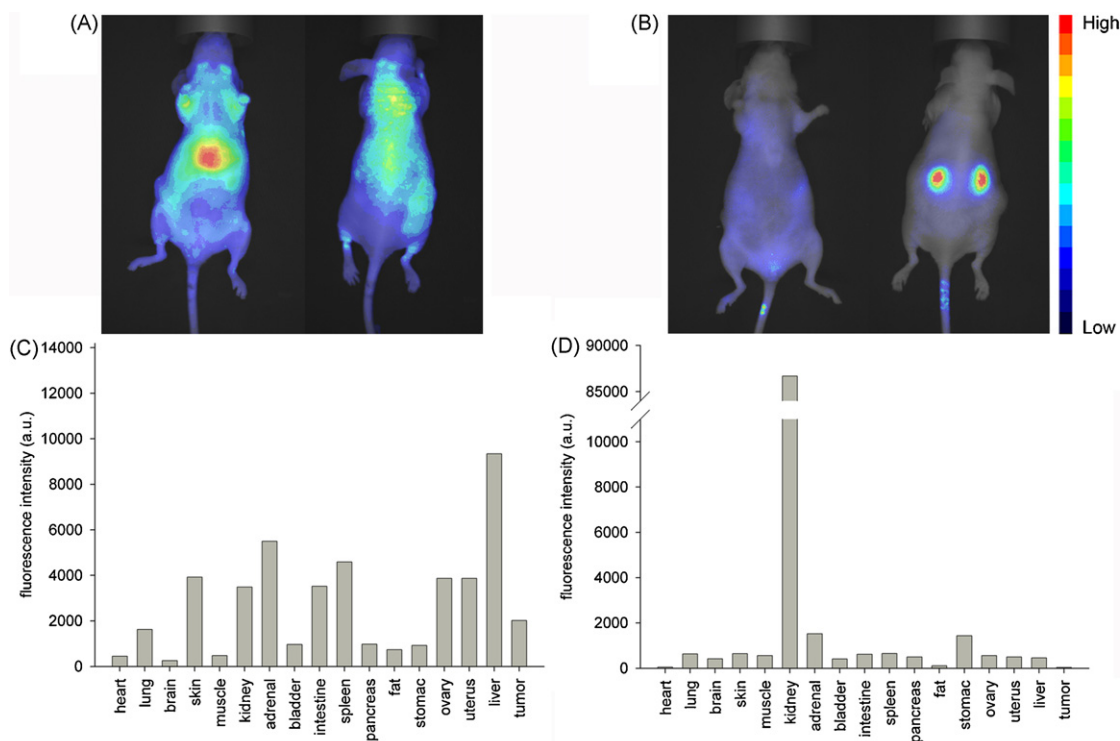


Fig. 6. (A) and (C) Fluorescence reflectance imaging of *nude* mice laid on the back (left) and the belly (right), 24 h after the intravenous injection of two different nanoparticles (representative examples, $N=4$). (B) and (D) Corresponding biodistributions of the different nano-carriers were obtained after sacrifice of the animals and exposure of the different organs directly under the camera.

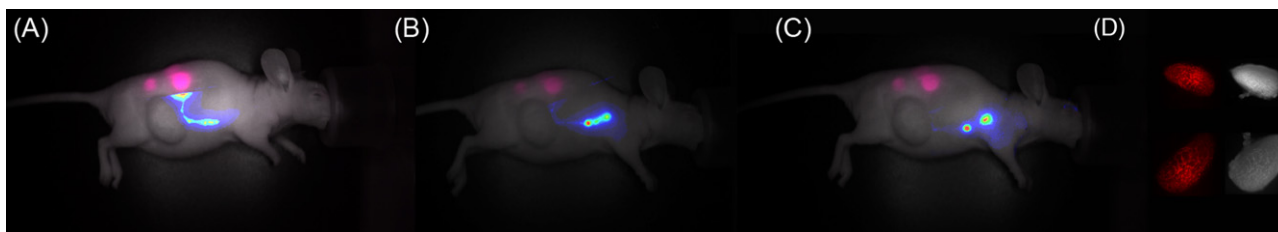


Fig. 7. Nanoparticles were subcutaneously injected in two locations in the vicinity of the tumor (pink dots). As observed after 15 min (A), 1 h (B) or 3 h (C), the nanoparticles were migrating toward two draining lymph nodes of the subcutaneous tumor, allowing their precise localization. (D) After resection, lymph nodes were observed under bright field and fluorescence imaging. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

geted nanoparticles in two peri-tumoral locations (pink dots) and used the Fluobeam imaging system to follow the distribution of the nanoparticles in real time, as shown in Fig. 7, 15 min, 1 h and 3 h after injection. As observed after 3 h, two lymph nodes were identified draining directly the subcutaneous tumor. The advantage of using the Fluobeam instead of the conventional 2D-FRI system is its ability to function under surgical white light, allowing us to detect and remove such draining lymph node by optical-guided surgery (see supplementary data S4). This could be done as well in large animals (pigs, goat, ...) because the Fluobeam does not require the introduction of the animal in a black box, oppositely to all other conventional fluorescent imaging systems.

4. Discussion

In this study, we illustrated how optical imaging can help in the development of targeted therapeutics in oncology. This method allows us to noninvasively follow the fate of a molecule and its functional activation on a very broad scale. Indeed, using a fluorescent tag, the distribution of the desired molecule can be followed from the subcellular level up to the whole-body level (Pierce et al., 2008).

For cell targeting and drug release, we used a synthetic peptidic RAFT-RGD vector targeting the $\alpha_v\beta_3$ integrin. Combined with different fluorescent or smart-FRET probes, we studied its efficiency in delivering and releasing a toxic peptide, normally unable to cross the cell membrane on its own.

The FRET experiment demonstrated a rapid release of the drug after disulfide bridge rupture occurring after its internalization mediated by the RAFT-RGD vector in small endocytic and acidic vesicles (Sancey et al., 2009). After 2 h, the drug perforated many organelles, leading to cell death and allowing the compound to penetrate the nucleus. In this analysis, the different pictures were obtained after 543- or 633-nm laser excitations, for the Cy3 and FRET or Cy5 channel, respectively. Furthermore, the intensity of the 543-nm laser differed between Cy3 and FRET analysis. The use of different lasers and intensities prevented us from comparing the fluorescence intensities of the different emission channels. Here, two phenomena were observed: RAFT-RGD-X1 accumulation and KLA release. As we could not quantify each phenomenon separately, the amount of drug released could not be quantified in this experiment.

The RAFT-RGD-X2 was constructed to follow the release of the drug and its intracellular trafficking. The time course of drug release

varied with the cell type. In the three different cell types, red vesicles first appeared before accumulation in the mitochondrion. Since small quantities of RAFT-RGD-X2 in solution (2 μ M) were used, we assumed that only a small quantity of the drug combined with the Cy5 was internalized with the vector RAFT-RGD, released into small vesicles, and escaped this organelle. This small proportion of released drug reached its target, as demonstrated by its colocalization with the mito-tracker probe. This proportion was sufficient to induce substantial cell damage representative of cell death: as demonstrated in Fig. 4, this concentration induced perforations of the nuclear membrane, leading to the diffusion of the vector and its drug into this organelle. Furthermore, the KLA also perforated the mitochondrial membranes disturbing their polarization and leading to cell death (data not shown).

Such functional characteristics could effectively be investigated with optical imaging techniques. This method gives access to *in cellulo* association/dissociation of compounds using appropriate techniques (FRET, FRAP, etc.) (Rajwa, 2005). At the animal level, optical imaging also allowed us to determine specific organ accumulation, particularly in tumors, and gave functional information such as tumoral growth and vascularization (Weissleder and Pittet, 2008).

Using innovative nano-carriers, we studied their elimination route and biodistribution features after PEGylation of their surface. Nano-carriers should be accurately targeted to obtain an acceptable biodistribution without accumulating in vital organs. The biodistribution depends on several physicochemical properties of the nano-carriers such as their size, but also the electrostatic charge and chemical composition of their surface (Debbage and Jaschke, 2008). Since fluorescence optical imaging is an easy, immediate, and noninvasive method, this tool makes a major contribution to the development of new innovative antitumoral nano-carriers (Weissleder, 2002; Weissleder and Pittet, 2008).

We can use fluorescent dyes that are excitable at wavelengths greater than or equal to 633 nm at least, in particular for animal investigations. Imaging in the NIR spectrum (650–900 nm) maximizes tissue penetration in addition to minimizing the autofluorescence from nontargeted tissues (Weissleder, 2001; Weissleder and Ntziachristos, 2003). The signal-to-background ratio, for detecting optical imaging agents, equals or exceeds that which can be achieved with other molecular imaging modalities.

One of the major drawbacks of optical imaging concerns its limited depth of investigation. Depending on the machine used, the emission signal was collected at a 15-cm depth at best (Frangioni, 2008). The development of 3D cameras allows whole-body noninvasive investigations on small animals such as mice and rats. At the clinical level, optical imaging could be used to facilitate the surgery using nanoparticle probes, for example as established here for lymph node detection using a surgical Fluobeam device, or for other applications (Frangioni, 2008; Jechart and Messmann, 2008).

Optical imaging is a sensitive method: 2 pmol of fluorescent Cy5 could be detected in the mouse brain (V. Josserand, unpublished data), a good spatial resolution close to the millimeter in 3D and 0.01 mm² in 2D (Collier et al., 2007; Frangioni, 2008), and a very fast temporal resolution. For example, in 2D, a series of images can be taken with milliseconds of exposure time. It must be noted that a 3D acquisition of a 2-cm³ volume is slower and would require 10–15 min.

To conclude, optical imaging is an inexpensive, easy-to-use, and nonradiative tool able to provide rapid semi-qualitative (2D), quantitative (3D), and functional information from cellular to the several-centimeter scale.

Acknowledgements

This study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the INCA (Institut National

pour le Cancer), the Association for Research on Cancer (ARC, France), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) and the EMIL and N2L NoE of the 6th FWP. We also acknowledged Stéphanie Guillermet (Fluoptics, Grenoble France) and Alexei Grichine (CRI/INSERM U823, Eq. 10) for helpful technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.034.

References

- Ahmadi, M., Sancey, L., Briat, A., Riou, L., Boturyn, D., Dumy, P., Fagret, D., Ghezzi, C., Vuillez, J.P., 2008. Chemical and biological evaluations of an ¹¹¹In-labeled RGD-peptide targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ in a preclinical tumor model. *Cancer Biother. Radiopharm.* 23, 1–10.
- Anandasabapathy, S., 2008. Endoscopic imaging: emerging optical techniques for the detection of colorectal neoplasia. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 64–69.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C., 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5, 505–515.
- Boturyn, D., Coll, J.L., Garanger, E., Favrot, M.C., Dumy, P., 2004. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5730–5739.
- Bridot, J.L., Faure, A.C., Laurent, S., Rivière, C., Billotey, C., Hiba, B., Janier, M., Josserand, V., Coll, J.L., Elst, L.V., Muller, R., Roux, S., Perriat, P., Tillement, O., 2007. Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: Multimodal contrast agents for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5076–5084.
- Chen, X., Sievers, E., Hou, Y., Park, R., Tohme, M., Bart, R., Bremner, R., Bading, J.R., Conti, P.S., 2005. Integrin $\alpha_v\beta_3$ targeted imaging of lung cancer. *Neoplasia* 7, 271–279.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G., Shin, D.M., 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 1310–1316.
- Clift, M.J., Rothen-Rutishauser, B., Brown, D.M., Duffin, R., Donaldson, K., Proudfoot, L., Guy, K., Stone, V., 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 418–427.
- Collier, T., Guillaud, M., Follen, M., Malpica, A., Richards-Kortum, R., 2007. Real-time reflectance confocal microscopy: comparison of two-dimensional images and three-dimensional image stacks for detection of cervical precancer. *J. Biomed. Opt.* 12, 024021.
- Da Silva, A., Dinten, J.M., Coll, J.L., Rizo, P., 2007. From bench-top small animal diffuse optical tomography towards clinical imaging. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2007, 526–529.
- Debbage, P., Jaschke, W., 2008. Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. *Histochem. Cell Biol.* 130, 845–875.
- Foillard, S., Jin, Z.H., Garanger, E., Boturyn, D., Favrot, M.C., Coll, J.L., Dumy, P., 2008. Synthesis and biological characterisation of targeted pro-apoptotic peptide. *Chem. Biol. Chem.* 9, 2326–2332.
- Frangioni, J.V., 2008. New technologies for human cancer imaging. *J. Clin. Oncol.* 26, 4012–4021.
- Garanger, E., Boturyn, D., Dumy, P., 2007. Tumor targeting with RGD peptide ligands—design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers. *Anticancer Agents Med. Chem.* 7, 552–558.
- Garanger, E., Boturyn, D., Jin, Z., Dumy, P., Favrot, M.C., Coll, J.L., 2005. New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol. Ther.* 12, 1168–1175.
- Gehlsen, K.R., Davis, G.E., Sriramarao, P., 1992. Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clin. Exp. Metastasis* 10, 111–120.
- Gladson, C.L., Cheresch, D.A., 1991. Glioblastoma expression of vitronectin and the $\alpha_v\beta_3$ integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J. Clin. Invest.* 88, 1924–1932.
- Herve, L., Koenig, A., Da Silva, A., Berger, M., Boutet, J., Dinten, J.M., Peltie, P., Rizo, P., 2007. Noncontact fluorescence diffuse optical tomography of heterogeneous media. *Appl. Opt.* 46, 4896–4906.
- Jechart, G., Messmann, H., 2008. Indications and techniques for lower intestinal endoscopy. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 22, 777–788.
- Jin, Z.H., Josserand, V., Foillard, S., Boturyn, D., Dumy, P., Favrot, M.C., Coll, J.L., 2007. *In vivo* optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol. Cancer* 6, 41.
- Jin, Z.H., Josserand, V., Razkin, J., Garanger, E., Boturyn, D., Favrot, M.C., Dumy, P., Coll, J.L., 2006. Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDFK)-4. *Mol. Imaging* 5, 188–197.
- Josserand, V., Texier-Nogues, I., Huber, P., Favrot, M.C., Coll, J.L., 2007. Non-invasive *in vivo* optical imaging of the lacZ and luc gene expression in mice. *Gene Ther.* 14, 1587–1593.
- Kim, S., Lim, Y.T., Soltesz, E.G., De Grand, A.M., Lee, J., Nakayama, A., Parker, J.A., Mihaljevic, T., Laurence, R.G., Dor, D.M., Cohn, L.H., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V., 2004. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* 22, 93–97.

- Koenig, A., Herve, L., Josserand, V., Berger, M., Boutet, J., Da Silva, A., Dinten, J.M., Peltie, P., Coll, J.L., Rizo, P., 2008. In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *J. Biomed. Opt.* 13, 011008.
- Kumar, S., Richards-Kortum, R., 2006. Optical molecular imaging agents for cancer diagnostics and therapeutics. *Nanomedicine* 1, 23–30.
- Lukyanov, A.N., Torchilin, V.P., 2004. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1273–1289.
- Owens 3rd, D.E., Peppas, N.A., 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307, 93–102.
- Pierce, M.C., Javier, D.J., Richards-Kortum, R., 2008. Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer. *Int. J. Cancer* 123, 1979–1990.
- Rajwa, B., 2005. Modern confocal microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.*, Chapter 12, Unit 12.13.
- Ripoll, J., Yessayan, D., Zacharakis, G., Ntziachristos, V., 2005. Experimental determination of photon propagation in highly absorbing and scattering media. *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis.* 22, 546–551.
- Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A., Felding-Habermann, B., 2003. Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9482–9487.
- Rupp, P.A., Czirok, A., Little, C.D., 2004. Alphavbeta3 integrin-dependent endothelial cell dynamics in vivo. *Development* 131, 2887–2897.
- Sancey, L., Ardisson, V., Riou, L.M., Ahmadi, M., Marti-Batlle, D., Boturyn, D., Dumy, P., Fagret, D., Ghezzi, C., Vuillez, J.P., 2007. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 34, 2037–2047.
- Sancey, L., Garanger, E., Foillard, S., Schoehn, G., Hurbin, A., Albigès-Rizo, C., Boturyn, D., Souchier, C., Grichine, A., Dumy, P., Coll, J.L., 2009. Clustering and internalization of integrin $\alpha_v\beta_3$ with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol. Ther.* 17, 837–843.
- Sato, T., Konishi, K., Kimura, H., Maeda, K., Yabushita, K., Tsuji, M., Miwa, A., 2001. Vascular integrin beta 3 and its relation to pulmonary metastasis of colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 21, 643–647.
- Seftor, R.E., Seftor, E.A., Gehlsen, K.R., Stetler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., Ruoslahti, E., Hendrix, M.J., 1992. Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1557–1561.
- Sevick-Muraca, E.M., Sharma, R., Rasmussen, J.C., Marshall, M.V., Wendt, J.A., Pham, H.Q., Bonetas, E., Houston, J.P., Sampath, L., Adams, K.E., Blanchard, D.K., Fisher, R.E., Chiang, S.B., Elledge, R., Mawad, M.E., 2008. Imaging of lymph flow in breast cancer patients after microdose administration of a near-infrared fluorophore: feasibility study. *Radiology* 246, 734–741.
- Stupack, D.G., Cheres, D.A., 2002. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115, 3729–3738.
- Tromberg, B.J., Cerussi, A., Shah, N., Compton, M., Durkin, A., Hsiang, D., Butler, J., Mehta, R., 2005. Imaging in breast cancer: diffuse optics in breast cancer: detecting tumors in pre-menopausal women and monitoring neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 7, 279–285.
- Weissleder, R., 2001. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* 19, 316–317.
- Weissleder, R., 2002. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer* 2, 11–18.
- Weissleder, R., Ntziachristos, V., 2003. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* 9, 123–128.
- Weissleder, R., Pittet, M.J., 2008. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452, 580–589.

RESULTS

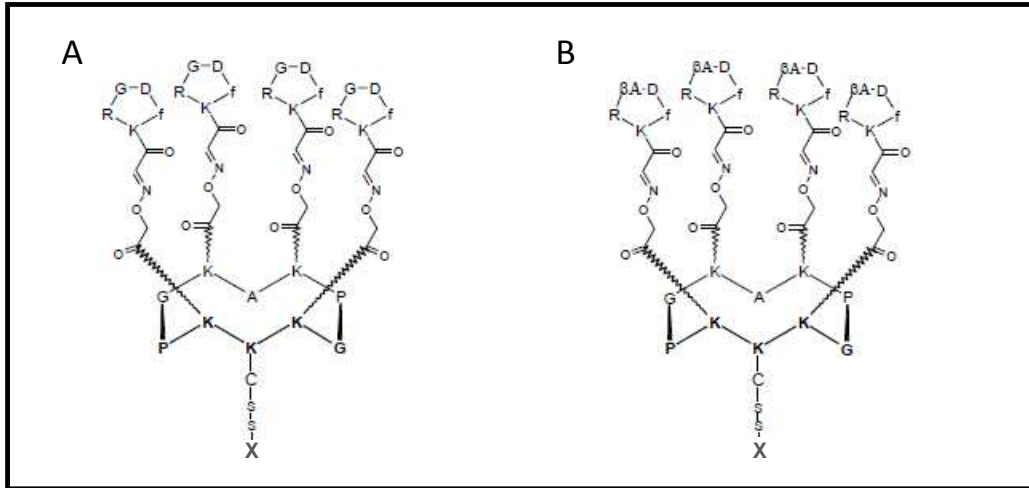


Figure 40. Structure du RAFT-(cRGD)₄ [A] et du RAFT-(cRAD)₄ [B].
 Ces molécules permettent de vectoriser différents composés (X) (fluorophores ou biomolécules) qui sont greffés *via* un pont disulfure.

I. Vectorisation ciblée de biomolécules uniques

Actuellement, les recherches en cancérologie s'orientent vers le développement de thérapies ciblées avec des molécules ciblant des anomalies spécifiques des cellules tumorales ou de leur microenvironnement. Différentes approches sont envisagées comme la thérapie génique ou l'utilisation de siRNA ou de peptides thérapeutiques. Cependant différents obstacles limitent leur efficacité *in vivo* et le vecteur semble être un élément essentiel de la réussite de ces thérapies. Ainsi, il doit permettre de véhiculer les biomolécules jusqu'à leur site d'action après administration systémique et de les libérer sous forme active.

Dans ce contexte, nous avons vectorisé le peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂ ou des siRNA à l'aide de différents vecteurs.

1. Vectorisation de peptides

1.1. Le RAFT-(cRGD)₄ comme vecteur du peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂

Le RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template) est un châssis moléculaire original, constitué d'un décapeptide cyclique présentant deux domaines indépendants permettant de séparer les deux fonctions du vecteur. Sur un domaine, la fonction de ciblage est assurée par la présentation multivalente du ligand -cRGD spécifique du récepteur d'intérêt, dans notre cas, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le second domaine du vecteur supporte les molécules d'intérêt à vectoriser : agents de détection pour l'imagerie ou agents thérapeutiques (Figure 40).

Notre équipe a montré que ce vecteur est capable d'interagir spécifiquement avec des cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et que cette interaction induit un clustering des intégrines $\alpha_v\beta_3$ qui conduit à un phénomène d'endocytose récepteur-dépendant (*via* la voie des clathrines) (Garanger et coll., 2005 ; Sancey et coll., 2009). De plus, couplé à la cyanine 5 ou à un radiotracer, et administré par voie systémique, le RAFT-(cRGD)₄ permet la détection de tumeurs localisées ou métastatiques (Garanger et coll., 2005 ; Jin et coll., 2007a et b ; Sancey et coll., 2007). Afin d'utiliser son potentiel pour un traitement anti-tumoral ciblé, il a été envisagé d'utiliser cette plateforme pour vectoriser des drogues d'intérêt de manière spécifique, notamment des agents de chimiothérapie (telle la doxorubicine), des peptides pro-apoptotiques (tel le peptide (KLAKLAK)₂) (Figure 41) ou des siRNA. Ces différentes

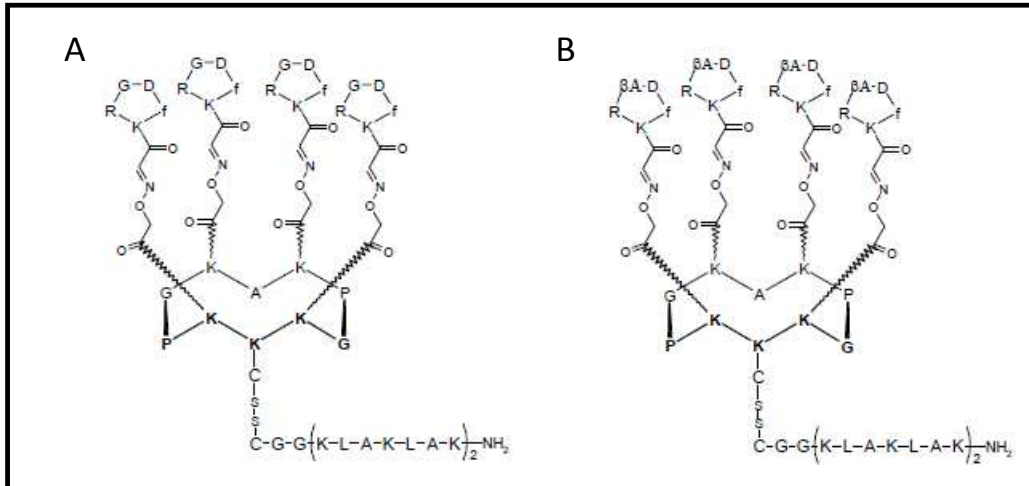


Figure 41. Structure des composés utilisés pour la vectorisation du peptide (KLAKLAK)₂.

[A] RAFT-(cRGD)₄-(KLAKLAK)₂ (ou RAFT-RGD-KLA).

[B] RAFT-(cRAD)₄-(KLAKLAK)₂ (ou RAFT-RAD-KLA).

Le peptide (KLAKLAK)₂ est greffé *via* un pont disulfure.

molécules ont été couplées au vecteur par un lien disulfure favorisant leur libération intracellulaire. L'ensemble de ces molécules a été synthétisé dans le laboratoire de chimie du Pr Pascal Dumy (CNRS UMR 5250, Grenoble).

Dans cette étude, nous avons choisi de vectoriser le peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂. Il s'agit d'un antibiotique naturel de structure amphipathique, capable d'induire l'apoptose par rupture du potentiel de membrane mitochondrial après internalisation dans les cellules (Ellerby et coll., 1999). Mais utilisé seul, il est incapable de pénétrer dans les cellules eucaryotes d'où la nécessité de le vectoriser, dans le cas présent par le vecteur RAFT-(cRGD)₄ (Figure 41).

Les différentes molécules évaluées, RAFT-RGD-KLA, RAFT-RAD-KLA et KLA, ont été synthétisées par Stéphanie Foillard (CNRS UMR 5250, Grenoble). Les premiers tests biologiques réalisés avaient montré que le RAFT-(cRGD)₄ permettait une vectorisation du peptide (KLAKLAK)₂ plus efficace que le cRGD (Foillard et coll., 2008). Ils avaient également mis en évidence l'intérêt d'utiliser un peptide (KLAKLAK)₂ protégé, par remplacement du groupement -COOH de l'extrémité C-terminale par un groupement -NH₂ (Foillard et coll., 2008). Cette modification chimique protège le peptide d'une dégradation par les protéases (del Rio et coll., 2001). Enfin, le greffage du peptide sur le vecteur *via* un pont disulfure facilite sa libération après internalisation, lui permettant ainsi d'exercer son activité biologique.

Nous avons évalué la capacité du RAFT-(cRGD)₄ à vectoriser le peptide (KLAKLAK)₂ et à le libérer sous une forme fonctionnelle pour qu'il puisse atteindre sa cible intracellulaire. Les expériences ont été réalisées sur différents modèles cellulaires tumoraux exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: HEK293(β_3), TS/A- β_3 et IGROV1.

Les expériences de microscopie confocale (réalisées par Lucie Sancey) ont été réalisées avec une molécule particulière permettant le suivi de la libération du peptide (KLAKLAK)₂ après internalisation dans les cellules : le peptide (KLAKLAK)₂ marqué par de la cyanine 5 est greffé, *via* un pont disulfure, sur le RAFT-(cRGD)₄ sur lequel est greffé un quencher (Figure 1 de l'article). Lorsque la molécule est intacte, aucune fluorescence n'est détectable. La rupture du pont disulfure permet l'étude du devenir intracellulaire du peptide fluorescent (Foillard et coll., 2009). Les résultats montrent qu'après internalisation, le RAFT-(cRGD)₄ libère, par rupture du pont disulfure, le peptide (KLAKLAK)₂, qui peut alors atteindre sa cible cellulaire : la mitochondrie (Figure 2 de l'article). De plus, la modification de l'activité mitochondriale des IGROV1 après traitement par le RAFT-RGD-KLA confirme que le

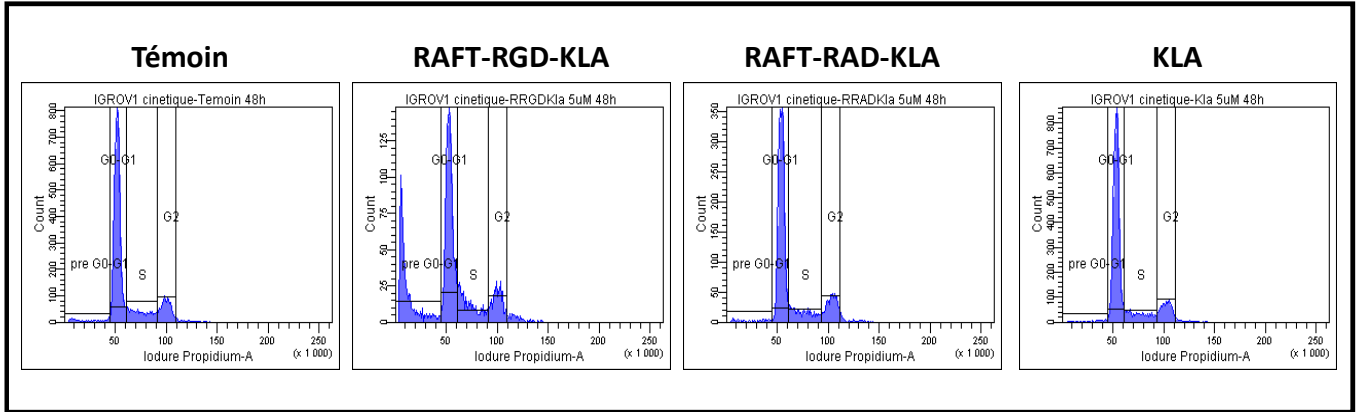


Figure 42. Analyse du cycle cellulaire après traitement par le RAFT-RGD-KLA.

Les cellules IGROV1 sont traitées pendant 48h par 5 μ M des différents peptides. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux après marquage de l'ADN par de l'iodure de propidium.

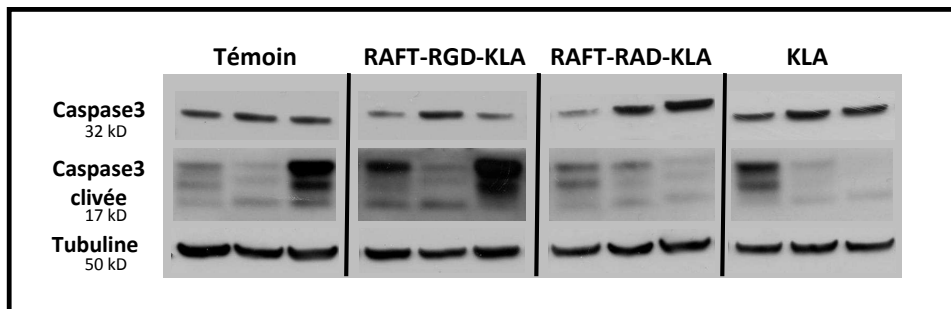


Figure 43. Analyse de la caspase 3 et de la caspase 3 clivée par western blot sur les tumeurs traitées par le RAFT-RGD-KLA.

peptide libéré est bien fonctionnel (Figure 3 de l'article) : il est capable d'induire la dépolarisation de la membrane mitochondriale initiant ainsi le processus de mort de la cellule. Nous avons ensuite analysé son influence sur la prolifération cellulaire, ainsi que sa capacité à induire l'apoptose *in vitro*. Les résultats montrent que le RAFT-RGD-KLA inhibe la prolifération cellulaire de manière dose-dépendante, avec une inhibition, après traitement par 5 μ M de peptide, de 50 à 60 % selon les types cellulaires étudiés. Aucune modification du cycle cellulaire n'est observée après traitement des cellules IGROV1 par 5 μ M des différents peptides, hormis l'apparition d'un pic préG0-G1 après traitement par le RAFT-RGD-KLA, signe de l'apoptose induite (Figure 42).

De plus, le RAFT-RGD-KLA est capable d'induire l'apoptose des cellules de manière dose-dépendante (environ 7%), ce qui n'est pas le cas pour le KLA utilisé seul (environ 1%).

Enfin, nous avons effectué un test d'inhibition de la prise tumorale *in vivo*, par traitement de souris *nude* porteuses d'une xéno greffe sous-cutanée de cellules IGROV1.

Le suivi du volume tumoral a été effectué trois fois par semaine. Le traitement par le RAFT-RGD-KLA à la dose de 31,2 mg/kg/jour, en administration intra-péritonéale, ralentit la prise de la tumeur *in vivo*. Après 14 jours de traitement, le volume tumoral des souris traitées par le RAFT-RGD-KLA est trois fois inférieur à celui du groupe traité par le KLA et cinq fois inférieur à celui du groupe contrôle. Cette inhibition de la prise tumorale est associée à une inhibition de la prolifération cellulaire dans les tumeurs, qui a été évaluée par un marquage au Ki67. Elle est de l'ordre de 12 % pour les tumeurs traitées par le RAFT-RGD-KLA *versus* 28 % pour les groupes contrôles (Figure 5 de l'article).

Cette inhibition de la prolifération cellulaire, non associée à une modification du cycle cellulaire, pourrait être due au fait que le peptide KLA n'est pas assez efficace pour induire l'apoptose de manière importante. En revanche, en agissant au niveau de la mitochondrie, il pourrait contribuer à la diminution de la production d'ATP, engendrant une inhibition de la prolifération cellulaire, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

De plus, l'analyse par western blot des extraits tumoraux est en faveur d'un plus fort niveau d'expression de la caspase 3 clivée dans les tumeurs traitées par le RAFT-RGD-KLA, associée à une diminution du niveau d'expression de la caspase 3, en comparaison aux tumeurs traitées par les peptides contrôles (KLA et RAFT-RAD-KLA) (Figure 43). Le RAFT-RGD-KLA induit donc, mais de manière modeste, de l'apoptose *in vivo*.

Ces résultats démontrent donc que le RAFT-(cRGD)₄ est capable de véhiculer un peptide thérapeutique de la cavité péritonéale jusqu'à la tumeur sous-cutanée et de délivrer une

molécule active spécifiquement dans les cellules cibles. Aucune toxicité particulière n'est notée chez les animaux, dans les tissus sains

1.2. Article 1

Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors *in vivo*.

Dufort S.* and Sancey L.*, Hurbin A., Foillard S., Boturyn D., Dumy P., Coll J-L.

Soumis dans Journal of Drug Targeting, 2010.

*Co-premiers auteurs

1.3. Conclusions

Nous avons ainsi fait la preuve de concept que le RAFT-(cRGD)₄ était capable de véhiculer un peptide jusqu'aux cellules d'intérêt, d'en permettre la libération pour qu'il exerce son activité spécifique. Cependant, même vectorisé par le RAFT-(cRGD)₄, le peptide (KLAKLAK)₂ reste relativement peu efficace. Une explication possible étant un problème de rendement du vecteur car pour un RAFT-(cRGD)₄ une seule molécule active est vectorisée. Des travaux antérieurs du laboratoire portant sur la vectorisation de la doxorubicine par le RAFT-(cRGD)₄, ont également montré un problème d'efficacité très probablement dû à un problème de libération de la doxorubicine.

Pour améliorer l'efficacité thérapeutique, il faudrait donc augmenter la toxicité du peptide, soit en augmentant le nombre de peptides (KLAKLAK)₂ vectorisé par exemple avec un système multivalent de type nanoparticulaire, soit en greffant d'autres biomolécules plus actives ou d'autres drogues anti-tumorales. Il serait intéressant de greffer une pro-drogue : molécule inactive sous forme greffée et active lors de sa libération. Ainsi certains produits qui ne peuvent actuellement pas être utilisés à cause de leur forte toxicité sur les cellules saines, pourraient être vectorisés sous forme de pro-drogue et libérés en leur site d'action afin de pouvoir réaliser une thérapie ciblée.

Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors *in vivo*.

Dufort S* and Sancey L*, Hurbin A, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Coll J-L.

Soumis dans Journal of Drug Targeting, 2010

Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors in vivo

Sandrine Dufort^{1,3,*}, Lucie Sancey^{1,2,*}, Amandine Hurbin^{1,2}, Stéphanie Foillard^{2,4}, Didier Boturyn^{2,4}, Pascal Dumy^{2,4}, Jean-Luc Coll^{1,2}.

¹ INSERM U823, Grenoble, France

² Université Joseph Fourier, Grenoble, France

³ CHU de Grenoble, DBTP UM Biologie des cancers et Biothérapies, Grenoble, France

⁴ Département de Chimie Moléculaire, CNRS, UMR-5250, Grenoble, France

* Equal contribution

Correspondance to: Dr Coll Jean-Luc

INSERM U823, Equipe 5

Institut Albert Bonniot, BP 170

38 042 Grenoble cedex 9, France

Phone: 33 [0]4 76 54 95 53 / Fax: 33 [0]4 76 54 94 13

E-mail: Jean-Luc.Coll@ujf-grenoble.fr

Running title: Drug vectorization via a RGD-tetrameric peptide

Key words: drug vectorization, cancer, integrin $\alpha_v\beta_3$, RGD-peptide

Abstract

RGD peptides recognize the $\alpha_v\beta_3$ integrin, a receptor that is overexpressed on the surface of both tumor blood vessels and cancerous cells. These peptides are powerful tools that act as single antiangiogenic molecules, but recently also have been used for tumor imaging and drug targeting. We designed the molecule RAFT-(c[-RGDfK-])₄, a constrained and chemically defined entity that can be produced at clinical grade quality. This scaffold was covalently coupled via a disulfide, labile bridge to the proapoptotic peptide (KLAKLAK)₂ (RAFT-RGD-KLA), consisting of L-amino acids and protected at the C-terminus by an -NH₂ group. A fluorescent, activatable probe was also introduced, allowing intracellular localization using confocal microscopy. At 2.5 μ M, this molecule induced the intracellular release of an active KLA peptide, which in turn caused mitochondrial depolarization and cell death *in vitro* in human tumor cells. In an *in vivo* mouse model, the repeated intraperitoneal injection of the RAFT-RGD-KLA peptide was found to prevent the growth of remote subcutaneous tumors. In contrast, the negative control peptide RAFT-RAD-KLA, which does not recognize the integrin, did not affect cancer cells *in vitro* or *in vivo*. Thus, this study demonstrated that the natural L-isomer of an antitumor peptide is capable of killing tumor cells in an RGD-dependent manner, thus lowering the non-specific cytotoxic effects expected to occur when using cationic cytotoxic peptides. Thus, this chemistry is suitable for the design of complex, multifunctional molecules that can be used for both imaging and therapeutics, representing the next generation of perfectly controlled, targeted drug delivery systems.

Introduction

Selective inactivation of certain tumor-enhancing events would be expected to provide strong therapeutic benefits with the absence of detrimental side effects, as are seen with “conventional” chemotherapy. Examples of such targeting have been described for the treatment of gastrointestinal stromal tumors, renal cell carcinoma, breast cancer, colorectal cancer and non–small cell lung cancer patients harboring epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations (bevacizumab and erlotinib). The new highly selective molecules that are currently being tested or have recently been proven in clinical trials are either small molecules that diffuse through virtually every cell of the body, such as tyrosine kinase inhibitors (TKI), or monoclonal antibodies that bind specifically to their target and block it. Small molecules have the disadvantage of diffusing equally well in sick and normal cells, thus causing adverse effects despite their extremely high specific activity. On the other hand, the major disadvantage associated with the use of monoclonal antibodies comes from their large size and poor diffusion within solid tumors. Additionally, this diffusion problem has also prevented the successful utilization of other targeted large molecules, such as nanoparticles.

To avoid some of the therapeutic difficulties concerning the specificity, size and diffusion of the targeted molecules, we designed a molecular scaffold with a low molecular weight called RAFT(c[-RGDfK-])₄. This molecule (RAFT-RGD) binds to and is endocytosed by tumor cells that overexpress the integrin $\alpha_v\beta_3$, a receptor that is easily accessible to the peptide because it is largely expressed on the surfaces of both the tumor blood vessels and tumor cells themselves. We already presented evidence that the RAFT-RGD molecule specifically targeted the $\alpha_v\beta_3$ integrin *in vitro* and *in vivo*, was rapidly endocytosed and facilitated preclinical tumor detection using nuclear or optical imaging methods (1-5). These properties of RAFT-RGD make it a suitable vector for image-guided surgery of tumors (2-4, 6, 7).

Because RAFT-RGD is rapidly internalized via the $\alpha_v\beta_3$ receptor in clathrin-coated small acidic vesicles (8), we decided to use it as a drug delivery system. Using an activatable disulfide bridge (9), we linked the proapoptotic (KLAKLAK)₂, (KLA) toxic peptide to the RAFT scaffold (5). KLA is a natural antibiotic with an amphipathic structure that is known to disrupt the negatively charged mitochondrial membrane and to induce cell death if it is properly delivered by a vector into the cellular cytoplasm (10-13).

In the present study, we demonstrate the ability of RAFT-RGD to specifically carry and release a functional KLA peptide into three different cell lines *in vitro*, leading to mitochondrial depolarization. Using a quenched fluorescent probe, the distribution and subcellular release of the active KLA peptide can be followed using optical molecular imaging *in vitro* and *in vivo*. In addition, we show that repeated intraperitoneal injections of RAFT-RGD-KLA significantly reduced the growth rate of remote subcutaneous tumors, confirming the capacity of the RAFT-RGD carrier to both target these tumors after an intraperitoneal administration and effectively deliver an active cytotoxic peptide *in vivo*.

Materials and Methods

RGD-Peptide Synthesis and Fluorescent Labeling

The different compounds were synthesized according to previously reported procedures (5, 14). The chemical structures are presented in Fig. 1. Four copies of the c[-RGDfK-] peptide were grafted onto the upper face of the cyclic pentapeptide RAFT backbone. On the opposite side, the peptidic sequence (KLAKLAK)₂-NH₂ (KLA) was grafted *via* a disulfide bridge and a short linker on the lysine chain (c[-KKKPGKAKPG-]) (15). From both ends of this disulfide bridge, a quencher (QSH21[®]) could be added onto the first cysteine, and a Cy5 mono NHS (N-hydroxysuccinimide) ester (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) could be added onto the second cysteine, as described in Fig. 1. As a negative control probe, RAFT(c[-RβADfK-])₄ (RAFT-RAD) was also synthesized in a similar way.

Cell Lines and Culture Conditions

The cell line HEK293(β₃) is a stable human embryonic kidney cell line (HEK293) transfectant of the human β₃ integrin that was cultured as described in Jin et al. (1) in DMEM supplemented with 1% glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin and 700 μg/ml Geneticin (G418 sulfate, Gibco, Paisley, UK). IGROV-1, human ovarian carcinoma cells, and TS/A-pc, mouse mammary carcinoma cells, were cultured in RPMI 1640 supplemented with 1% glutamine, 10% FBS, 50 units/ml penicillin, and 50 μg/ml streptomycin. All cell lines were cultured at 37°C in a humidified 95% air / 5% CO₂ atmosphere. All of the cells described here are integrin α_vβ₃-positive (1-3).

Colocalization Studies

The cells were cultured in 4-well Lab-Tek I chambered coverglass slides in the appropriate medium and kept at 37°C. Medium was removed and RAFT-RGD-QSY21[®]-S-S-KLA-Cy5 was added at 2 µM for 1 hr in DMEM without FBS and phenol red. Then red mitotracker dye (M7512, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was added to the cell medium at a concentration of 100 nM together with 5 µM Hoechst for 10 min. The cells were then carefully rinsed and the medium was replaced. The cells were observed in a 37°C, 5% CO₂ environment on the LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Confocal slices were either 0.5 or 1 µm thick. The images (8-bit color) were processed using ImageJ software, version 1.37.

Proliferation Assay and Induction of Apoptosis

IGROV-1 cells were seeded at a density of 2.1×10^4 per cm². The following day, the media were replaced with fresh media containing 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 µM of the appropriate compound. These media were also changed after 24 hr. The cells were harvested and analyzed at 48 hr. Three separate experiments (n = 3) were performed, and the results were expressed as the mean ± SD of the percentage of proliferation compared to the control. The cells were then fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min, and the nuclei were stained with Hoechst 33342 at a concentration of 5 µM for 10 min to allow the quantification of apoptotic cells. The results were expressed as the percentage of apoptotic cells (at least 300 cells were counted per sample).

Mitochondrial Activity: Confocal Imaging

Mitochondrial activity was assessed using the mitochondrial potential sensor JC-1 (Invitrogen). IGROV-1 cells were cultured in 4-well Lab-Tek chamber slides and starved for 30 min before the addition of RAFT-RGD-KLA at a concentration of 1 µM for 30 to 60 min at 37°C. JC-1 was then used as described by the manufacturer at a concentration of 10 µg/ml

for 10 min at 37°C. Functional mitochondria were observed after excitation at 543 nm from 565 to 615 nm (red), whereas depolarized mitochondria were observed after excitation at 488 nm from 500 to 550 nm (green). The experiment was performed on at least 20 randomly chosen cells. Three-dimensional topographies were determined using the Topo application within the LSM510 software, and the fluorescence intensities were quantified with the threshold application within the ImageJ software. In control conditions, the mean of the fluorescence intensities was arbitrarily normalized to 1 for each individual imaging, and the variations observed after RAFT-RGD-KLA treatment were statistically analysed with an unpaired t-test (Statview).

Mitochondrial Activity: FACS Analysis

IGROV-1 cells were cultured in 6-well plates and starved for 30 min before the addition of 2 μ M RAFT-RGD-KLA, KLA or RAFT-RAD-KLA for 2 hr. The mitochondria were labeled with 10 μ g/ml JC-1 for 30 min at 37°C. After treatment, the cells were resuspended with trypsin and carefully washed in PBS before analysis. Strongly to weakly polarized mitochondria ratios were determined compared to control conditions and then arbitrarily normalized to 100.

***In Vivo* Tumor Study**

Ten million IGROV-1 cells were injected subcutaneously into 6-week-old female NMRI nude mice (6-8 weeks old, Janvier, Le Genest Saint Isle, France; n = 5 to 7 mice per group). Mice in the experimental groups were injected intraperitoneally five times per week with a total volume of 0.2 ml of PBS alone or a solution providing 0.12 μ mol of RAFT-RGD-KLA or RAFT-RAD-KLA per mouse until day 14. Tumor length and width were measured using

Vernier calipers, and the tumor volume was calculated using the standard formula: length \times width squared \times 0.52 (16). Results are expressed as tumor volume \pm S.E.M.

Immunohistochemical staining.

Tumor sections, 7 μ m thick, were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature, then saturated for 5 minutes with 0.03% bovine serum albumin, incubated overnight at 4°C with monoclonal mouse antihuman Ki67 (1/150; Dako, Trappes, France). Immunohistochemistry was further processed using the Histostain-Plus Bulk Kit (Invitrogen). The final reaction product was visualized with diaminobenzidine. Negative controls were performed with the same sections incubated with irrelevant antibody (mouse IgG 1/30,000).

Results

RAFT-RGD-mediated delivery of KLA

The RAFT-RGD scaffold was used for the targeted delivery of the proapoptotic drug KLA into different cell lines expressing the $\alpha_v\beta_3$ integrin. KLA was covalently attached to the dye cyanine 5 (Cy5) and linked to the RAFT-RGD vector by a labile disulfide bridge. On the other side of this bridge, the RAFT-RGD moiety was coupled to QSY21[®], a quencher that absorbs Cy5 fluorescence when the S-S link is intact (see Fig. 1). During internalization in the target cell, the disulfide link was reduced, leading to the appearance of a detectable Cy5 fluorescence only after the physical separation between QSY21[®] and KLA-Cy5 had occurred. This molecular construction was thus used to follow the delivery of the KLA-Cy5 molecule. Confocal imaging done on three different cell lines indicated that RAFT-RGD was able to efficiently release KLA-Cy5 into small vesicles (red spots). Mitochondrial labeling and colocalization experiments with KLA-Cy5 demonstrated that the released peptide reached its main target, the mitochondrion, although small endocytic vesicles containing only KLA-Cy5 could still be detected. These vesicles were mostly located in the cell periphery and represented newly formed endocytotic vesicles (Fig. 2).

***In vitro* toxicity of RAFT-RGD-KLA**

The activity of the vectorized KLA on IGROV-1 cell-proliferation and/or apoptosis was determined (Fig. 3). Cells were treated with 0 to 5 μ M RAFT-RGD-KLA, RAFT-RAD-KLA or KLA, for 48 hr, and the number of viable cells was determined (Fig. 3A). In this assay KLA and RAFT-RAD-KLA had no or very moderate antiproliferative effects ($p = 0.42$ and $p < 0.05$ at 5 μ M, respectively). In contrast, RAFT-RGD-KLA significantly reduced IGROV-1

proliferation ($p < 0.05$ at $1 \mu\text{M}$ and $p < 0.01$ at lower concentrations when compared with KLA).

To further characterize the proapoptotic effect of RAFT-RGD-KLA, apoptosis induced by the different compounds was quantified by counting the number of fragmented nuclei after Hoechst staining (Fig. 3B). In agreement with the data presented in Fig. 3A, at $5 \mu\text{M}$, RAFT-RGD-KLA significantly enhanced apoptosis compared to all other groups ($p < 0.05$). These experiments on proliferation and apoptosis were also performed on the other two cell lines (TS/A-pc and HEK293(β_3)) and produced similar results.

The mitochondrial activity in the IGROV-1 cells was then studied in the presence of RAFT-RGD-KLA at a concentration of $1 \mu\text{M}$ using the green monomer compound JC-1. This compound fluoresces red when it is in its “J-aggregated” form in polarized healthy mitochondria (17, 18), while it fluoresces green when it is in its monomeric dispersed form, a hallmark of the collapsing of mitochondria during apoptosis or after metabolic stress. Two hours after the addition of $1 \mu\text{M}$ RAFT-RGD-KLA to the culture medium of the IGROV-1 cells, mitochondrial depolarization was observed (Fig. 4A), as indicated by an increase in the green fluorescence intensity from 1 (control condition) to 3.62 ± 2.99 (mean of fluorescence intensity/pixel) after treatment ($p < 0.05$). The red fluorescence intensity was similar in both conditions (1 to 1.05 ± 0.30 , $p = 0.6$).

Using the same model, mitochondrial activity was studied by flow cytometry in the presence of $2 \mu\text{M}$ RAFT-RGD-KLA, RAFT-RAD-KLA or KLA for 2 hr (Fig. 4B). Mitochondrial ratios were defined as polarized (*i.e.*, functional mitochondria) / depolarized mitochondria and normalized to 100 in the control condition. The presence of RAFT-RGD-KLA significantly decreased the mitochondrial ratio compared to the control (44.43 ± 8.24 vs. 100 ± 11.33) or RAFT-RAD-KLA-treated groups (61.01 ± 11.29) ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively).

Reduction of tumor growth *in vivo* after intraperitoneal injection of RAFT-RGD-KLA

The toxicity of RAFT-RGD-KLA was confirmed *in vivo* on mice bearing IGROV-1 flank tumors (Fig. 5). The animals were treated repeatedly with intraperitoneal (IP) injections of PBS or 0.12 μmol of RAFT-RGD-KLA or RAFT-RAD-KLA daily beginning on the day following cell implantation. Fifteen days later, tumor growth was significantly reduced by RAFT-RGD-KLA compared to all of the other groups ($p \leq 0.0001$). Moreover, no significant difference was observed after RAFT-RAD-KLA treatment compared to the control group ($p = 0.6536$).

This antitumor activity was associated with a marked decrease in tumor cell proliferation. This was demonstrated on tumor sections extracted at day 14, after immunostaining with an antibody to the Ki67 nuclear antigen. Indeed, the percentage of cycling, Ki67-positive cells was $28.30 \pm 2.07\%$ and $28.33 \pm 3.37\%$ for the control or the RAFT-RAD-KLA group, respectively, whereas only $12.87 \pm 3.83\%$ of the cells were cycling in the RAFT-RGD-KLA group ($p < 0.01$) (Fig. 5B). RAFT-RGD-KLA treatment was also associated with a slightly increased level of cleaved caspase-3 staining in the tumors (data not shown).

Discussion

Our aim was to demonstrate that RAFT-RGD, a multimeric targeting vector capable of detecting tumors and their metastasis (6), can also be used for the delivery of a toxic peptide *in vivo*.

Nanomedicine is on the cusp of being able to provide us with several types of new therapeutic systems to fight cancer. Nanoparticles are currently imparting a “second life” to the chemotherapeutic arsenal. Indeed, nanoparticles not only help with drug solubilization and bioavailability but also assist in the transport of drugs across barriers and with the release of drugs to tumor sites while sparing healthy tissues from the damage that causes the major side effects of chemotherapy. Several drugs are currently being encapsulated such as doxorubicin, paclitaxel, adriamycin and taxol (for a recent review see Kedar *et al*; (19). However, the tumor specificity of these nanoparticles is due to the enhanced permeability and retention phenomenon (EPR effect), which allows for their passive accumulation into tumors. Specific, ligand-mediated, active targeting of nanoparticles is still a major issue, and it is possible that this cannot be expected by simply adding a tumor-specific ligand onto the surface of the particles (20). In addition, despite some promising results, the delivery of large “bio”-drugs such as DNA, siRNA or peptides by nanoparticles is still very limited, which may be related to our poor ability to achieve an active targeting that would allow the binding, internalization, release and adapted intracellular trafficking of these unstable molecules. We thus choose a parallel approach, based on the use of our multifunctional tumor targeting RAFT-RGD molecule. Because it is actively internalized once attached to the integrin receptor (8) and then releases the drug or molecular probe into the cytoplasm of the target cells (2, 9, 15) due

to the presence of a labile disulfide bridge between the RAFT-RGD vector and the cargo, we hypothesized that RAFT-RGD could efficiently deliver a toxic KLA peptide to tumor cells. RAFT-RGD-KLA allows the internalization and release of KLA into intracellular vesicles, but a fraction of the peptide can escape these vesicles and reach its main target, the mitochondria. Indeed, we observed that 90 to 95% of the mitochondria were decorated with the Cy5-labeled KLA peptide in our conditions. In addition, the released KLA peptide was still active and toxic because it was disturbing the mitochondrial potential, as demonstrated by the membrane potential sensitive dye JC-1. At low doses, the released drug initiated mitochondrial depolarization, which could result in the inhibition of cellular proliferation and the induction of apoptosis when as little as 2.5 μM of peptides was provided to the IGROV-1 human cancer cells *in vitro*.

The amphipathic KLA peptide not very toxic (21). It is supposed to induce apoptosis by disrupting the negatively charged mitochondrial membrane, but not the zwitterionic plasma membrane of eukaryotic cells. However, a very similar peptide was shown to induce also necrosis after disruption of the plasma membrane (22). The vectorization of this proapoptotic peptide (or of its D-diastereomer) has previously been reported using antibody-targeted delivery (11), fusion to the cell-penetrating peptide TAT (23) or poly-arginine (24), infection with a recombinant adenovirus vector (25) and by fusion to a protein transduction domain (26) or to an integrin $\alpha_v\beta_3$ targeting RGD-peptide (10, 12). In our experiment, the growth of human IGROV-1 xenografts was significantly reduced after intraperitoneal treatment with KLA (0.12 μmol , daily) conjugated to RAFT-RGD. *In vivo*, the reduction of tumor growth involved a diminution in the number of cycling cells and a poor induction of apoptosis. However, apoptosis was detected *in vitro* with low doses of molecules (2.5 μM). This dose was significantly less than the previously reported 80 to 100 μM concentrations of protected peptides of the D-form (10, 21). This suggests that the use of a multimeric RGD-presenting

scaffold, plus the -NH₂ modification on the C-terminal extremity of the KLA peptide (27) and the introduction of a labile disulfide bridge, are sufficient to provide active peptide delivery to the mitochondria of target cells after an intraperitoneal injection *in vivo*. The natural L-diastereomers are known to lose their activity in serum and to be cleaved by trypsin and proteinase K (28). Diastereomers containing L or D amino acids have several functional differences with regard to their capacity to permeate zwitterionic membranes (29). In addition, it has been shown that RGD-mediated systemic delivery of a toxic cationic peptide called tachylepsin can induce tumor killing (30); however, its mechanism of action could be indirect and may involve the activation of the classic complement pathway (31). In a previous, unpublished work, we introduced two copies of the KLA peptide attached covalently without the disulfide bridge to the bottom face of both RAFT-RGD and RAFT-RAD. In this case, cellular toxicity was observed independent of the presence of RGD, and the RAD-containing molecule was also toxic. This suggested that the cell membranes were degraded by a double helix that was formed by the two KLA peptides acting as a corkscrew, possibly perforating the cell membrane without any specificity (data not shown). For the compound used in this study, the use of an NH₂-protected, L-isomer of KLA was found to be specific and required the binding of the molecule to its receptor because RAFT-RAD-KLA had no effect *in vitro* or *in vivo*. Thus, it is possible to rule out a non-specific mechanism of action such as complement activation or direct permeation of the plasma membrane by KLA. RAFT-RGD was necessary to concentrate enough KLA motifs on the cell surface and to induce their internalization within clathrin-coated vesicles (8) into which the disulfide link would be reduced and the KLA moiety released. The KLA peptide could then help the molecule to destabilize the vesicles and reach the mitochondria. *In vivo*, the amount of intact KLA in contact with the mitochondria was not sufficient; rather, the peptide reduced cellular proliferation by decreasing the energy supply. To augment the concentration of active peptide

reaching the target cells, it would be interesting to encapsulate and protect RAFT-RGD-KLA in multi-stage delivery systems such as stealth liposomes or nanovesicles. As discussed earlier, this would allow the accumulation of a large quantity of intact RAFT-RGD-KLA by the EPR effect. When the capsule collapsed within the tumor, it would then release the targeted delivery system to the immediate vicinity of the tumor cell surface, where the RAFT-RGD would then efficiently mediate the intracellular uptake and delivery of KLA.

Acknowledgements

We thank Corine Tenaud and Mélanie Guidetti for their technical assistance. This study was supported by the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), the INCA (Institut National du Cancer), the CLARA (Canceropole Lyon Auvergne Rhône-Alpes), the University Joseph Fourier, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and the ANR (Agence Nationale pour la Recherche).

Legend to Figures

Figure 1: Representative picture of RAFT-(cRGD)₄-QSY21[®]-S-S-(KLAKLAK)₂-Cy5 in medium alone (A-C) or with 1 μ l β -mercaptoethanol (B-D). This reducing agent induced disulfide bridge rupture and allowed the detection of the Cy5 fluorescence with the 2D-FRI imaging system before (C) and after (D) the addition of DMSO β -mercaptoethanol.

Figure 2: Confocal microscopy on living cells. The cells were starved for 30 min prior to the addition of 2 μ M RAFT-(cRGD)₄-QSY21[®]-S-S-(KLAKLAK)₂-Cy5. After 1 hr, the mitochondria were labeled with Mitotracker. Confocal imaging was performed between 1 and 2 hr. Colocalization of the mitochondria (green) and (KLAKLAK)₂-Cy5 (red) appears yellow. Note that the red fluorescence was not observed under excitation at 633 nm until 1 hr after addition of RAFT-(cRGD)₄-QSY21[®]-S-S-(KLAKLAK)₂-Cy5 in the medium. Pictures are representative of cells observed on three separate plates. Scale bar: 10 μ m.

Figure 3: RAFT-RGD-KLA-mediated cytotoxicity. (A) IGROV-1 cells were treated for 48 hr with 0.5, 1.0, 2.5 or 5.0 μ M of each compound, and the number of viable cells was counted. The results are expressed as the percentage of cells compared to untreated control. (B) The cells were then fixed, and their nuclei were labeled using Hoechst 33342. The number of apoptotic nuclei was counted. The results are expressed as the mean \pm SD (n = 3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

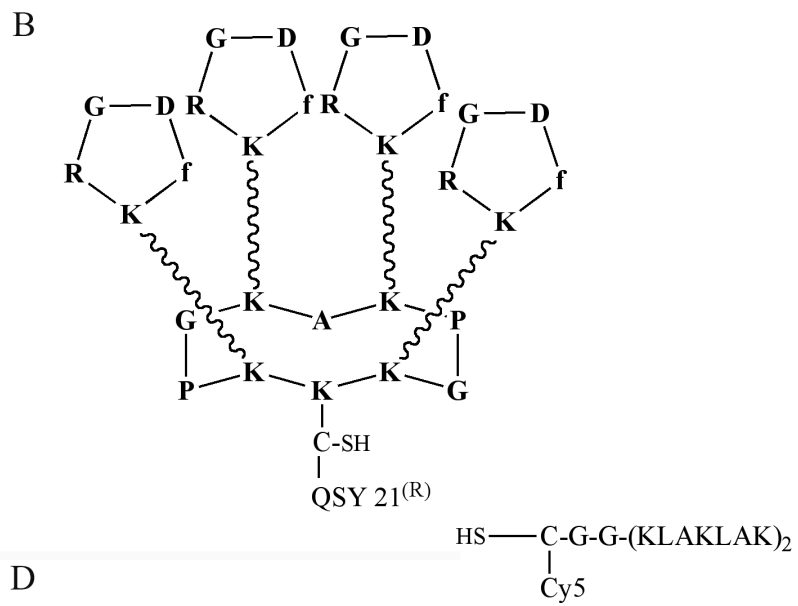
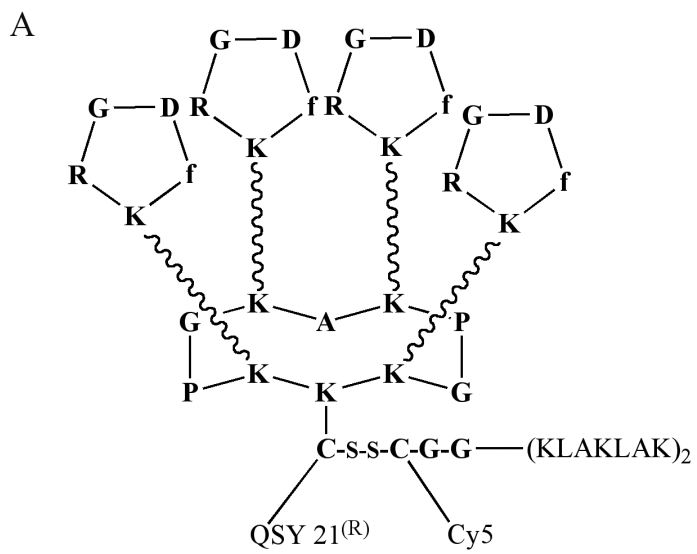
Figure 4: Mitochondrial activity in IGROV-1 cells. (A) Example of confocal imaging of polarized (red, ex. 543 nm) and depolarized (green, ex. 488 nm) mitochondria in IGROV-1 living cells before and after treatment with RAFT-RGD-KLA at a concentration of 1 μ M. Corresponding 3D surface topographies from confocal imaging are represented below. Treatment with RAFT-RGD-KLA induced an increase in green fluorescence, *i.e.*, mitochondria depolarization ($p < 0.05$). Topography scale: low (in blue) to high fluorescence intensity (in red). Angle of view: lower right corner. (B) Polarized to depolarized mitochondria ratio from JC-1 staining of IGROV-1 cells after 2 hr of treatment with PBS (control) or 2 μ M RAFT-RGD-KLA, KLA or RAFT-RAD-KLA. RAFT-RGD-KLA was found to significantly decrease the mitochondrial ratio compared to the control condition ($p = 0.002$ ** and $p = 0.095$, respectively).

Figure 5: Inhibition of tumor growth *in vivo* by RAFT-RGD-KLA. (A) At day 0, IGROV-1 cells were implanted subcutaneously in the right legs of nude mice. Mice were treated daily for 14 days with an IP injection of 200 μ l PBS (control) or with solutions containing 0.12 μ mol RAFT-RGD-KLA or RAFT-RAD-KLA. Tumor volumes are expressed as the mean tumor volume \pm S.E.M. ($n = 5-7$ per group; *** $P < 0.0001$). (B) Ki67 nuclear protein detected by immunostaining on frozen tumor sections from control mice, mice treated by RAFT-RGD-KLA or RAFT-RAD-KLA, as indicated. Histogram: the percentage of positive cells for Ki67 was determined after counting the number of positively stained cells per 1,000 cells on the tissue section. The results are expressed as the mean \pm SD; ** $P < 0.01$ for comparisons between RAFT-RGD-KLA and control.

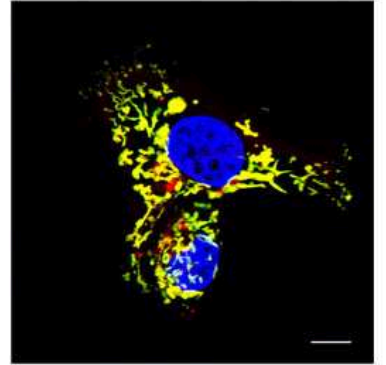
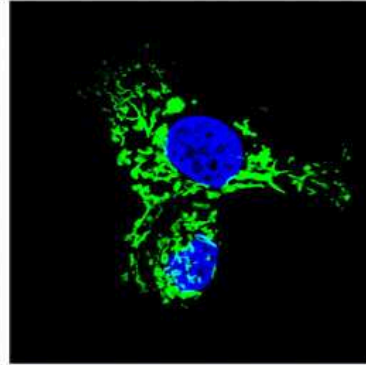
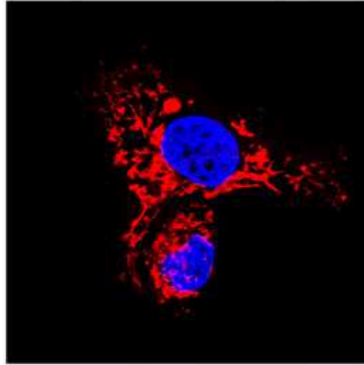
References

1. Jin ZH, Josserand V, Foillard S, et al. In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer* 2007;6:41.
2. Jin ZH, Josserand V, Razkin J, et al. Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)4. *Mol Imaging* 2006 Jul;5(3):188-97.
3. Sancey L, Ardisson V, Riou LM, et al. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer (99m)Tc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007 Dec;34(12):2037-47.
4. Ahmadi M, Sancey L, Briat A, et al. Chemical and Biological Evaluations of an (111) In-Labeled RGD-Peptide Targeting Integrin Alpha(V) Beta(3) in a Preclinical Tumor Model. *Cancer Biother Radiopharm* 2008 Dec 27.
5. Foillard S, Sancey L, Coll JL, Boturyn D, Dumy P. Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org Biomol Chem* 2009 Jan 21;7(2):221-4.
6. Keramidas M, Josserand V, Righini CA, Wenk C, Faure C, Coll JL. Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg* 2010 May;97(5):737-43.
7. Sancey L, Dufort S, Josserand V, et al. Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. *Int J Pharm* 2009 Sep 11;379(2):309-16.
8. Sancey L, Garanger E, Foillard S, et al. Clustering and internalization of integrin avb3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther* 2009;in press.
9. Razkin J, Josserand V, Boturyn D, et al. Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice. *ChemMedChem* 2006 Oct;1(10):1069-72.
10. Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, et al. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 1999 Sep;5(9):1032-8.
11. Marks AJ, Cooper MS, Anderson RJ, et al. Selective apoptotic killing of malignant hemopoietic cells by antibody-targeted delivery of an amphipathic peptide. *Cancer Res* 2005 Mar 15;65(6):2373-7.
12. Smolarczyk R, Cichon T, Graja K, Hucz J, Sochanik A, Szala S. Antitumor effect of RGD-4C-GG-D(KLAKLAK)2 peptide in mouse B16(F10) melanoma model. *Acta Biochim Pol* 2006;53(4):801-5.
13. Ko YT, Falcao C, Torchilin VP. Cationic liposomes loaded with proapoptotic peptide D-(KLAKLAK)(2) and Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide G3139 for enhanced anticancer therapy. *Mol Pharm* 2009 May-Jun;6(3):971-7.
14. Boturyn D, Coll JL, Garanger E, Favrot MC, Dumy P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* 2004 May 12;126(18):5730-9.
15. Garanger E, Boturyn D, Jin Z, Dumy P, Favrot MC, Coll JL. New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* 2005 Dec;12(6):1168-75.
16. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997 Jan 24;88(2):277-85.
17. Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 1991 May 7;30(18):4480-6.
18. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 May 1;88(9):3671-5.

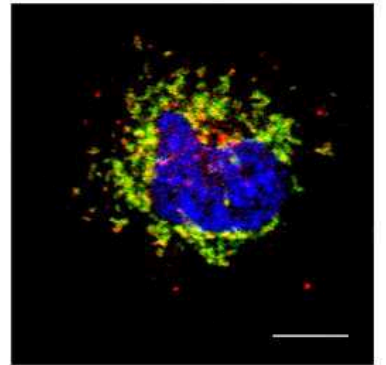
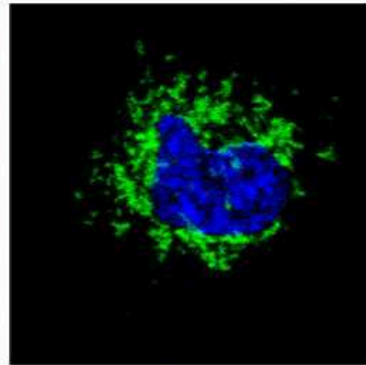
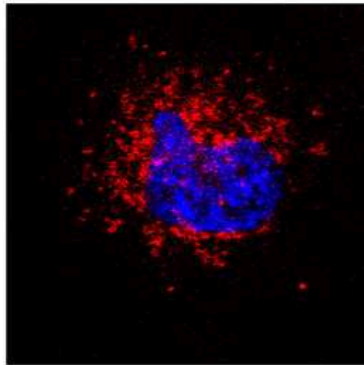
19. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine* 2010 Jun 11.
20. Ferrari M. Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers. *Trends Biotechnol* 2010 Apr;28(4):181-8.
21. Borgne-Sanchez A, Dupont S, Langanne A, et al. Targeted Vpr-derived peptides reach mitochondria to induce apoptosis of alphaVbeta3-expressing endothelial cells. *Cell Death Differ* 2007 Mar;14(3):422-35.
22. Papo N, Seger D, Makovitzki A, et al. Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide. *Cancer Res* 2006 May 15;66(10):5371-8.
23. Kwon MK, Nam JO, Park RW, et al. Antitumor effect of a transducible fusogenic peptide releasing multiple proapoptotic peptides by caspase-3. *Mol Cancer Ther* 2008 Jun;7(6):1514-22.
24. Law B, Quinti L, Choi Y, Weissleder R, Tung CH. A mitochondrial targeted fusion peptide exhibits remarkable cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 2006 Aug;5(8):1944-9.
25. Oshikiri T, Miyamoto M, Hiraoka K, et al. Transcriptional targeting of adenovirus vectors with the squamous cell carcinoma-specific antigen-2 promoter for selective apoptosis induction in lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2006 Sep;13(9):856-63.
26. Mai JC, Mi Z, Kim SH, Ng B, Robbins PD. A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors. *Cancer Res* 2001 Nov 1;61(21):7709-12.
27. Foillard S, Jin ZH, Garanger E, et al. Synthesis and biological characterisation of targeted pro-apoptotic peptide. *Chembiochem* 2008 Sep 22;9(14):2326-32.
28. Papo N, Oren Z, Pag U, Sahl HG, Shai Y. The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J Biol Chem* 2002 Sep 13;277(37):33913-21.
29. Papo N, Shai Y. New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry* 2003 Aug 12;42(31):9346-54.
30. Chen Y, Xu X, Hong S, et al. RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth. *Cancer Res* 2001 Mar 15;61(6):2434-8.
31. Chen J, Xu XM, Underhill CB, et al. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells. *Cancer Res* 2005 Jun 1;65(11):4614-22.



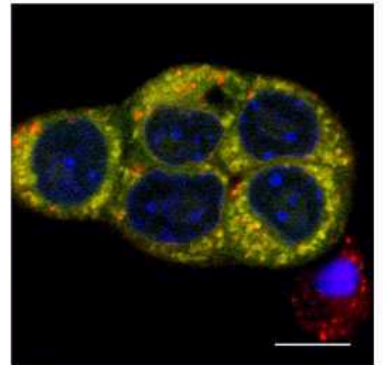
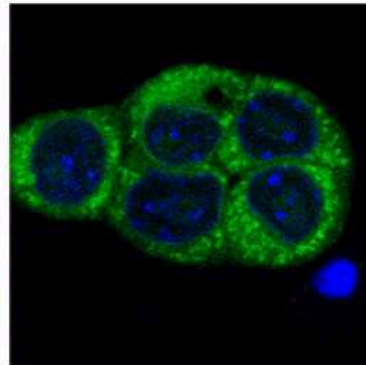
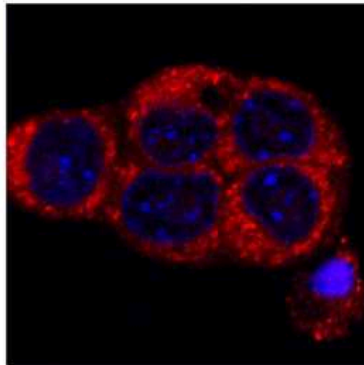
IGROV-1

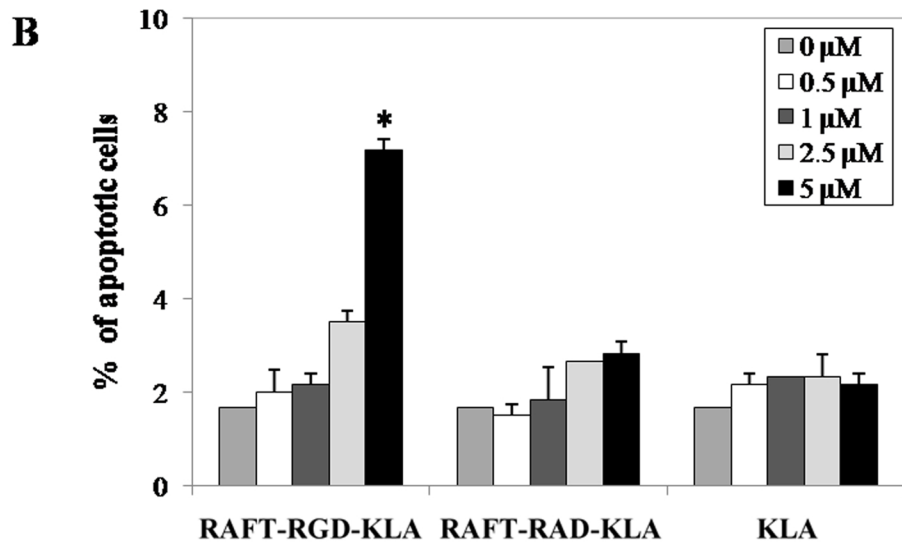
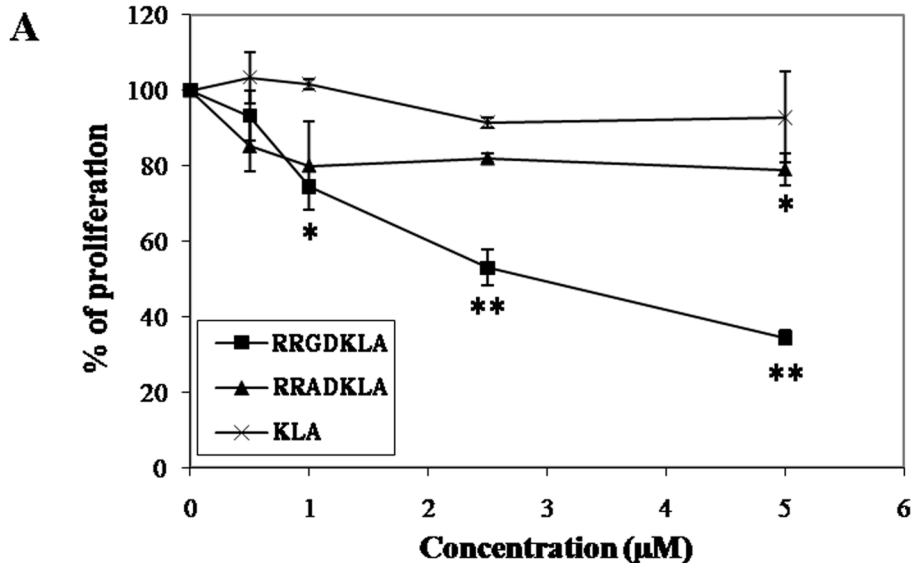


Hek(beta3)



TS/A-pc





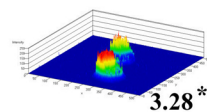
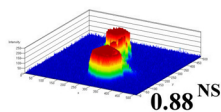
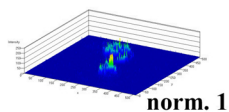
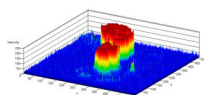
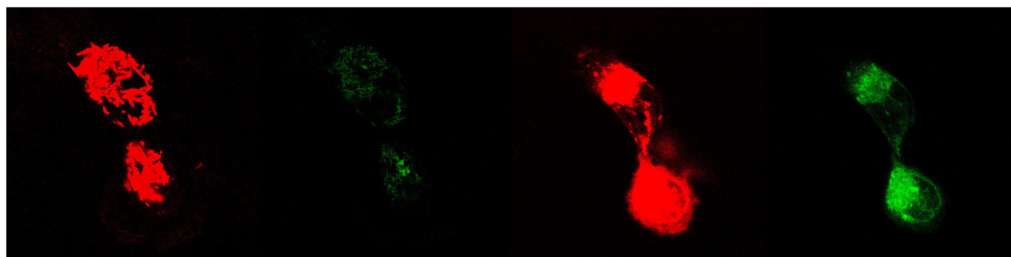
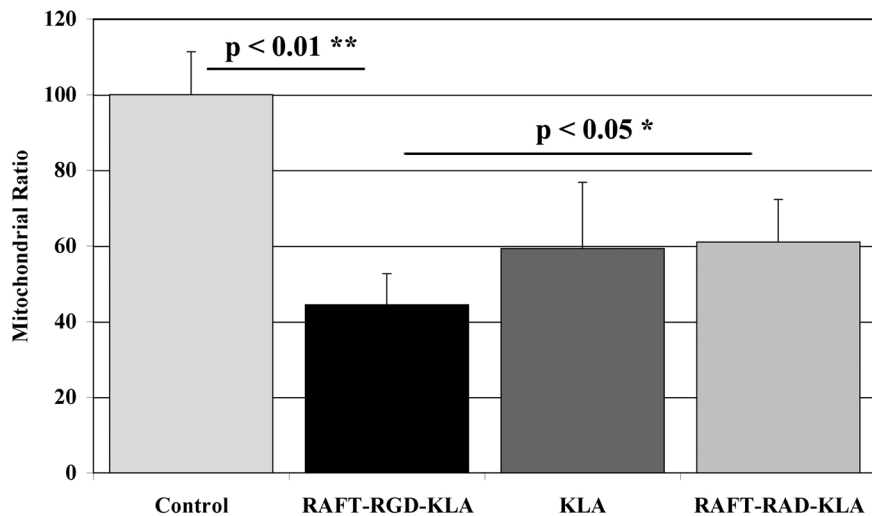
A**Control****+ RAFT-RGD-KLA**

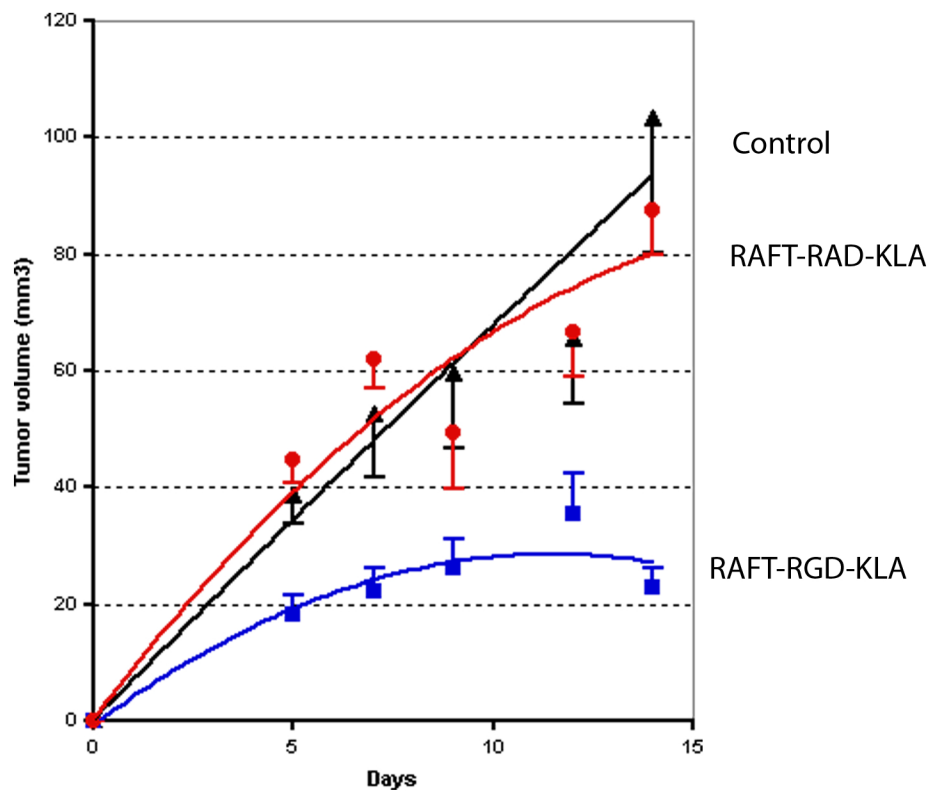
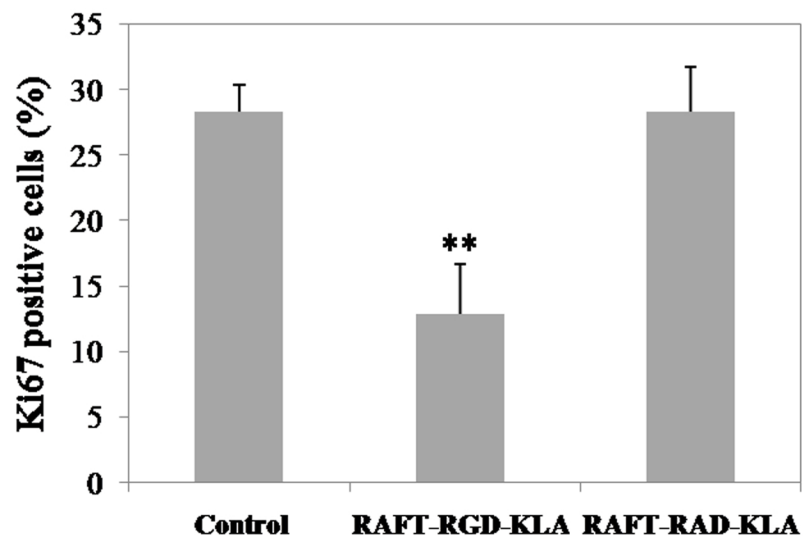
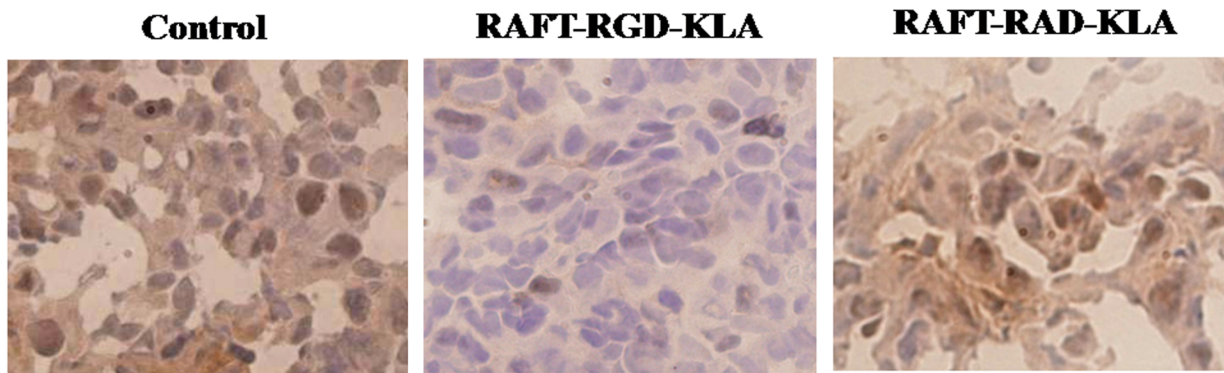
543 nm

488 nm

543 nm

488 nm

**B**

A**B**

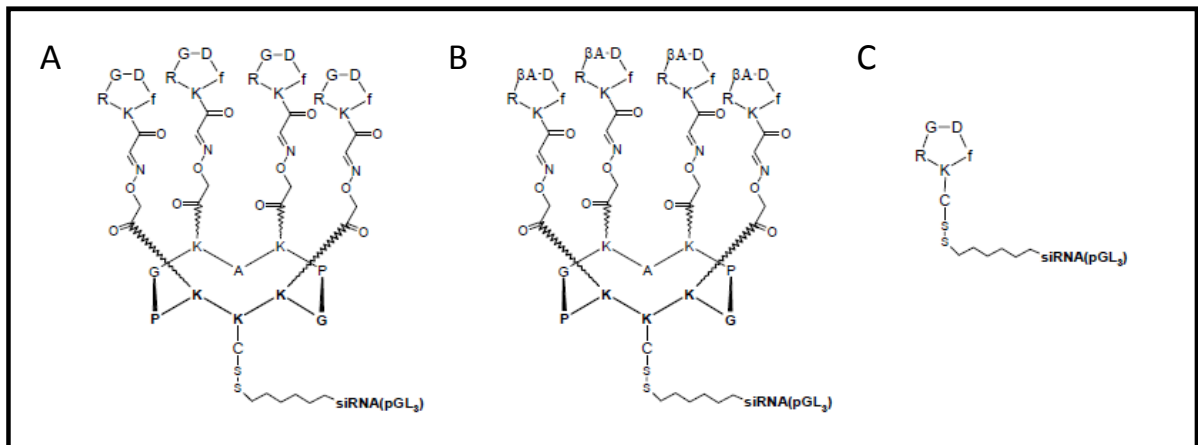


Figure 44. Structure des composés utilisés pour la vectorisation du siRNA anti-pG13.

[A] RAFT-(cRGD)₄-siRNA anti-pG13. [B] RAFT-(cRAD)₄-siRNA anti-pG13.

[C] cRGD-siRNA anti-pG13.

Le siRNA anti-pG13 est greffé aux différentes molécules via un pont disulfure.

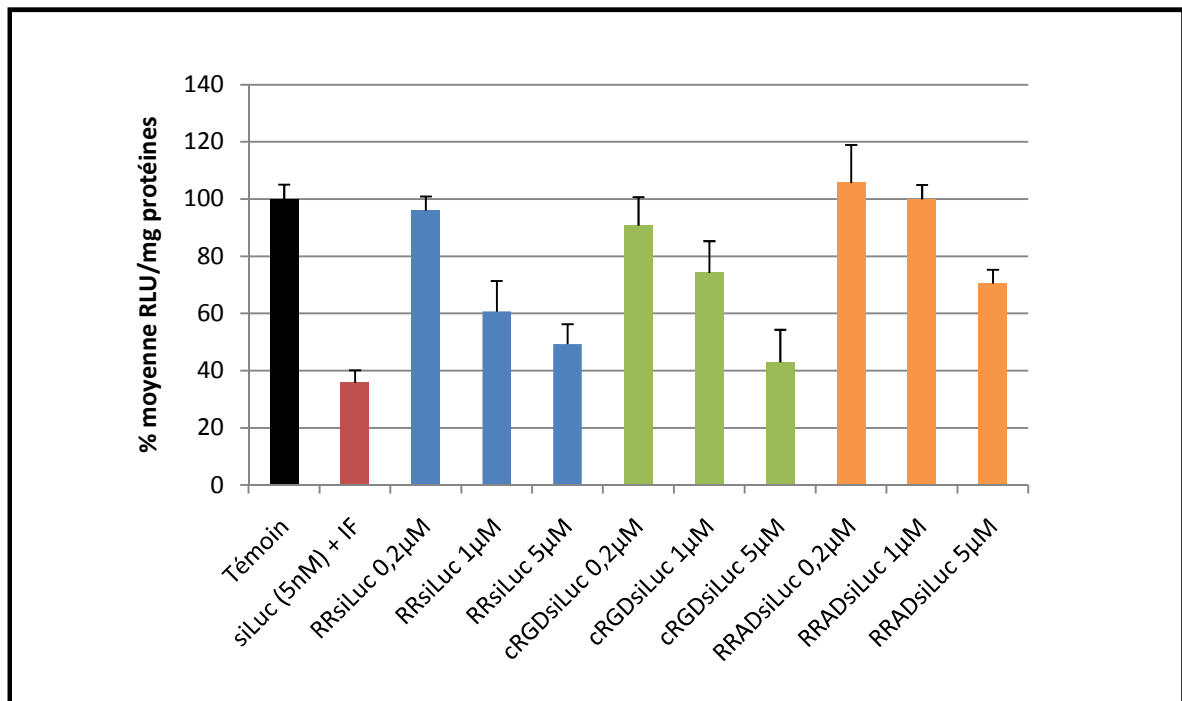


Figure 45. Evaluation de la transfection du siRNA anti-pG13 vectorisés par le RAFT-(cRGD)₄ *in vitro* sur des cellules TS/A-pc pG13.

Les cellules sont traitées pendant 72h avec les différents composés. L'activité luciférase des cellules est mesurée puis rapportée à la quantité de protéines de l'échantillon.

siLuc : siRNA anti-pG13 ; IF : Interferin® ; RRsiLuc : RAFT-(cRGD)₄-siRNA anti-pG13

cRGDsiLuc : cRGD-siRNA anti-pG13 ; RRADsiLuc : RAFT-(cRAD)₄-siRNA anti-pG13

2. Vectorisation de siRNA par le RAFT-(cRGD)₄

2.1. Le RAFT-(cRGD)₄ comme vecteur du siRNA anti-luciférase (anti-pGl3)

Suite aux résultats obtenus pour la vectorisation du peptide (KLAKLAK)₂, nous avons vectorisé un second type de biomolécules : des siRNA. Ils présentent l'intérêt majeur d'avoir une activité catalytique, à savoir qu'une molécule de siRNA permet la dégradation de nombreux ARNm. Ainsi, un siRNA anti-luciférase (anti-pGl3) a été couplé, *via* un pont disulfure, au RAFT-(cRGD)₄, au cRGD ou au RAFT-(cRAD)₄ (Figure 44). Les molécules ont été synthétisées par Stéphanie Foillard (Didier Boturyn et Pascal Dumy, CNRS UMR 5250, Grenoble). La transfection induite par ces différents composés a été évaluée *in vitro* sur des cellules TS/A-pc pGl3, qui expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et présentent une activité luciférase, par transfection du plasmide pGl3 codant pour le gène de la luciférase.

Les cellules TS/A-pc pGl3 ont été traitées avec trois concentrations (0,2 μ M, 1 μ M et 5 μ M) de RAFT-(cRGD)₄-siRNA anti-pGl3, de cRGD-siRNA anti-pGl3 ou de RAFT-(cRAD)₄-siRNA anti-pGl3. Le siRNA anti-pGl3 a également été transfecté à l'aide de l'Interferin[®] comme contrôle positif de transfection. Après 72h de traitement (durée pour laquelle l'efficacité de transfection est la meilleure), les cellules sont trypsinées puis lysées afin de réaliser un dosage de l'activité luciférase. Les mesures sont normalisées par rapport à la quantité de protéines dosée dans les échantillons.

Les résultats montrent une inhibition de l'activité luciférase de 65 % lorsque 5nM de siRNA anti-pGl3 sont transfectés à l'aide de l'Interferin[®] (Figure 45). Avec le RAFT-(cRGD)₄-siRNA, une concentration 10 fois supérieure en siRNA (5 μ M) est nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition de l'activité luciférase. Une inhibition similaire (55 %) est obtenue avec le 5 μ M de cRGD-siRNA, alors qu'elle est de 30% le RAFT-(cRAD)₄-siRNA (5 μ M), qui théoriquement ne se fixe pas aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ présentes à la surface des cellules TS/A-pc pGl3 et qui ne devrait donc pas être internalisé et libérer le siRNA au niveau intracellulaire. Pour une concentration de 0,2 μ M, l'activité luciférase est très peu modifiée (moins de 8 % d'inhibition de l'activité luciférase quel que soit le composé utilisé). A 1 μ M, aucune inhibition de l'activité luciférase n'est détectée pour le RAFT-(cRAD)₄-siRNA, alors qu'elle varie entre moins 25 % pour le cRGD-siRNA et moins 40 % pour le RAFT-(cRGD)₄-siRNA. A cette concentration, il semble y avoir une spécificité de ciblage des cellules exprimant l'intégrine d'intérêt. De plus, le greffage du siRNA anti-pGl3 sur le RAFT-(cRGD)₄ améliore

l'efficacité de transfection (quasiment d'un facteur 2) par rapport au greffage sur le cRGD, démontrant l'intérêt de vecteur multivalent RAFT-(cRGD)₄.

2.2. Conclusions

Les résultats obtenus montrent que le greffage d'un siRNA sur le RAFT-(cRGD)₄ (utilisé à la concentration de 1 μM) présente un certain intérêt pour délivrer efficacement et spécifiquement ce siRNA dans des cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La concentration d'utilisation doit être définie précisément. En effet, aucun effet n'est obtenu à une concentration plus faible de 0,2 μM et l'effet observé à 5 μM est non spécifique, car il est comparable pour l'ensemble de molécules testées.

Cependant, l'efficacité de transfection doit encore être optimisée. Les explications possibles pour le manque d'efficacité de ce système sont la dégradation du siRNA, la rupture du pont disulfure à l'extérieur des cellules ou une absence de libération du siRNA au niveau intracellulaire. Il serait intéressant de travailler avec des siRNA protégés, plus stables et qui seraient moins dégradés.

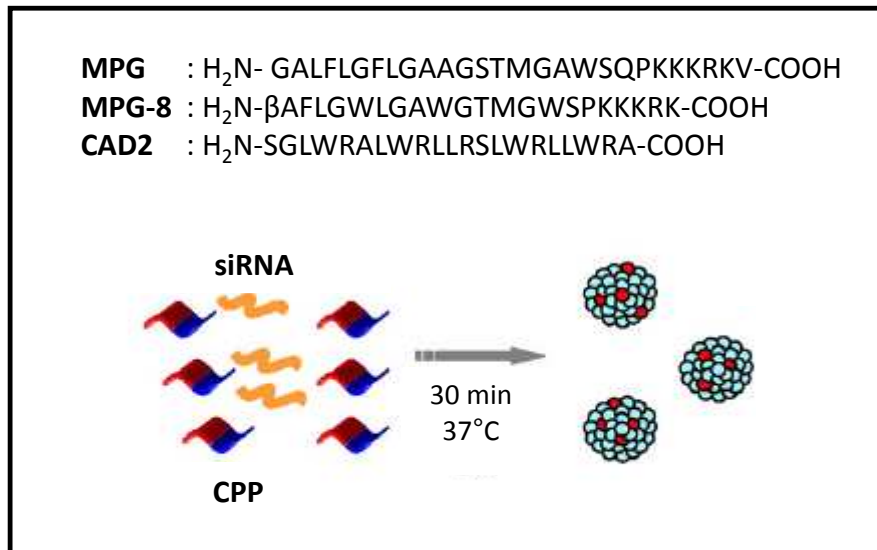


Figure 46. Formation des complexes siRNA/CPP et séquence des CPPs utilisés.

Dans notre cas, le CPP est soit le MPG, soit le MPG-8 (séquence tronqué de MPG), soit le CAD2.

II . D'un système monovalent vers un système multivalent : **Exemple de la vectorisation de siRNA**

Comme nous l'avons montré précédemment, le RAFT-(cRGD)₄ pourrait être utilisé comme vecteur pour les molécules thérapeutiques, cependant ce système reste relativement limité puisqu'une molécule vecteur ne peut transporter qu'une seule molécule thérapeutique. De plus, les essais de vectorisation de siRNA par le RAFT-(cRGD)₄ montrent une efficacité limitée, certainement liée à un problème de dégradation ou de libération du siRNA. Par ailleurs, le développement des siRNA a engendré beaucoup d'espoirs pour le ciblage thérapeutique de gènes spécifiques responsables de différentes pathologies. Cependant, leur faible internalisation cellulaire et leur biodisponibilité sont des obstacles majeurs pour leur utilisation clinique et les différentes stratégies développées pour améliorer leur vectorisation restent limitées au niveau des applications *in vivo*. Au cours des dix dernières années, les CPPs (Cell Penetrating Peptide) ont montré leur efficacité pour améliorer la libération intracellulaire de nombreuses molécules biologiquement actives, et plus récemment celle des siRNA. Plus particulièrement, les petits CPPs amphipathiques, tel le MPG, complexent les siRNA sous forme particulaire de manière stable et non covalente, ce qui favorise leur libération intra-cellulaire.

Ainsi, en collaboration avec l'équipe de Gilles Divita (CNRS UMR 5237, Montpellier), qui a synthétisée des CPPs, nous avons évalué la biodistribution de siRNA fluorescents vectorisés par différents CPPs (Cell Penetrating Peptide) amphipathiques tels que le MPG-8 et le CAD2. Les molécules amphipathiques sont constituées de deux domaines : un domaine hydrophile (polaire) et un domaine hydrophobe (non polaire). Le caractère amphipathique de ces peptides peut résulter de leur structure primaire ou de leur structure secondaire. Les peptides amphipathiques primaires sont définis comme l'assemblage séquentiel des résidus des domaines hydrophile et hydrophobe, c'est le cas du MPG et de son dérivé tronqué le MPG-8. D'autre part, les peptides amphipathiques secondaires sont générés par un état conformationnel permettant de positionner les résidus hydrophiles et hydrophobes sur des sites opposés de la molécule. CAD2 est un peptide amphipathique secondaire.

L'association des siRNA avec les CPPs forme des particules (Figure 46) capables de vectoriser puis de libérer les siRNA au niveau intra-cellulaire, mais ne permettent pas de cibler des cellules d'intérêt. La taille des particules formées varie en fonction du ratio entre les

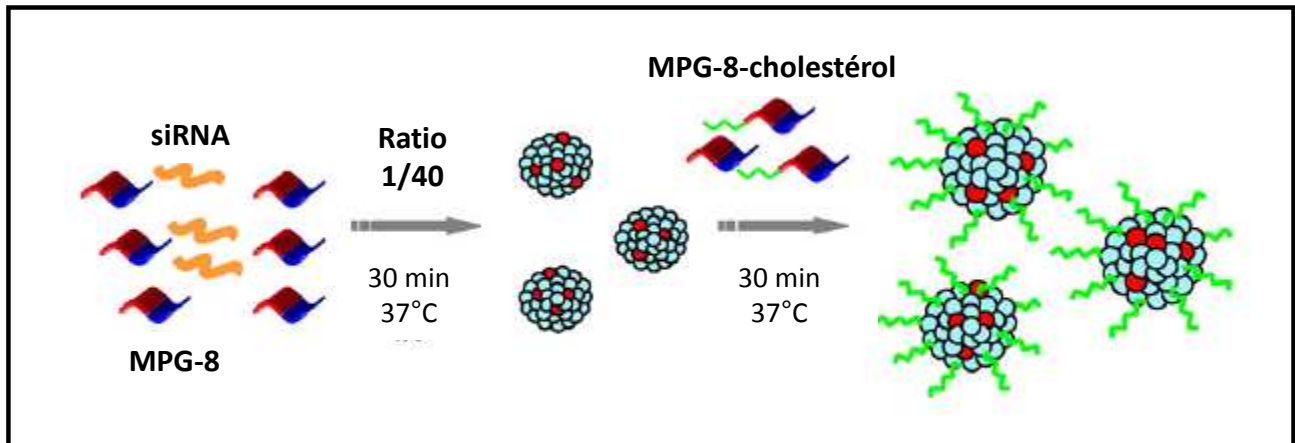


Figure 47. Formation des complexes siRNA/MPG-8-cholestérol.

Les complexes sont réalisés en deux temps. Tout d'abord la formation d'une particule siRNA/MPG-8, puis l'ajout d'une seconde couche composée d'un mélange de MPG-8 et de MPG-8-cholestérol. L'ajout de cholestérol améliore l'efficacité thérapeutique des siRNA, notamment en augmentant leur temps de demi-vie plasmatique.

deux éléments, allant d'environ 200 nm pour un ratio molaire de Q20 (1 siRNA pour 20 CPPs) à 600 nm pour un ratio Q40. Ces particules sont formées d'une couche compacte au centre, entourée d'une couche fluide. Dans les différentes études réalisées, cette couche fluide a été modifiée, soit pour améliorer la biodistribution des complexes (étude réalisée avec le peptide MPG-8), soit pour les rendre ciblant (étude réalisée avec le peptide CAD2).

Les complexes siRNA/CPP formés par ces deux CPPs de structures différentes mais aux propriétés similaires pourraient présenter certaines différences notamment en terme d'efficacité de transfection des cellules *in vivo*, d'où l'intérêt d'évaluer ces deux molécules.

Les résultats obtenus avec le MPG-8 ont fait l'objet d'une publication dans *Nucleic Acid Research* en 2009.

1. Présentation de l'étude et principaux résultats

Dans cet article, nous avons comparé l'efficacité de transfection du MPG, du MPG-8 (forme tronquée du MPG, formant des complexes plus stables avec les siRNA), dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Nous avons également évalué la biodistribution des différents complexes siRNA-fluorescent / CPP dans un modèle de souris *nude*, par imagerie de fluorescence *in vivo*. Ensuite, nous avons cherché à améliorer la biodisponibilité et la stabilité des complexes pour pouvoir les administrer par voie systémique. Nous avons réalisé des particules multicouches : au centre une particule siRNA/MPG-8, entourée d'une couche de MPG-8/MPG-8-cholestérol (Figure 47). Notre choix s'est porté sur le cholestérol car différentes études ont montré que les modifications des siRNA par du cholestérol permettent d'améliorer leur efficacité et leur stabilité *in vivo* (Wolfrum et coll., 2007 ; Soutschek et coll., 2004), notamment en augmentant leur temps de demi-vie plasmatique.

Les biodistributions des complexes siRNA/MPG-8 et siRNA/MPG-8-cholestérol (ratio molaire Q40) sont comparables et relativement homogènes, avec une accumulation dans les poumons, le foie, la peau, les reins et la rate (Figure 6 de l'article). La fonctionnalisation par le cholestérol améliore la cinétique de distribution dans les quinze premières minutes, en diminuant le signal fluorescent détecté dans les poumons et en permettant une distribution plus rapide dans l'ensemble de l'organisme. Elle maintient également un plus fort taux plasmatique à 24h (une fois et demie plus important que pour les complexes MPG). Le

cholestérol doit limiter l'élimination et stabiliser les complexes, améliorant ainsi la réponse biologique des siRNA administrés par voie systémique.

L'efficacité de transfection de ces complexes a ensuite été évaluée sur différents modèles *in vitro* et *in vivo*. Les résultats montrent que l'utilisation du MPG-8 favorise la libération des siRNA dans les cellules primaires et dans les tumeurs *in vivo*, après injection intra-tumorale, par rapport au MPG. Le MPG-8 est 30 à 60 fois plus efficace que le MPG. La stabilité des formulations cargo/vecteur *in vivo* et en particulier dans la circulation sanguine est un des enjeux majeurs pour leur administration par voie systémique. Ainsi, malgré des potentialités *in vitro*, l'injection intra-veineuse des complexes MPG-8/siRNA (0,5 mg/kg) n'induit qu'une inhibition de 12 % du volume tumoral. La fonctionnalisation par du cholestérol améliore la biodistribution et la stabilité des siRNA *in vivo*, ce qui permet leur administration par voie systémique sans engendrer de réponse immunitaire. Cette stratégie a été validée avec un siRNA anti-Cycline B1 qui, vectorisé par le MPG-8-cholestérol, inhibe la croissance tumorale.

Cette étude a permis de montrer que le MPG-8 est capable de vectoriser efficacement de petites quantités de siRNA (0,5 mg/kg) *in vivo* et que cette vectorisation est améliorée par l'ajout de cholestérol en surface des particules.

2. Article 2

Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth.

Crombez L., Morris M.C., **Dufort S.**, Aldrian-Herrada G., Nguyen Q., Mc Master G., Coll J-L., Heitz F., Divita G.

Nucleic Acids Research 2009 Aug;37(14) : 4559-69.

Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth.

Crombez L, Morris MC, Dufort S, Aldrian-Herrada G, Nguyen Q, Mc Master G, Coll JL, Heitz F, Divita G.

Nucleic Acids Research 2009 Aug;37(14) : 4559-69

Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth

Laurence Crombez¹, May Catherine Morris¹, Sandrine Dufort^{2,3}, Gudrun Aldrian-Herrada¹, Quan Nguyen⁴, Gary Mc Master⁴, Jean-Luc Coll^{2,3}, Frederic Heitz¹ and Gilles Divita^{1,*}

¹Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Department of Molecular Biophysics and Therapeutic, UMR-5237 CNRS-UM2-UM1, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier, ²INSERM CRI U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble Cedex 9, ³University Joseph Fourier, Grenoble, France and ⁴Panomics Inc., 6519 Dumbarton Circle Fremont, CA 94555, USA

Received and Revised May 12, 2009; Accepted May 13, 2009

ABSTRACT

The development of short interfering RNA (siRNA), has provided great hope for therapeutic targeting of specific genes responsible for pathological disorders. However, the poor cellular uptake and bioavailability of siRNA remain a major obstacle to their clinical development and most strategies that propose to improve siRNA delivery remain limited for *in vivo* applications. In this study, we report a novel peptide-based approach, MPG-8 an improved variant of the amphipathic peptide carrier MPG, that forms nanoparticles with siRNA and promotes their efficient delivery into primary cell lines and *in vivo* upon intra-tumoral injection. Moreover, we show that functionalization of this carrier with cholesterol significantly improves tissue distribution and stability of siRNA *in vivo*, thereby enhancing the efficiency of this technology for systemic administration following intravenous injection without triggering any non-specific inflammatory response. We have validated the therapeutic potential of this strategy for cancer treatment by targeting cyclin B1 in mouse tumour models, and demonstrate that tumour growth is compromised. The robustness of the biological response achieved through this approach, infers that MPG 8-based technology holds a strong promise for therapeutic administration of siRNA.

INTRODUCTION

Although the *in vivo* delivery of siRNA has been successfully achieved thanks to several non-viral delivery systems, systemic administration of siRNA remains a major challenge for their therapeutic application (1–5). Over the last

decade, cell-penetrating peptides (CPPs) have been shown to improve intracellular delivery of various biologically active molecules into living cells quite efficiently (6,7) and have more recently been applied to siRNA delivery (8,9). Although conjugation strategies with either Transportan, Penetratin or Tat certainly improve the delivery of siRNA into cultured cells, non-covalent strategies are more appropriate for both *in cellulo* and *in vivo* delivery of siRNA (8,10–17). Short amphipathic cell-penetrating peptides forming non-covalent, yet stable complexes with their cargo have been successfully applied to the delivery of different macromolecules into mammalian cells (18,19). In particular, the peptide carrier MPG efficiently delivers siRNA in a fully biologically active form into a wide variety of cell lines, including embryonic stem cells (10,11,20). In the present study we describe a novel strategy which promotes efficient delivery of siRNA *in vivo*, using functionalized peptide-based nanoparticulate formulations. We have developed a shorter version of MPG, MPG-8, that forms stable particles with siRNA, and that can be functionalized. MPG-8 improves siRNA delivery *ex vivo* and *in vivo* without activating the innate immune response. We have validated the potential of this technology by targeting cyclin B1, a non-redundant mitotic partner of cyclin-dependent kinase 1 (cdk1) (21) and report that MPG-mediated administration of siRNA targeting cyclin B1 prevents tumour growth in xenografted tumour mouse models. Cyclin B1 constitutes a key target for anti-proliferative strategies and both anti-sense and siRNA-based-approaches targeting cyclin B1 have been proposed as an anti-proliferative strategy (22–24). Cyclin B1 together with Cdk1 kinase, forms the ‘mitosis promoting factor’, whose activity is required for entry into and progression through mitosis (21). Cdk1 is essential for mammalian cell division, its knockout is lethal and several small molecule inhibitors targeting Cdk1 have been reported to induce arrest in G2 and to reduce tumour growth (22,24). Likewise, altered expression of cyclin B1 has been reported in numerous cancers

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 (0)4 67 61 33 92; Fax: +33 (0)4 67 52 15 59; Email: gilles.divita@crbm.cnrs.fr

MATERIALS AND METHODS

Peptides and siRNAs

All peptides were synthesized and purified as previously described (10,25). Cholesterol conjugation to MPG-8 was performed at the primary amino group of the N-terminal residues, then cholesterol-MPG-8 was further purified by Reverse Phase-HPLC and analysed by electro-spray ionization mass spectroscopy (25). siRNAs and 5' Alexa⁷⁰⁰ fluorescently labelled siRNA were synthesized by Eurogentec according to the following sequences.

Cyc-B1 sense 5'-GGCGAAGAUAACAUGGCATT-3'
 Cyc-B1 anti-sense 5'-UGCCAUGUUGAUCUUCGCTT-3'
 Cyc-B3 sense 5'-GGUGAAGAUCAGCAUGGCATT-3'
 Cyc-B3 anti-sense 5'-UGCCAUGUCGAUCUUCACCTT-3'
 GAPDH sense 5'-CAUCAUCCCGCCUCUACUTT-3'
 GAPDH anti-sense 5'-AGUAGAGGCAGGGAUGAUG-3'.

Cyc-B1 siRNA targeting cyclin B1, and a derived siRNA harbouring two mismatches, Cyc-B3, was used as control. An siRNA targeting GAPDH was used as control to validate target specificity and to monitor associated non-specific interferon response.

Cell culture and MPG-mediated transfection

Adherent HS68 fibroblasts, HeLa, PC3, MCF-7 and SCK3-Her2 cell lines [from American Type Culture Collection (ATCC)] were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 2-mM glutamine, 1% antibiotics (streptomycin 10 000 µg/ml, penicillin, 10 000 IU/ml) and 10% (w/v) fetal calf serum (FCS), at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Stock solutions of MPG-8/siRNA and MPG^{ΔNLS}/siRNA particles were prepared by complexing 100 nM siRNA with MPG peptides at a molar ratio of 1/20 for 30 min at 37°C. Lower concentrations of MPG-carrier/siRNA (from 20 nM to 0.125 nM) were obtained by serial dilution of the stock complexes in PBS, in order to preserve the same MPG-carrier/siRNA ratio. A total of 150 000 cells seeded in a 35-mm dish the day prior transfection, were grown to 60% confluence and overlaid with 200 µl of preformed complexes, incubated for 3–5 min, then 400 µl of DMEM were added. After a 30-min incubation at 37°C, 1 ml of fresh DMEM containing 16% FCS was added in order to reach a final FCS concentration of 10%, without removing the overlay of MPG-8/siRNA complexes. Cells were returned to the incubator for 24 h. Cyclin B1 mRNA and protein levels were determined 12 and 24 h following transfection, using Quantigen (Panomics Inc.) and western blotting, respectively. Mouse monoclonal anti-Cyclin B1 antibodies (SC-245) and rabbit polyclonal anti-Cdk2 antibodies (SC-163) were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. Data reported are an average of three or four distinct experiments.

Mouse tumour models

Athymic female nude mice (6–8 weeks of age) were subcutaneously inoculated into the flank with 1×10^6 PC3 or SCK-3-HEK2 cells in 100 µl PBS. Two to three weeks after tumour implant, when tumour size reached about

100 mm³, animals were treated by intra-tumoral or intravenous injection, every 3 days, with a solution of 0.1 ml of either free Cyc-B1 siRNA (50 or 100 µg), control siRNA Cyc-B3 or Cyc-B1 siRNA (1, 5, 10 µg) complexed with MPG-8 or MPG-8/Chol-MPG-8 at a 1/20 molar ratio. Formulations containing 15% Chol-MPG-8 were prepared in a stepwise fashion by first forming a precomplex of MPG-8/siRNA at molar ratio of 1/20, followed by addition of Chol-MPG-8 so as to increase the ratio of siRNA/carrier to 1/25. Tumour diameter was measured in two directions at regular intervals using a digital calliper and tumour volume was calculated as length × width × height × 0.52. Curves show the mean value of tumour size in a cohort of six animals and neither animal death nor any sign of toxicity was observed. Experiments were performed according to national regulations and approved by the local animal experimentation ethical committee. The statistical significance of the results was calculated by Student's *t*-test and *P* < 0.05 considered to be statistically significant.

Characterization of peptide-based nanoparticles

Mean particle size distribution was determined with a Coulter N4 Plus (Coulter-Beckman) at 25°C for 3 min per measurement and zeta potential was measured with Zetasizer 4 apparatus (Malvern Ltd.) as previously described (24).

Cytotoxicity

Toxicity of MPG-8/siRNA complexes was investigated on HeLa and HS-68 cell lines. A total of 30 000 cells seeded in 24-well plate the day prior transfection, were incubated with increasing concentrations of siRNA complexed with MPG-8 at a 20/1 molar ratio ranging from 0.1 to 5 µM (100 µM MPG-8), for 30 min prior to addition of medium to reach a final 10% concentration of FCS. Cytotoxic response was measured 12 h or 24 h later by monitoring the housekeeping gene cyclophilin mRNA level (Quantigen, Panomic Inc.) and by colorimetric MTT assay (Sigma, Germany), respectively. For MTT assay, cell culture medium was removed and replaced with PBS containing 2.5 mg/ml of MTT for 4 h. Results correspond to the average of three separate experiments.

Interferon assay

Interferon response was evaluated on cultured cells by quantitative RT-PCR monitoring induction of INF-β and of Interleukin 8 (IL8). HeLa, SCK3-Her2 and MCF7 cells were mock transfected or transfected with MPG-8 MPG-8/Chol-MPG-8/siRNA complexes (100 nM) or poly(I:C) (5 µg/ml). After 24 h, RNA was isolated using Trizol (Sigma), and analysed by quantitative RT-PCR, standardized to GAPDH mRNA. Quantitative PCR was performed on a Biorad iCycler using primer sequences for IL8 (forward) 5'-GTGCAGTTTTGCCAAGGACT3' and INF-β (forward) 5'-CTGGAGCAGCTGAATGGA AAG-3'. *In vivo* inflammatory response was monitored in the plasma, 6 h after injection of either MPG-8/Chol-MPG-8/siRNA complex, MPG-8, Chol-MPG-8 (0.5 mg/kg) or poly(I:C) (200 µg). The level of mouse cytokine

tissue tumor necrosis factor (TNF- α). Interferon α (INF- α) and interleukin 6 (IL6) were quantified using sandwich ELISA assay kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The reported results correspond to the average of two separate experiments with four animals per group.

***In vivo* imaging of siRNA biodistribution**

In vivo fluorescence imaging was performed as previously described (26,27). Mice were injected intravenously with 10 μ g (200 μ l) of Alexa⁷⁰⁰ fluorescently labelled siRNA either naked or complexed with MPG-8 or MPG-8Chol/MPG-8 ($n = 3$ animals per group). Anaesthetized mice, using 2% Isoflurane, were illuminated by 663-nm light emitting diodes equipped with interference filters and movies were acquired over the first 15 minutes and fluorescence images were taken every hour for 5 h and then after 24 h, with a back-thinned CCD cooled camera as previously described (26,27). At 24 h, mice were euthanized and different organs were removed for quantification of Alexa fluorescence.

RESULTS AND DISCUSSION

Design and evaluation of MPG-8-based nanoparticles for siRNA delivery

MPG (ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-Cya) is a primary amphipathic peptide consisting of an N-terminal hydrophobic motif derived from the fusion sequence of the HIV protein gp41, a hydrophilic domain derived from the nuclear localization sequence of SV40 large T antigen, and a short linker which separates these domains (25). MPG was previously reported to deliver siRNA into cultured mammalian cells efficiently and to promote potent downregulation of the target at the protein level, thanks to rapid release of siRNA into the cytoplasm (10,28). The sequence of MPG was optimized to improve its interactions with siRNA as well as the stability of MPG/siRNA complexes. For this purpose, MPG parent peptide was shortened by six residues: Gly¹, Leu³, Ser¹³, Ala¹⁷, Glu²⁰ and Val²⁷, and the two hydrophobic Phe⁷ and Ala¹¹ residues were mutated into Trp so as to favour interactions with both siRNA and lipid phase of the membrane. We previously demonstrated that the cysteamide group at the C-terminus of MPG is a prerequisite for its cellular uptake (10), therefore a β -alanine was added to the N-terminus to allow further functionalization of the peptide, thereby yielding MPG-8 a 21-residue amphipathic peptide: β AFLGWLGAWGTMGWSPPK KKK-Cya.

We first characterized the efficiency of MPG-8 to deliver siRNA targeting cyclin B1 (Cyc-B1), compared to the MPG ^{Δ NLS} parent peptide, and found that target silencing was directly correlated to the ratio, and to the size of MPG-8/siRNA particles (Figure 1A). An optimal reduction of cyclin B1 protein level (was achieved for an MPG-8/siRNA molar ratio of 20/1, corresponding to stable MPG-8/siRNA particles with a diameter of 120 ± 50 nm, as determined by dynamic light scattering, with a zeta potential of $+16 \pm 3$ v. At lower ratios, MPG-8/siRNA

particles are unstable and poorly taken up by cells; at higher ratios, a net increase in the size of particles is associated with a reduction of silencing efficiency. The parental peptide MPG ^{Δ NLS} also forms stable particles with siRNA with an optimal cyclin B1 silencing response (50%) for a molar ratio of 20/1 and particle size of 260 ± 50 nm diameter (Figure 1B). However, the efficiency of MPG ^{Δ NLS} is 2-fold lower than that of MPG-8 at a 20/1 ratio. Therefore, to ensure optimal biological conditions for siRNA delivery, throughout the rest of our study, MPG-8/siRNA particles were systematically prepared at 20/1 ratio. In addition, the toxicity of MPG-8-based formulations was investigated using either MTT assay or by monitoring cyclophilin mRNA levels. As reported in Figure 1C, no toxicity was detected up to a concentration of 20 μ M of MPG-8/siRNA particles and only 10–15% of cell death was observed with 100 μ M of MPG-8/siRNA particles.

MPG-8-mediated delivery of siRNA targeting cyclin B1 induces G2 arrest

Dose–response experiments performed on cultured cells revealed that MPG-8-mediated delivery of siRNA (Cyc-B1) induced a robust biological response associated with downregulation of both cyclin B1 protein and mRNA levels (Figure 2A and B). An siRNA concentration of 5 nM was sufficient to reduce cyclin B1 levels by more than 85% in HeLa cells (Figure 2A) and IC₅₀ of 1.1 ± 0.3 nM and 0.9 ± 0.2 nM were estimated for downregulation of protein levels, and of 0.6 ± 0.1 nM and 0.4 ± 0.1 nM for mRNA levels, for non-transformed HS68 fibroblasts (Figure 2B) and HeLa cells (data not shown), respectively. In comparison, when siRNA were delivered with MPG ^{Δ NLS}, IC₅₀ values of 24 ± 5 nM and 35 ± 7 nM were obtained for downregulation of protein and mRNA levels, respectively (Figure 2C). That MPG is 30- to 60-fold less efficient than MPG-8 can be directly correlated to differences in stability, solubility and size of the siRNA/MPG complexes. Reduction of cyclin B1 protein levels was directly associated with accumulation of cells with a 4N content, consistent with downregulation of Cdk1-Cyclin B1 activity, and was optimally obtained with 2 nM siRNA and IC₅₀ values estimated to 0.8 ± 0.2 nM and 1.2 ± 0.4 nM for HeLa and HS68 cells, respectively (Figure 2D). In contrast, no effect on cyclin B1 levels and cell cycle progression was observed with 200 nM of an unrelated siRNA (si-GAPDH), or of a mismatch siRNA harbouring two mutations (Cyc-B3) complexed with MPG-8 at a 20/1 ratio, or with MPG-8 carrier alone (100 μ M).

MPG-8-mediated delivery of siRNA targeting cyclin B1 blocks cancer cell proliferation

The potency of MPG-8/siRNA particles to block cancer cell proliferation was evaluated using MCF-7, PC3, SKBr3-HER2 cell lines and compared to the response observed for HS68 fibroblasts. Cells were treated on Day 1 with different concentrations (0.125–20 nM) of siRNA, MPG-8/siRNA and MPG-8/m-siRNA complexes, and inhibition of cell proliferation was determined

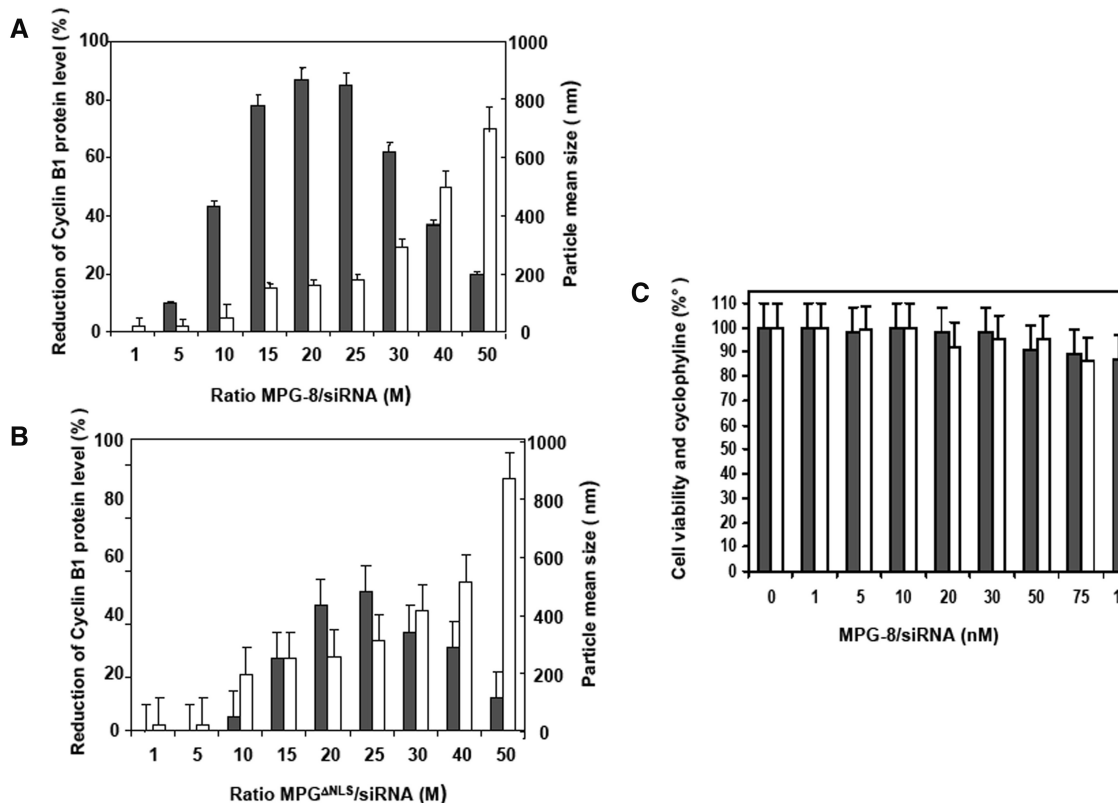


Figure 1. MPG-8 nanoparticle-mediated delivery of siRNA targeting cyclin B1. Impact of MPG-8 particle size on silencing efficiency (**A** and **B**): A fixed concentration of 20 nM of siRNA (Cyc-B1) was associated with different molar ratios of MPG-8 (**A**) or MPG (**B**) ranging from 1/1 to 50/1. The size of the MPG-8/siRNA or MPG/siRNA particles were measured by light scattering (white bars) and the biological response associated with siRNA internalization was evaluated in cultured cells by measuring reduction of cyclin B1 protein levels 24 h after transfection (grey bars). Toxicity of MPG-8 particles (**C**): The toxicity of MPG-8 particles was investigated by MTT assay (grey bars) and by monitoring the level of cyclophilin mRNA (white bars). HeLa cells were treated with increasing concentrations of MPG-8/siRNA particles ranging from 1 to 100 μ M and toxicity was then evaluated 12 h (Cyclophilin mRNA) or 24 h (MTT) after treatment. Reported data are the average of three separate experiments.

after 7 days. As reported in Figure 3, subnanomolar concentrations of Cyc-B1 siRNA complexed to MPG-8 significantly blocked proliferation of the three cancer cell lines, with IC_{50} values of 0.6 ± 0.2 nM, 0.9 ± 0.3 nM and 1.1 ± 0.3 nM, for PC3, MCF7 and SKBr3-HER2 cells, respectively, whereas no effect was observed with control siRNA or carrier alone. In comparison, the effect of this treatment on cell proliferation of HS68 fibroblasts was quite limited, despite efficient downregulation of cyclin B1 levels (Figure 3D). Although MPG-8/cyclin B1 siRNA compromised proliferation of cancer cells, it only had a moderate effect on non-cancer cells. These results are in agreement with previous reports showing that downregulation of proteins required for the G2/M transition including Plk1 kinase or cyclin B1 have a limited effect on non-cancer cells with an active G2/M checkpoint machinery and do not induce mitotic catastrophes (22,29).

***In vivo* MPG8-mediated Cyclin B1 siRNA delivery blocks tumour growth upon topical injection**

The potential of MPG-8 to deliver cyclin B1 siRNA *in vivo* was first evaluated on human prostate carcinoma cell PC3-xenografted mice (Figure 4A). The effect of local intra-tumoral administration of MPG-8/siRNA particles (molar ratio 20/1) on the growth of established

subcutaneous tumours was evaluated. At Day 50, tumour sizes in the control cohort, injected with PBS increased by about 3.5-fold. Reduction of tumour growth by 75% was observed using 1 μ g (0.05 mg/kg) of siRNA/MPG-8 and tumour growth was completely prevented with 5 μ g (0.25 mg/kg) siRNA/MPG-8 (Figure 4A). In contrast, intra-tumoral administration of 5 μ g (0.25 mg/kg) MPG^{ΔNLS}/siRNA particles did not significantly reduce tumour growth, as only 7–10% of growth curve deviation was observed in comparison to the saline control. The poor efficiency of MPG^{ΔNLS}/siRNA is associated with low stability of the particles after injection and the tendency of MPG^{ΔNLS}/siRNA complexes to precipitate at the concentration required for *in vivo* administration. At Day 48, we validated that the Cyc-B1 siRNA-mediated inhibition of tumour growth was directly associated with a decrease in the level of cyclin B1 mRNA. As reported in Figure 4B, the level of cyclin B1 mRNA was reduced by 58% and 82% with 1 and 5 μ M of siRNA formulated with MPG-8, respectively. In contrast, 5 μ M MPG^{ΔNLS}/Cyc-B1siRNA reduced cyclin B1 mRNA by only 7%, in perfect agreement with the observed variation in tumour growth (Figure 4B). As a control, we showed that administration of 50 μ g (intra-tumoral) or 100 μ g (intravenous) naked siRNA or MPG-8 carrier alone had

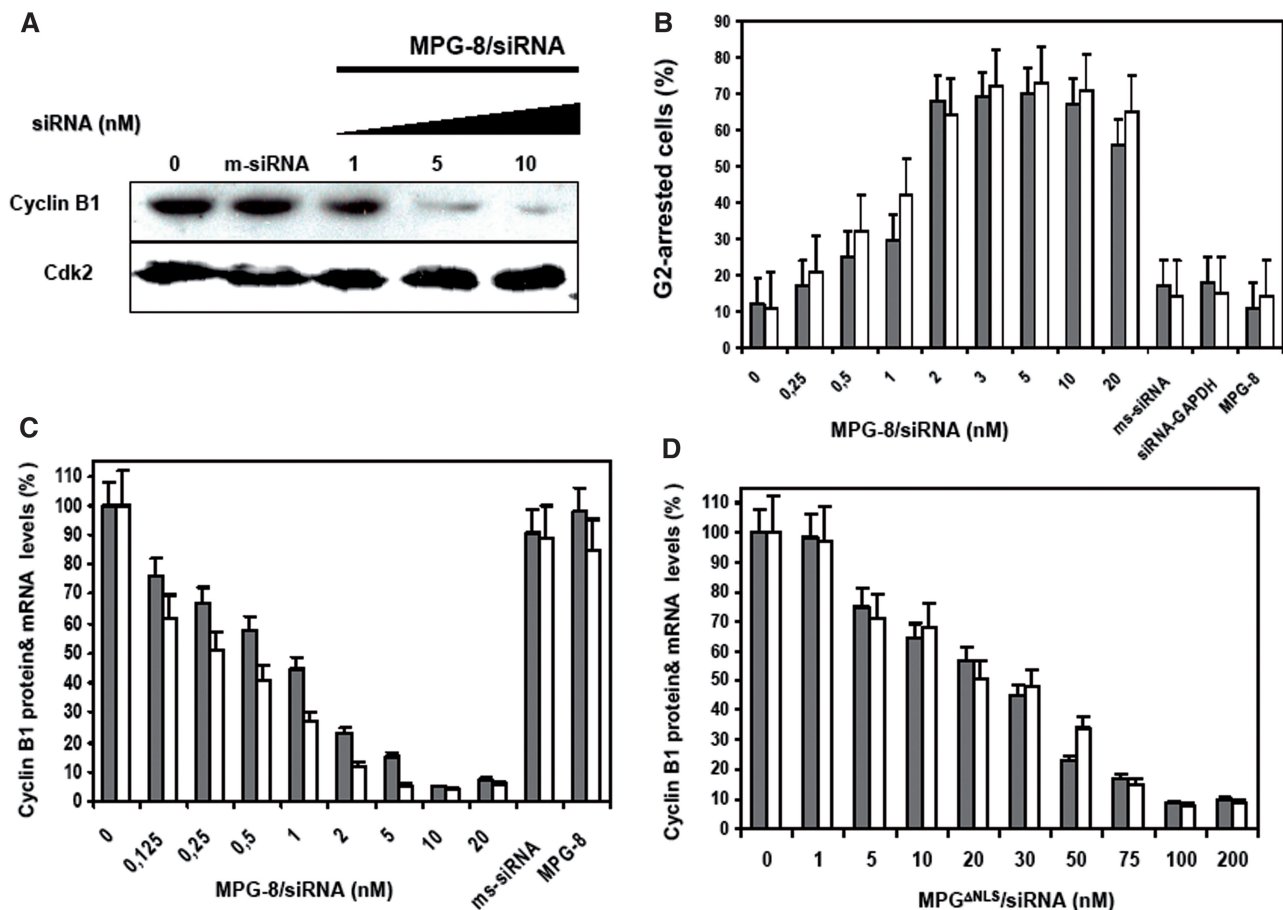


Figure 2. MPG-8-mediated delivery of siRNA targeting cyclin B1 induces G2-arrest. MPG-8 (A and B) and MPG (C) dose-response of Cyclin B1 silencing at the protein and mRNA levels. Stock solutions of MPG-8/siRNA (100 nM) or MPG/siRNA (500 nM) particles were prepared at a molar ratio of 1/20, and lower concentrations (from 200 nM to 0.125 nM) were obtained by serial dilution of the stock solution in PBS. HeLa (A) and HS-68 (B and C) cells (60% confluency) were overlaid with preformed complexes for 30 min, then fresh DMEM supplemented with 10% FCS was added directly to the cells, which were then returned to the incubator for 24 h. Cyclin B1 protein levels were determined by western blotting using Cdk2 as a control for quantification (grey bars). Cyclin B1 mRNA levels were measured 12 h after transfection using Quantigen technology (white bars). Mismatched Cyc-B3 siRNA associated with MPG-8 (200 nM) and empty MPG-8 particles (20 μ M) were used as a control. Dose-response of G2-arrest associated with Cyclin B1 silencing (D). HeLa (grey bars) and HS68 (white bars) cells were treated with increasing concentrations of MPG-8/siRNA-Cyc-B1 from 0.25 to 20 nM. The cell cycle status was evaluated by FACS analysis. Mismatched Cyc-B3 siRNA (100 nM) and GAPDH siRNA (100 nM) associated to MPG-8 as well as to MPG-8 carrier alone (20 μ M) were used as controls. Results are the means \pm of four separate experiments.

no significant effect on tumour growth. Moreover, inhibition of tumour growth was siRNA sequence-specific as a cyclin B1 siRNA harbouring two mutations (Cyc-B3) complexed with MPG-8 and injected into mice at 0.5 mg/kg was unable to inhibit tumour growth (Figure 4A).

Functionalization of MPG-8 improves *in vivo* stability and distribution of MPG-8/siRNA complexes

The stability of drug-carrier formulations *in vivo* and in the blood circulation is a major issue for systemic administration of therapeutics. Despite its demonstrated potency *in cellulo*, intravenous injection of MPG-8/siRNA formulations (0.5 mg/kg) only produces an anti-tumoural response of about 12% (Figures 4A and 7A). Cholesterol modification of siRNA has been reported to enhance their potency and stability *in vivo* by maintaining the siRNA in the circulation for longer periods of time (30,31).

Hence, in order to improve the bioavailability and stability of the MPG-8/siRNA particles, thereby rendering them more suitable for systemic administration, the surface layer of MPG-8/siRNA particles was functionalized with a cholesterol-moiety at the N-terminus of MPG-8 (Chol-MPG-8), through activation of the N-terminal beta alanine amino group. Cholesterol-functionalized MPG-8/siRNA particles were obtained stepwise by complexing siRNA molecules with MPG-8 at a molar ratio of 20/1, followed by coating of particles with a second layer of Chol-MPG-8. The optimal ratio of Chol-MPG-8 required was determined experimentally, by assessing the ability of the different particles containing between 5 and 50% Chol-MPG-8 to deliver Cyc-B1 siRNA. Below a ratio of 15% Chol-MPG-8/MPG-8, no significant difference in the efficiency of cyclin B1 silencing, with 85–92% knockdown of protein or mRNA levels (Figure 5A), nor of the associated G2 cell arrest (Figure 5B) were observed. In these

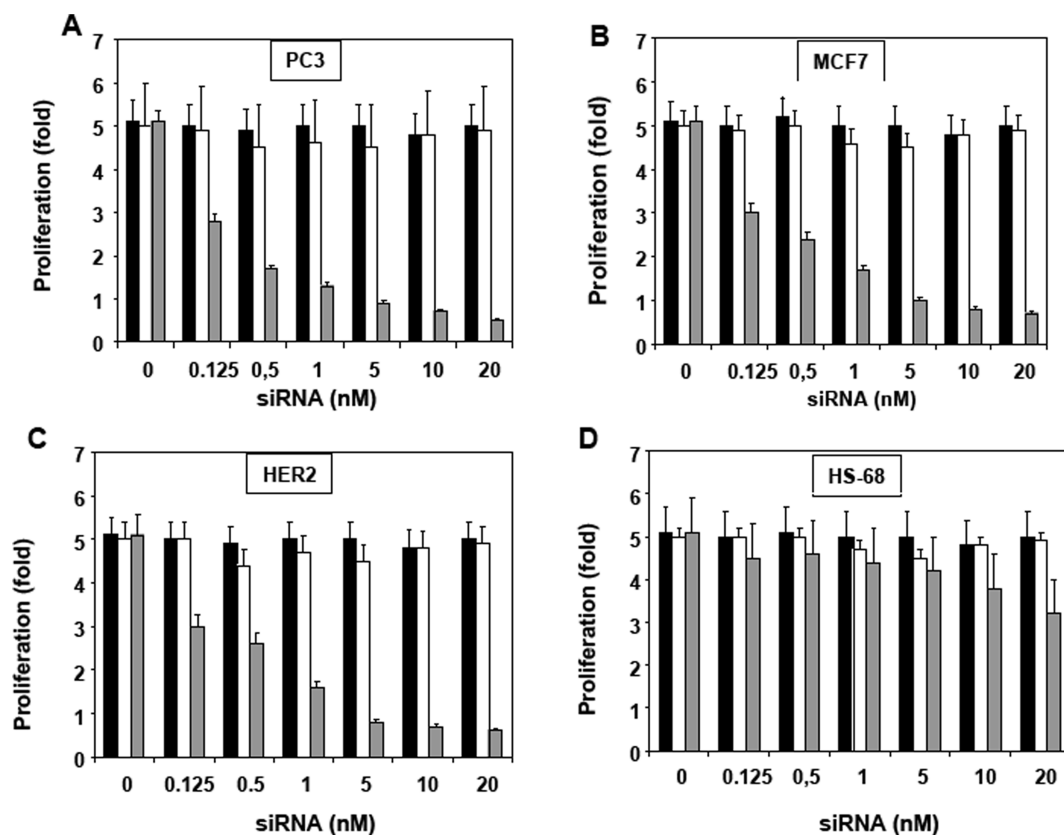


Figure 3. Cyclin B1 siRNA-MPG-mediated delivery reduces cancer cell proliferation. PC3 (A), MCF7 (B) SKBR3-HER2 (C) tumour cell lines and HS-68 (D) were treated on Day 1, with increasing concentrations of MPG-8/siRNA-Cyc-B1 (from 0.125 to 20 nM). The concentrations of formulated siRNA (from 20 to 0.125 nM) were obtained by serial dilution as described in Figure 2. The proliferation of cells treated with MPG-8/siRNA (grey bars) was evaluated on Day 7 and compared to controls including a MPG-8/Cyc-B3 mismatch siRNA (black bars) and MPG-8 carrier alone (white bars). Results are the average of four independent experiments.

conditions, an IC_{50} of 1.1 ± 0.2 nM was obtained for HS68 cells, similar to the value obtained for non-functionalized MPG-8 particles. Functionalized-MPG-8/siRNA particles with 15% of Chol-MPG-8 measure 180 ± 45 nm in diameter and are characterized by a zeta potential of 14 ± 2 v. These results indicate that functionalization of the MPG-8/siRNA particles with 15% of cholesterol alters neither their physicochemical parameters nor their efficiency to deliver siRNA. We next investigated to what extent cholesterol functionalization of MPG-8 influenced the *in vivo* bio-distribution of MPG-8/siRNA particles. Mice were injected intravenously with $10 \mu\text{g}$ of Alexa⁷⁰⁰ labelled-siRNA either naked or complexed with MPG-8 or MPG-8Chol/MPG-8. Kinetics of siRNA biodistribution were measured during the first 15 min (Figure 6A), then every hour for 5 h (Figure 6B) and fluorescence was quantified in the different organs 24 h after injection (Figure 6C). Naked siRNA was reported to be rapidly degraded, with a half-life of a few hours *in vivo*. Therefore, as expected, the control experiment performed with naked siRNA revealed that it rapidly accumulated in the bladder and in the liver over the first hours and was barely distributed throughout the rest of the body (Figure 6A, panel 1). In contrast, MPG-8/siRNA (Figure 6A, panel 2) and MPG-8/MPG-8-Chol/siRNA

(Figure 6A, panel 3) formulations favoured the rapid distribution of siRNA throughout the body within the first 15 min following injection, more prominently for the cholesterol functionalized-particles (Figure 6A, panel 2). In both cases, MPG-8/siRNA (Figure 6B, top panel) and MPG-8/MPG-8-Chol/siRNA (Figure 6B, bottom panel) were found to access all tissues and siRNA distribution was optimal at 5 h, accumulating mainly in the lung, liver, plasma, skin and kidney, adrenal gland and spleen. Although we cannot exclude that fluorescence is due to degradation of the siRNA, the fact that siRNA remains in the plasma and in most of the tissues 24 h after injection (Figure 6C), and also to a certain extent in the brain, ovary and uterus, confirms the high stability of MPG-8/siRNA and MPG-8/MPG-8chol/siRNA particles. No major differences were obtained between MPG-8/siRNA and MPG-8/MPG-8chol/siRNA particles in terms of tissue targeting. However, cholesterol-functionalization of the particles significantly increased the distribution kinetics of siRNA within the first 15 min and maintained a higher level of siRNA in the plasma even after 24 h, in comparison to MPG-8/siRNA particles, suggesting that it may limit siRNA clearance, thereby further favouring delivery of siRNA into the tumour.

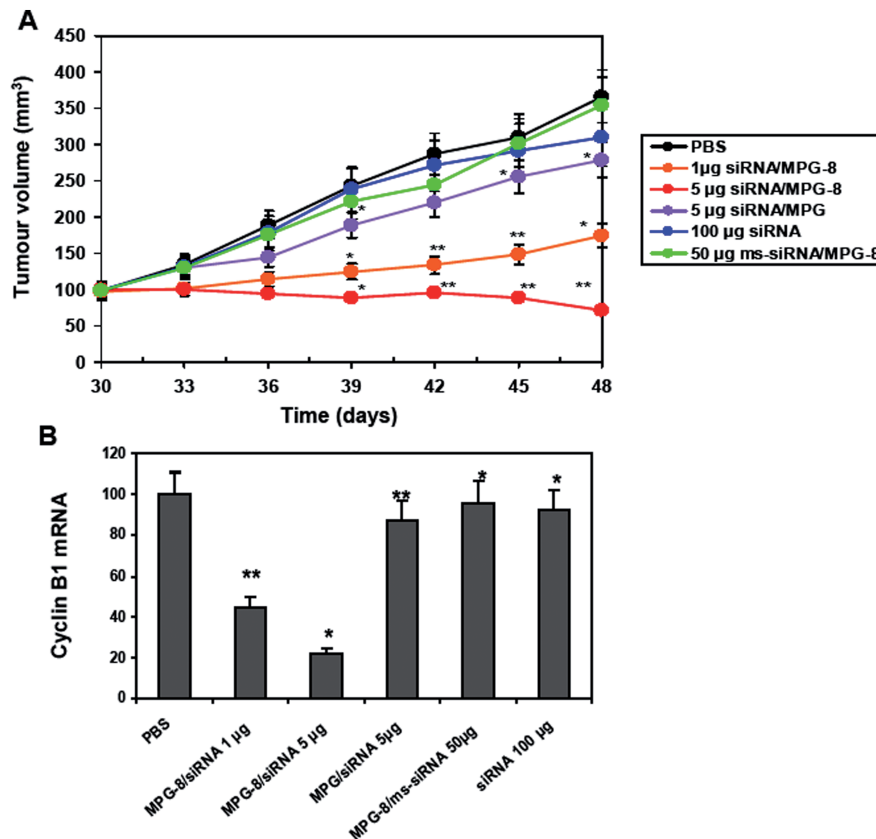


Figure 4. MPG-8-mediated Cyclin B1 siRNA delivery inhibits tumour growth upon intra-tumoural injection. (A) Swiss nude mice (a cohort of $N = 6$ animals) were injected subcutaneously with 106 PC3 cells. Thirty days after tumour implant, when tumour size reached 100 mm³, animals were treated by intratumoural injection, every 3 days, with a solution of 0.1 ml of either free Cyc-B1 siRNA (100 µg) (in blue), control siRNA Cyc-B3 (50 µg, in green), Cyc-B1 siRNA (1 µg in orange and 5 µg in red) complexed with MPG-8 at a 1/20 molar ratio, or Cyc-B1 siRNA (5 µg, in purple) associated with MPG at a 1/20 molar ratio. Curves show the mean value of tumour size. (B) After 48 days, PC3 tumours were removed, and Cyclin B1 mRNA levels were evaluated by Quantigen and normalized to GAPDH levels. * $P < 0.05$ versus saline control and ** $P < 0.01$ versus saline control.

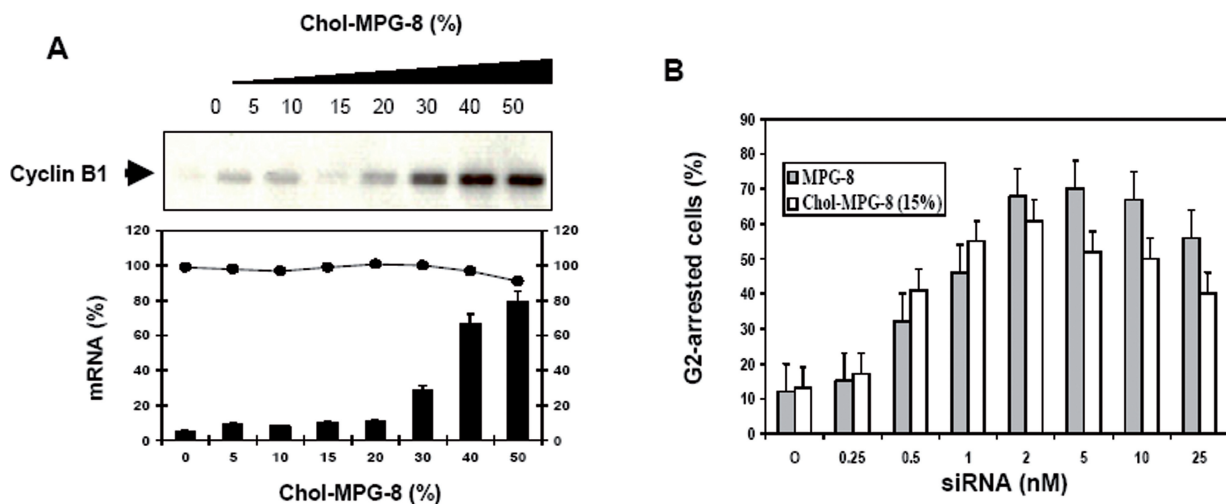


Figure 5. Cholesterol functionalization of MPG-8 does not affect *ex-vivo* efficiency. (A) Cholesterol functionalization of MPG-8-based particles. Formulations containing variable concentrations of Chol-MPG-8 were obtained by forming a precomplex of MPG-8/siRNA at a molar ratio of 1/20 and then increasing the ratio of siRNA/carrier up to 1/25 with Chol-MPG-8. The impact of the Chol-MPG-8 concentration on particle efficiency was evaluated using 5 nM Cyc-B1 siRNA and increasing concentrations of cholesterol-functionalized MPG-8, by measuring Cyclin B1 protein levels by western blot analysis 24h after transfection (A, top) and mRNA levels by Quantigen assay (A, bottom). mRNA levels were corrected using cyclophilin level as control (closed circles). (B) Dose-response of G2-arrest associated with Cyclin B1 silencing. HeLa cells were treated with increasing concentrations of MPG-8/siRNA-Cyc-B1 (grey bars) and of MPG-8/siRNA-Cyc-B1/cholesterol-functionalized MPG-8 (white bars) as in Figure 2. The concentrations of formulated siRNA (from 20 to 0.25 nM) were obtained by serial dilution of the stock solution in PBS. The cell cycle status was evaluated by FACS analysis. Results are the means \pm of four separate experiments.

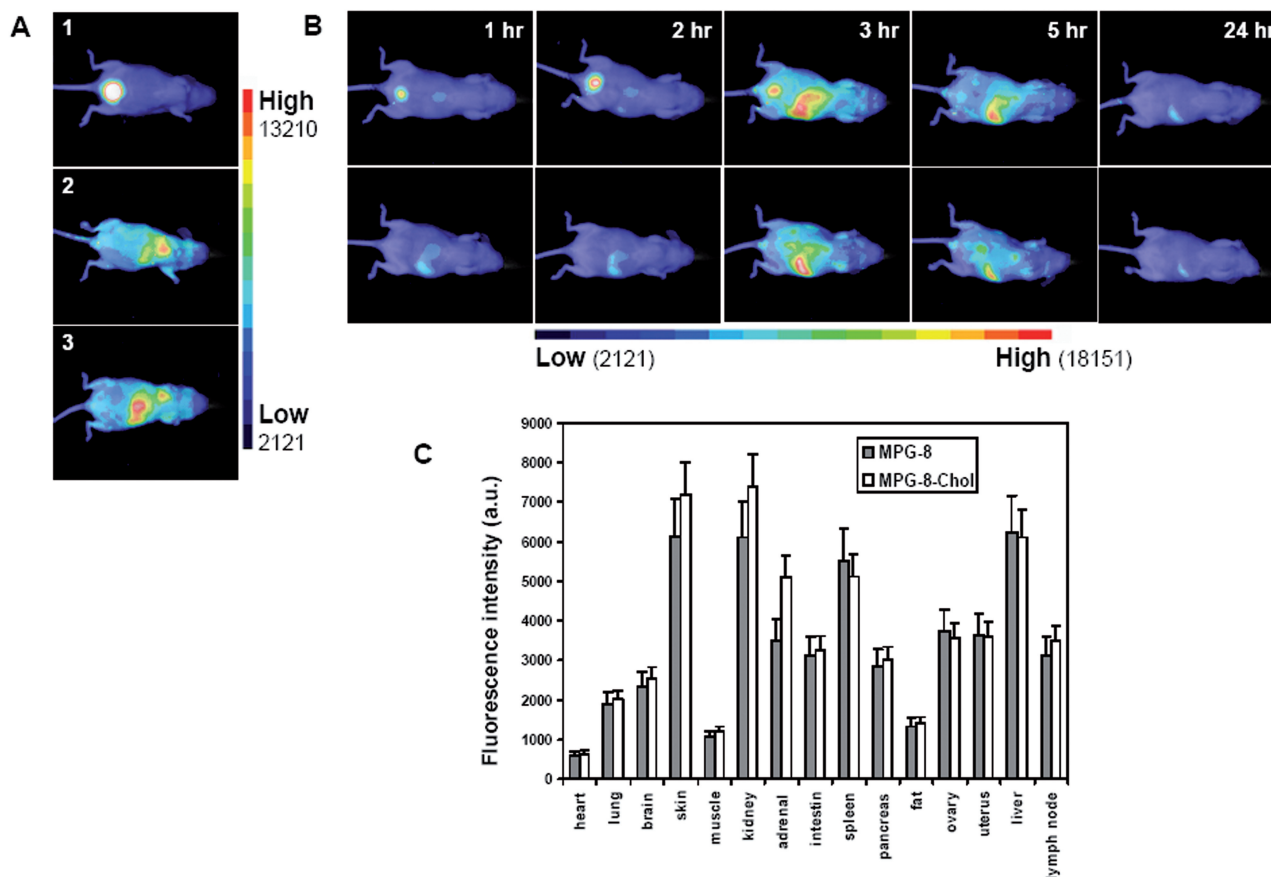


Figure 6. *In vivo* biodistribution of MPG-8 and cholesterol functionalization of MPG-8. Mice were injected intravenously with 10 μ g (200 μ l) of Alexa⁷⁰⁰ fluorescently labelled siRNA either naked (A, 1) or complexed with MPG-8 (A, 2) or MPG-8Chol/MPG-8 (A, 3). Anaesthetized mice were illuminated by 663 nm light emitting diodes equipped with interference filters and fluorescence images and real-time kinetics of biodistribution were acquired during the first 15 min with time of exposures ranging from 100 to 200 ms/image (A), then every hour for 5 h and after 24 h (B). The level of fluorescently labelled siRNA in the different organs was quantified 24 h after administration (C). Results are the average of three animals per group.

Functionalized MPG8-mediated Cyclin B1 siRNA delivery blocks tumour growth upon systemic injection

In order to analyse if increase in the distribution of siRNA associated to functionalized-MPG-8 particles directly affects its potency to inhibit tumour growth, the particles were used for systemic intravenous administration into two xenografted tumour mouse models; human prostate carcinoma (PC3) and human lung cancer (SCK3-HER-2) injected subcutaneously into the flanks of NCR nude mice. Five micrograms (0.25 mg/kg) and 10 μ g (0.5 mg/kg) of Cyc-B1 siRNA complexed with MPG/Chol-MPG-8 at a 20/1 ratio were injected intravenously every 3 days into mice bearing PC3 xenografted tumour and a significant reduction in PC3 tumour size was observed at Day 50, with 60% and 92% inhibition with 5 μ g and 10 μ g of siRNA, respectively (Figure 7A). The reduction in tumour size was directly correlated to reduction of cyclin B1 protein levels, as evaluated by western blotting, by 60% and 80% in animals treated with 5 μ g and 10 μ g of siRNA complexed to MPG-8/Chol-MPG-8, respectively (Figure 7A, insert). These results together with the lack of anti-tumoural activity of the mismatch siRNA/MPG/

Chol-MPG-8 (10 μ g) or of MPG-8/Chol-MPG-8 carrier alone, underscores the robustness and specificity of the biological response associated with systemic delivery of cyclin B1 siRNA. MPG/Cyc-B1-siRNA/Chol-MPG8 particles were next evaluated on human lung cancer cells (SCK3-HER-2) xenografted mice. After 20 days, reduction of tumour growth of 70% was achieved with 10 μ g (0.5 mg/kg) of Cyc-B1-siRNA/MPG-8/Chol-MPG-8 (data not shown). Further analysis of the mice that received (10 μ g) of Cyc-B1-siRNA/MPG-8/Chol-MPG-8 in comparison to control (PBS) or mice injected with Cyc-B1-siRNA/MPG-8 or Cyc-B3 siRNA/MPG-8/Chol-MPG-8, demonstrated a significant increase in survival at Day 40, with 70% of survival, instead of 20% with cholesterol free MPG-8 formulation (Figure 7C). Moreover, 50% of survival was observed after 100 days through injection of cholesterol-functionalized particles every 3 days for 20 days, then every 10 days (10 μ g) (Figure 7B), demonstrating the long-term efficiency of this approach. In contrast, no significant effect was observed with non-functionalized MPG-8-particles, suggesting that cholesterol increases the biodistribution

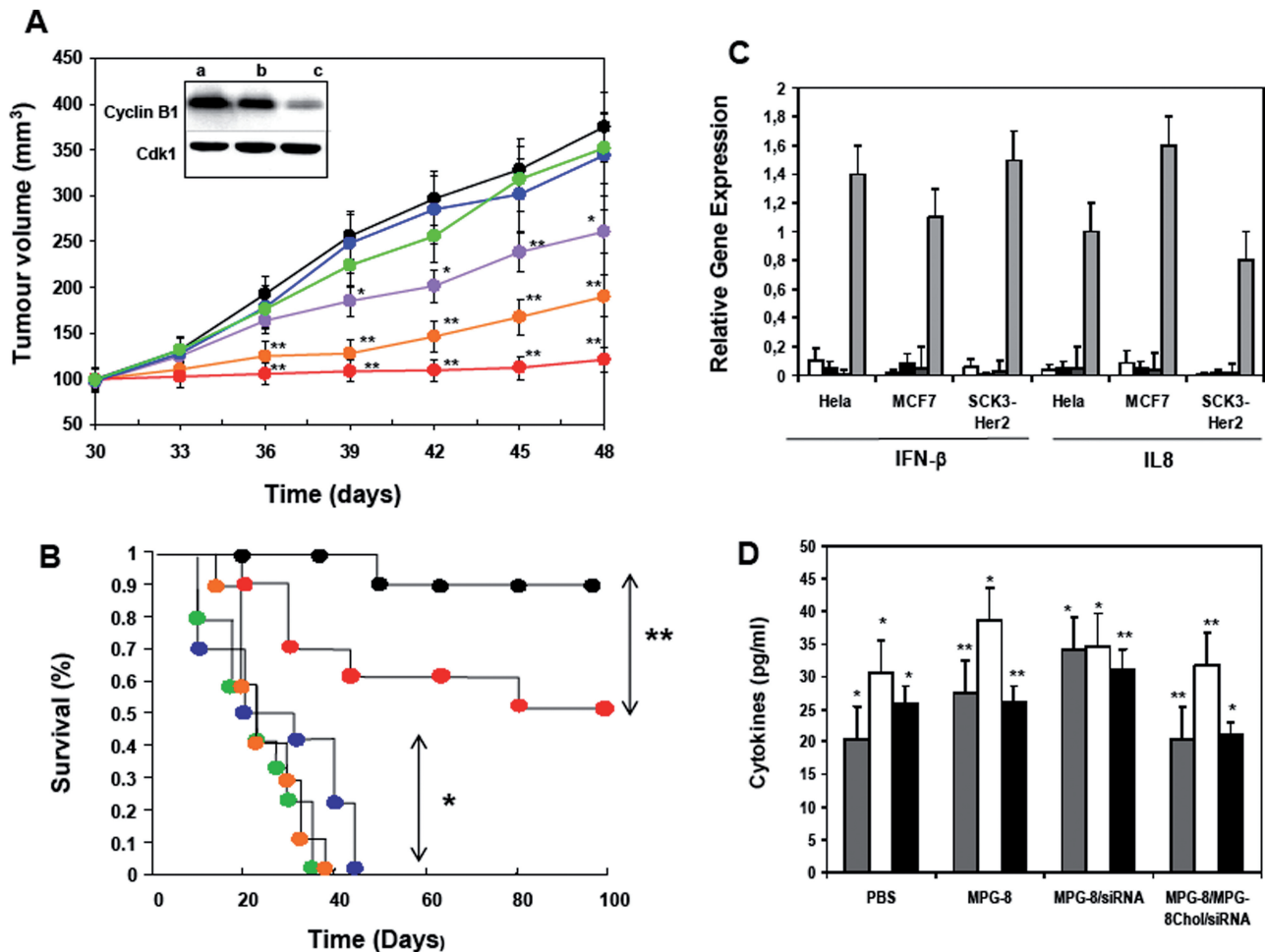


Figure 7. Systemic administration of MPG-8/MPG-8chol/cyclin B1 siRNA blocks tumour growth in vivo. (A) Inhibition of PC3 tumour growth upon intravenous injection. Swiss nude mice (a cohort of $N = 6$ animals) were injected subcutaneously with 106 PC3 cells and tumour analysis was performed as described in Figure 4A. Animals were treated by intravenous tail vein injection, every 3 days, with a solution of 0.1 ml of either PBS (black), free Cyc-B1 siRNA (100 μ g; blue), Cyc-B1 siRNA (10 μ g) complexed with MPG-8 (purple), control siRNA Cyc-B3 (100 μ g; green) or Cyc-B1 siRNA (5 μ g; orange and 10 μ g; red) complexed with MPG-8/Chol-MPG-8 at a 1/20 molar ratio. Curves show the mean value of tumour size in a group of six animals. After 48 days, PC3 tumours were removed, and Cyclin B1 protein levels were evaluated by western blotting (insert) in control (lane a), 5 μ g siRNA (lane b) and 10 μ g siRNA (lane c) complexed with MPG-8/Chol-MPG-8 at a 1/20 molar ratio. * $P < 0.05$ versus saline control and ** $P < 0.01$ versus saline control. (B) Inhibition of SK-BR3 HER2 tumour growth upon intravenous injection. Swiss nude mice (a cohort of $N = 10$ animals) were injected subcutaneously with 106 SK-BR3 HER2 cells. Ten days after tumour implant, when tumour size reached 100 mm³, animals were treated by intravenous tail vein injection, every 3 days from D10 to D30, then every 10 days, with a solution of 0.1 ml of either PBS (green), Cyc-B1 siRNA (10 μ g) complexed with MPG-8 (blue) and Cyc-B3 siRNA (10 μ g; red) complexed with MPG-8/Chol-MPG-8. Control mice treated by intravenous tail vein injection of (10 μ g) Cyc-B1 siRNA complexed with MPG-8/Chol-MPG-8 (black) * $P < 0.05$ versus saline control and ** $P < 0.01$ versus saline control. (C) Expression of IFN response genes: expression of INF- β and IL8 relative to GAPDH was analysed by quantitative RT-PCR. HeLa, MCF7 and SCK3-Her2 cells were treated with MPG-8 carrier alone (white) (20 μ M), 20 nM of Cyc-B1 siRNA associated with MPG-8 (black) or MPG-8/Chol-MPG8 (light grey) particles. Poly(I:C) was used as a positive control to induce interferon response (grey). (D) MPG-8 formulation does not induce interferon response in vivo. MPG-8/siRNA, MPG-8/MPG-8-Chol/siRNA (0.5 mg/kg), and MPG-8 carrier were intravenously injected into mice and IL-6 (grey), TNF- α (white) and IFN- γ (black) induction were measured in the serum 6 h after injection by sandwich ELISA and expressed as pg/ml. (P versus saline controls * <0.05 , ** <0.01) each value is the mean of three separate experiments.

of siRNA in the tumour by maintaining siRNA in the plasma.

The potential induction of inflammatory cytokine and interferon responses by siRNA has been reported as a major limitation to their therapeutic application (32–34). As interferon response has been recently reported for covalent CPP-siRNA formulations (34), we investigated the ability of MPG-8 and MPG-8/Chol formulations to induce innate immune response in cultured HeLa, MCF7 and SCK3-HER-2 cells, by monitoring expression of INF-

β and of IL8 by quantitative RT-PCR (Figure 7C), and *in vivo* by quantifying the level of IFN- α , TNF- α and IL6 in the plasma (Figure 7D). As reported in Figure 7C, none of the formulations triggered activation of interferon response, the level of expression of INF- β and IL8 being similar to those of the negative control, in contrast to poly(I:C) (positive control) which induced 1.0–1.7-fold gene expression depending on the gene and the cell line. Similarly no increase in cytokine level, in comparison to saline solution, was observed in the plasma, 6 h after

injection of any formulation (Figure 7D). Interferon response of siRNA and formulations has been associated to the binding to Toll Like Receptors within the endosome (33). As such, the lack of activation of interferon response with MPG-8 is in perfect agreement with an endosomal-independent uptake pathway (10).

CONCLUSIONS

Despite the potential of siRNA *in vitro* and *ex vivo*, their systemic delivery remains a major obstacle to therapeutic administration (4). Several reports using polycationic formulations (35), protamine-antibodies (36,37) and peptides (12,17) have largely proven that non-covalent strategies are very suitable approaches for siRNA delivery, as they improve the stability of siRNA in biological fluids, thereby increasing their overall potency. In the present work, we have developed a potent strategy to deliver siRNA *in vivo* based on an improved variant of the primary amphipathic peptide carrier MPG, MPG-8, which forms stable, yet non-covalent nanoparticles with siRNA, ensuring its efficient delivery *in vivo*. We provide a proof of concept that MPG-8 mediates efficient delivery of low effective concentrations of siRNA (0.5 mg/kg) *in vivo*. Moreover, we demonstrate that siRNA-targeting of cyclin B1 compromises tumour cell proliferation and tumour growth in a xenografted tumour mouse model.

The high stability of MPG-8-based particles, together with the slow release of the siRNA within cells, allows the use of low concentrations of siRNA, thereby limiting side effects whilst ensuring long-term response associated with siRNA delivery. MPG-8-based nanoparticles can be functionalized, and we have shown that an additional layer of cholesterol-functionalized-MPG-8 at the surface of MPG-8/siRNA particles is sufficient to stabilize these formulations in biological fluids, thereby enhancing the biological response associated with the siRNA delivered upon systemic injection. Likewise, functionalization of MPG-8 with other chemical groups or biological moieties could be applied to generate formulations to target specific cell types or tissues will be of a major interest for future development. Taken together, these findings provide new perspectives for the specific targeting and treatment of tumours, and the marked anti-tumoural effect achieved with the MPG-8-based nanoparticle system, with very low concentrations of siRNA and the lack of induction of innate immunoresponse, infers that it constitutes a promising technology for systemic administration of siRNA in a therapeutic context.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the laboratory for fruitful discussions and IGMM 'animal core facility' for their expertise.

FUNDING

The Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); grants from the ANR (Agence Nationale de la

Recherche, ANR-06-BLAN-0071); and Panomics Inc. Funding for open access charge: Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-BLAN-0071).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K. and Tuschl,T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cell. *Nature*, **411**, 494–498.
- Dorsett,Y. and Tuschl,T. (2004) siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 318–329.
- Dykxhoorn,DM., Palliser,D. and Lieberman,J. (2006) The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther.*, **13**, 541–552.
- De Fougères,A., Vornlocher,H.-P., Maraganore,J. and Lieberman,J. (2007) Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 443–453.
- Akhtar,S. and Benter,I.F. (2007) Nonviral delivery of synthetic siRNA *in vivo*. *J. Clinical Invest.*, **117**, 3623–3632.
- El-Andaloussi,S., Holm,T. and Langel,Ü. (2005) Cell-penetrating peptides:mechanism and applications. *Cur. Pharma. Design.*, **11**, 3597–3611.
- Deshayes,D., Morris,MC., Divita,G. and Heitz,F. (2005) Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.*, **16**, 1839–1849.
- Meade,B.R. and Dowdy,S.F. (2007) Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 134–140.
- Morris,M.C., Deshayes,S., Heitz,F. and Divita,G. (2008) Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. Cell.*, **100**, 201–217.
- Simeoni,F., Morris,M.C., Heitz,F. and Divita,G. (2003) Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2717–2724.
- Morris,K.V., Chan,S.W., Jacobsen,S.E. and Looney,D.J. (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, **305**, 1289–1292.
- Kumar,P., Wu,H., McBride,J.L., Jung,K.E., Kim,M.H., Davidson,B.L., Lee,S.K., Shankar,P. and Manjunath,N. (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, **7149**, 39–43.
- Kim,W.J., Christensen,L.V., Jo,S., Yockman,J.W., Jeong,J.H., Kim,Y.H. and Kim,S.W. (2006) Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol. Ther.*, **14**, 343–350.
- Lundberg,P., El-Andaloussi,S., Sütli,T., Johansson,H. and Langel,U. (2007) Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J.*, **11**, 2664–2671.
- Veldhoen,S., Laufer,S.D., Trampe,A. and Restle,T. (2006) Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6561–6573.
- Crombez,L., Aldrian-Herrada,G., Konate,K., Nguyen,Q.N., Mc Master,G.K., Brasseur,R., Heitz,F. and Divita,G. (2009) A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol. Ther.*, **17**, 95–103.
- Kumar,P., Ban,H.S., Kim,S.S., Wu,H., Pearson,T., Greiner,D., Laouar,A., Yao,J., Lee,S.K. and Shankar,P. (2008) T-Cell specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*, **134**, 577–586.
- Morris,M.C., Depollier,J., Mery,J., Heitz,F. and Divita,G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1173–1176.
- Crombez,L., Morris,M.C., Deshayes,S., Heitz,F. and Divita,G. (2008) Peptide-based nanoparticle for *ex vivo* and *in vivo* drug delivery. *Cur. Pharm. Des.*, **14**, 3656–3665.
- Zeineddine,D., Papadimou,E., Chebli,K., Gineste,M., Liu,J., Gr,C., Thurig,S., Behfar,A., Wallace,V.A., Skerjanc,I.S. *et al.* (2006) Oct-3/

- 4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev. Cell*, **11**, 535–546.
21. Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 261–291.
 22. Goga, A., Yang, D., Tward, A.D., Morgan, D.O. and Bishop, J.M. (2007) Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat. Med.*, **13**, 820–827.
 23. Yuan, J., Krämer, A., Matthes, Y., Yan, R., Spänkuch, B., Gätje, R., Knecht, R., Kaufmann, M. and Strebhardt, K. (2006) Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo. *Oncogene*, **25**, 1753–1762.
 24. Morris, M.C., Gros, E., Aldrian-Herrada, G., Choob, M., Archdeacon, J., Heitz, F. and Divita, G. (2007) A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e49.
 25. Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. and Divita, G. (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2730–2736.
 26. Jossierand, V., Texier-Nogues, I., Huber, P., Favrot, M.C. and Coll, J.L. (2007) Non-invasive in vivo optical imaging of the lacZ and luc gene expression in mice. *Gene Ther.*, **14**, 1587–1593.
 27. Jin, Z.H., Jossierand, V., Foillard, S., Boturyn, D., Dumy, P., Favrot, M.C. and Coll, J.L. (2007) In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol. Cancer*, **6**, 41.
 28. Crombez, L., Charnet, A., Morris, M.C., Aldrian-Herrada, G., Heitz, F. and Divita, G. (2007) A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 44–46.
 29. Spänkuch, B., Hurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M. and Strebhardt, K. (2007) Rational combinations of siRNA targeting Plk1 with breast cancer drugs. *Oncogene*, **26**, 5793–5807.
 30. Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R., Rajeev, K.G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E.M. *et al.* (2007) Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1149–1157.
 31. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J. *et al.* (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, **432**, 173–178.
 32. Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K. and MacLachlan, I. (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 457–466.
 33. Sioud, M. (2006) Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.*, **12**, 167–176.
 34. Moschos, S.A., Jones, S.W., Perry, M.M., Williams, A.E., Erjefalt, J.S., Turner, J.J., Barnes, P.J., Sproat, B.S., Gait, M.J. and Lindsay, M.A. (2007) Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug. Chem.*, **18**, 1450–1459.
 35. Zimmermann, T.S., Lee, A.C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M.N., Harborth, J., Heyes, J.A., Jeffs, L.B., John, M. *et al.* (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, **441**, 111–114.
 36. Song, E., Zhu, P., Lee, S.K., Chowdhury, D., Kussman, S., Dykxhoorn, D.M., Feng, Y., Palliser, D., Weiner, D.B., Shankar, P. *et al.* (2005) Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 709–717.
 37. Fountaine, T.M., Wood, M.J. and Wade-Martins, R. (2005) Delivering RNA interference to the mammalian brain. *Curr. Gene Ther.*, **5**, 399–410.

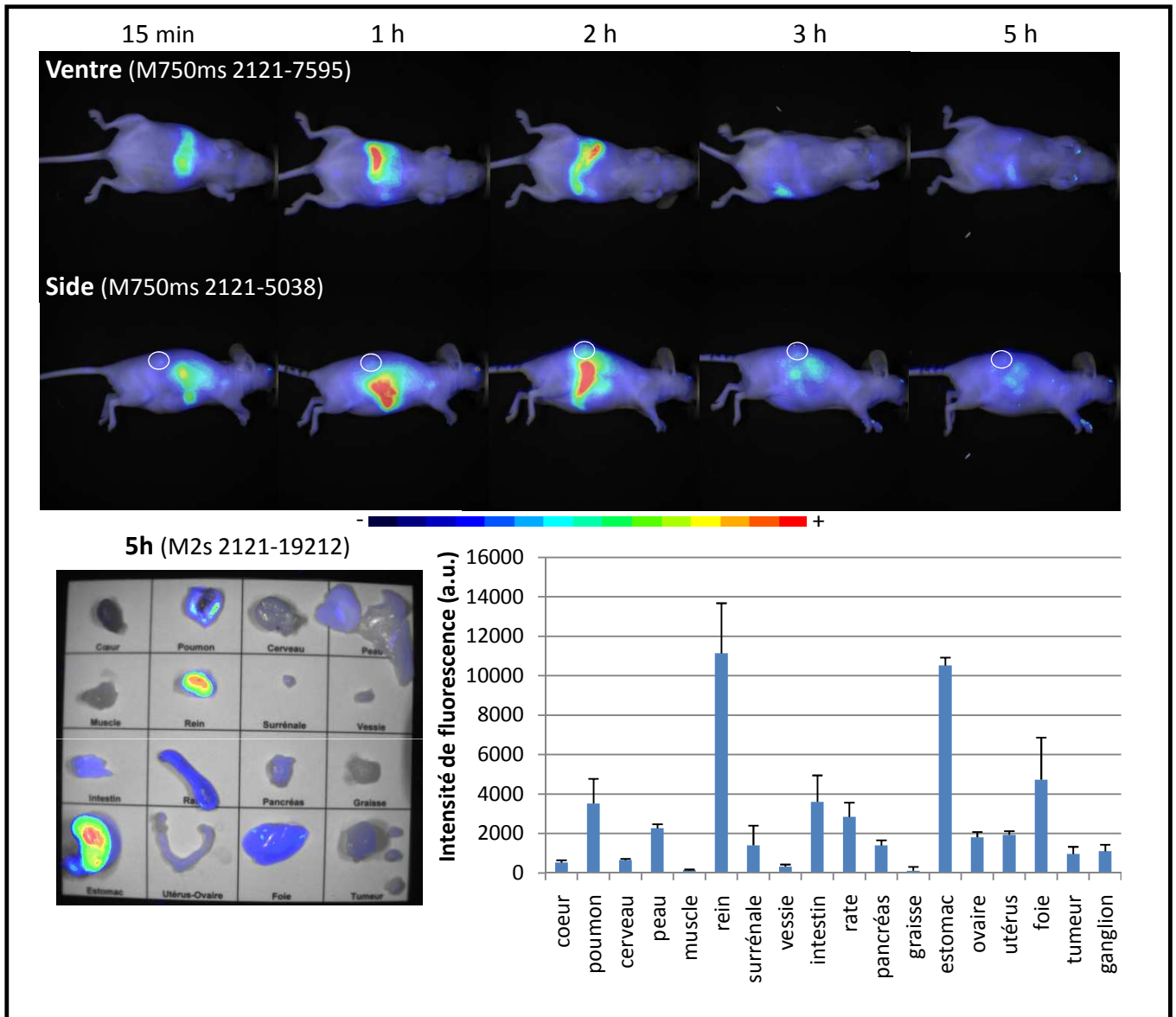


Figure 48. Biodistribution des complexes siRNA/CAD2 *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xéngreffe sous-cutanée de PC3 (cercle sur les images en Side), sont injectées par voie intra-veineuse par 10 µg (200 µl) de siRNA couplé à l'Alexa 700, complexé avec du CAD2.

3. Résultats complémentaires

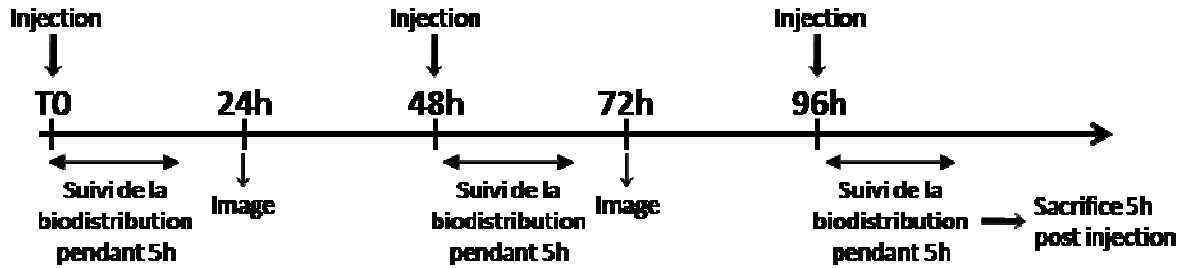
3.1. Biodistribution des complexes siRNA-Cy5 / CAD2

En parallèle des expériences effectuées avec le MPG-8 et le MPG-8-cholestérol, nous avons étudié la biodistribution d'un CPP amphipathique secondaire : le CAD2. Les résultats obtenus *in vitro* (par Laurence Crombez), montrent un maximum d'efficacité de transfection pour des ratios siRNA/CAD2 allant de Q20 (20 CAD2 pour 1 siRNA, ratio molaire) à Q40 (40 CAD2 pour siRNA). Nous avons tout d'abord évalué le ratio optimal à utiliser pour obtenir la meilleure accumulation passive dans la tumeur *in vivo*. Pour cela, deux ratios molaires ont été testés : Q20 et Q40. Dans les 2 cas, 10 µg de siRNA-Alexa700 (200 µl) (Alexa700 : $\lambda_{abs} = 702$ nm; $\lambda_{em} = 723$ nm) sont injectés à la souris par voie intra-veineuse. Les biodistributions ont été réalisées sur des souris *nude* porteuses de tumeur PC3, dans la continuité des expériences *in vitro* menées sur cette même lignée cellulaire.

Les biodistributions donnent des résultats similaires quelque soit le ratio utilisé, avec dans les premières minutes, un passage dans les poumons suivi d'une accumulation hépatique. Cinq heures après injection, par ordre décroissant de fluorescence, un signal fluorescent est détecté dans les reins, le foie, l'estomac, les intestins, les poumons et la rate (Figure 48). Les tumeurs présentent un faible signal fluorescent. En 24h la quasi-totalité de la fluorescence est éliminée de l'organisme. L'accumulation hépatique détectée quinze minutes après injection, suivie d'une visualisation de la fluorescence dans les intestins, laisse à penser que l'élimination se fait par voie hépato-biliaire.

Ces complexes présentent une distribution dans l'ensemble de la souris, cependant l'accumulation tumorale passive par effet EPR est faible (la fluorescence détectée est comparable à celle de l'ensemble des organes) et doit être améliorée.

Dans un second temps, nous avons cherché à améliorer l'accumulation passive des complexes dans les tumeurs. Pour cela, nous avons réalisé une expérience comportant des injections répétées. Le protocole et les intervalles d'injection ont été déterminés par rapport aux résultats d'une expérience réalisée par Laurence Crombez (CNRS UMR 5237, Montpellier), visant à évaluer l'effet de la transfection d'un siRNA anti-Cycline B1 par le CAD2 (ratio Q40) sur l'inhibition de l'expression de la Cycline B1 *in vivo*. Le protocole utilisé a été le suivant :



Nous n'avons pas mis en évidence de différence de biodistribution entre les complexes injectés en dose unique et de manière répétée. Aucune accumulation tumorale supplémentaire n'est observée.

3.2. Complexes ciblant : CAD2 / CAD2-RAFT-(cRGD)₄

Suite aux résultats obtenus avec les complexes siRNA-Alexa700 / CAD2, nous avons cherché à réaliser un ciblage tumoral actif en ajoutant du CAD2-RAFT-(cRGD)₄ en surface (formation de complexes multi-couches) (Figure 49), dans le but de pouvoir réaliser une thérapie ciblée. Dans ce cas, le RAFT-(cRGD)₄ n'emmène pas un seul siRNA, mais un ensemble de siRNA au sein d'une particule. Le peptide CAD2 a été synthétisé par l'équipe de Gilles Divita (CNRS UMR 5237, Montpellier), alors que la synthèse du RAFT-(cRGD)₄ et le couplage du CAD2 ont été réalisés par Didier Boturyn (CNRS UMR 5250, Grenoble).

Nous avons d'abord évalué la capacité de ces complexes à cibler *in vitro* les cellules positives pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Pour cela, un siRNA anti-luciférase (anti-pGL3) a été utilisé. Il est capable d'inhiber l'expression de la luciférase dans les cellules tumorales HEK293(β_3)-RVLuc et HEK293(β_1)-RVLuc, ces deux lignées étant transfectées par un rétrovirus permettant l'expression stable de la luciférase. Les complexes sont réalisés en deux temps : dans un premier temps, formation du complexe CAD2/siRNA anti-pGL3 avec un ratio molaire Q40, et dans un second temps ajout de différentes quantités de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ (10 ou 100% par rapport à la molarité en CAD2). Deux concentrations de siRNA ont été testées : 25 et 50 nM. L'activité luciférase est mesurée 72h après traitement.

Le CAD2 et le CAD2-RAFT-(cRGD)₄ utilisés seuls, aux plus fortes concentrations utilisés dans les complexes (soit 2 μ M), n'ont quasiment aucun effet sur l'activité luciférase quelque soit le type cellulaire (Figure 50). En transfectant 25nM de siRNA anti-pGL3, aucune inhibition de l'activité luciférase n'est détectée pour les complexes avec le CAD2. Lorsque 10 % de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ sont ajoutés aux complexes siRNA/CAD2 (Q40), l'activité

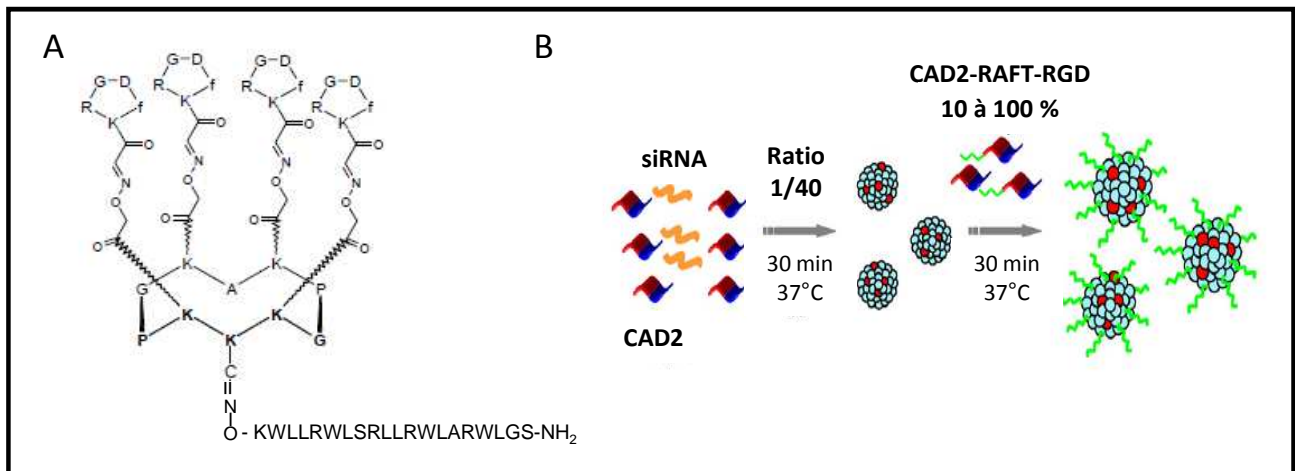


Figure 49. Structure du CAD2-RAFT-(cRGD)₄ et formation des complexes siRNA/CAD2/CAD2-RAFT-(cRGD)₄.

[A] Le peptide CAD2 est lié au RAFT-(cRGD)₄ *via* un pont éther-oxime.

[B] Les complexes sont réalisés en deux temps. Tout d'abord la formation d'une particule siRNA/CAD2, puis l'ajout d'une seconde couche composée de CAD2-RAFT-(cRGD)₄.

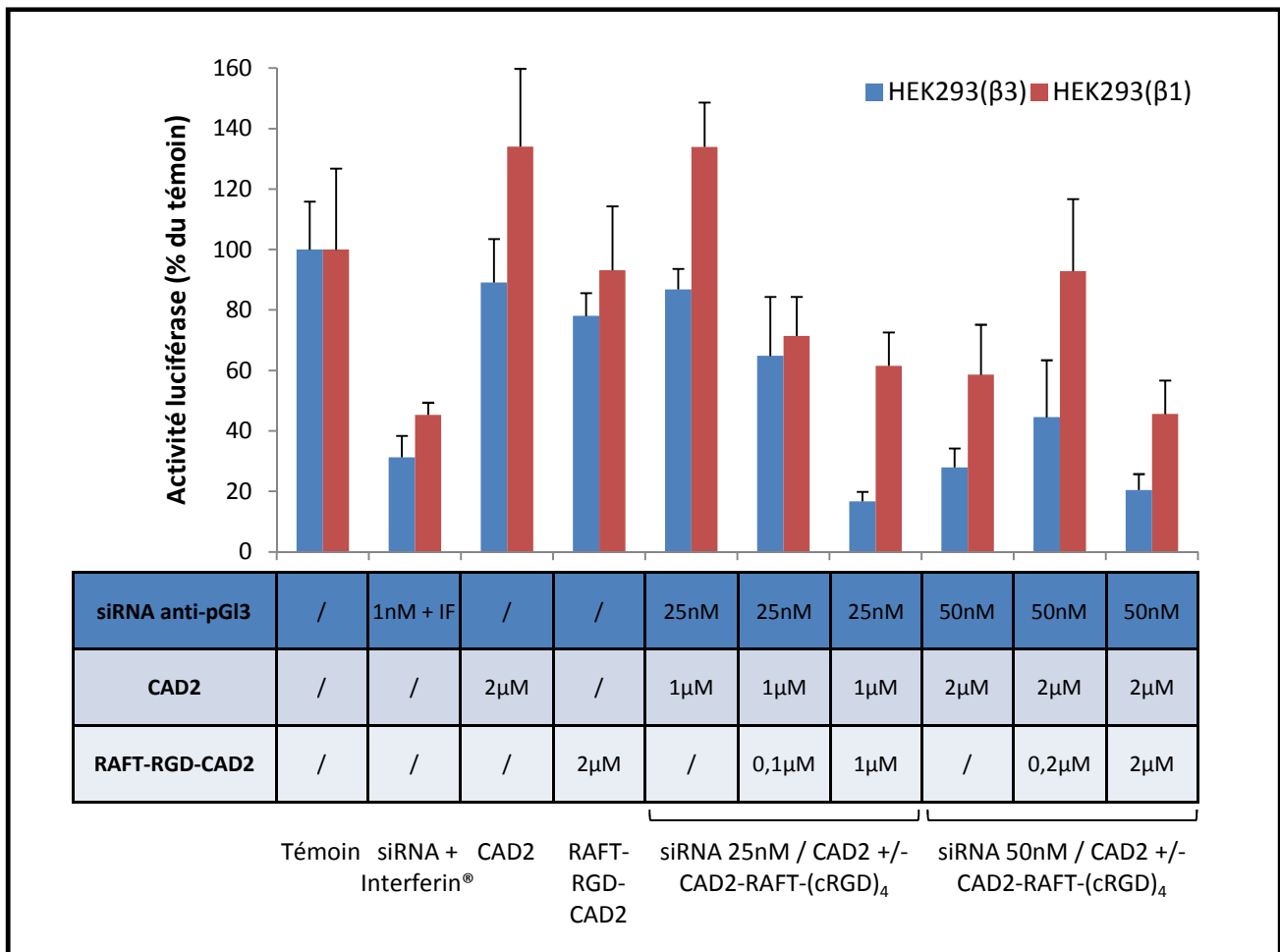


Figure 50. Evaluation de la transfection de siRNA anti-pGL3 complexés avec du CAD2 +/- CAD2-RAFT-(cRGD)₄ *in vitro* sur des cellules HEK293(β3)-RVLuc et HEK293(β1)-RVLuc.

luciférase est diminuée de 35 % par rapport au témoin ; mais cette inhibition est observée pour les HEK293(β 3)-RVLuc et les HEK293(β 1)-RVLuc. En revanche, avec 100 % de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ en surface des complexes, l'activité luciférase est inhibée de 83 % pour les HEK293(β 3)-RVLuc *versus* 38 % pour les HEK293(β 1)-RVLuc (Figure 50).

Pour les complexes contenant 50 nM de siRNA, une diminution de l'activité luciférase d'environ 55 à 75 % est observée pour les HEK293(β 3)-RVLuc quelque soit le pourcentage de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ ajouté aux complexes siRNA/CAD2, et une inhibition de 7 à 50 % pour les HEK293(β 1)-RVLuc. La différence entre les deux lignées étant d'environ 35 % en faveur des HEK293(β 3)-RVLuc, quelle que soit la formulation (Figure 50). Dans ces conditions expérimentales (50 nM de siRNA), il y a une meilleure activité du siRNA anti-pG13 sur les cellules HEK293(β 3)-RVLuc que sur les cellules HEK293(β 1)-RVLuc.

Lorsque 25 nM de siRNA sont vectorisés, l'ajout de 100 % de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ semble apporter une spécificité de transfection pour les HEK293(β 3)-RVLuc par rapport aux HEK293(β 1)-RVLuc, avec une différence d'extinction de l'activité luciférase d'environ 45 % *versus* 7 % pour les complexes comprenant 10 % de CAD2-RAFT-(cRGD)₄. En revanche pour 50 nM de siRNA vectorisés, le différentiel d'extinction de l'activité luciférase entre les deux lignées cellulaires est constant (35 %). Dans ce cas la meilleure efficacité de transfection pourrait s'expliquer par l'augmentation de la quantité de CAD2 dans la formulation, qui pourrait permettre une meilleure internalisation dans les cellules et ainsi masquer un potentiel effet de l'ajout de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ en surface des complexes. Ces résultats montrent qu'en fonction de la formulation des complexes (dépendante de la quantité de siRNA vectorisée), l'ajout d'une quantité optimale de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ en surface peut apporter une spécificité de ciblage des cellules d'intérêt.

Le pouvoir ciblant des complexes CAD2/siRNA/CAD2-RAFT-(cRGD)₄ a ensuite été évalué *in vivo* sur un modèle de souris *nude* xénotreffé par des cellules tumorales HEK293(β 3). Les complexes siRNA-Alexa700 (10 μ g)/CAD2 (Q40) + 10 % de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ ont été injectés par voie intra-veineuse et le suivi de leur biodistribution a été effectué par imagerie de fluorescence *in vivo* pendant 24h. Les premiers résultats montrent peu de différence de biodistribution entre les complexes siRNA/CAD2 et siRNA/CAD2/CAD2-RAFT-(cRGD)₄ pour un ratio molaire Q40 (Figure 51). Cependant, l'ajout du CAD2-RAFT-(cRGD)₄ améliore la biodistribution des complexes dans les premières heures post-injection, mais il accélère également leur élimination à 24h. Cette élimination est principalement intestinale. Aucune accumulation active n'a été observée dans la tumeur. Ces résultats préliminaires doivent

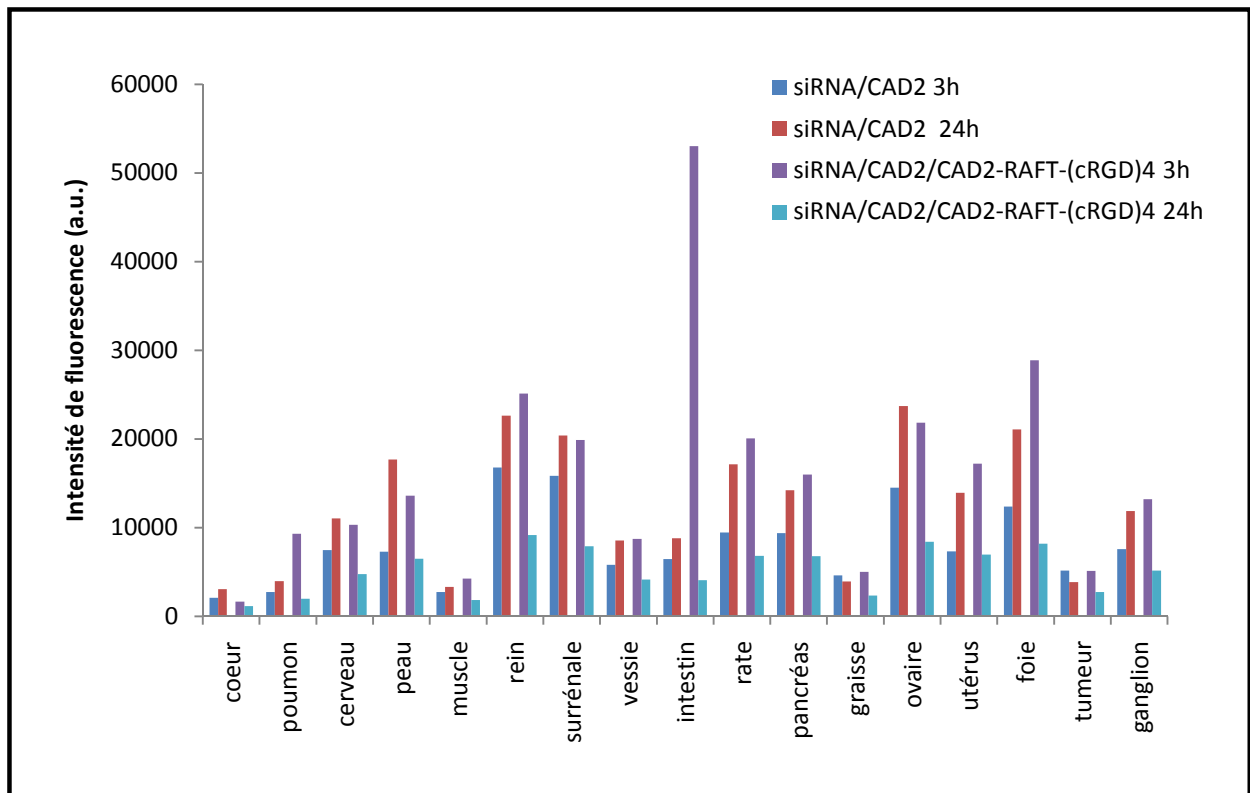


Figure 51. Comparaison des biodistributions des complexes SiRNA/CAD2 +/- CAD2-RAFT-(cRGD)₄ *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xénogreffe sous-cutanée de HEK293(β 3), sont injectées par voie intra-veineuse par 10 μ g (200 μ l) de siRNA couplé à l'Alexa 700, complexé avec du CAD2 +/- CAD2-RAFT-(cRGD)₄.

2.2. Importance de la fonctionnalisation de surface

Les premières expériences de biodistribution de ces nano-objets ont été réalisées avec des nanoparticules non fonctionnalisées : cœur d'oxyde de gadolinium + couche de polysiloxane contenant de la cyanine 5. Elles étaient très fortement accumulées dans les poumons et dans le foie, et provoquaient la mort de l'animal 1h30 après injection probablement par embolie pulmonaire. Cette agrégation dans les capillaires pulmonaires était liée à leur instabilité colloïdale en milieu aqueux à pH physiologique. Il a donc été important d'augmenter leur caractère hydrophile en modifiant leur surface, la solution couramment utilisée pour les nanoparticules étant le greffage de PEG. La fonctionnalisation des nanoparticules par des PEG de petite taille (250 g/mol) ayant une fonction terminale acide carboxylique, a complètement modifié la biodistribution, passant ainsi d'une nanoparticule qui s'accumule dans le foie et les poumons à une nanoparticule éliminée de manière très rapide dans les urines par voie rénale. Un signal fluorescent est détecté dans la vessie 3 minutes après injection et à 24 h le signal est exclusivement dans les reins (Bridot et coll., 2007). La PEGylation des particules a suffisamment augmenté leur caractère hydrophile pour les rendre injectables par voie IV. Elles pourront ainsi être utilisées pour différentes applications, notamment le diagnostic des tumeurs si elles ont la capacité de les cibler. Les différences de biodistribution engendrées par le type de PEG greffé peuvent être exploitées en fonction de l'application envisagée.

Nous avons donc cherché à améliorer la biodistribution et la biodisponibilité des nanoparticules afin d'obtenir des nano-objets qui ne s'accumulent pas dans les organes vitaux (foie, poumons, ...) et qui ont un temps de circulation suffisamment long pour pouvoir être capté par la tumeur. Pour cela nous avons évalué l'influence de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules par les PEG, et plus particulièrement l'influence de la taille des PEG et de leur fonction terminale.

Les résultats font l'objet d'une publication parue dans Small en 2009, dans laquelle je suis co-premier auteur.

maintenant être améliorés, notamment en optimisant la formulation des complexes et en optimisant le pourcentage de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ présent en surface de ces complexes.

4. Conclusions

Nous avons montré que les complexes siRNA-Alexa700/CAD2 s'accumulaient de manière passive dans les tumeurs. L'ajout de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ améliore la vectorisation spécifique du siRNA anti-pG13 dans le modèle étudié *in vitro* et la meilleure formulation testée semble être : 25 nM de siRNA / 1 μM de CAD2 + 1 μM de CAD2-RAFT-(cRGD)₄. Cependant les résultats *in vivo* concernant le ciblage spécifique des tumeurs ne sont pas satisfaisants et sont à optimiser.

Avec ce système, la quantité de biomolécules vectorisée est plus importante qu'avec le RAFT-(cRGD)₄, mais à l'heure actuelle, il manque de spécificité pour réaliser des thérapies ciblées. C'est pour cela que nous nous sommes ensuite orientés vers l'étude de « nanostructures » de différentes natures (nanoparticules avec un cœur métallique, nanoémulsions et nanocapsules lipidiques, ...), le but étant d'augmenter la capacité de ciblage et la quantité de biomolécules vectorisée, mais aussi d'avoir un système couplant l'imagerie et la thérapie.

III . Développement de nanoparticules pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs

La nanomédecine, domaine émergent créé par la fusion des nanotechnologies et de la médecine, est l'une des voies les plus prometteuses pour le développement de thérapies ciblées efficaces, notamment en oncologie. Ainsi au cours de ces dernières années, les nombreuses recherches consacrées aux nanotechnologies ont conduit au développement de diverses nanoparticules multifonctionnelles pour des applications thérapeutiques ou diagnostiques. Ces nanoparticules qui peuvent être inorganiques (comme par exemple les quantum dots, les nanoparticules de silice ou d'oxydes métalliques,...) ou organiques (telles les polymères synthétiques, les liposomes, les nanocapsules lipidiques, ...), apparaissent bien adaptées pour l'imagerie et la thérapie pour différentes raisons. La première est liée à leur petite taille qui permet l'exploration du vivant du niveau sub-cellulaire au niveau clinique. La seconde réside dans leur capacité à présenter diverses propriétés malgré leur faible taille. De plus leur comportement (stabilité colloïdale, ciblage,...) peut être modulé par ajustement de leur fonctionnalisation de surface.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié différentes nanoparticules : des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium, des nanoparticules d'or, des nanocapsules lipidiques et des nanoémulsions. Pour chaque nanoparticule, le même schéma de développement a été suivi, à savoir une évaluation de leur interaction avec des cellules *in vitro*, une étude de la biodistribution en fonction de leur fonctionnalisation de surface et en fonction de la taille des nanoparticules, et enfin nous avons essayé de les rendre ciblantes en greffant du cRGD voire du RAFT-(cRGD)₄.

1. Nanoparticules d'oxyde de Gadolinium

Les nanoparticules d'oxyde de Gadolinium présentent diverses propriétés qui en font des candidates prometteuses pour des applications médicales. Elles peuvent être visualisées par diverses modalités d'imagerie : imagerie de fluorescence et IRM. De plus, elles peuvent être utilisées comme agent radio-sensibilisant. Enfin, l'administration IV de chélates de Gadolinium est déjà autorisée chez l'homme, pour une utilisation comme agents de contraste

en IRM. En vue de ces applications, il est nécessaire d'obtenir des nanoparticules ayant une biodistribution optimale, notamment en modulant leur fonctionnalisation de surface.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Olivier Tillement, Stéphane Roux et Anne-Charlotte Faure (Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents – UMR 5620, Villeurbanne), qui ont synthétisé l'ensemble des nanoparticules.

2.1. Structure des nanoparticules d'oxyde de gadolinium

Les nanoparticules d'oxyde de Gadolinium sont des nanoparticules hybrides de structure cœur-coquille (core-shell) constituées d'un cœur nanométrique d'oxyde de Gadolinium (2-3 nm), encapsulé dans un réseau de polysiloxane. La partie interne de la couche de polysiloxane est fonctionnalisée par des fluorophores et la partie externe par des molécules favorisant la biodisponibilité de ces particules dans les fluides biologiques et/ou par des biomolécules ciblantes (telles le cRGD, ...). La présence d'un fluorophore, et plus particulièrement de la cyanine 5 ($\lambda_{exc} = 659 \text{ nm}$; $\lambda_{exc} = 670 \text{ nm}$), dans la couche de polysiloxane permet le suivi de leur biodistribution *in vivo*, par un système d'imagerie de fluorescence du petit animal (Figure 52).

Pour permettre l'incorporation de fluorophores et le greffage de groupements hydrophiles en surface, la couche de polysiloxane est obtenue par hydrolyse-condensation d'un mélange de TEOS (tétraéthoxysilane), d'APTES (aminopropyltriéthoxysilane) et de Cyanine 5 conjuguée à de l'APTES (40% - 59,2% et 0,8% respectivement).

Les nanoparticules ont un diamètre hydrodynamique de l'ordre de 15 nm.

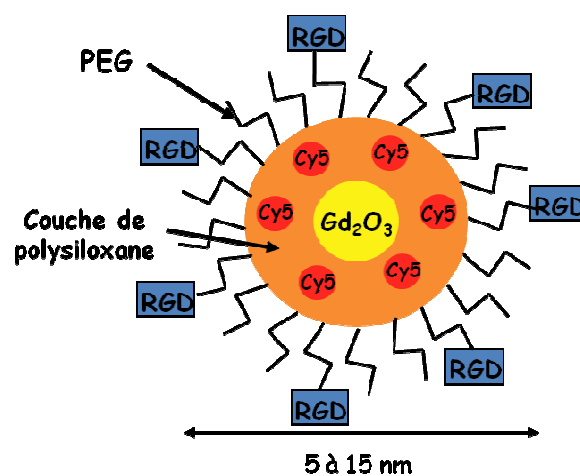


Figure 52. Représentation schématique des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium.

		Fonction terminale		
		-NH ₂	-COOH	-OCH ₃
P E G	Chaîne courte	1500 stable	250 stable	750 précipitation
	Chaîne moyenne	2000 stable	2000 stable	2000 stable
	Chaîne longue	6000 stable	6000 gélification	5000 stable

Tableau VI. Résumé des différentes nanoparticules d'oxyde de Gadolinium synthétisées.

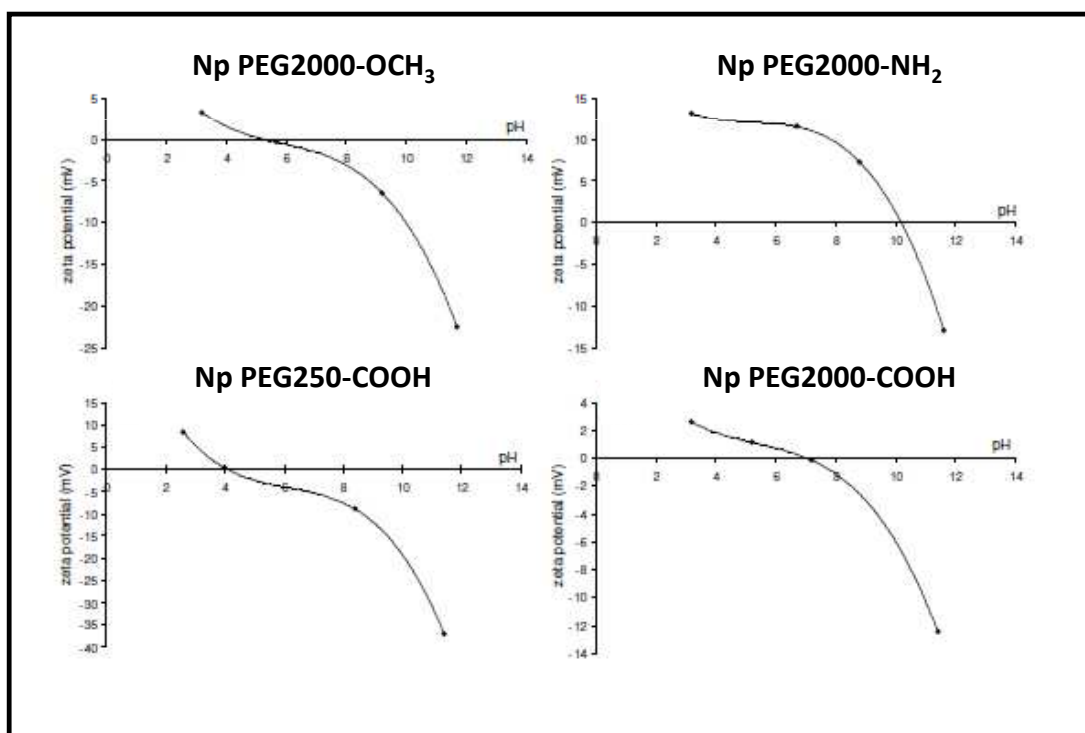


Figure 53. Evaluation du potentiel zêta des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium en fonction du pH et de leur fonctionnalisation de surface.

Le potentiel zêta représente la charge que la particule acquiert en solution. Il varie en fonction du pH.

2.2.1. But de l'étude et principaux résultats

Le but de cette étude était d'obtenir des nanoparticules PEGylées présentant des caractéristiques de surface modulables afin de pouvoir comparer l'effet de la nature du polymère greffé en surface sur la biodistribution des particules après injection systémique. Différentes séries de particules ont été synthétisées. Nous avons choisi d'étudier la série PEG2000 car c'est la seule série pour laquelle nous avons des particules présentant une bonne stabilité colloïdale à pH 7,4 permettant leur administration par voie systémique, quelle que soit la fonction terminale (Tableau VI). L'influence de la taille de la chaîne sur la biodistribution a été examinée sur les PEG-COOH.

Ainsi, nous avons évalué l'influence de 2 tailles de PEG-COOH : 250 et 2000 g/mol, et de 3 fonctions terminales différentes pour un PEG de taille 2000 g/mol : -COOH, -NH₂ et -OCH₃.

Lors de la caractérisation physico-chimique, le potentiel zêta des nanoparticules a été déterminé. Le potentiel zêta caractérise la charge de surface des nanoparticules en solution. Il ne correspond pas à la charge réelle de la surface de la particule, mais à celle qu'elle acquiert en solution. Le potentiel zêta permet de prédire la stabilité des particules en suspension. En effet, l'intensité de la force de répulsion électrostatique est liée au potentiel zêta : plus les particules ont un potentiel zêta élevé (en valeur absolue), plus elles vont se repousser et moins elles auront tendance à s'agréger. Les Np-PEG2000-NH₂ ont un potentiel zêta positif (+10 mV) en milieu acide, qui reste stable jusqu'à pH 7,4, ensuite il diminue lorsque le pH augmente (Figure 53). Les Np-PEG2000-COOH, Np-PEG2000-OCH₃, et Np-PEG250-COOH possèdent un potentiel zêta similaire en milieu acide (entre + 2 et + 8 mV), ensuite il diminue lorsque le pH augmente (Figure 53). Les potentiels zêta mesurés pour chaque type de fonctionnalisation suivent une évolution cohérente avec les fonctions terminales insérées : les nanoparticules ont donc bien été fonctionnalisées par les différents PEG. Lors de l'injection (pH 7,4), les Np-PEG2000-OCH₃ sont très faiblement négatives, les Np-PEG-COOH (250 ou 2000 g/mol) ont une charge nulle ou légèrement positive et les Np-PEG2000-NH₂ sont positives.

La caractérisation biologique de l'effet de la fonctionnalisation des nanoparticules a débuté par une étude de leur internalisation cellulaire *in vitro*. Le protocole utilisé est calqué sur celui mis en place pour étudier le pouvoir ciblant des molécules RGD, à savoir une incubation des

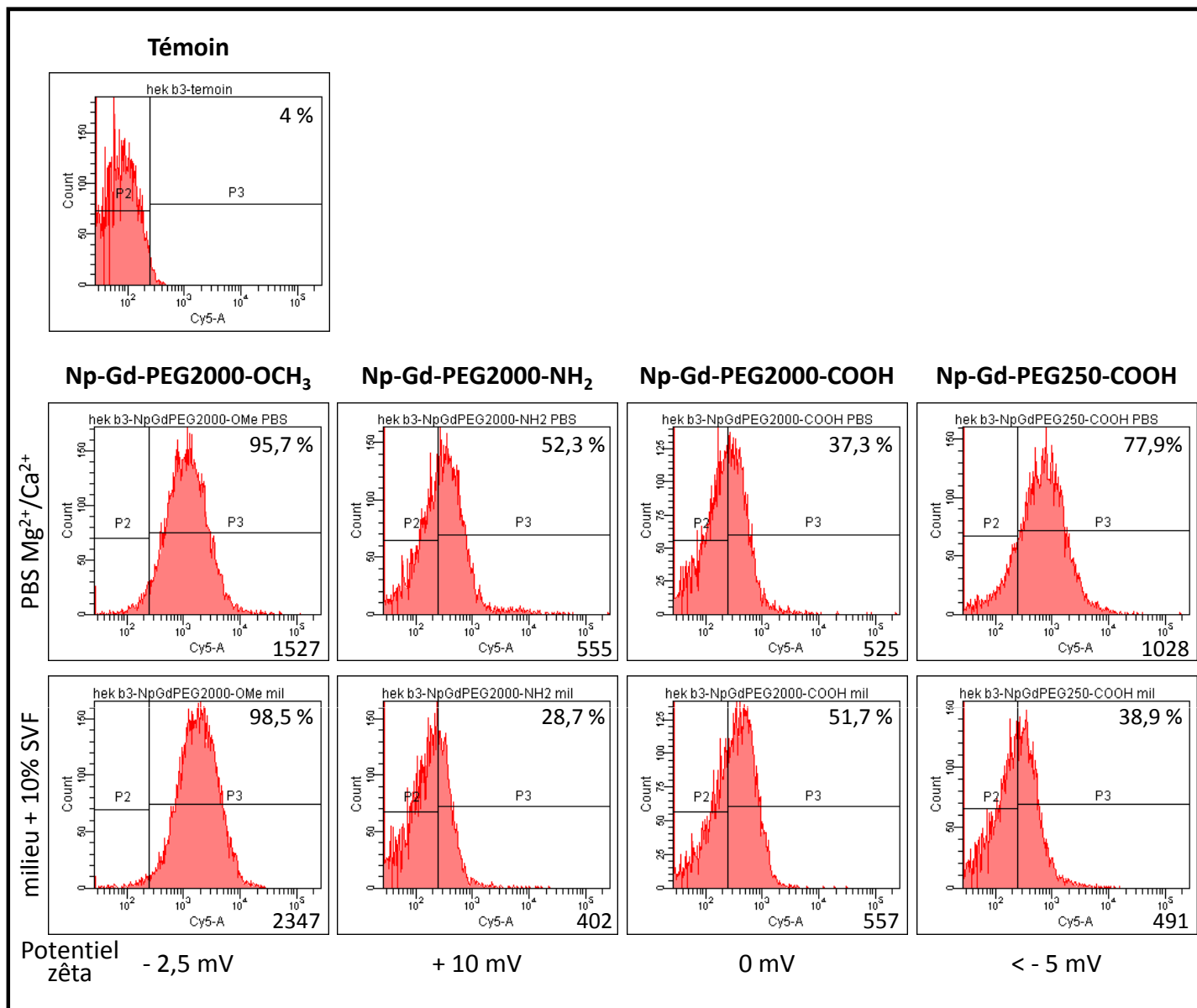


Figure 54. Influence de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'oxyde de Gadolinium sur leur interaction avec les cellules HEK293(β3).

Les nanoparticules sont incubées avec des cellules HEK293(β3) pendant 1h à 37°C en PBS Mg²⁺/Ca²⁺ ou en milieu + 10 % de SVF. L'internalisation dans les cellules est analysée par cytométrie en flux.

La zone P2 correspond à l'auto-fluorescence des cellules et la zone P3 correspond aux cellules ayant interagit avec les nanoparticules et donc présentant un marquage positif.

(La valeur en haut à droite des graphiques correspond au pourcentage de cellules présent dans la zone P3. La valeur en bas à droite est la valeur de MFI de la zone P3).

Les valeurs de potentiel zêta sont données pour un pH 7,4

particules avec les cellules HEK293(β 3) pendant 1h à 37°C. Deux milieux d'incubation ont été testés, du PBS avec Mg^{2+} et Ca^{2+} 1 mM ou du milieu de culture supplémenté avec 10 % de SVF (afin de mimer des conditions d'administration par voie intra-veineuse). En présence de SVF, la surface est susceptible d'être masquée par l'adsorption de protéines. Les propriétés d'interaction avec la surface membranaire peuvent alors être affectées et l'internalisation être modifiée.

Pour les PEG de même taille (2000 g/mol), il existe de fortes différences entre les différents groupements réactifs. Les Np-PEG2000-COOH et Np-PEG2000-NH₂ ne marquent qu'une faible partie de la population cellulaire (entre 30 et 50 % des cellules), alors qu'en présence des Np-PEG2000-OCH₃, la quasi-totalité des cellules sont marquées (Figure 54). Ainsi, les particules neutres ou chargées positivement ne semblent pas interagir avec la membrane cellulaire. A l'opposé, il y a interaction des particules chargées négativement (Np-PEG2000-OCH₃), comme le confirme le marquage des cellules en présence de Np-PEG250-COOH, elles aussi chargées négativement.

Les Np-PEG250-COOH sont également les seules particules à être affectées par la présence de protéines lors de l'incubation en présence de SVF. Le marquage observé dans ces conditions est beaucoup plus faible (Moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) de la cyanine 5 passant de 910 en PBS à 258 en milieu+SVF). Les protéines ne se sont vraisemblablement adsorbées que sur les nanoparticules recouvertes de PEG de petite taille. Des PEG de taille plus importante jouent mieux leur rôle répulsif comme suggéré dans la littérature. La taille du PEG greffé ainsi que la fonction terminale influencent donc l'interaction des nanoparticules avec les cellules. Ces nanoparticules ont ensuite été évaluées *in vivo*.

Comme nous l'avons vu précédemment, *in vivo* la fonctionnalisation par un PEG-COOH de petite taille (250 g/mol) favorise l'élimination des particules par voie urinaire après accumulation dans les reins, avec une élimination totale du signal dans le plasma 24 h après injection (Figures 3 et 7 de l'article). Lorsque la taille de la chaîne PEG-COOH est augmentée (2000 g/mol), les particules sont également éliminées par voie urinaire, mais de manière beaucoup plus lente au cours du temps. La distribution des particules dans l'organisme est plus homogène (Figures 4 et 7 de l'article). Le signal dans le plasma diminue au cours du temps, même si le signal dans les organes reste équivalent entre 24h et 72 h. La longueur de la chaîne PEG influence donc fortement la biodistribution des nanoparticules. Pour une même longueur de chaîne, en l'occurrence 2000 g/mol, la fonction terminale semble également jouer

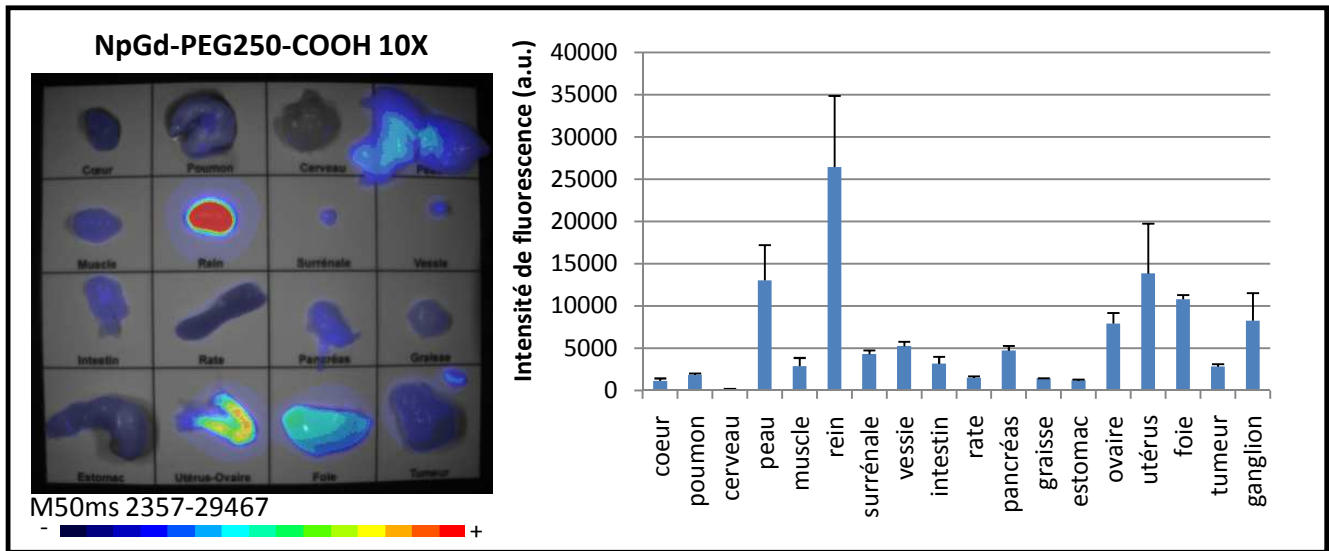


Figure 55. Biodistribution des NpGd-PEG250-COOH 10X 144h après injection IV.
 Les souris, porteuses d'une xénotgreffe sous-cutanée de HEK293(β 3), sont injectées par voie intraveineuse par 200 μ l d'une solution de Np-Gd-PEG250-COOH 10 fois concentrée (0,5 mM).

un rôle important. Les Np-PEG2000-COOH et les Np-PEG2000-OMe (Figures 5 et 7 de l'article) ne montrent pas d'accumulation spécifique dans les organes hormis dans la peau et elles sont éliminées par voie urinaire. Cependant, les Np-PEG2000-OMe semblent être éliminées de manière plus rapide avec une diminution du signal dans les organes et le plasma entre 24h et 72h, alors que le signal reste constant pour les Np-PEG2000-COOH. En revanche, le remplacement des groupements -COOH et -OMe par une fonction -NH₂ induit des changements notables de la biodistribution des nanoparticules. De la même manière que pour les deux particules précédentes, nous observons une accumulation dans les reins, la surrénale, la tumeur et la peau, à laquelle vient s'ajouter une accumulation dans le foie et dans la rate (Figures 6 et 7 de l'article). Ces particules ne sont pas éliminées par voie urinaire, mais plutôt par voie hépato-biliaire, après accumulation dans le foie. Enfin de faibles points fluorescents sont détectés dans les poumons 24 h après injection, ce qui laisse à penser que les PEG2000-NH₂ ne sont pas aussi efficaces que les PEG2000-COOH et -OCH₃ pour permettre une bonne circulation des nanoparticules dans l'organisme (sans fixation sur la majorité des tissus) et pour éviter l'agrégation dans les poumons. En effet, une accumulation pulmonaire similaire a été observée avec les nanoparticules non fonctionnalisées, présentant elles aussi des groupements -NH₂ sur leur surface.

Les Np-PEG250-COOH circulent donc bien plus rapidement que leurs homologues à longues chaînes. La persistance du signal dans le rein associée à une absence de particules encore en circulation dans le sang à 72h laisse à penser qu'une partie des particules passe dans le rein pour être éliminée par la vessie mais qu'une autre partie reste séquestrée dans le rein. Une étude à plus long terme serait nécessaire pour étudier le devenir de ces particules et déterminer si elles passent très lentement dans la vessie ou au contraire restent accumulées dans le rein. Pour une dose injectée dix fois supérieure, les nanoparticules sont toujours majoritairement éliminées *via* les reins (Figure 55).

Une captation hépatique, ainsi qu'une accumulation dans la peau et dans les ganglions lymphatiques apparaissent. Ainsi, les Np-PEG250-COOH qui à faible dose sont particulièrement furtives semblent être plus reconnues par le RES et dirigées vers le foie lorsque la dose est fortement augmentée. La dose injectée est donc également un élément à prendre en compte pour obtenir des paramètres de biodistribution satisfaisants pour les applications envisagées.

En ce qui concerne l'accumulation passive dans les tumeurs par effet EPR, elle est faible mais équivalente pour toutes les particules fonctionnalisées avec un PEG 2000 g/mol. De plus, la longueur de la chaîne influence fortement l'accumulation passive dans la tumeur puisque pour les Np-PEG250-COOH aucun signal n'est détectable dans la tumeur (Figure 8 de l'article).

2.3. Article 3

Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings

Faure A-C.* and **Dufort S***, Josserand V., Perriat P., Coll J-L., Roux S., Tillement O.

Small 2009 Nov ; 5(22) : 2565-75.

*co-premiers auteurs

2.4. Conclusions

Dans cette étude, les particules fonctionnalisées avec différents PEG répondent aux critères de stabilité et sont injectables par voie intra-veineuse. Leur fonctionnalisation a permis de moduler leur biodistribution, avec pour les Np-PEG2000-OCH₃ une accumulation tumorale passive intéressante. Or pour exploiter leur capacité thérapeutique tout en limitant les dommages induits sur les cellules saines, il est indispensable que ces particules ne s'accumulent que dans les zones à traiter, elles devront donc être fonctionnalisées avec une molécule spécifique d'un récepteur surexprimé dans la zone tumorale, par exemple le cRGD.

Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings.

Faure AC* and **Dufort S***, Josserand V, Perriat P, Coll J-L, Roux S, Tillement O.

Small 2009 Nov;5(22):2565-75

Control of the in vivo Biodistribution of Hybrid Nanoparticles with Different Poly(ethylene glycol) Coatings

Anne-Charlotte Faure, Sandrine Dufort, Véronique Josserand, Pascal Perriat, Jean-Luc Coll,* Stéphane Roux,* and Olivier Tillement

Fluorescent nanoparticles containing a gadolinium oxide core are very attractive because they are able to combine both imaging (fluorescence imaging, magnetic resonance imaging) and therapy (X-ray therapy and neutron-capture therapy) techniques. The exploitation of these multifunctional particles for in vivo applications requires accurate control of their biodistribution. The postfunctionalization of these particles by four different poly(ethylene glycol) derivatives, which differ by chain length and end group, exerts a great influence on the ζ potential of the nanoparticles and on their biodistribution after intravenous injection to HEK- β 3-tumor-bearing mice. This study reveals that the behavior of PEGylated nanoparticles, which was monitored by in vivo fluorescence imaging, depends on both the chain length and the end group of the PEG chain.

Keywords:

- biodistribution
- hybrid nanoparticles
- in vivo imaging
- PEGylation

1. Introduction

The intense research activities devoted to nanotechnology have led to the development of a variety of multifunctional nanoparticles.^[1] Based on a physical and chemical point of view, some of these particles appear very well suited for imaging and/or therapy for at least two reasons. The first is their small size, which allows their use for exploring living machinery from the subcellular scale up to the whole living organism.^[2] The

second reason is based on the possibility of gathering a large range of properties that can be accurately tuned by a convenient choice of components,^[3–6] despite the small volume of the nanoparticles. Moreover, the behavior of the particles (e.g., colloidal stability in biological fluids) can be controlled by postfunctionalization of the nanoparticles.^[7–9] The potential of the multifunctional nanoparticles can be fully exploited for in vivo applications only if they do not nonspecifically accumulate, and if they are rather quickly eliminated by natural means.

Frangioni et al. emphasized the necessity of rapid clearance and clearly pointed out the problems related to the accumulation of the nanoparticles in a living body, since their presence can interfere with contrast agents used for monitoring the effects of a therapy and induce unexpected long-term injury.^[10] The principal conclusions of their study focused on the biodistribution and clearance of quantum dots distinguished by their size, and the organic coating indicated the criteria required for the clinical use of nanoparticles. They demonstrated that a rapid clearance of quantum dots (QDs) is observed only when the hydrodynamic diameter (HD) is smaller than 5.5 nm. However, nonspecific accumulation of cysteine-coated QDs was observed in the liver even for the smallest particles, while the largest ones (HD = 8.65 nm) are mostly present in the liver, spleen, and lungs. Nonspecific accumulation in the liver and the spleen is

[*] Dr. S. Roux, Dr. A.-C. Faure,[†] Prof. O. Tillement
Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents
CNRS UMR 5620, Université Claude Bernard Lyon 1
69622 Villeurbanne Cedex (France)
E-mail: roux@pcml.univ-lyon1.fr

Dr. J.-L. Coll, S. Dufort,[†] Dr. V. Josserand
CRI-INSERM U823, Institut Albert Bonniot, BP 170
38042 Grenoble Cedex 9 (France)
E-mail: jean-luc.coll@ujf-grenoble.fr

Prof. P. Perriat
Matériaux, Ingénierie et Sciences
CNRS UMR 5510, INSA de Lyon
69621 Villeurbanne Cedex (France)

[†] These authors contributed equally to the work.

DOI: 10.1002/sml.200900563

generally ascribed to uptake by the reticuloendothelial system (RES), like macrophage cells,^[11] whereas the presence of particles in the lungs results from their agglomeration caused by the adsorption of plasma proteins.^[12] The functionalization of nanoparticles by a PEG shell is probably the most efficient way to avoid nonspecific accumulation, which can be detrimental for the *in vivo* application of nanoparticles. Many studies, which were focused on liposomes or polymeric particles, have indeed demonstrated the positive effect of PEG on the biodistribution of such particles.^[13] Derivatization by PEG chains limits the uptake by resident phagocytes in the liver (Kupfer cells) and in the spleen (macrophages and B cells).^[14] Because of steric shielding, the PEG chains impede the adsorption of plasma proteins onto the surface of the nanoparticles (opsonisation), which can occur when particles are injected into the bloodstream. However, the effect of PEG chains on the biodistribution can be counterbalanced by the charge of the particle since negatively and positively charged liposomes showed increased uptake by the RES.^[15] However, the extensive studies performed on the biodistribution of liposomes were restricted to relatively large (>100 nm) and flexible particles. In the case of smaller and stiffer particles, knowledge about their biodistribution is still incomplete. Although PEGylation seems to induce prolonged blood circulation, in some cases, it does not prevent the liver uptake of nanoparticles, as shown by previous studies.^[16,17] However, Sun et al. demonstrated by *in vitro* experiments that the PEGylation of iron oxide nanoparticles drastically reduces nonspecific uptake by macrophage cells, as compared to that when the same particles are coated by a dextran shell instead.^[18] Despite the previous data given by this study, *in vivo* studies are, however, required for a reliable evaluation of the biodistribution of PEGylated nanoparticles. We recently developed PEGylated hybrid gadolinium oxide nanoparticles that are able to combine *in vivo* imaging (fluorescence imaging and magnetic resonance imaging (MRI)) and therapy (dose enhancement of X-rays used for radiotherapy, and generation of a cytotoxic effect after interaction with a harmless thermal neutron beam).^[7,19–21] Even if these particles appear to be intrinsically very attractive for medical applications, their use will be partly governed by their biodistribution. By taking into account the results of Frangioni et al.,^[10] Sun et al.,^[18] and Ballou et al.,^[8] we investigated the influence of the length and the nature of the chain end of four different PEG chains (PEG250–COOH, PEG2000–COOH, PEG2000–NH₂, PEG2000–OCH₃; see Table 1) on the biodistribution of hybrid gadolinium oxide nanoparticles. The biodistribution of these fluorescent nanoparticles was monitored by a fluorescence imaging technique, which is largely more sensitive than MRI and easy to

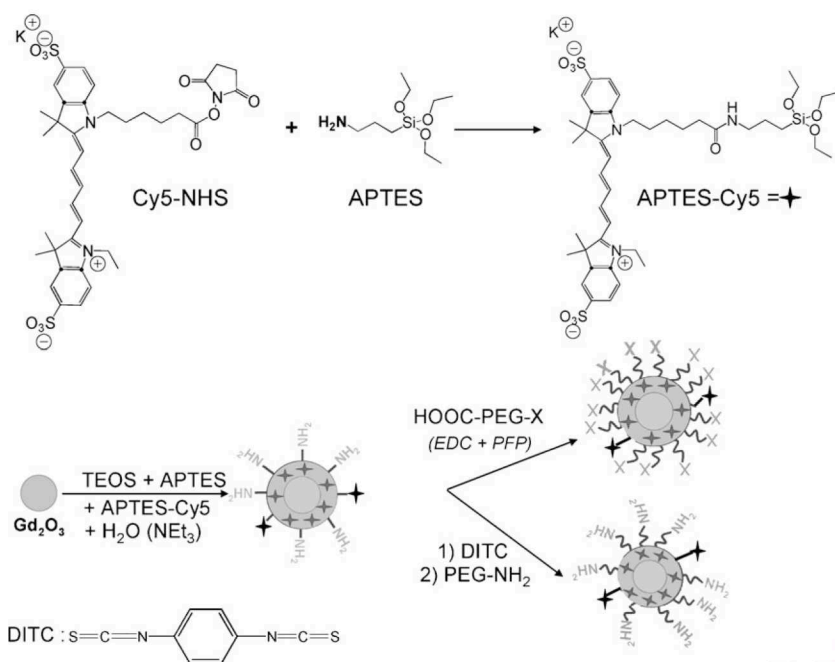
apply.^[22,23] The main limitation of fluorescence imaging (i.e., the strong absorption of visible light) can be overcome by the use of a fluorophore that can be excited in the 600–900-nm range since biological tissues are relatively transparent in this spectral region.^[24,25]

2. Results and Discussion

Gadolinium oxide nanoparticles embedded in a fluorescent polysiloxane shell constitute a very attractive tunable platform combining several *in vivo* imaging techniques and therapies. Owing to the paramagnetic character of Gd³⁺ ions, the high-neutron-capture cross section of two gadolinium isotopes (¹⁵⁵Gd and ¹⁵⁷Gd), and the relatively high atomic number of this element, a gadolinium oxide core gives the particle the ability to enhance the positive contrast of MRI and the dose effect of X-ray radiotherapy, and renders a harmless thermal neutron beam cytotoxic.^[7,20,21] However, these attractive features can be exploited only if colloidal stability in biological fluids is ensured. These cores are encapsulated in a polysiloxane shell, which can be designed sequentially in order to render the resulting particles fluorescent and highly hydrophilic (Scheme 1).^[7,19] In order to entrap dyes within the polysiloxane shell and graft hydrophilic groups onto the surface, the polysiloxane shell was obtained by hydrolysis/condensation of a mixture of tetraethyl orthosilicate (TEOS), aminopropyltriethoxysilane (APTES), and Cyanine-5-conjugated APTES (Cy5–APTES) (40%, 59.2%, and 0.8%, respectively). Due to the large proportion of unmodified amino groups of APTES (59.2% versus 0.8% for Cy5–APTES), –NH₂ groups are likely to be accessible on the surface. The presence of unmodified amino groups at the surface was confirmed by zeta-potential measurements and the behavior of these particles in water at various pHs. As revealed by the value of the zeta potential at pH 4.4 ($\zeta = +25$ mV), the surface charge of the particle is positive for pH < 5. This positive charge ensures colloidal stability in water due to the resulting electrostatic repulsion between the particles. However, an initial flocculation followed by precipitation of the particles is observed after 24 h when the pH is around pH = 7. This is not acceptable for *in vivo* applications as the pH of biological fluid is 7.4. The precipitation indicates the loss of the positive charge of the particles when the pH increases. This pH-dependent behavior reflects the presence of amino groups, whose protonation at low pH confers a positive charge to the particles. The postfunctionalization (i.e., the chemical modification of the surface of the particle after the hydrolysis/condensation step) therefore depends on the presence of these unmodified amino groups. Previous studies have demonstrated that amino groups are accessible on the surface of the polysiloxane shell since biotin, streptavidin, or an oligonucleotide can be grafted onto the resulting particles. This reaction can be direct between N-hydroxysuccinimide (NHS) moieties of the molecules and surface amino groups,^[19] or may use a cross linker (p-phenylene diisothiocyanate (DITC)), which allows the grafting of aminated molecules onto aminated surfaces.^[26] Besides preventing nonspecific accumulation of particles in living bodies, derivatization of the particle surface by hydrophilic PEG chains

Table 1. Characteristics of the four PEG derivatives used for the functionalization of gadolinium-oxide-fluorescent-polysiloxane core-shell nanoparticles.

PEG	Anchoring group	End group	M_w [g mol ⁻¹]
PEG250–COOH	COOH	COOH	250
PEG2000–COOH	COOH	COOH	2000
PEG2000–NH ₂	NH ₂	NH ₂	2000
PEG2000–OCH ₃	COOH	OCH ₃	2000



Scheme 1. Synthesis of PEGylated hybrid Gd_2O_3 nanoparticles.

should improve the colloidal stability in biological fluids. In order to evaluate the influence of the chain length and end group, four different PEG molecules (PEG250-COOH, PEG2000-COOH, PEG2000-NH₂, PEG2000-OCH₃) were studied (Table 1). All these PEG chains carry a reactive group at one end (a carboxylic acid group for PEG250-COOH, PEG2000-COOH, and PEG2000-OCH₃, and an amine function for PEG2000-NH₂) for grafting onto the aminated surface of the particles, and a carboxylic group at the other extremity (PEG250-COOH, PEG2000-COOH), an amine group (PEG2000-NH₂), and a methoxy group (PEG2000-OCH₃), whose influence on the colloidal stability and biodistribution was investigated. Three of the PEGs (PEG2000-COOH, PEG2000-NH₂, PEG2000-OCH₃) have the same molecular weight ($M_w = 2000 \text{ g mol}^{-1}$), and we can assume that they have similar chain lengths but differ by their terminal group. PEG250-COOH and PEG2000-COOH differ only in length. PEGs with a COOH moiety as the grafting group were covalently tethered to the surface of the particles through a reaction with amine promoted by 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and pentafluorophenol (PFP) in order to yield the amide linkage (see Experimental Section and Scheme 1). The grafting of PEG2000-NH₂ to the aminated particles was performed thanks to the use of DITC (Scheme 1). DITC is a rigid cross linker containing two reactive isothiocyanate groups, which are well known for their ability to yield a thiourea linkage after reacting with the amine function.

The encapsulation of the gadolinium oxide cores into a fluorescent, hydrophilic shell was reflected by an increase of the HDs of the particles. Photo correlation spectroscopy (PCS) measurements indicate that the HD of the particles is 11–14 nm, except for nanoparticles coated by PEG2000-COOH (8 nm), whereas the Gd_2O_3 cores have a HD of 3.8 nm (Figure 1). The

conjugation of the fluorophore Cy5-NHS to APTES through the formation of an amide linkage before the hydrolysis/condensation allows distribution of the dyes in the whole thickness of the shell (Scheme 1). The coupling reaction between the organic fluorophores and APTES was certified by mass spectrometry, with complete disappearance of the molecular peak of Cy5-NHS ($m/z = 792.0$) and the appearance of the molecular peak of the fluorophores-conjugated APTES (Cy5-APTES, $m/z = 858.3$). As a result, the gadolinium oxide cores were coated by a fluorescent polysiloxane shell with excitation/emission wavelengths adapted to in vivo imaging. The incorporation of the fluorophores (Cy5-NHS) inside the polysiloxane shell is confirmed by the absorption and emission spectra of the colloids (Figure 1). The spectra of colloids display a similar shape to that of Cy5 in solution. In the case of nanoparticles functionalized by PEG250-COOH, PEG2000-COOH, and PEG2000-OCH₃, the position of the absorption and

emission maxima are slightly shifted towards higher wavelengths (Table 2), whereas the shift is more pronounced in the case of nanoparticles coated by PEG2000-NH₂. These shifts arise from changes in the environment of fluorophores and can be attributed to the incorporation of the organic dyes in the polysiloxane shell. This strategy increases the photostability of the fluorophores and makes a large proportion of the surface available for further derivatization by hydrophilic groups since only a small portion of APTES was modified. The reaction of hybrid particles with the various PEGs significantly affects their colloidal stability in water. Whatever the PEG molecule, improved stability is observed in a larger pH range, including the pH of biological fluids (7.4), although zeta-potential measurements revealed that the influence of each PEG on the surface charge is different (Figure 2). Even if the methoxy group is neutral whatever the pH, the particles exhibit a weak positive charge until $pH \approx 5$, which decreases to a relatively strong negative value when the pH is elevated (Figure 2a). The point of zero charge (PZC) is located between pH 5 and 6. The evolution of the charge with the pH reflects actually the behavior of ionisable groups like silanol and amine groups present in the polysiloxane shell. Since $pK_a(\text{SiOH}/\text{SiO}^-) \approx 3$ and $pK_a(\text{NH}_3^+/\text{NH}_2) \approx 8$, the positive charge is attributed to the presence of ammonium groups. From this data, we can deduce that some amine groups remain unchanged after the grafting of PEG-OCH₃, but a large part of amine groups acted as anchorage sites since the value of the ζ -potential is weaker than that of uncoated nanoparticles (3.3 mV at pH 3.2 versus 25 mV at pH 4.4). The increase of the pH induces the deprotonation of nonionic silanol into negatively charged silanolate first, and of positively charged ammonium into nonionic amine. As a result, for $pH > 6$, hybrid particles coated by neutral PEG2000-OCH₃ exhibit a negative charge. It must be pointed out that the colloid remains stable when the pH

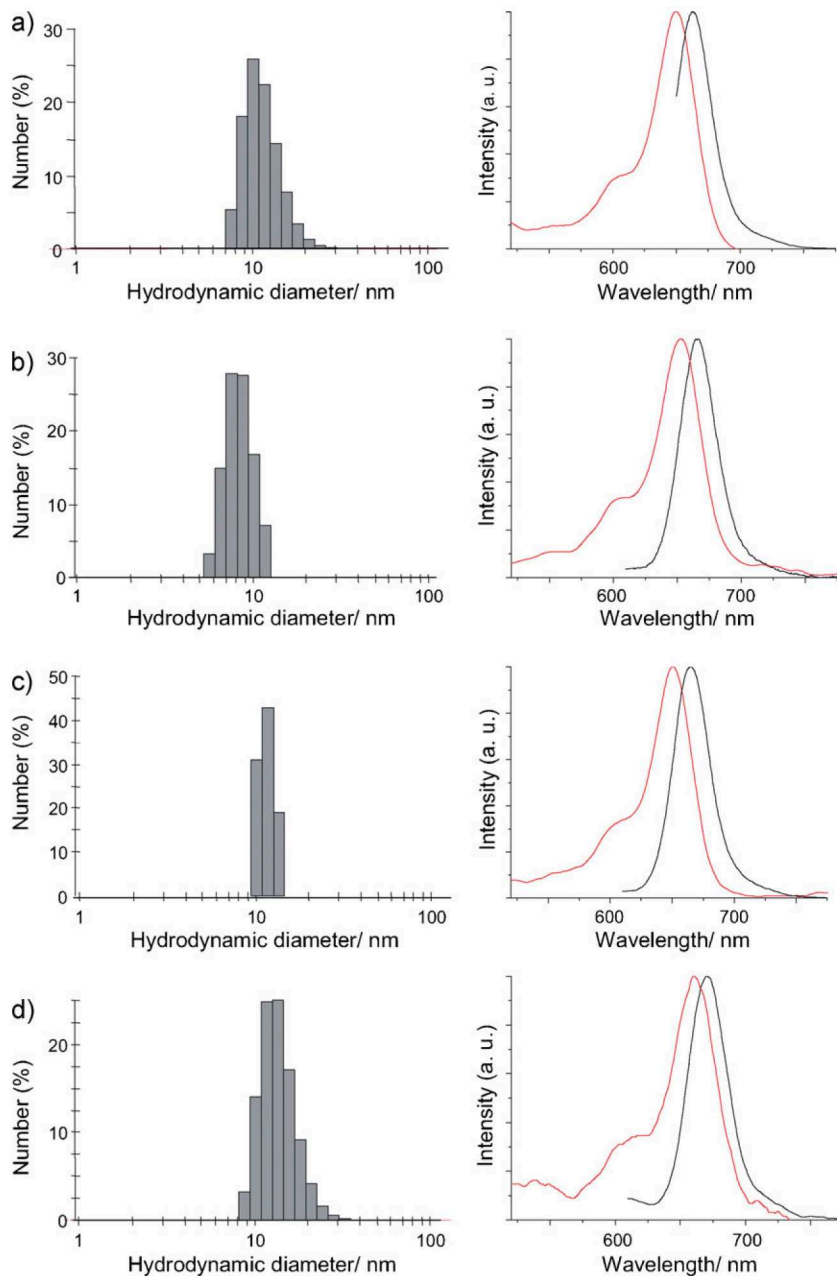


Figure 1. Size distribution determined by photon correlation spectroscopy (left column) and by absorption and emission spectra (right column, red and black curves, respectively) of hybrid nanoparticles coated by a) PEG250-COOH, b) PEG2000-COOH, c) PEG2000-OCH₃, and d) PEG2000-NH₂.

Table 2. Wavelengths of maximum absorption (λ_{abs}) and emission (λ_{em}) of Cyanine 5 in solution (Cy5-NHS) and entrapped in the polysiloxane shell of nanoparticles coated by various PEG chains.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]
Cy5-NHS	646	663
PEG250-COOH	650	662
PEG2000-COOH	653	666
PEG2000-OCH ₃	651	665
PEG2000-NH ₂	661	670

is between 3 and 8 despite the low values of the zeta potential (-5 mV ; $+5\text{ mV}$). In this pH range (including the pH of biological fluids), the colloidal stability is unlikely to arise from electrostatic repulsion, but should be attributed to steric hindrance and the hydrophilic character of the PEG chains. This was corroborated by the fact that the derivatization of the hybrid nanoparticles by PEG750-OCH₃ chains, which are shorter and consequently less bulky and hydrophilic than PEG2000-OCH₃ chains, induces an irreversible precipitation. As expected, the particles carry a positive charge in a large pH range (until pH 9) when they are coated by PEG2000-NH₂ because amine groups are protonated into ammonium groups in this pH range (Figure 2b). Moreover, the amount of ammonium is sufficiently high to compensate the negative charge of the silanolate groups. However, the ζ potential of PEG2000-NH₂-coated particles is weaker than that of uncoated nanoparticles, whereas it was expected that the values would be similar since the amount of amine groups should be identical. Indeed, each amine group on the surface of the nanoparticles engaged in the linkage with PEG via DITC is replaced by the free amine group of PEG. This difference can probably be explained by the bridging of PEG2000-NH₂ with amine of the same particle and/or by the shielding effect of PEG chains, which has been reported previously.^[15] In contrast to uncoated particles whose surface is covered by NH₂ groups (due to the use of APTES for the elaboration of the polysiloxane shell), PEG2000-NH₂-coated nanoparticles are very well dispersed in aqueous solution in a large pH range, although their positive charge is weaker. This confirms the role of the PEG chain in the colloidal stability, as seen in the case of nanoparticles coated with PEG-OCH₃.

The grafting of PEG250-COOH and PEG2000-COOH onto the hybrid particles renders them water soluble in a large pH range, including the pH of biological fluid,

whereas the colloidal stability of uncoated nanoparticles is not sufficient. This behavior is attributed to the negative charge of carboxylate groups, which results from the deprotonation of COOH ($\text{pKa}(\text{COOH}/\text{COO}^-) \approx 5$) as well as the negative charge of silanolate, and to the steric hindrance and hydrophilic character of the PEG chains. However, the relative contribution of the end group and of the PEG chain to the colloidal stability seems different for both carboxylated PEGs. In both cases, which are similar to that of particles coated by PEG-OCH₃, the particles exhibit a

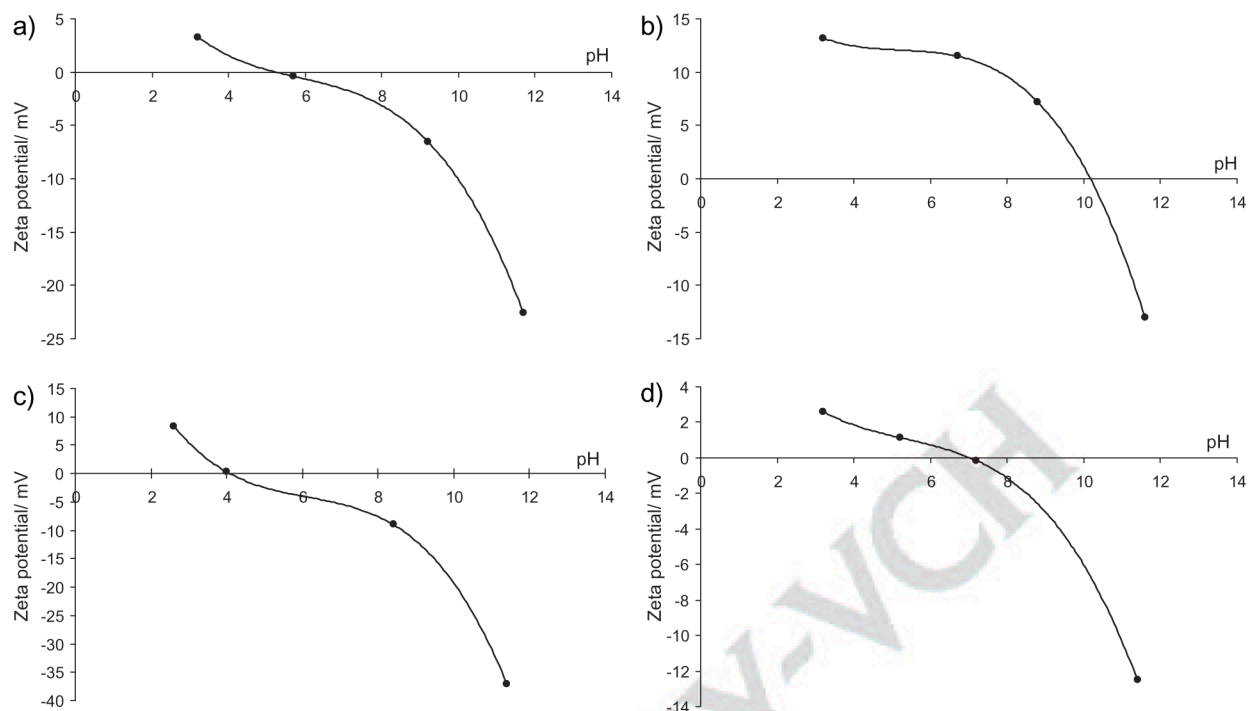


Figure 2. Evolution of the ζ potential versus pH for hybrid gadolinium oxide nanoparticles coated by a) PEG2000–OCH₃, b) PEG2000–NH₂, c) PEG250–COOH, and d) PEG2000–COOH.

1 positive charge at low pH owing to the presence of ammonium.
 2 However, inversion of the charge, which results from the
 3 deprotonation of silanol and of carboxylic acid groups
 4 accentuated by the deprotonation of ammonium groups at
 5 higher pH values, occurs at lower pH for particles coated by
 6 PEG250–COOH (pH 4 versus pH 7). The particles coated by
 7 the shorter carboxylated PEG chains (PEG250–COOH)
 8 consequently exhibit a strong negative charge at pH 7.4
 9 (Figure 2c), whereas the charge of the surface of the particles
 10 coated by PEG2000–COOH is only slightly negative
 11 (Figure 2d). This difference probably stems from the folding
 12 of the long PEG2000–COOH chains. This folding allows the
 13 interaction of negatively charged carboxylate ends with
 14 ammonium groups and leads, therefore, to the neutralization
 15 of the negative charge of carboxylate groups until ammonium is
 16 deprotonated when pH increases. Such folding was not
 17 observed with PEG250–COOH because the PEG chain is too
 18 short. The folding of PEG2000–COOH limits the influence of
 19 electrostatic repulsion between negative charges on the
 20 colloidal stability, which is largely due to the steric hindrance
 21 and hydrophilic character of PEG chains, whereas colloidal
 22 stability of particles coated by PEG250–COOH is mainly
 23 ensured by the electrostatic repulsion. According to the
 24 ζ -potential measurements, nanoparticles coated by PEG250–
 25 COOH are negatively charged, whereas the derivatization by
 26 PEG2000–NH₂ confers a positive charge on the nanoparticles
 27 at pH 7.4. After functionalization by PEG2000–COOH and
 28 PEG2000–OCH₃, the nanoparticles exhibit such a weakly
 29 negative ζ -potential value at pH 7.4 that the particles are
 30 considered neutral. Visual examination, PCS, and ζ -potential
 31 measurements show that the derivatization of the particles by
 32 various PEG chains confers a high colloidal stability in aqueous

solutions on them. The preparation of an injectable solution can
 be envisaged with each set of particles.

Figure 3 depicts the biodistribution of nanoparticles coated
 by PEG250–COOH at various durations after the intravenous
 injection to NMRI nude mice bearing a HEK- β 3 tumor on the
 right side. It appears that only the kidneys and the bladder,
 which are involved in renal excretion, are fluorescent 15 min
 after the injection. Moreover, the light emitted from the
 bladder vanishes 1 h after the intravenous injection. The
 absence of fluorescence from the tumor indicates that the
 amount of nanoparticles in this zone is not sufficient to be
 detected, whereas HEK- β 3 tumors are surrounded by a denser
 vascularization than healthy tissues. This can be explained not
 only by the rapid elimination of the particles from the body
 reflected by the biodistribution (Figure 3a and b), but also by the
 imaging of plasma (Figure 3c) that does not present
 fluorescence 24 h after the intravenous injection. The amount
 of particles in the blood decreases dramatically because they
 are very quickly accumulated in the kidneys and are then
 eliminated by urine (Figure 3a and b). Ex vivo examination of
 the organs 24 h after the intravenous injection of the
 nanoparticles unambiguously confirms that the nanoparticles
 freely circulate and do not accumulate in organs other than the
 kidneys, which are strongly fluorescent (Figure 3d). Although
 they have the same terminal group (carboxylic acid), the
 biodistributions of particles coated by PEG250–COOH and by
 PEG2000–COOH display some differences (Figure 4). These
 differences can be attributed to the longer PEG chain, which
 generates a higher steric hindrance. Moreover, zeta-potential
 measurements demonstrated that nanoparticles coated by
 PEG250–COOH exhibited a negative charge at pH 7.4,
 whereas nanoparticles coated by PEG2000–COOH were

1 neutral. As in the case of PEG250–COOH, the bladder is
 2 strongly fluorescent. Consequently, particles coated by
 3 PEG2000–COOH are also eliminated by urine, but the
 4 elimination occurs for a longer time since the bladder
 5 remains fluorescent for at least 1 h instead of 15 min, as in the case of
 6 PEG250–COOH. Moreover, for most of the mice, the bladder
 7 again became strongly fluorescent after 4–5 h. This indicates

1 that PEG2000–COOH-coated nanoparticles circulate for a
 2 longer time. This assertion is confirmed by the data of Figure 4c,
 3 which shows that the blood is still fluorescent 24 h after the
 4 injection. Despite the excretion of the particles by urine, the
 5 kidneys are not visible because their low fluorescence due to a
 6 more gradual elimination is masked by the moderate
 7 fluorescence observed on the whole body of the mouse.

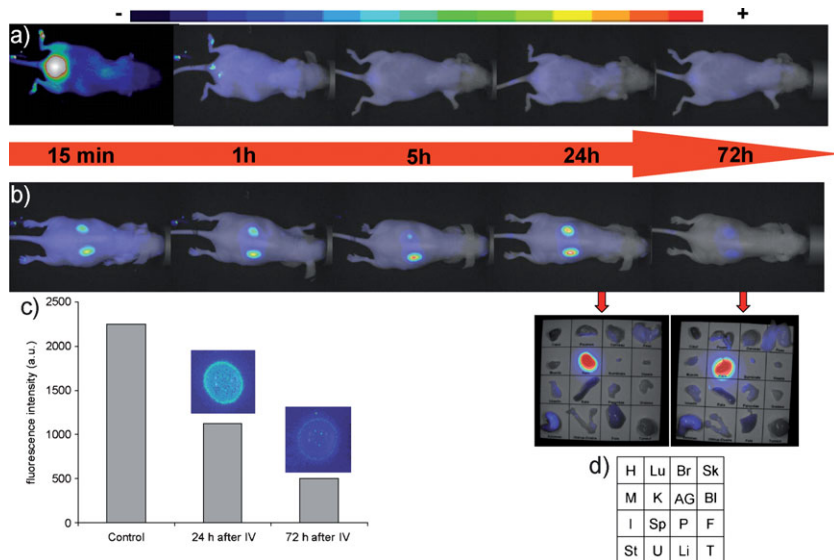


Figure 3. Fluorescence reflectance imaging of a nude mouse (a) on its back and (b) on its belly after intravenous injection in the caudal vein of hybrid gadolinium oxide nanoparticles coated by PEG250–COOH. (c) Fluorescence intensity of the plasma of a control mouse (no particle injection) and of mice 24 and 72 h after the intravenous injection (inset: fluorescence imaging of the plasma). (d) Fluorescence reflectance imaging of some organs after dissection of a nude mouse 24 and 72 h after the intravenous injection.^[27] Each image was acquired with an exposure time of 200 ms.

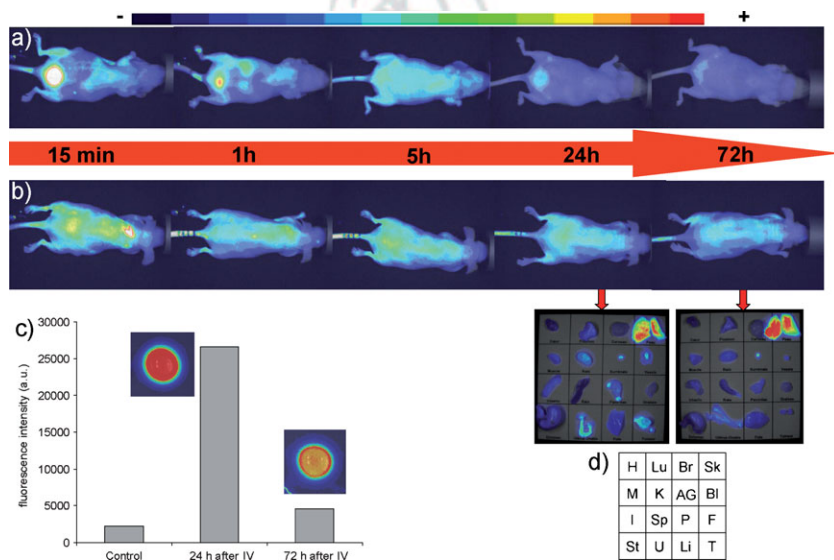


Figure 4. Fluorescence reflectance imaging of a nude mouse (a) on its back and (b) on its belly after intravenous injection in the caudal vein of hybrid gadolinium oxide nanoparticles coated by PEG2000–COOH. (c) Fluorescence intensity of the plasma of a control mouse (no particle injection) and of mice 24 and 72 h after the intravenous injection (inset: fluorescence imaging of the plasma). (d) Fluorescence reflectance imaging of some organs after dissection of a nude mouse 24 and 72 h after the intravenous injection.^[27] Each image was acquired with an exposure time of 200 ms.

8 Figure 4a and b gives the impression that the
 9 distribution of the particles in the body is
 10 more homogeneous, but this is invalidated
 11 by the visualization of the organs after
 12 the sacrifice of the mice 24 and 72 h after
 13 the injection (Figure 4d). After 24 h, the
 14 kidneys, bladder, adrenal gland, ovaries,
 15 uterus, and tumor are moderately fluores-
 16 cent, while the skin is strongly fluores-
 17 cent. As fluorescence intensity decreases in
 18 blood, it was expected that a similar
 19 decrease would be observed in the afore-
 20 mentioned organs (Figure 4d). Except for
 21 the kidneys and bladder, the adrenal gland,
 22 ovaries, uterus, tumor, and skin remain at
 23 the same level of fluorescence 72 h after the
 24 injection. However, it must be pointed out
 25 that, as expected, the functionalization of
 26 the particles by PEG2000–COOH pre-
 27 vented accumulation in the liver, spleen,
 28 and lungs since the latter were almost not
 29 fluorescent. As previously observed for
 30 liposomes, the behavior of these nanopar-
 31 ticles confirms the absence of uptake by the
 32 RES and of agglomeration for neutral
 33 PEGylated particles.

34 The replacement of PEG2000–COOH
 35 by PEG2000–OCH₃ leads to only minor
 36 changes (Figure 5), whereas the functiona-
 37 lization of the particles by PEG2000–NH₂
 38 induces striking differences in the biodis-
 39 tribution (Figure 6). Figure 5a shows that
 40 the fluorescence of the bladder after the IV
 41 injection of PEG2000–OCH₃-coated nano-
 42 particles varies periodically during the first
 43 5 h. The bladder is strongly fluorescent
 44 15 min, 1 h, and 5 h after the injection,
 45 whereas the fluorescence is less intense 2
 46 and 3 h after the injection (Figure 5a). This
 47 variation of fluorescence reflects the gradual
 48 elimination of the particles by urine. How-
 49 ever, the elimination from the body takes a
 50 longer time than in the case of nanoparticles
 51 functionalized by short PEG250–COOH
 52 chains. The fluorescence of the plasma
 53 remains important 24 h after the injection
 54 of PEG2000–OCH₃-coated particles, as
 55 compared to the blood of a control mouse
 56 (Figure 5c). The elimination of the particles
 57 is confirmed by the low intensity of the
 58 fluorescence of the plasma and of most
 59 of the organs 72 h after the injection.

1 Between 24 and 72 h, the fluorescence of the plasma and of the
2 organs decreases (Figure 5c and d). If the fluorescence is
3 observed in the same organs as in the case of nanoparticles
4 functionalized by PEG2000-COOH, it can be noticed that skin
5 is less fluorescent, but that the ovaries and uterus are strongly
6 fluorescent (Figure 5d). Figure 5d shows that the liver, spleen,
7 and lungs are not fluorescent. In other words, the covalent

grafting of PEG2000-OCH₃ prevents the nanoparticles from
uptake by the RES and from agglomeration. It must be pointed
out that the coating of the hybrid nanoparticles by this
hydrophilic polymer is very efficient because no accumulation
and no agglomeration are observed, whereas these nanopar-
ticles circulate for a longer time than PEG250-COOH-coated
nanoparticles do. PEG2000-NH₂ confers a behavior on the
hybrid particles that is obviously different

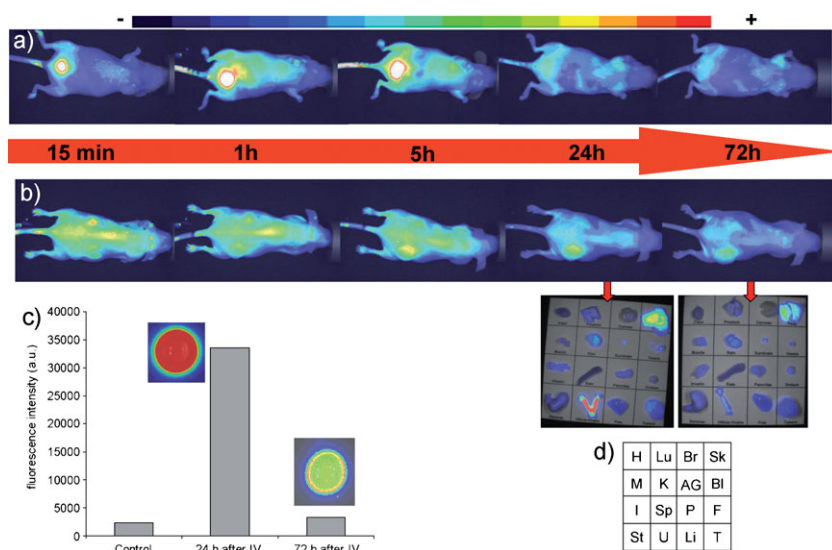


Figure 5. Fluorescence reflectance imaging of a nude mouse lain a) on its back and b) on its belly after intravenous injection in the caudal vein of hybrid gadolinium oxide nanoparticles coated by PEG2000-OCH₃. c) Fluorescence intensity of the plasma of a control mouse (no particle injection) and of mice 24 and 72 h after the intravenous injection (inset: fluorescence imaging of the plasma). d) Fluorescence reflectance imaging of some organs after dissection of a nude mouse 24 and 72 h after the intravenous injection.^[27] Each image was acquired with an exposure time of 200 ms.

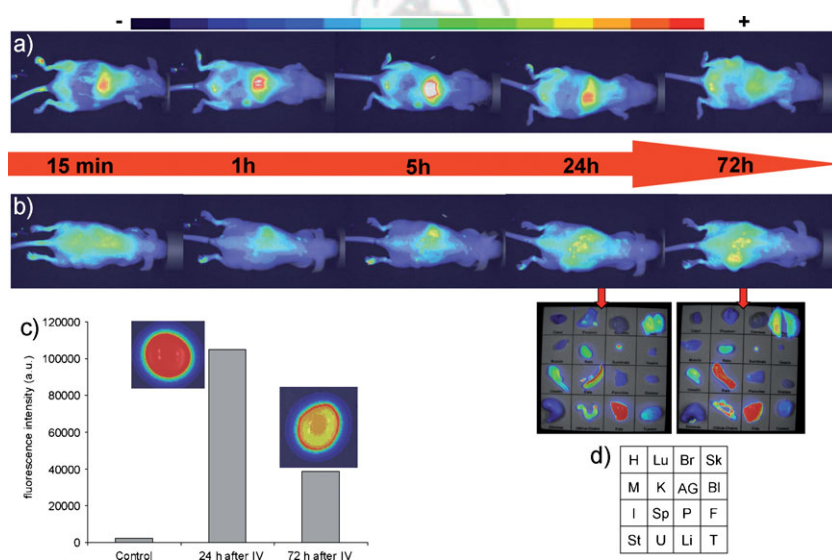


Figure 6. Fluorescence reflectance imaging of a nude mouse lain a) on back and b) on belly after the intravenous injection in caudal vein of hybrid gadolinium oxide nanoparticles coated by PEG2000-NH₂. c) Fluorescence intensity of the plasma of a control mouse (no particle injection) and of mice 24 and 72 h after the intravenous injection (inset: fluorescence imaging of the plasma). d) Fluorescence reflectance imaging of some organs after dissection of a nude mouse 24 and 72 h after the intravenous injection.^[27] Each image was acquired with an exposure time of 200 ms.

Besides the accumulation in the kidneys, adrenal gland, ovaries, uterus, tumor, and skin, which was also observed when particles were functionalized by PEG2000-COOH and PEG2000-OCH₃, a huge accumulation is also observed in the liver and the spleen, as revealed by the strong fluorescence from these organs (Figure 6a and d). Moreover, the elimination of the particles was not performed by urine since no fluorescence was detected during the first 5 h in the bladder (Figure 6a). This was confirmed by visualization of the organs 24 and 72 h after the injection (Figure 6d). However, the fluorescence of the intestines indicates that particles accumulated in the liver are excreted through feces. This elimination mode is largely slower than the elimination by urine. For this reason, fluorescence from the liver remains very strong (Figure 6d), even if its intensity from the zone containing the liver starts to decrease 24 h after the injection (Figure 6a). In contrast to PEG250-COOH, PEG2000-COOH, and PEG2000-OCH₃, PEG2000-NH₂ does not prevent the uptake of the particles by organs containing phagocytic cells (liver, spleen). Such a difference in behavior could be attributed to the positive charges of PEG2000-NH₂-coated nanoparticles since the other PEG chains with the same molecular weight do not accumulate in the liver and the spleen. Indeed, the positive charge of ammonium groups should favor the adsorption of negatively charged opsonins, which constitutes the first step of the uptake by phagocytic cells. If functionalization by PEG2000-NH₂ does not prevent accumulation in the liver and the spleen, it succeeds, however, in preventing agglomeration in the lungs since the fluorescence of these organs is very weak 72 h after the injection. However, this organic shell is not as efficient as the other PEG because some fluorescent spots are visible on the lungs 24 h after the injection of PEG2000-NH₂-coated nanoparticles. Despite the large amount of nanoparticles accumulated in the liver and the spleen, the tumor seems more fluorescent when particles are coated by

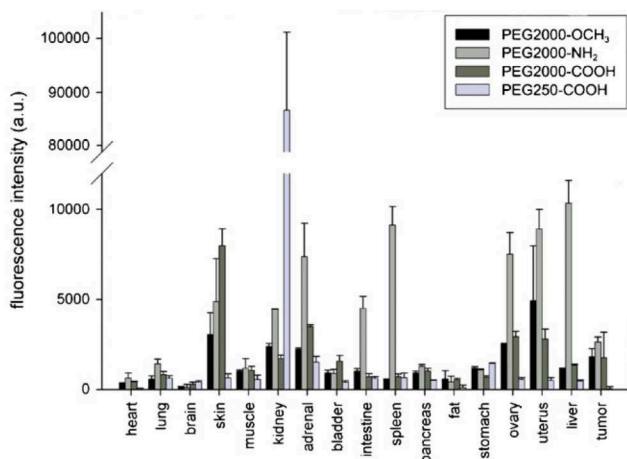


Figure 7. Biodistribution of hybrid gadolinium oxide nanoparticles coated by PEG250-COOH or PEG2000-X (with X = COOH, OCH₃, or NH₂) 72 h after intravenous injection.

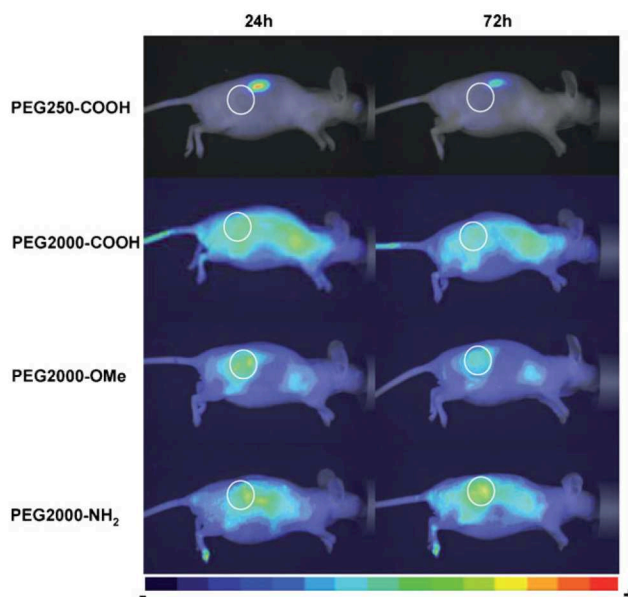


Figure 8. Fluorescence reflectance imaging of a nude mouse lain on its left side 24 and 72 h after the injection of hybrid gadolinium oxide nanoparticles coated by PEG250-COOH or PEG2000-X (with X = COOH, OCH₃, or NH₂). The white circle delimits the tumor zone.

1 PEG2000-NH₂ (Figure 6d). Figure 7 gathers the data on
 2 fluorescence intensity of organs measured ex vivo 72 h after the
 3 intravenous injection of the PEGylated nanoparticles. As
 4 suggested by Figure 3, nanoparticles functionalized by
 5 PEG250-COOH are only present in the kidneys 72 h after
 6 injection. The very high fluorescence intensity, in comparison
 7 with the case of nanoparticles coated by longer PEG chains,
 8 indicates that a large number of particles are present in the
 9 kidneys, whereas the amount in other organs, muscle, fat, and
 10 the HEK-β3 tumor is, in most cases, the lowest. From this data,
 11 we can deduce that PEG250-COOH chains confer on the
 12 nanoparticles the ability to freely circulate without any
 13 undesirable accumulation and ensure that they are removed
 14 rather quickly by urine. The replacement of PEG250-COOH
 15 by longer PEG chains induces a significantly higher accumula-
 16 tion in the skin, adrenal gland, ovaries, uterus, and tumor. Apart
 17 from the case of skin, which is more fluorescent after the
 18 injection of nanoparticles coated by PEG2000-COOH, the
 19 accumulation is more pronounced when PEG2000-NH₂ is
 20 grafted onto the nanoparticles. The propensity of PEG2000-
 21 NH₂ to favor the accumulation of the nanoparticles is even
 22 more obvious in the case of the intestines, liver, and spleen.

23 These organs are effectively largely more fluorescent in the
 24 case of nanoparticles functionalized by PEG2000-NH₂. Even if
 25 the nonspecific accumulation of nanoparticles coated by
 26 PEG2000-X is moderate in tumors, it must be pointed out
 27 that the influence of the PEG chain length is not negligible since
 28 no fluorescence (i.e., no accumulation) is observed with the
 29 shorter chain. The absence of nanoparticles coated by
 30 PEG250-COOH in the HEK-β3 tumor was confirmed by in
 31 vivo fluorescence imaging 24 and 72 h after the intravenous
 32 injection of the nanoparticles (Figure 8). Because of a strong
 33 fluorescence from the skin when the nanoparticles are
 34 functionalized by PEG2000-COOH, the accumulation of
 35 these nanoparticles in the tumor, which was revealed by
 36 ex vivo fluorescence measurements (Figure 7), is not visible
 37 because the fluorescence coming from the tumor is masked
 38 by that of the skin (Figure 8). Despite the fluorescence
 39 of the skin, the accumulation of nanoparticles functionalized

by PEG2000-NH₂ in the tumor is perceptible (Figure 8),
 probably because the fluorescence intensity from the skin is
 weaker than in the previous case, while the tumor is more
 fluorescent when PEG2000-NH₂ chains are tethered to the
 nanoparticles (Figure 7). In contrast to the nanoparticles
 coated by PEG2000-COOH and PEG2000-NH₂, the moderate
 accumulation in the tumor of the nanoparticles whose
 hydrophilic character is due to PEG2000-OCH₃ is more easily
 distinguishable, although the fluorescence intensity of the
 tumor is similar to that observed in the case of nanoparticles
 functionalized by PEG2000-COOH. Figure 5b, which displays
 the evolution of the fluorescence after intravenous injection
 of PEG2000-OCH₃-coated nanoparticles in a mouse lain
 on its belly, shows that the fluorescence contrast is positive in
 the tumor 5 h after the intravenous injection. Despite the
 decrease in fluorescence intensity observed 24 and 72 h after
 the administration of the fluorescent nanoparticles, the tumor
 stands out against the surrounding tissues more clearly because
 the fluorescence intensity of the latter decreases more quickly.
 The image acquired when the mouse was on the left side
 confirms the passive accumulation of PEG2000-OCH₃-coated
 nanoparticles (Figure 8). However, the amount of fluorescent
 nanoparticles in the tumor is relatively weak compared
 to the low fluorescence intensity of the tumor
 when it was examined ex vivo after the sacrifice of the
 animals (Figures 5d and 7). Although derivatization of the
 nanoparticles by PEG2000-NH₂ leads to the highest accumu-
 lation in the tumor zone (Figure 7), functionalization by
 PEG2000-OCH₃ seems to be better suited because this
 polymer prevents accumulation in the liver and spleen, in
 contrast to PEG2000-NH₂.

This study, which focused on the biodistribution of hybrid
 nanoparticles (HD < 20 nm) that were designed for combining
 multimodal medical imaging techniques and therapy,

1 shows that the retention time and biodistribution of
2 these nanoparticles depends strongly on the chemical composi-
3 tion of the outer surface. If the grafting of hydrophilic PEG
4 molecules is required to ensure circulation of the nanoparticles
5 in the bloodstream, the biodistribution depends on the chain
6 length and on the end group. For the same end group (COOH),
7 clearance from the blood is significantly higher for the short
8 chain (PEG250-COOH) than for the long chain (PEG2000-
9 COOH). Nanoparticles coated by PEG250-COOH quickly
10 accumulated in the kidneys before being removed from the
11 body by urine. The fluorescence intensity of the blood is in the
12 same magnitude range as that of the blood of a mouse that did
13 not receive any nanoparticles 24 h after the injection.

14 For equal chain lengths, the biodistribution depends on the
15 nature of the end group. When the PEG chain is terminated by
16 an NH₂ group, the particles are positively charged in the
17 biological pH range. The undesirable accumulation of hybrid
18 nanoparticles coated by PEG2000-NH₂ in the liver and the
19 spleen is probably correlated to the positive ζ potential, which
20 favors, as previously reported, uptake by phagocytic cells of the
21 RES (mainly present in these organs).^[15] The absence of
22 PEG2000-NH₂-coated nanoparticles in the lungs reflects a
23 satisfactory colloidal stability of these nanoparticles despite the
24 presence of negatively charged serum proteins, which are well
25 known for inducing the agglomeration of positively charged
26 nanoparticles.^[12] Such a colloidal stability can probably be
27 ascribed to the steric hindrance of hydrophilic PEG chains since
28 aminated nanoparticles without PEG accumulate quickly in the
29 lungs.^[7] In contrast to the NH₂ end group, COOH and OCH₃
30 functions carried at the extremity of PEG chains with the same
31 length prevented accumulation of the nanoparticles in the liver
32 and the spleen. The biodistribution and clearance of nano-
33 particles coated by PEG2000-COOH and PEG2000-OCH₃
34 were similar, except for the accumulation in the skin. Tumoral
35 uptake is based on the enhanced permeability and retention
36 (EPR) effect due to the increased capillary permeability in the
37 tumor vasculature. Among the four PEG derivatives,
38 PEG2000-OCH₃ seems the most attractive because it favored
39 accumulation in the tumor without undesirable uptake in the
40 liver and spleen, in contrast to PEG2000-NH₂. The accumula-
41 tion of the nanoparticles seems to be dependent on the PEG
42 chain length since tumoral uptake based on the EPR effect was
43 not observed for nanoparticles functionalized by the shortest
44 PEG chain (PEG250-COOH). The absence of any accumula-
45 tion of nanoparticles coated by PEG250-COOH in the tumor
46 probably arises from too rapid a clearance, and also from the
47 absence of interactions between the tumoral tissue and the
48 nanoparticles, which can easily enter the tumor through its
49 poorly organized and leaky endothelium, and come out again.
50

51 3. Conclusions

52 In this study, fluorescent nanoparticles composed of a
53 gadolinium oxide core and a fluorescent polysiloxane shell were
54 derivatized by four different hydrophilic PEG chains. What-
55 ever the nature of the hydrophilic polymer, PEGylation led to a
56 higher colloidal stability in the biological pH range. However,

the polymers exert an influence on the biodistribution and on
the clearance of the fluorescent nanoparticles that depends on
the length and the end group of the various PEG chains
immobilized on the nanoparticles. Therefore, for a given
nanoparticle, the clearance and biodistribution can be
tuned. Among the four hydrophilic polymers, PEG2000-OCH₃
appears the most interesting because this polymer
favors the accumulation of the nanoparticles in the tumor by the
EPR effect, whereas they freely circulate in the bloodstream
without undesirable accumulation in the liver, spleen, and
lungs. However, the postfunctionalization of these nanoparti-
cles by biotargeting groups will be impeded by the absence of
grafting sites. This could, however, be overcome by mixing
PEG2000-OCH₃ with PEG terminated by reactive groups
(COOH, NH₂). The data collected during this biodistribution
study also confirms the deleterious effect of the positive charge,
which favors accumulation in resident phagocyte-rich tissues
(liver, spleen), despite the hydrophilic character of the PEG
chain, which is well known for preventing plasma protein
adsorption and avoiding subsequent uptake by phagocytes. The
ability of PEG chains to reduce the uptake by macrophages is
reflected by the behavior of nanoparticles coated by carboxy-
lated and methoxy PEG. Although PEG250-COOH is the
shortest hydrophilic polymer of the series, it confers the
greatest ability to circulate freely in the blood pool on the
nanoparticles since no accumulation is observed apart from
organs involved in the natural elimination (kidneys, bladder).
The next step of our work will consist of improving the selective
uptake of these PEGylated nanoparticles by tumoral tissues by
grafting various molecules onto the PEG corona that will favor
cancerous-cell targeting and uptake.

4. Experimental Section

Chemicals: Gadolinium chloride hexahydrate (99.99%),
sodium hydroxide (99.99%), tetraethyl orthosilicate (Si(OC₂H₅)₄,
TEOS, 98%), (3-aminopropyl)triethoxysilane (H₂N(CH₂)₃-
Si(OC₂H₅)₃, APTES, 99%), EDC (98+%), PFP (99%), poly(ethylene
glycol)bis(carboxymethyl)ether (PEG250-COOH, 99%,
250 g mol⁻¹), α,ω-Bis{2-[(3-carboxy-1-oxopropyl)amino]ethyl}po-
ly(ethylene glycol) (PEG2000-COOH, 99%, 2000 g mol⁻¹), poly
(oxyethylene) bis(amine) (PEG2000-NH₂, 99%, 2000 g mol⁻¹)
O-Methyl-O'-succinyl-poly(ethylene glycol) (PEG2000-OCH₃, 99%,
2000 g mol⁻¹), hepes solution (solution in water, pH 7.0-7.6),
sodium chloride, triethylamine (TEA, 99.5%), and hydrochloric
acid (HCl, 37%) were all purchased from Aldrich Chemical
(France). Cy5 mono-NHS ester (89.1%) was purchased from
Amersham Bioscience. Ethanol, diethylene glycol (DEG, 99%),
and other organic solvents (reagent grade) were purchased from
SDS (France) and used as received. For the preparation of an
aqueous solution of nanoparticles, only milliQ water (ρ > 18 MΩ)
was used. The dialysis of colloidal solutions was performed with a
tubular membrane of cellulose (molecular-weight cut off
(MWCO) = 4-6 kDa) purchased from Roth (France). Pur-
ification and concentration of colloids by tangential filtration were
carried out using Vivaspine (MWCO = 10 000 Da).

Synthesis of gadolinium oxide nanoparticles embedded in a polysiloxane shell: These particles were obtained by a two-step route. Gadolinium oxide nanoparticles were first synthesized by applying a modified “polyol” protocol.^[28,29] Afterwards polysiloxane shell growth was induced by hydrolysis/condensation of convenient siloxane precursors in the presence of the nanoparticles.^[19]

Preparation of gadolinium oxide core: Gadolinium chloride salt (11.53 g) was placed in DEG (200 mL) at 60 °C overnight under vigorous stirring. Sodium hydroxide solution (7.5 mL, 3 M) was added and the solution was heated at 140 °C for 1 h, and at 180 °C for 4 h. A transparent colloid of gadolinium oxide nanoparticles was obtained, which can be stored at room temperature for weeks without alteration.

Encapsulation of Gd₂O₃ cores by polysiloxane shell: A solution containing organic dyes (Cy5 NHS ester, 5 mg) and APTES (1.4 μL) dissolved in DMSO (291 μL) was prepared as a precursor and stirred overnight. The coupling reaction between the organic fluorophores and APTES was certified by mass spectrometry with complete disappearance of the molecular peak of the fluorophore ($m/z = 792.0$ for Cy5–NHS) and the appearance of the molecular peak of the fluorophore-conjugated APTES ($m/z = 858.3$ for Cy5–APTES). Cy5–APTES solution and a portion of 327 μL of APTES and of 209 μL of TEOS were added to a solution containing Gd₂O₃ nanoparticles (1.5 mL) diluted in DEG (13.5 mL) under stirring at 40 °C. After 1 h, a portion of 792 μL of a DEG solution (0.1 M of TEA, 10 M of water) was added. The other portions of polysiloxane precursors and hydrolysis solution were sequentially and alternately added. The final mixture was stirred for 48 h at 40 °C.

Nanoparticles PEGylation: Particles were functionalized by three different homobifunctional PEGs carrying amino or carboxylic acid groups at both ends and one heterobifunctional PEG bearing a methoxy group at one end and a carboxylic acid function at the other end.

Covalent grafting of carboxylated PEG on hybrid nanoparticles: For grafting PEG via its carboxylic acid function, –COOH functions were activated by EDC and PFP. DEG solution (500 μL) containing PEG250–COOH (0.091 M) was added to an isopropanol solution (5 mL) containing a mixture of EDC and PFP (0.367 M). In the case of PEG2000–COOH and PEG2000–OCH₃, the activation of the carboxylic acid function was performed by first dissolving the polymers in DMF (100 mg mL⁻¹). Afterwards the PEG solution (1.8 mL) was mixed with EDC/PFP in DMF solution (1.8 mL, 0.1 M). The reaction between COOH groups of the polymer and PFP, assisted by EDC, is expected to yield pentafluorophenyl esters. The resulting mixture was stirred for 1.5 h at room temperature and added to 1 mL of colloidal suspension composed of hybrid nanoparticles (Gd₂O₃ cores encapsulated in a fluorescent polysiloxane shell) dispersed in DEG. The covalent grafting of PEG onto the hybrid nanoparticles was performed overnight at room temperature with gentle stirring.

Covalent grafting of aminated PEG on hybrid nanoparticles: PEGs bearing amine functions as the grafting group were covalently bound to the aminated nanoparticles by using DITC as a cross linker.^[26] Prior to the reaction, a stock solution of DITC was prepared by dissolving DITC in DMF (10 mg mL⁻¹). The stock solution containing DITC (1.6 mL) was added to 1 mL of a colloidal

suspension composed of hybrid nanoparticles (Gd₂O₃ cores encapsulated in a fluorescent polysiloxane shell) dispersed in DEG solution (7.5 μM). After 8 h of stirring at room temperature, PEG2000–NH₂ in DMF solution (1.8 mL, 100 mg mL⁻¹) was added. The resulting solution was allowed to react overnight at room temperature under stirring.

Purification: Whatever the nature of the PEG anchored onto the nanoparticles, the resulting colloids are purified in the same way. The colloids of PEGylated nanoparticles were introduced into a tubular dialysis membrane and immersed in water (250 mL), which was replaced four times every 12 h. Diluted purified solutions were finally concentrated by tangential filtration using Vivaspin until their concentration was equal to 7.5 μM.

Size measurement: Direct measurement of the size distribution of the nanoparticles was performed by PCS with a Zetasizer NanoZS from Malvern Instruments. Measurements were made on the colloids after purification by dialysis.

Zeta-potential measurements: Direct determination of the ζ potential of the hybrid PEGylated nanoparticles was performed using a Zetasizer NanoZS (laser He–Ne, 633 nm) from Malvern Instruments. Prior to the experiment, the aqueous colloid was diluted in an aqueous solution containing NaCl (0.01 M) and adjusted to the desired pH.

Absorption and emission spectra: Absorption and emission spectra were acquired on a WPA spectrophotometer and a fluorescence spectrometer (F2500, Hitachi), respectively.

Preparation of injectable solution: After tangential filtration, 160 μL of colloid (hybrid nanoparticles in water) was diluted with an aqueous solution (40 μL) containing NaCl (750 mM) and hepes (20 mM).

Biodistribution of nanoparticles: Female NMRI nude mice (6–8 weeks old, JANVIER) received a subcutaneous xenograft of HEK293(β3) cells (20 × 10⁶ cells per mouse). After tumor growth, mice ($n = 3$ for each type of PEG, and in vivo imaging experiments were reproduced at least twice) were anesthetized (isoflurane/oxygen 4% for induction and 2% thereafter) and were injected intravenously with a nanoparticle suspension (200 μL). The mice were illuminated by 633-nm light-emitting diodes equipped with interference filters. Fluorescence images, as well as black-and-white pictures, were acquired by a back-thinned charge-coupled device cooled camera (ORCAII-BT-512G, HAMAMATSU). A colored-glass long-pass filter (RG 665) cut off all excitation light in the image.^[30,31] After imaging, the mice were sacrificed and dissected in order to image the organs and blood.

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-NANO-037-02).

[1] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042.

[2] W. Cai, X. Chen, *Small* **2007**, *11*, 1840.

[3] C. Alric, J. Taleb, G. Le Duc, C. Mandon, C. Billotey, A. Le Meur-Herland, T. Brochard, F. Vocanson, M. Janier,

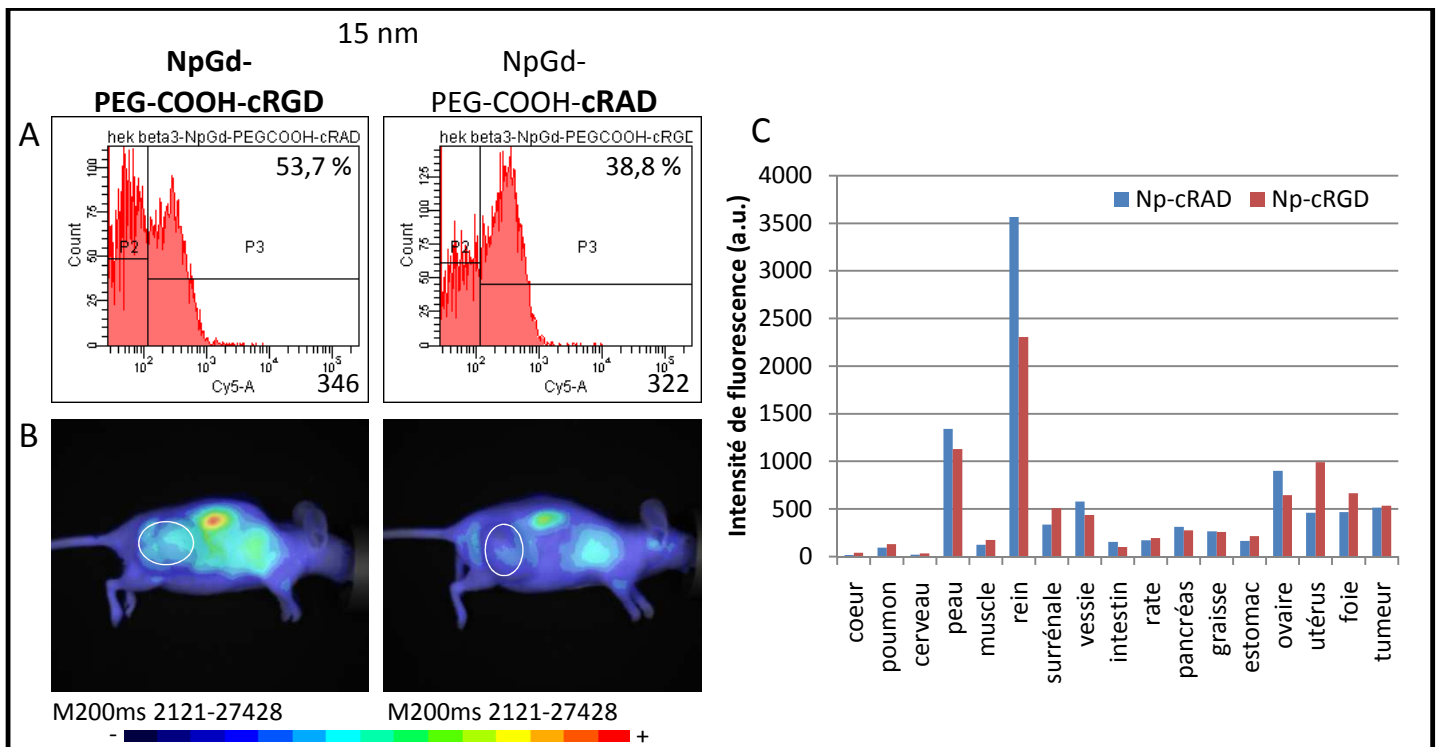


Figure 56. Etude du comportement des Np-PEG250-COOH-cRGD et -cRAD de 15 nm *in vitro* et *in vivo*.

[A] Analyse de l'interaction des nanoparticules avec les cellules HEK293(β 3) par cytométrie en flux, après 15 minutes d'incubation à 4°C. [B] Biodistribution des nanoparticules 96h après injection IV. [C] Quantification de la fluorescence dans les organes 96h après injection IV.

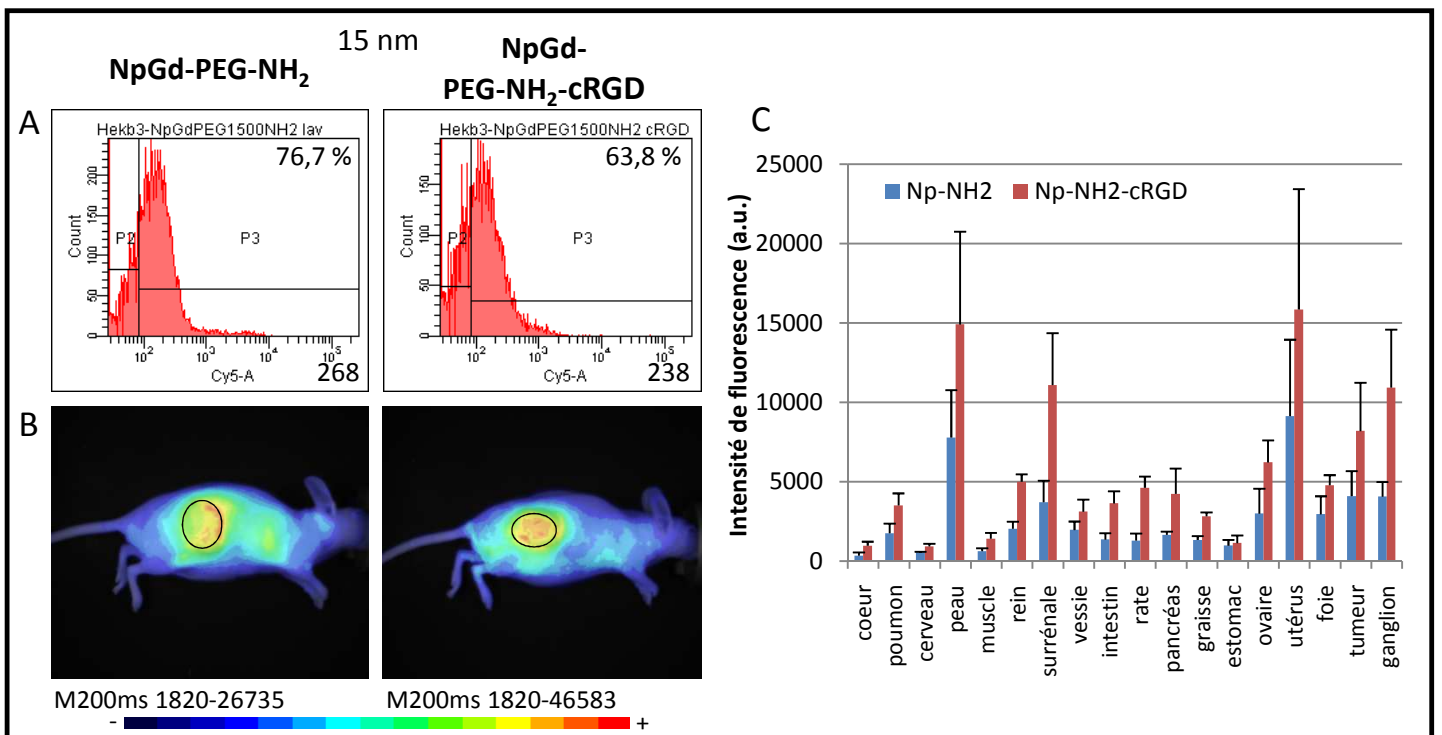


Figure 57. Etude du comportement des Np-PEG1500-NH₂ et -cRGD de 15 nm *in vitro* et *in vivo*.

[A] Analyse de l'interaction des nanoparticules avec les cellules HEK293(β 3) par cytométrie en flux, après 15 minutes d'incubation à 4°C. [B] Biodistribution des nanoparticules 72h après injection IV. [C] Quantification de la fluorescence dans les organes 72h après injection IV.

2.5. Résultats complémentaires : Nanoparticules ciblantes

2.5.1. Effet de la taille du PEG

Comme nous l'avons vu précédemment, la séquence cyclique -cRGD est reconnue spécifiquement par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée par les cellules endothéliales des néo-vaisseaux en croissance, mais également par la plupart des tumeurs. Elle constitue donc un marqueur de tumeur en cours de développement. Le potentiel ciblant des Np-PEG250-COOH et des Np-PEG1500-NH₂ couplées au -cRGD a été évalué conjointement *in vitro* sur les HEK293(β_3) et *in vivo* après injection intra-veineuse chez des souris xénotransplantées avec des cellules HEK293(β_3). Le comportement biologique des nanoparticules couplées au -cRAD, contrôle négatif du -cRGD ne liant pas l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, a également été étudié.

L'interaction des particules fonctionnalisées ou non par du -cRGD a été analysée sur les cellules HEK293(β_3) par cytométrie en flux, après 15 minutes d'incubation à 4°C. Pour les Np-PEG250-COOH, le profil de marquage des cellules est similaire qu'elles soient fonctionnalisées par le -cRGD ou par le -cRAD (Figure 56) : une partie des cellules ne sont pas marquées et l'autre partie est marquée (54 % de cellules positives pour les Np-PEG250-COOH-cRGD *versus* 39 % pour les Np-PEG250COOH-cRAD). Dans les deux cas, les particules semblent être accrochées à la surface des cellules, de manière non spécifique.

En ce qui concerne les Np-PEG1500-NH₂, le profil de fixation sur les cellules est similaire que les nanoparticules soient greffées avec du -cRGD (64% de cellules positives) ou pas (76%) (Figure 57). Il s'agit d'une interaction non spécifique des particules avec les cellules.

In vivo, les Np-PEG250-COOH-cRGD et les Np-PEG1500-NH₂-cRGD présentent des profils de biodistribution différents, mais identiques à ceux observés pour les mêmes particules non fonctionnalisées par le peptide. Avec le -cRGD ou le -cRAD, les Np-PEG250-COOH sont éliminées rapidement par voie rénale et ne semblent pas avoir accès au compartiment tumoral. Après dissection, aucun marquage tumoral spécifique n'est observé (Figure 56). Cependant, le signal quantifié dans les tumeurs pour les nanoparticules greffées avec du -cRGD ou du -cRAD est 42 fois supérieur à celui obtenu avec les nanoparticules non greffées (-OH). Ainsi les faibles différences de ciblage obtenues *in vitro* sont corrélées aux biodistributions *in vivo*. Le greffage induit également une augmentation de la fluorescence dans le foie (d'un facteur 16) et dans la peau (d'un facteur 30).

A l'inverse, les Np-PEG1500-NH₂ qui ont initialement tendance à s'accumuler passivement dans la tumeur voient leur potentiel ciblant augmenter après greffage du -cRGD, même si

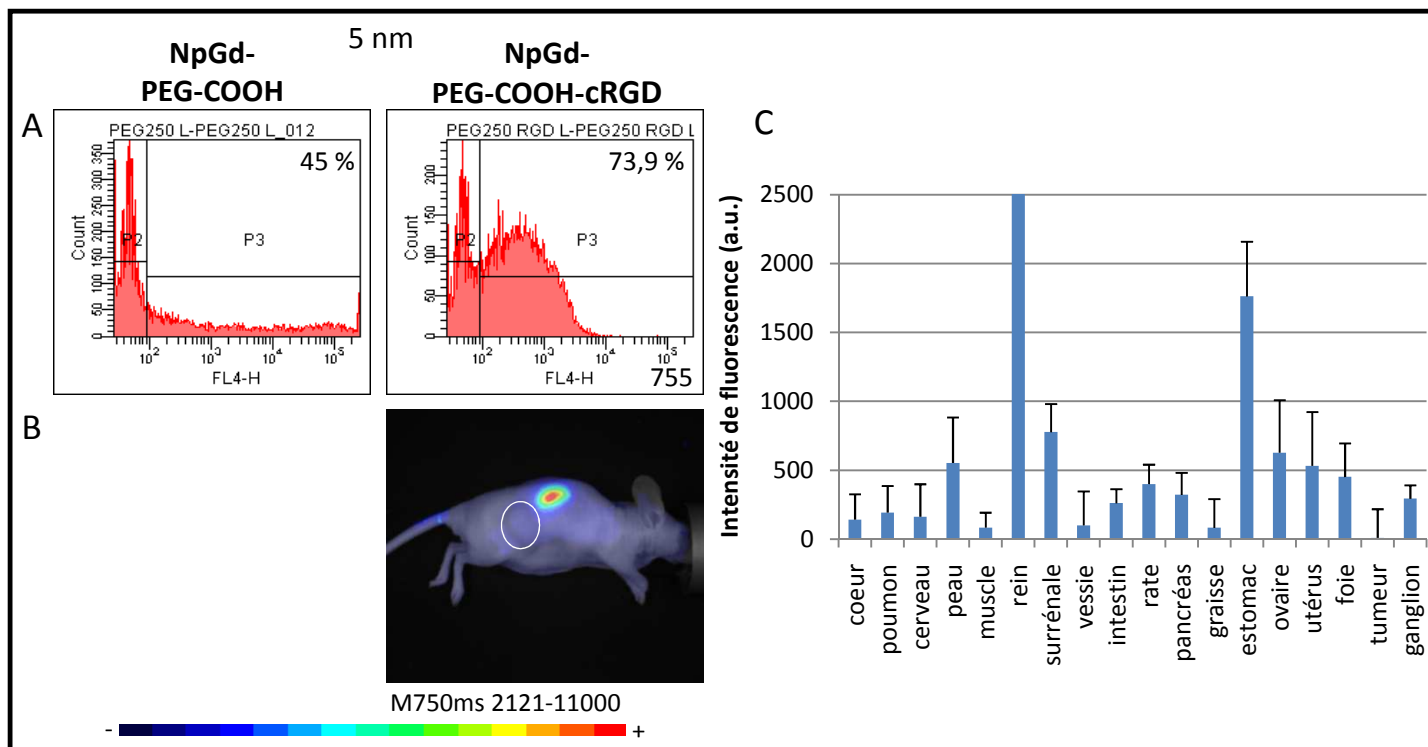


Figure 58. Etude du comportement des Np-PEG250-COOH-cRGD et -cRAD de 5 nm *in vitro* et *in vivo*. [A] Analyse de l'interaction des nanoparticules avec les cellules HEK293(β 3) par cytométrie en flux, après 15 minutes d'incubation à 4°C. [B] Biodistribution des nanoparticules 72h après injection IV (200 μ l d'une suspension de Np à 50 μ M en Cy5) de souris porteuses d'une xéno greffe sous-cutanée de cellules HEK293(β 3). Les NpGd-PEG250-COOH n'ont pas été injectées. [C] Quantification de la fluorescence dans les organes 72h après injection IV des NpGd-PEG250-COOH-cRGD. L'intensité de fluorescence du rein est de 49182 a.u. +/- 7837.

elles s'accumulent également de manière très importante dans la peau. Le greffage du -cRGD améliore la biodistribution générale de la particule, avec une augmentation d'un facteur 2 de la fluorescence dans la majorité des organes (Figure 57). Cette légère augmentation de l'accumulation tumorale passive signe une modification de la surface de la particule et laisse à penser que le -cRGD est bien greffé, même si sa capacité de reconnaissance spécifique de l'intégrine n'est pas mise en évidence. Ces résultats sont en accord avec les résultats de la littérature qui montrent que le greffage d'un ligand à la surface des nanoparticules améliore le ciblage passif des tumeurs, mais pas la spécificité du marquage (Park et coll., 2004 ; Kirpotin et coll., 2006).

Pour ces deux types de particules, la longueur de la chaîne PEG joue un rôle sur la biodistribution des nanoparticules comme nous l'avons montré précédemment, mais elle n'influence pas l'interaction entre le -cRGD et les cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

2.5.2. Effet de la taille des particules

Pour les Np-PEG250-COOH de 15 nm greffées avec du -cRGD ou du -cRAD, nous avons montré qu'il n'y avait pas de différences de comportement *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs explications sont envisageables : soit le -cRGD est mal présenté à la surface des particules, soit il n'est pas greffé. Cependant, lorsque la même étude est réalisée avec des particules de plus petite taille (5 nm au lieu de 15nm) présentant la même fonctionnalisation (PEG250 +/- cRGD), un marquage spécifique des cellules est obtenu pour le Np-PEG250-COOH-cRGD (74 % de cellules positives, *versus* 40 % pour les Np-PEG250-COOH), alors que les résultats *in vivo* étaient identiques à ceux obtenus avec les particules de 15nm à savoir aucun marquage spécifique de la tumeur (Figure 58). Ces expériences réalisées *in vitro* avec les particules de 5 nm montrent que le -cRGD peut être greffé à la surface des particules et qu'il conserve ses propriétés de reconnaissance des intégrines.

2.5.3. Conclusions sur les nanoparticules ciblantes

Les différents résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sont synthétisés dans le tableau ci-dessous (Tableau VII).

	Np-PEG250-COOH-cRGD		Np-PEG1500-NH ₂ -cRGD
Taille	15 nm	5 nm	15 nm
Tumeur sc (HEK293(β3))	Pas de marquage	Pas de marquage	Augmentation du marquage tumoral spécifique
Cellules HEK293(β3)	Pas de marquage	Augmentation du marquage tumoral spécifique	Pas de marquage

Tableau VII. Résumé des résultats de ciblage obtenus *in vitro* et *in vivo* en présence de nanoparticules PEGylées fonctionnalisées ou non par du -cRGD.

Les Np-PEG250-COOH ont un temps de circulation trop court après injection chez la souris pour pouvoir interagir avec les cellules endothéliales et les cellules tumorales qui expriment l'intégrine. En effet, *in vitro* dans des conditions favorisant l'interaction, le greffage du -cRGD permet d'augmenter leur caractère spécifique (uniquement pour les nanoparticules de 5 nm). A l'inverse, le temps de circulation très long des Np-PEG1500-NH₂ et leur tendance à aller dans les tumeurs de manière passive, augmente les statistiques d'interactions efficaces avec l'intégrine et favorise donc le marquage.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible de greffer un peptide ciblant, le -cRGD, à la surface des nanoparticules, même si dans le cas présent, son aptitude à reconnaître spécifiquement l'intégrine est fortement entravée. La discordance des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* peut être due au fait que le peptide n'est pas présenté de manière satisfaisante à la surface des nanoparticules ce qui compromet leur interaction avec les intégrines. Le -cRGD doit en effet être présenté de manière satisfaisante à la surface des nanoparticules pour être fonctionnel. Il doit être suffisamment flexible et mobile au bout de la chaîne PEG pour pouvoir se lier aux intégrines. Ces paramètres peuvent être perturbés par la nanoparticule elle-même (repliement du -cRGD dans la chaîne PEG, trop faible densité de -cRGD à la surface des particules, ...), ce qui pourrait expliquer les différences de ciblage observées. De plus, nous ne disposons pas de méthode qui permettrait, par caractérisation chimique, de valider le greffage du peptide -cRGD.

2. Les nanoparticules d'or

Suite aux résultats de biodistribution et de ciblage obtenus avec les nanoparticules d'oxyde de Gadolinium, montrant qu'en utilisant des nanoparticules de petites tailles les effets de ciblage pouvaient être améliorés, nous avons évalué la biodistribution de nanoparticules d'or de très petite taille (de l'ordre de 2-3 nm). Les premiers résultats obtenus avec ces nanoparticules ont montré qu'elles étaient détectables par IRM et par imagerie X (synchrotron) (Alric et coll., 2008). De plus, elles possèdent un pouvoir radio-sensibilisant après irradiation aux rayons X, qui les rend particulièrement intéressantes pour une utilisation thérapeutique.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Olivier Tillement, Stéphane Roux et Christophe Alric (Laboratoire de Physico-chimie des Matériaux Luminescents – UMR 5620, Villeurbanne), qui ont réalisé la synthèse des nanoparticules.

2.1. Structure des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sont constituées d'un cœur d'or de 2 nm sur lequel sont greffés des DTDTPA (DiamideéthaneThiolDiéthylèneTriaminePentAcétate), qui s'organisent sous forme d'un réseau à la surface de la particule (Figure 59). Le DTDTPA permet de complexer des ions Gadolinium, permettant la visualisation des nanoparticules selon différentes méthodes d'imagerie (rayons X, IRM).

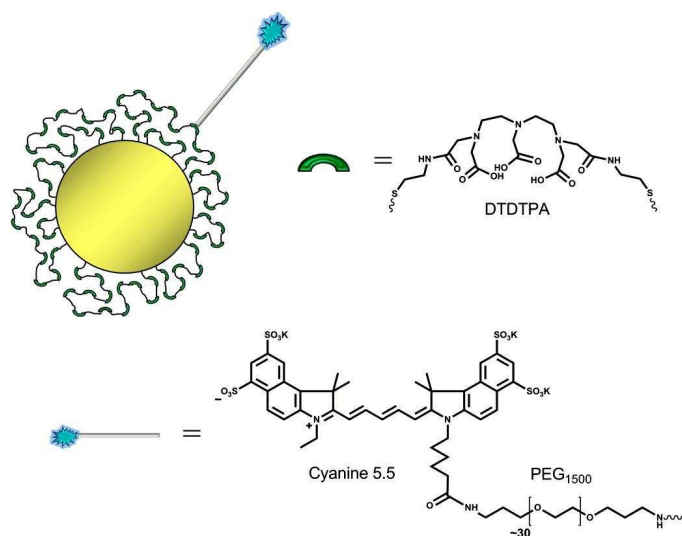


Figure 59. Représentation schématique des nanoparticules d'or

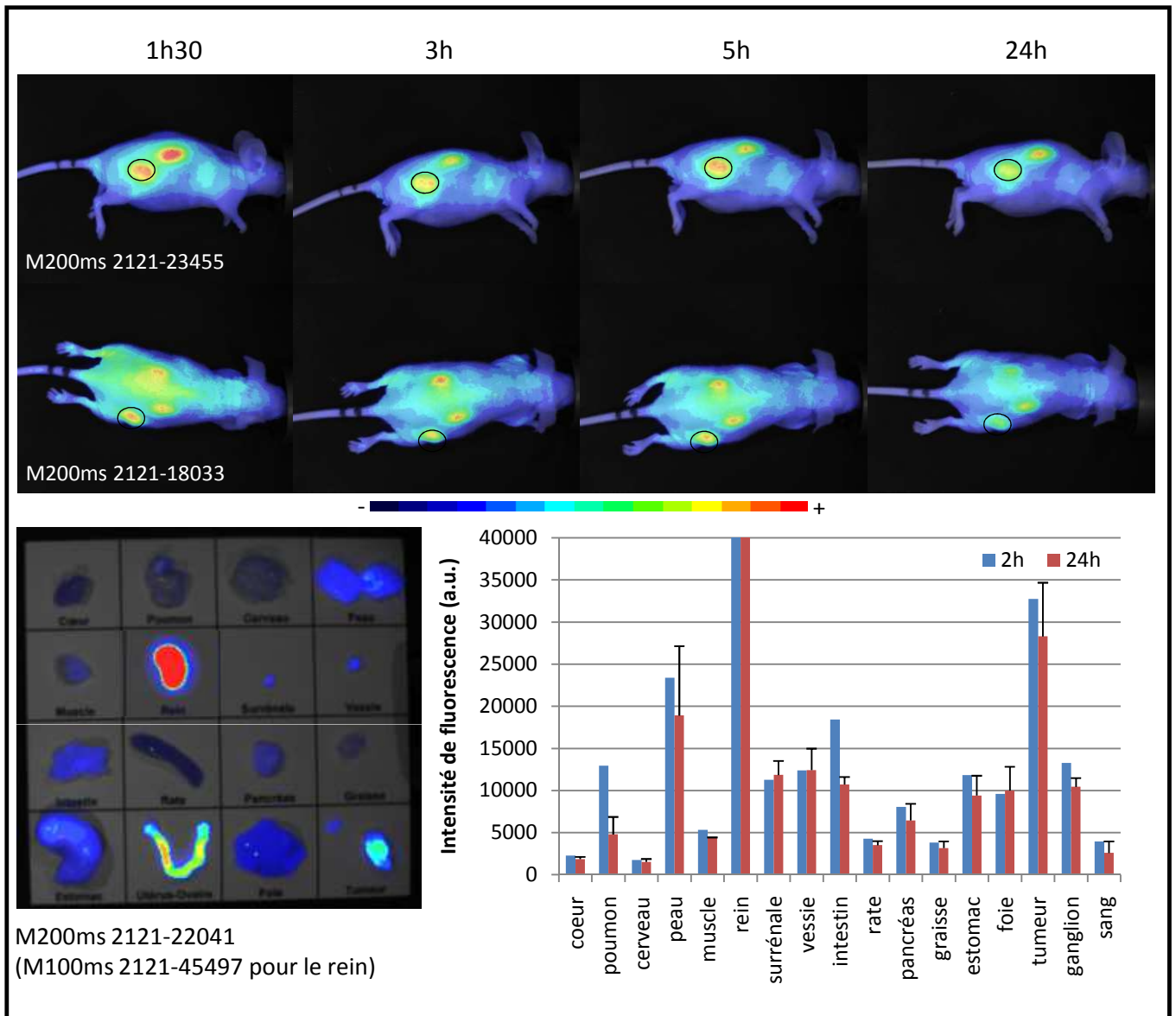


Figure 60. Biodistribution des nanoparticules d'or *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xénotgreffe sous-cutanée de TS/A-pc, sont injectées par voie intra-veineuse par 200 μ l d'une solution de Np-Au-PEG-Cy5.5 (50 μ M en Cy5.5). Pour le rein, l'intensité de fluorescence est de 804121 a.u. à 2h et de 292053 \pm 6260 a.u. à 24h.

De la même manière que l'or, le gadolinium est également utilisé pour ses propriétés radio-sensibilisantes. Afin de pouvoir visualiser ces nanoparticules *in vivo*, des PEG1500-Cy5.5 sont greffés en surface. La quantité de PEG1500-Cy5.5 est estimée à moins de un par nanoparticule.

2.2. Biodistribution des nanoparticules d'or *in vivo*

La biodistribution a été évaluée sur des souris *nude* xéno greffées avec des cellules tumorales TS/A-pc en sous-cutané, après injection de 200 μ l d'une solution de nanoparticules d'or par voie intra-veineuse ([Au] = 45mM et [Cy5.5] = 30 μ M).

Les nanoparticules d'or présentent une biodistribution homogène, avec une accumulation rénale (Figure 60). L'élimination des particules se fait par voie urinaire. Une accumulation passive dans la tumeur est également détectée. Celle-ci augmente jusqu'à 3h puis reste constante jusqu'à 24h. De manière très intéressante, après le rein, la tumeur est l'« organe » qui présente la fluorescence la plus importante. Entre 2h et 24h, le signal fluorescent ne varie pas dans la majorité des organes. Une diminution importante est observée dans les poumons et dans les reins : trois quart de la fluorescence est éliminée des poumons et deux tiers pour les reins. Les nanoparticules d'or sont donc éliminées rapidement par voie rénale.

Ainsi, les premiers résultats obtenus avec ces nanoparticules de petite taille (biodistribution homogène, élimination rénale et accumulation passive dans la tumeur par effet EPR) sont très encourageants. En effet, parmi les différentes nanoparticules testées, les nanoparticules d'or présentent la meilleure accumulation tumorale par effet EPR, ce qui présente un réel avantage pour une utilisation en thérapie.

Il serait donc intéressant de les fonctionnaliser avec du -cRGD afin d'améliorer leur capacité de ciblage *in vivo*. Des expériences d'irradiation par rayons X (synchrotron) des tumeurs sous-cutanés seront également réalisées, après injection des nanoparticules d'or, afin de tester leur pouvoir radio-sensibilisant dans notre modèle tumoral.

3. Les nano-cargos lipidiques : nanocapsules lipidiques (LNC) et nanoémulsions lipidiques (LNE)

Parallèlement aux études de biodistribution réalisées avec des nanoparticules à cœur d'oxyde de Gadolinium et sur les nanoparticules d'or, nous nous sommes intéressés aux nanoparticules lipidiques : nanocapsules lipidiques (LNC) et nanoémulsions lipidiques (LNE). En effet, parmi les différentes nanoparticules (inorganiques ou organiques) étudiées pour leurs applications thérapeutiques et/ou en imagerie, les particules lipidiques semblent très prometteuses. En effet, des systèmes liposomaux d'encapsulation de drogues sont actuellement utilisés pour le traitement des cancers, mais ils sont instables dans les fluides biologiques, présentent une faible capacité d'encapsulation de drogues lipophiles et sont synthétisés avec des procédés nécessitant des solvants organiques. Ainsi le développement de nouvelles nanoparticules lipidiques de petite taille (< 100 nm), stables (plus d'un an en suspension), fabriquées avec des procédés sans solvants organiques et utilisant des constituants agréés pour un usage chez l'homme, pourrait améliorer les modalités d'utilisation de ces traitements. De plus, les particules lipidiques ont une grande capacité d'encapsulation des drogues lipophiles, ce qui offrirait une solution pharmaceutique pour l'administration intra-veineuse de ces drogues.

La taille, la fonctionnalisation de surface de ces nanoparticules, ainsi que la présentation de ligands spécifiques peut être ajustée à la demande. Le but de cette étude est d'explorer l'influence de la structure des particules lipidiques sur leur internalisation cellulaire et leur devenir *in vivo*, et d'identifier les propriétés physico-chimiques optimales (taille, charge de surface, stabilité, présentation d'un peptide ciblant, ...) pour leur utilisation thérapeutique et/ou diagnostique en oncologie.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Jean-Pierre Benoit, Samuli Hirsjärvi, Catherine Passirani (INSERM U646, Angers), Isabelle Texier-Nogues, Julien Gravier (CEA/LETI, Grenoble), Jérôme Bibette, Audrey Royere, Qiao Yan (ESPCI, Paris), qui ont réalisé la synthèse de l'ensemble des nanoparticules lipidiques. Nous avons évalué deux types de cargos lipidiques : les nanocapsules lipidiques (LNC) et les nanoémulsions lipidiques (LNE). Ces deux types de particules lipidiques, constituées de composés de nature chimique proche, sont obtenus par deux techniques différentes. Elles présentent des structures relativement différentes notamment en terme de rigidité des particules.

	Cœur lipidique	Surfactant	Surfactant PEGylé	Méthode d'obtention
LNE	Phospholipides en C14 à C18 (Supppocire®)	Lécithines de soja : Phosphatidyl-choline 1 à 2 % deshydrogénée	Stéarate de polyoxyéthylène (PEG) (Myrj53)	Sonication
LNC	Phospholipides en C12 (Labrafac®)	Lécithines de soja : Phosphatidyl-choline deshydrogénée (Lipoid® S75-3)	Hydroxystéarate de PEG 660 (Solutol® HS15)	Inversion de température

Tableau VIII. Composition et méthode d'obtention des LNE et des LNC.

	Molécules utilisées
LNE	- PEG900 = st20 - PEG1800 = st40
LNC	- Hydroxystéarate de PEG 660 (Solutol® HS15) - PEG1500 - Lipo-chitosan - Lipodextran

Tableau IX. Récapitulatif des différentes molécules utilisées pour modifier la surface des LNC et des LNE.

st correspond au nombre motif PEG de la chaîne, un motif ayant un poids moléculaire de 45 g/mol.

3.1. Structure des LNC et des LNE

Les nanocapsules lipidiques (LNC) sont composées d'un cœur lipidique liquide de triglycérides (à chaînes moyennes) entouré par une coque rigide de tensioactifs amphiphiles, ce qui leur donne une structure hybride entre les nanocapsules polymériques et les liposomes (Figure 61). Les tensioactifs utilisés sont le Lipoid® S75-3 (lécithine de soja contenant en moyenne 69 % de phosphatidylcholine) et le Solutol® HS15 (12-hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660). Les LNC sont dispersées dans un milieu aqueux. Ces nanoparticules sont préparées suivant une méthode basée sur la variation de température autour de la zone d'inversion de phase d'une émulsion (Tableaux VIII et IX). Dans le but d'adapter ces vecteurs à la visée thérapeutique souhaitée, leur taille peut être contrôlée entre 20 et 100 nm.

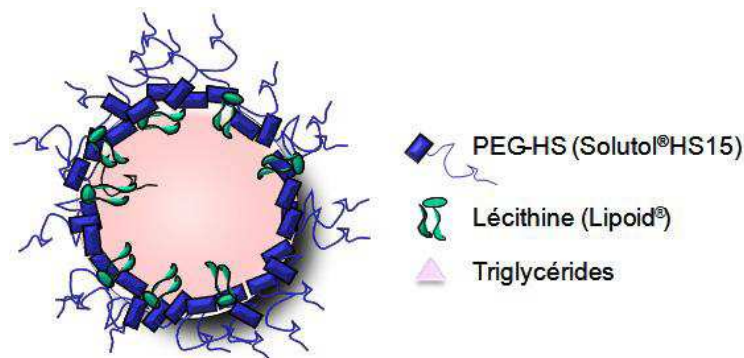


Figure 61. Représentation schématique des nanocapsules lipidiques (LNC)

Les nanoémulsions lipidiques (LNE) sont des émulsions de type huile dans eau, stabilisées par une couche de surfactants composée de phospholipides et d'agents de furtivité (Figure 62). La phase dispersée (cœur de la particule) est constituée d'huile de soja (triglycérides à chaînes longues et insaturées) et de Suppocire® (huile de synthèse composée de glycérides d'acides gras saturés en C12 et C18). Les surfactants sont des lécithines de soja (proche des acides gras insaturés en C18) et un surfactant PEGylé (Myrj53 : stéarate de polyoxyéthylène). Les LNE présentent une taille, ajustable, de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres de diamètre. Elles sont dispersées dans un milieu aqueux. Elles présentent une interface plus fluide que les LNC. Elles sont obtenues par sonication (Tableaux VIII et IX).

Pour ces deux types de particules lipidiques, du DiD (fluorophore lipophile émettant dans le proche infra-rouge ($\lambda_{exc} = 644 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$)) a été encapsulé afin de permettre leur suivi *in vitro* et *in vivo*.

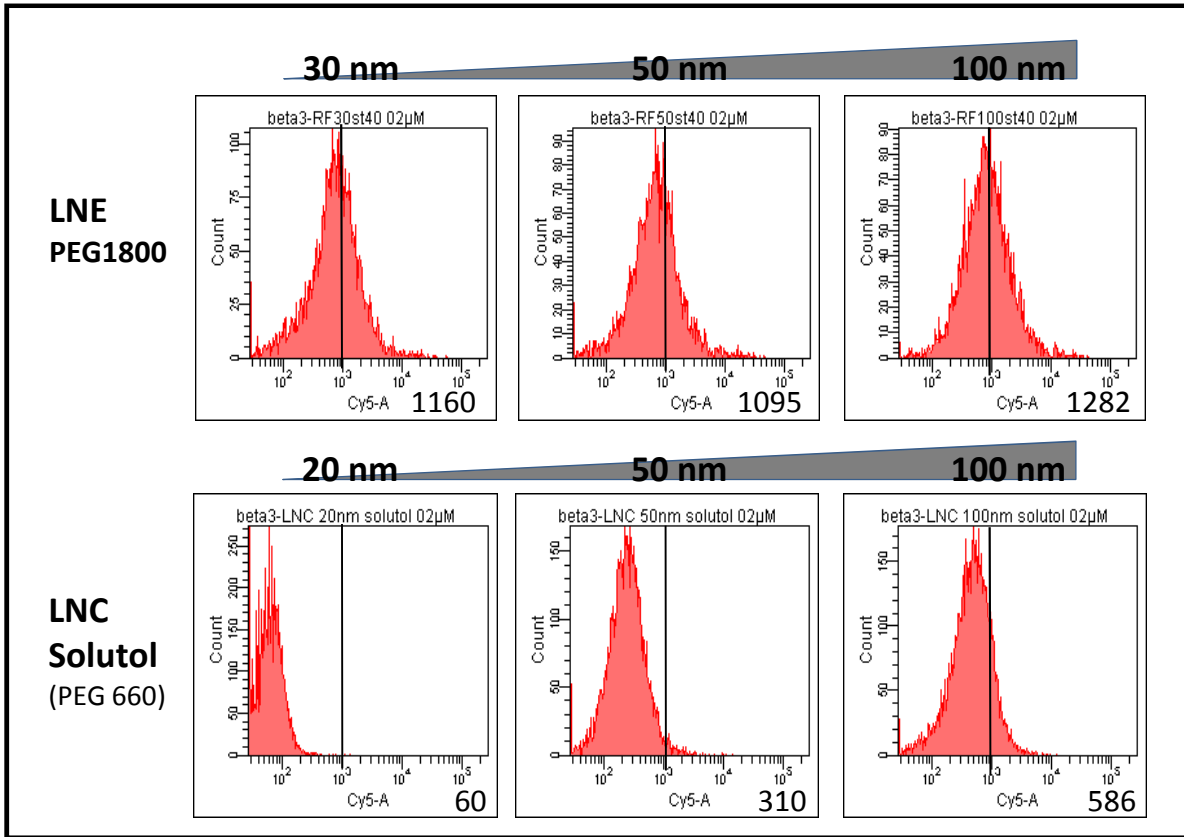


Figure 63. Influence de la taille des LNE et des LNC sur leur internalisation cellulaire *in vitro*.

L'analyse de l'interaction des nanoparticules avec les cellules HEK293(β) est réalisée par cytométrie en flux après 1 heure d'incubation à 37°C.

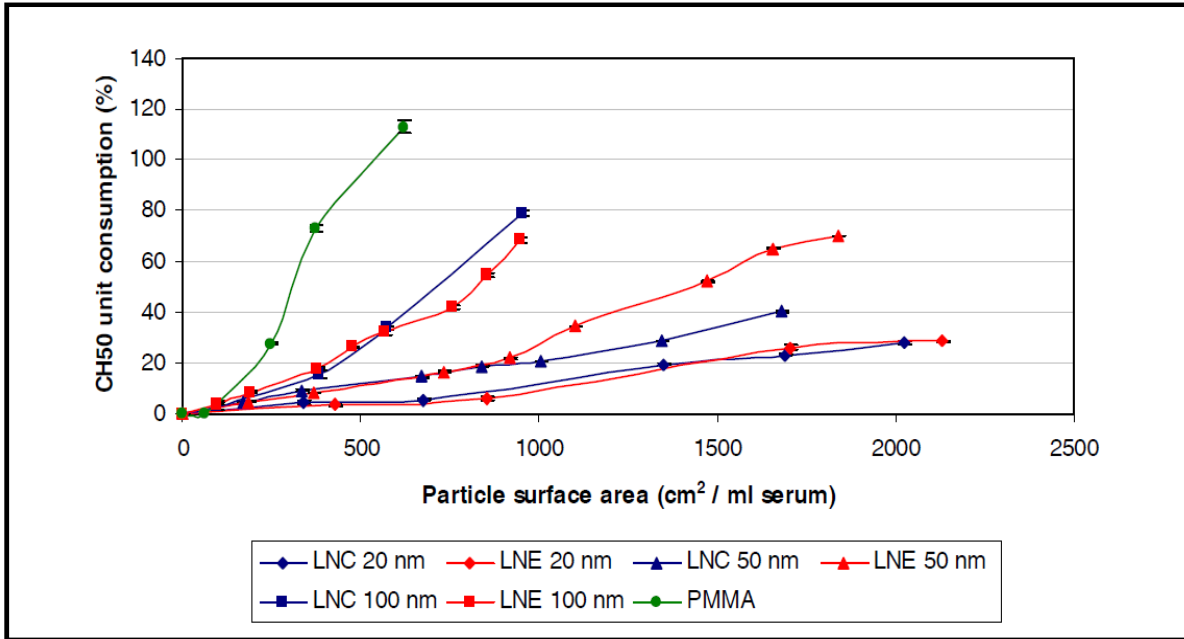


Figure 64. Influence de la taille des LNE et des LNC sur l'activation du complément.

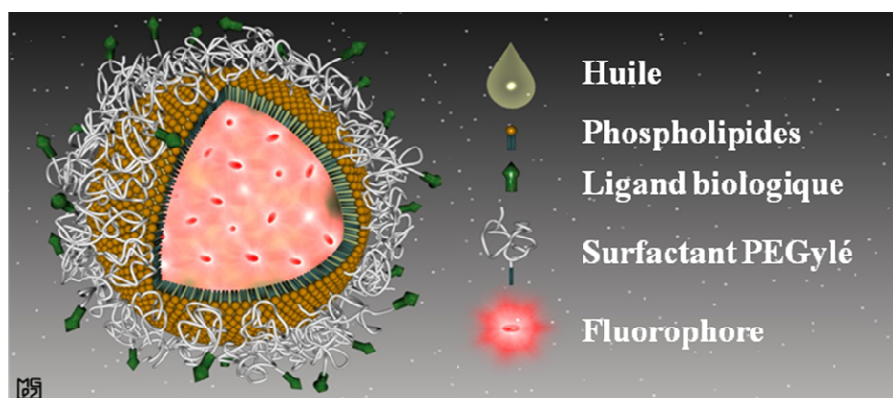


Figure 62. Représentation schématique des nanoémulsions lipidiques (LNE)

3.2. Influence de la taille des nano-cargos lipidiques

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la taille des LNC et des LNE sur l'interaction avec les cellules. Le protocole utilisé est identique à celui décrit précédemment, les cellules HEK293(β 3) sont incubées 1h à 37°C en présence des différentes particules, l'interaction cellules/particules est évaluée par cytométrie en flux. Trois tailles de particules ont été testées : 20 ou 30 nm, 50 nm et 100 nm, pour des LNC présentant du solutol à leur surface (équivalent de PEG660) et pour les LNE recouvertes de PEG1800.

Pour les LNE-PEG1800, l'interaction avec les cellules est comparable quelle que soit la taille des particules, avec une moyenne de fluorescence des cellules (en DiD) autour de 1100 (Figure 63). A l'inverse, pour les LNC, la taille des particules influence leur interaction avec les cellules. Les LNC-solutol de 20 nm ne sont pas internalisées dans les cellules. L'augmentation de leur taille favorise leur internalisation : les LNC de 100 nm sont plus internalisées que celles de 50 nm. La moyenne de fluorescence des cellules passe de 310 pour les LNC de 50 nm à 586 pour celles de 100 nm (Figure 63). En absence de ligand spécifique, la taille des particules influence donc leur interaction non spécifique avec les cellules.

L'interaction des particules lipidiques avec leur environnement a ensuite été évaluée par le test hémolytique CH50 (Tests réalisés par Samuli Hirsjärvi à Angers, INSERM U646). Ce test quantifie la capacité de nano-objets à fixer des opsonines, donc la capacité à être éliminés par la voie réticulo-endothéliale (Kazatchkine et al. 1986 ; Mayer, 1961). Des concentrations croissantes de particules (exprimées en surface de particules) sont incubées avec une quantité fixe de sérum humain. La fixation des opsonines est évaluée grâce à l'activité hémolytique du sérum humain sur des érythrocytes de moutons préalablement sensibilisés. Ainsi, si les

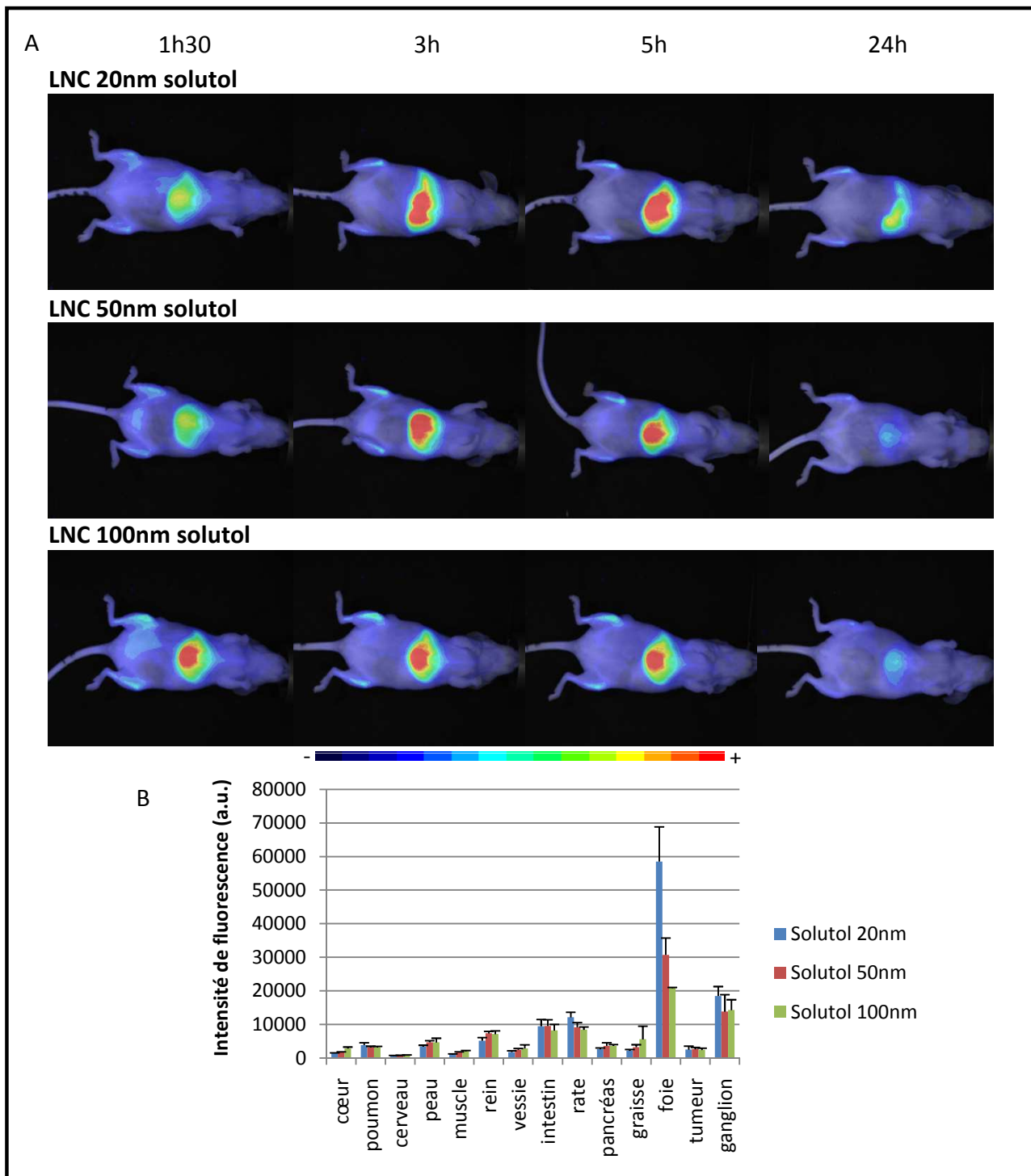


Figure 65. Influence de la taille des LNC-solutol sur la biodistribution *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xénogreffe sous-cutanée de cellules HEK293(β 3), sont injectées par voie intra-veineuse par 200 μ l d'une suspension de LNC (50 μ M en DiD).

[A] Cinétique de biodistribution des différentes LNC. [B] Quantification de la fluorescence après dissection des organes, 24 h après injection.

protéines du complément se fixent sur les nanoparticules, elles ne seront plus libres pour entraîner la lyse des érythrocytes. Inversement, si les nanoparticules ne fixent pas de protéines du complément, ces protéines seront libres pour entraîner la lyse des érythrocytes. Ce test est exprimé en pourcentage de lyse des érythrocytes en fonction d'une surface croissante de nanoparticules (Kazatchkine et coll., 1986 ; Labarre et coll., 1993 ; Mayer, 1961).

Les résultats montrent que les LNC de 20 nm n'activent pas le complément (Figure 64). En revanche lorsque la taille des particules augmente, le complément est activé avec de plus faibles concentrations de LNC. Par exemple pour avoir une activation de 20 % du complément, il faut l'équivalent de 1350 cm² de particules/ml de sérum pour les LNC de 20 nm, 900 cm² pour les LNC de 50 nm et 400 cm² pour les LNC de 100 nm. Ainsi plus la taille des LNC augmente plus le complément est activé par une faible quantité de particules. Les tests réalisés avec les LNE donnent des résultats comparables. Les résultats obtenus en cytométrie en flux et par le test hémolytique CH50 sont en accord et montrent que la taille des particules influence leur interaction et leur internalisation dans les cellules.

La biodistribution des différentes particules lipidiques a ensuite été évaluée *in vivo* par imagerie de fluorescence sur un modèle de souris *nude* portant une tumeur HEK293(β3), après injection de 200 µl d'une solution de particules à 50 µM en DiD.

Les résultats obtenus pour les LNC sont les suivants (Figure 65) : pour les particules de 20 nm, une accumulation hépatique est observée dans les premières minutes après injection. Le signal augmente avec un maximum à 5h puis les particules sont éliminées jusqu'à 24h. Une accumulation osseuse est également détectée, elle est visible à partir de 1h30 post injection. Le signal augmente au cours du temps puis reste stable jusqu'à 24h. Les quantifications de la fluorescence dans les organes, après dissection à 24h post injection, montrent une biodistribution relativement homogène avec une forte accumulation dans le foie (fluorescence détectée 4 fois (LNC 100nm) à 10 fois (LNC 20nm) supérieure à celles des autres organes) et dans une moindre mesure dans les ganglions lymphatiques (signal fluorescent 4 fois supérieur à celui des autres organes).

Les particules de 50 nm ont une biodistribution homogène comparable à celles de 20 nm, avec une accumulation dans les ganglions lymphatiques et une accumulation hépatique, qui atteint son maximum en 5h avant une phase d'élimination. Une accumulation osseuse est également observée.

La biodistribution globale des LNC-solutol de 100 nm est comparable à celles des LNC-solutol de 20 et 50nm, avec accumulation osseuse et hépatique. Cependant l'accumulation

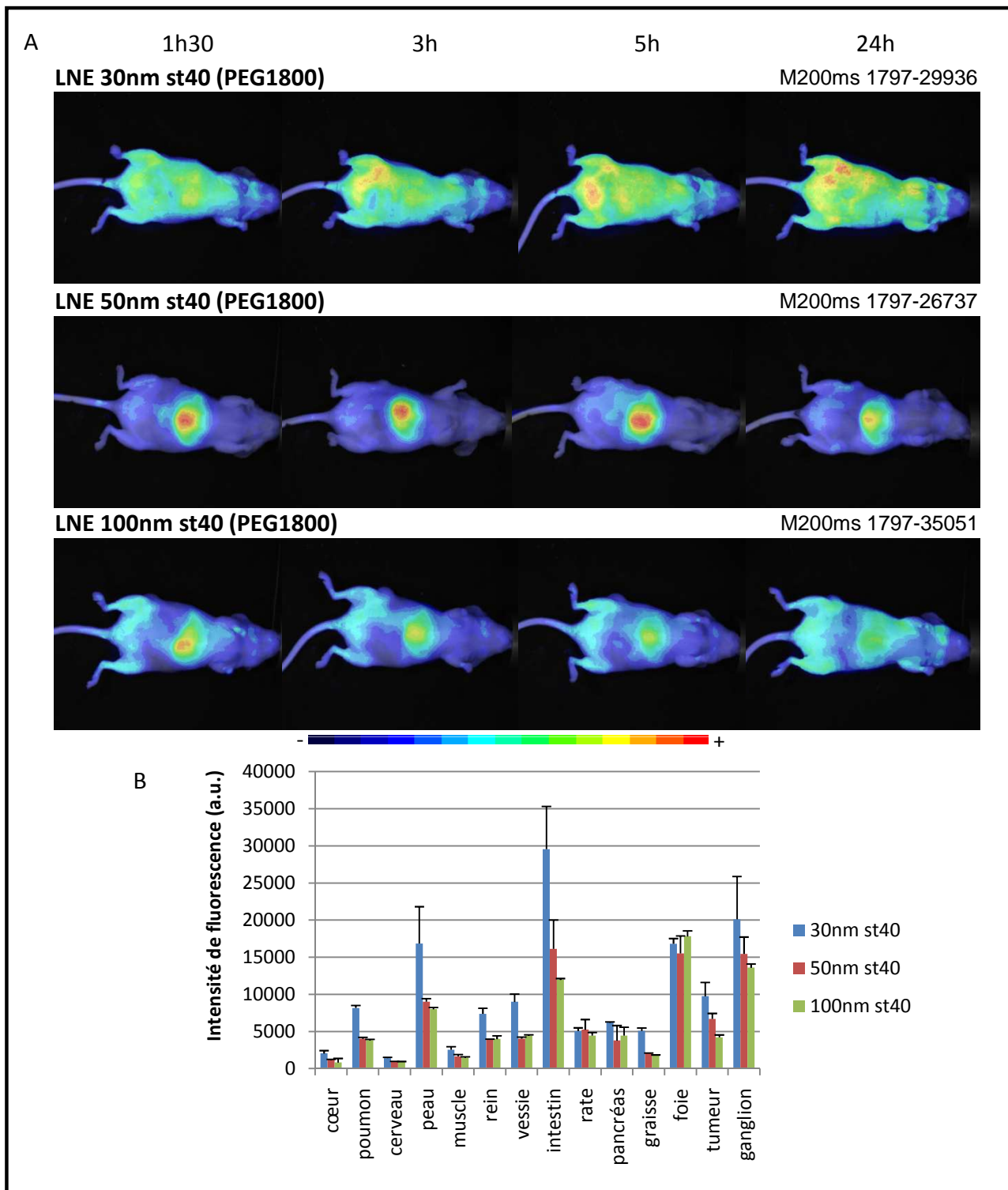


Figure 66. Influence de la taille des LNE-PEG1800 sur la biodistribution *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xéno greffe sous-cutanée de cellules HEK293(β 3), sont injectées par voie intra-veineuse par 200 μ l d'une suspension de LNE (50 μ M en DiD).

[A] Cinétique de biodistribution des différentes LNE. [B] Quantification de la fluorescence après dissection des organes, 24 h après injection.

dans le foie semble être plus importante après 1h30. La biodistribution est homogène avec une faible accumulation hépatique à 24h et une accumulation dans les ganglions lymphatiques.

Entre 5h et 24h, les particules sont fortement éliminées. La fluorescence quantifiée dans l'ensemble des organes diminue d'un facteur 2. Les particules présentent des profils de biodistribution comparables, avec des variations quantitatives essentiellement au niveau du foie. En effet, l'accumulation hépatique a tendance à diminuer lorsque la taille des particules augmente alors que l'on pourrait s'attendre au phénomène inverse au vu des données de la littérature, c'est-à-dire une augmentation de l'accumulation avec l'augmentation de la taille des particules. La distribution est similaire pour les autres organes, quelle que soit la taille de la LNC-solutol. Ces particules présentent peu d'affinité pour la tumeur, mais elles ont une forte affinité pour les ganglions lymphatiques.

En résumé, lorsque la taille des LNC-solutol augmente, l'accumulation cellulaire non spécifique augmente, ainsi que l'activation du complément. La captation hépatique diminue. A 24h post injection, l'accumulation hépatique varie en fonction de la taille des LNC, alors que l'accumulation dans les ganglions lymphatiques reste constante quelle que soit leur taille.

Pour les LNE-PEG1800 de 30 nm, un très fort signal est observé sur l'ensemble de la souris avec une accumulation très importante dans la peau (3 fois supérieure à celles obtenue avec les LNC de 20nm), qui est retrouvée avec les quantifications des organes réalisées à 5h et 24h (Figure 66). Un fort signal (3 fois supérieur à celui des LNC de 20nm) est également retrouvé dans les intestins. Il augmente au cours du temps alors que le signal dans le foie diminue, ce qui est en faveur d'une élimination hépato-biliaire. De plus, un marquage de la tumeur est observé à 5h et 24h (environ trois fois plus important que celui de la majorité des organes), de même qu'un marquage des ganglions lymphatiques, qui est constant entre 5h et 24h après injection.

Les LNE-PEG1800 de 50 nm ont une biodistribution légèrement différente des particules de 30 nm, avec une accumulation hépatique prédominante, à peu près constante de 1h30 à 5h et suivie d'une élimination à 24h. Ces données sont confirmées par les quantifications de fluorescence réalisées sur les organes 5h et 24h après injection. La biodistribution est homogène avec un signal équivalent dans le foie, l'intestin et les ganglions lymphatiques (6 fois plus important que dans la plupart des organes), mais également dans la tumeur (2 fois plus important). Le signal quantifié dans la tumeur reste constant entre 5h et 24h. Pour les

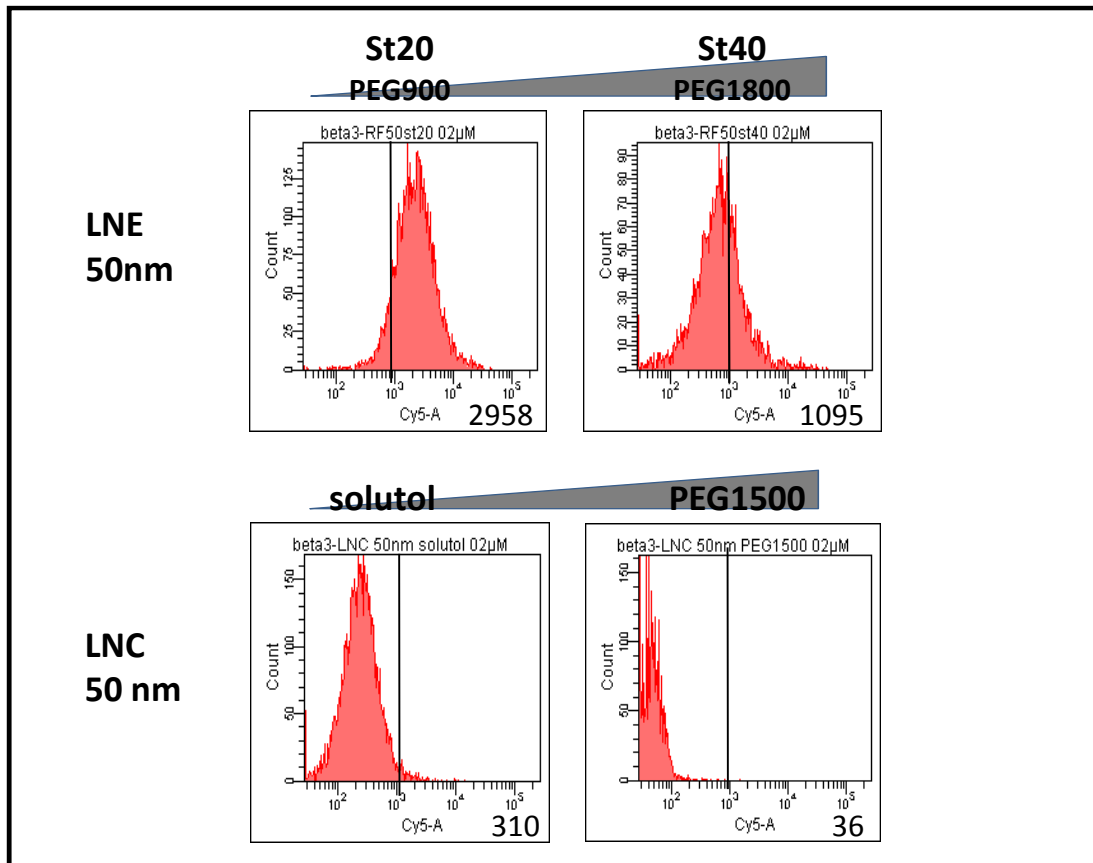


Figure 67. Influence de la fonctionnalisation de surface des LNE et des LNC sur leur internalisation cellulaire *in vitro*.

L'analyse de l'interaction des nanoparticules avec les cellules HEK293(β 3) est réalisée par cytométrie en flux après 1 heure d'incubation à 37°C.

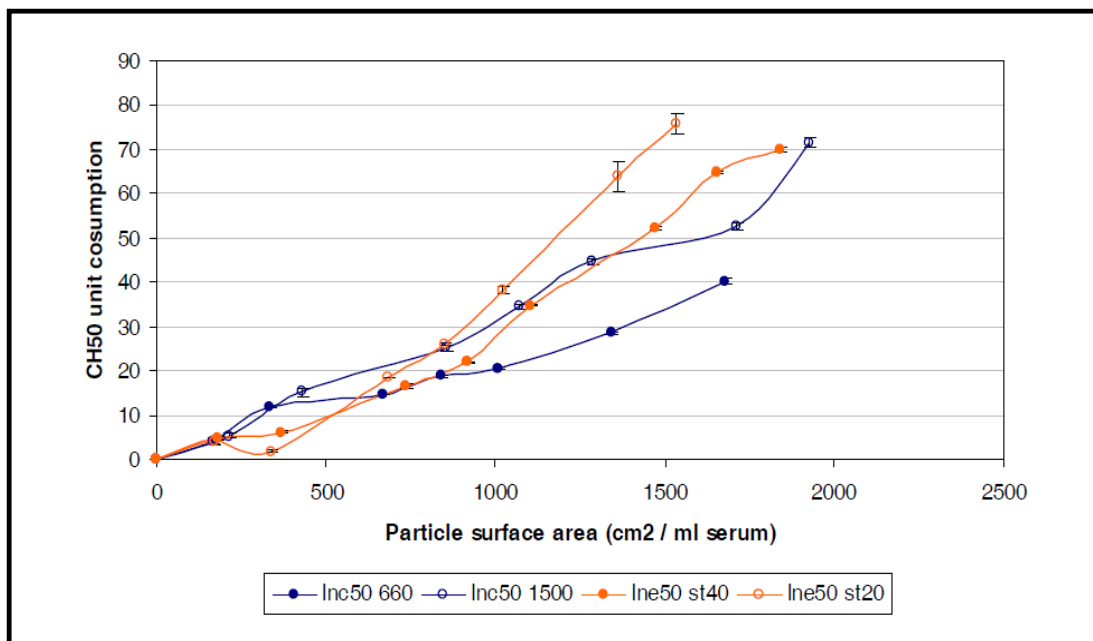


Figure 68. Influence de la fonctionnalisation de surface des LNE et des LNC sur l'activation du complément

autres organes, la répartition à 24h est homogène et les particules sont éliminées entre 5h et 24h, la fluorescence diminue d'un facteur 2. L'accumulation des LNE-PEG1800 dans les ganglions lymphatiques augmente (d'un quart) au cours du temps.

La biodistribution des LNE-PEG1800 de 100 nm est comparable à celle des LNE-PEG1800 de 50 nm : un signal diffus est observé sur la souris en corps entier avec une accumulation hépatique constante entre 1h30 et 5h, suivie d'une élimination à 24h. Cette élimination est hépato-biliaire, avec une diminution du signal dans le foie entre 5h et 24h et un signal dans les intestins qui reste constant. La biodistribution dans les organes est homogène avec une accumulation équivalente dans le foie, les ganglions lymphatiques et les intestins, 5 à 6 fois supérieure celle observée dans les autres organes. La fluorescence détectée dans la tumeur est équivalente à celle détectée dans l'ensemble des organes.

*En résumé, lorsque la taille des **LNE-PEG1800** augmente, l'internalisation cellulaire non spécifique augmente, ainsi que l'activation du complément. In vivo, la diffusion dans les tissus diminue, ainsi que l'élimination hépato-biliaire, qui est plus importante pour les particules de petite taille. A 24h, l'accumulation des particules est observée dans les intestins, la peau, le foie et les ganglions lymphatiques. A l'inverse des LNC, la taille des LNE n'influence pas l'accumulation hépatique, qui est constante. Les particules de petite taille présentent plus d'affinité pour les tumeurs que celles de grande taille. Cette tendance est également retrouvée pour l'accumulation dans les ganglions lymphatiques.*

L'interaction cellules/particules lipidiques et la biodistribution des LNE et des LNC sont donc influencées par la taille des particules.

3.3. Influence de la fonctionnalisation de surface

Dans un second temps, l'influence de la fonctionnalisation de surface a été évaluée pour des particules lipidiques de 50 nm. Deux tailles de PEG ont été testées pour chaque type de nanoparticules : PEG900 et PEG1800 pour les LNE, solutol (équivalent de PEG660) et PEG1500 pour les LNC.

Pour les LNE de 50 nm, alors que la taille du PEG augmente, les interactions avec les cellules diminuent. En cytométrie en flux, la moyenne de fluorescence des cellules est trois fois plus faible pour les LNE-PEG1800 que pour les LNE-PEG900 (Figure 67). L'activation du complément varie peu (Figure 68). Des résultats similaires sont observés pour les LNC-solutol de 50 nm,

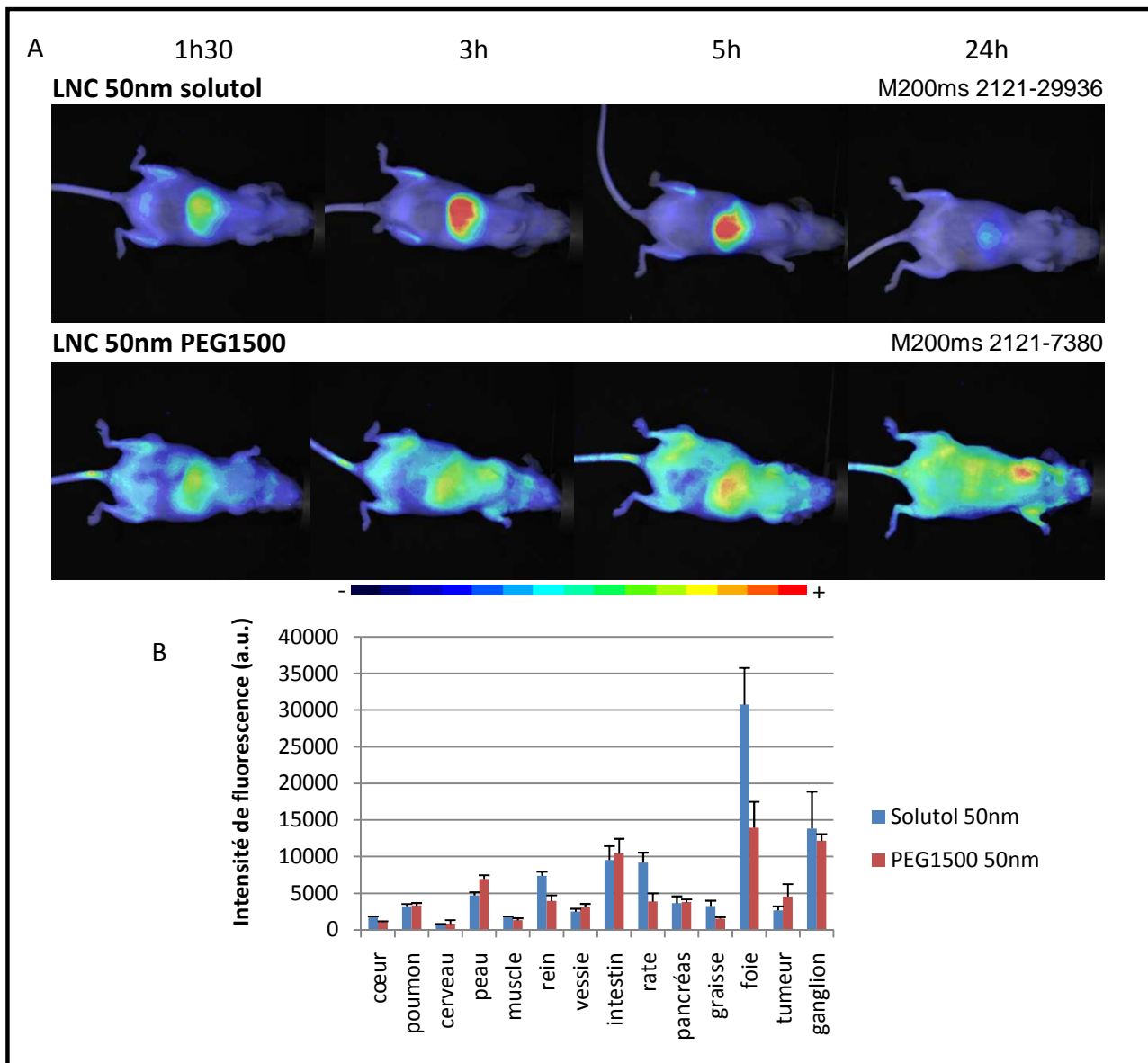


Figure 69. Influence de la fonctionnalisation de surface des LNC de 50 nm sur la biodistribution *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xéno greffe sous-cutanée de cellules HEK293(β 3), sont injectées par voie intra-veineuse par 200 μ l d'une suspension de LNC (50 μ M en DiD).

[A] Cinétique de biodistribution des différentes LNC. [B] Quantification de la fluorescence après dissection des organes, 24 h après injection.

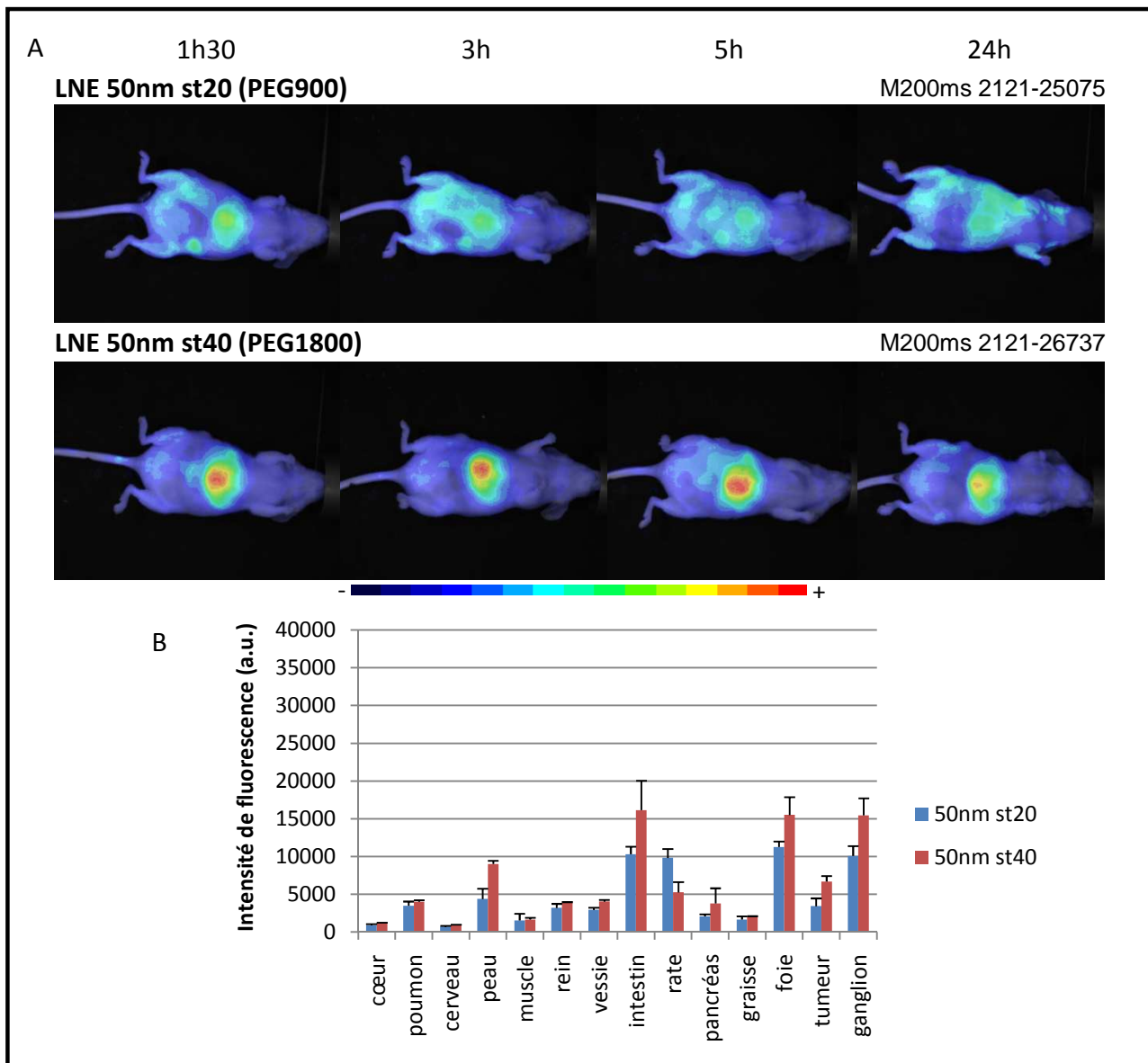


Figure 70. Influence de la fonctionnalisation de surface des LNE de 50 nm sur la biodistribution *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xélogreffe sous-cutanée de cellules HEK293(β 3), sont injectées par voie intra-veineuse par 200 μ l d'une suspension de LNE (50 μ M en DiD).

[A] Cinétique de biodistribution des différentes LNE. [B] Quantification de la fluorescence après dissection des organes, 24 h après injection.

avec une moyenne de fluorescence passant de 310 pour les LNC-solutol à 36 pour les LNC-PEG1500.

Les modifications de l'activation du complément semblent plus liées aux variations de la taille des particules plutôt qu'aux variations de la fonctionnalisation de surface.

Les résultats de biodistribution obtenus pour les LNC de 50 nm sont les suivants : comme précédemment décrits, les LNC-solutol de 50 nm présentent une accumulation hépatique qui augmente jusqu'à 3h, reste constante entre 3h et 5h puis diminue jusqu'à 24h (Figure 69). Après dissection à 24h, la biodistribution est homogène avec une accumulation hépatique et une accumulation dans les ganglions lymphatiques, les intestins, la rate, le rein et les os.

Les LNC-PEG1500 de 50 nm ont une biodistribution légèrement différente. Le signal observé sur la souris en corps entier est plus diffus, mais une accumulation hépatique est également visualisée. Cet aspect diffus reste constant jusqu'à 24h après injection. Après dissection, une accumulation est retrouvée dans le foie, les ganglions lymphatiques et les intestins, avec une fluorescence 4 à 5 fois plus importante que dans l'ensemble des autres organes, pour lesquels la biodistribution est homogène. La fluorescence quantifiée dans la tumeur est comparable à celle de la majorité des organes. De plus, le marquage osseux n'est pas visualisé avec les LNC-PEG1500.

En résumé, pour les LNC, lorsque la taille des PEG augmente, l'interaction cellulaire non spécifique diminue, alors que l'activation du complément varie peu. La captation hépatique et splénique diminue d'un facteur deux. A l'inverse, l'accumulation tumorale est deux fois plus importante pour les LNC-PEG1500, même si elle demeure très modeste.

De plus, il est intéressant de noter que pour les LNC-solutol, le signal diminue dans le foie mais n'augmente pas dans les intestins, ce qui pourrait être le signe de la perte de la fluorescence du DiD une fois que les LNC sont dégradés.

Pour les LNE-PEG900, un signal diffus et constant jusqu'à 24h est observé dans l'ensemble de la souris (Figure 70). Il est accompagné d'une accumulation hépatique, stable au cours du temps. La biodistribution est homogène avec une accumulation dans le foie, les intestins, les ganglions lymphatiques et la rate (signal fluorescent 2 à 3 fois plus important que pour les autres organes). L'élimination des LNE se fait très probablement par voie hépato-biliaire.

Les LNE-PEG1800 présentent, comme précédemment décrits, une accumulation hépatique stable entre 1h30 et 5h, suivie d'une élimination à 24h. La biodistribution à 24h post injection

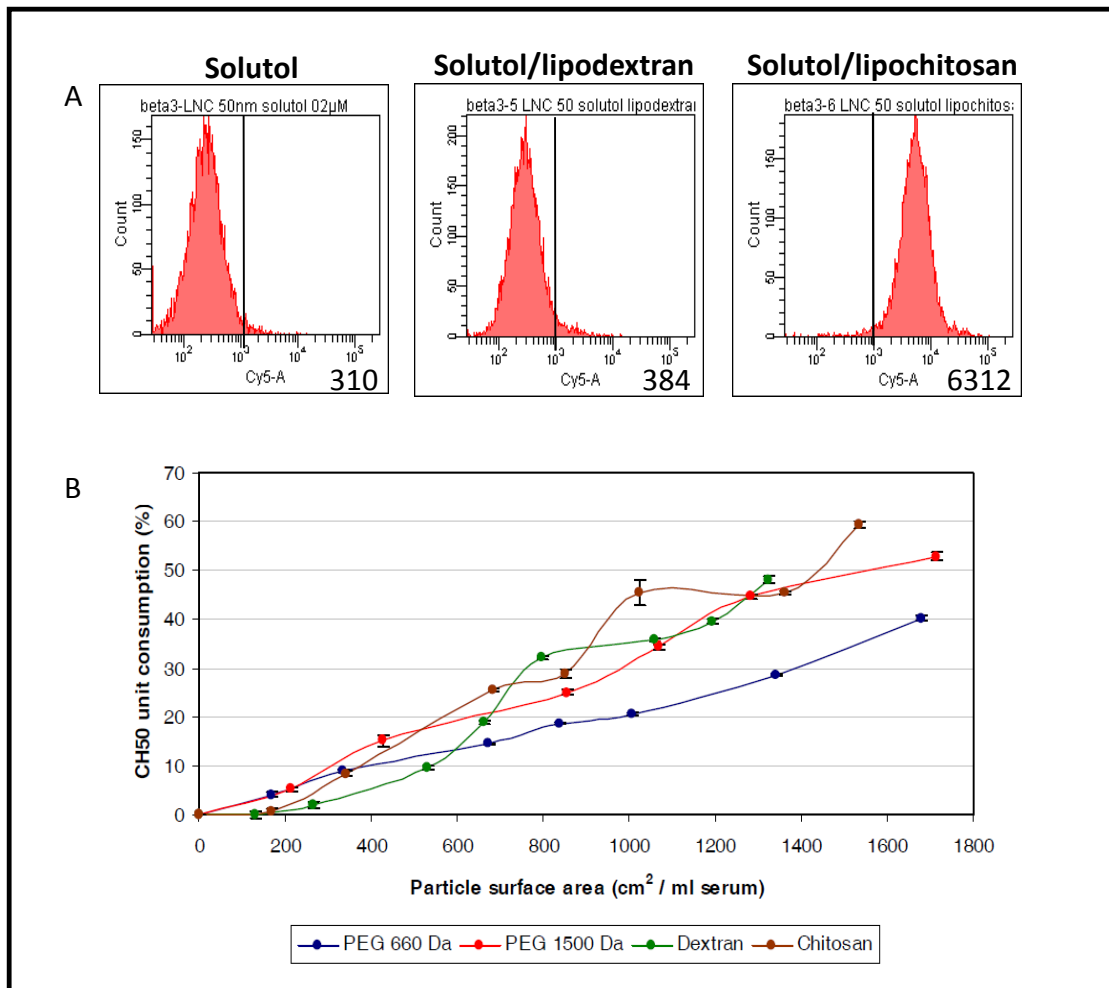


Figure 71. Influence de l'ajout de lipodextran ou de lipochitosan en surface des LNE de 50 nm sur leur comportement *in vitro*.

[A] Influence sur l'internalisation cellulaire *in vitro*. L'analyse de l'interaction des nanoparticules avec les cellules HEK293(β 3) est réalisée par cytométrie en flux après 1 heure d'incubation à 37°C.

[B] Influence sur l'activation du complément.

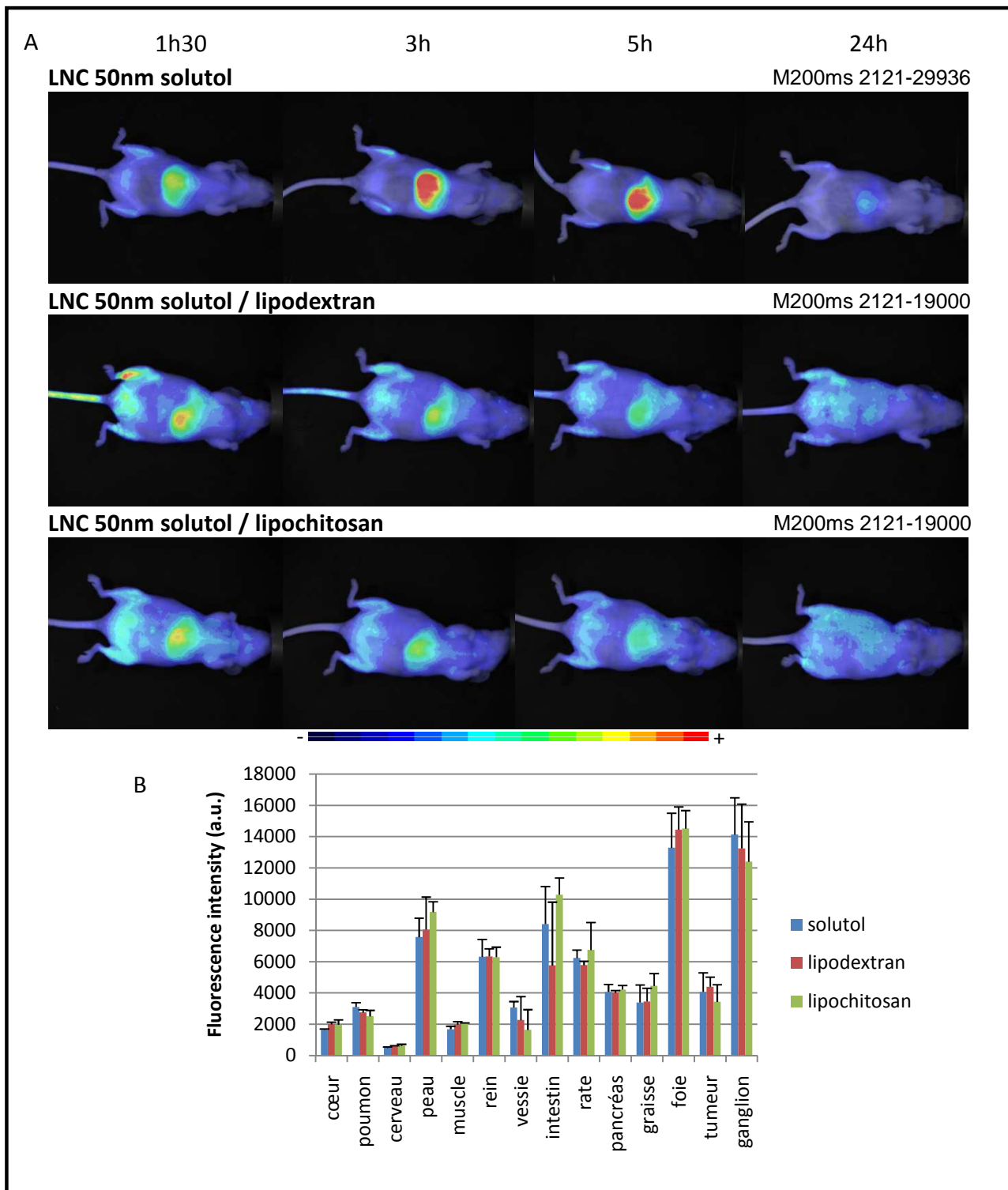


Figure 72. Influence de l'ajout de lipodextran ou de lipochitosan en surface des LNC de 50 nm sur la biodistribution *in vivo*.

Les souris, porteuses d'une xéno greffe sous-cutanée de cellules HEK293(β 3), sont injectées par voie intra-veineuse par 200 μ l d'une suspension de LNC (50 μ M en DiD).

[A] Cinétique de biodistribution des différentes LNC. [B] Quantification de la fluorescence après dissection des organes, 24 h après injection.

est homogène avec une accumulation dans le foie, les ganglions lymphatiques et les intestins, et dans une moindre mesure, dans la peau et la tumeur. Les particules sont éliminées entre 5h et 24h, à part dans les ganglions lymphatiques pour lesquels le signal augmente.

En résumé, pour les LNE, quand la taille des PEG augmente, les interactions cellulaires non spécifiques diminuent et l'activation du complément varie peu. L'élimination hépato-biliaire est favorisée, ainsi que l'accumulation dans la tumeur et les ganglions lymphatiques.

L'effet de la taille des PEG sur la captation hépatique semble plus important pour les LNC que pour les LNE.

Pour les LNC de 50 nm, nous avons également évalué l'influence d'autres polymères que le PEG, tels le lipodextran ou le lipochitosan (en mélange avec le solutol) sur leur biodistribution.

In vitro, l'ajout du lipodextran dans la formulation n'a pas d'influence sur l'interaction avec les cellules, qui est identique à celle obtenue avec les LNC-solutol (Figure 71). A l'inverse, l'ajout de lipochitosan augmente de manière très importante l'internalisation non spécifique des particules lipidiques avec les cellules. Ceci pourrait être dû au fait que les tests d'interaction *in vitro* ont été réalisés avec des cellules épithéliales qui auraient une certaine affinité pour le chitosan.

En revanche, l'activation du complément varie peu quelque soit la taille du PEG ou la nature de la fonctionnalisation, et donc sa charge (solutol ($p\zeta = -5$ mV), PEG1500 ($p\zeta = -4$ mV), lipodextran ($p\zeta = -2$ mV) ou lipochitosan ($p\zeta = +31$ mV)) (Figure 71).

In vivo, les biodistributions des LNC solutol, solutol/lipodextran et solutol/lipochitosan sont comparables (Figure 72). Les particules diffusent dans l'ensemble de la souris et présentent une accumulation hépatique, qui diminue au cours du temps. 24h après injection, les quantifications de la fluorescence dans les organes sont similaires pour les différents nanocargos lipidiques. La biodistribution est homogène avec une accumulation principalement dans le foie et les ganglions lymphatiques, mais également dans les intestins (signe d'une élimination hépato-biliaire), la peau et les reins.

L'ensemble de ces particules lipidiques présente un fort tropisme pour les ganglions lymphatiques, avec une accumulation qui augmente au cours du temps. La fluorescence des ganglions augmente d'un facteur 4 entre 5h et 24h.

En résumé, à l'exception des LNC solutol/lipochitosan qui présentent une forte interaction avec les cellules in vitro, l'ajout de lipodextran ou de lipochitosan à la surface des LNC solutol ne modifie ni l'activation du complément, ni la biodistribution in vivo. Ce comportement comparable pourrait être du à une dissociation rapide du lipodextran et du lipochitosan de la surface de la particule, notamment après injection intra-veineuse.

Dans cette étude, les résultats obtenus pour les **LNC-solutol** montrent que ces particules présentent une biodistribution globalement homogène chez la souris avec une accumulation prédominante dans le foie, les os et les ganglions lymphatiques. L'accumulation hépatique est inversement proportionnelle à la taille des particules à savoir que les plus petites sont plus accumulées que celles de plus grande taille. Aucune accumulation tumorale n'est détectée quelle que soit leur taille. En revanche, lorsque le solutol est remplacé par du PEG1500, l'accumulation tumorale augmente d'un facteur 2. De plus, l'accumulation hépatique est moindre, mais elle est fonction de la taille des particules. Toutes les LNC testées présentent une bonne affinité pour les ganglions lymphatiques.

En ce qui concerne les **LNE**, qu'elles soient fonctionnalisées avec un PEG 900 ou 1500, et quelle que soit leur taille, elles ont une biodistribution homogène avec une accumulation tumorale relativement faible, mais supérieure à celle observée pour les LNC, et sont toujours circulantes à 24h. Les LNE présentent une bonne affinité pour les tumeurs et les ganglions lymphatiques.

En conclusion, pour qu'une particule présente une biodistribution satisfaisante, c'est-à-dire que qu'elle se distribue dans l'ensemble de l'organisme après injection, qu'elle présente un temps de circulation suffisamment long et qu'elle s'accumule de manière passive dans les tumeurs par effet EPR, elle doit être de petite taille (20 à 50 nm) et être fonctionnalisée avec un PEG de grande taille.

Ces paramètres étant réunis, les particules lipidiques devront ensuite être fonctionnalisées par des peptides spécifiques de récepteurs tumoraux afin d'aboutir à un ciblage actif des tumeurs *in vivo*.

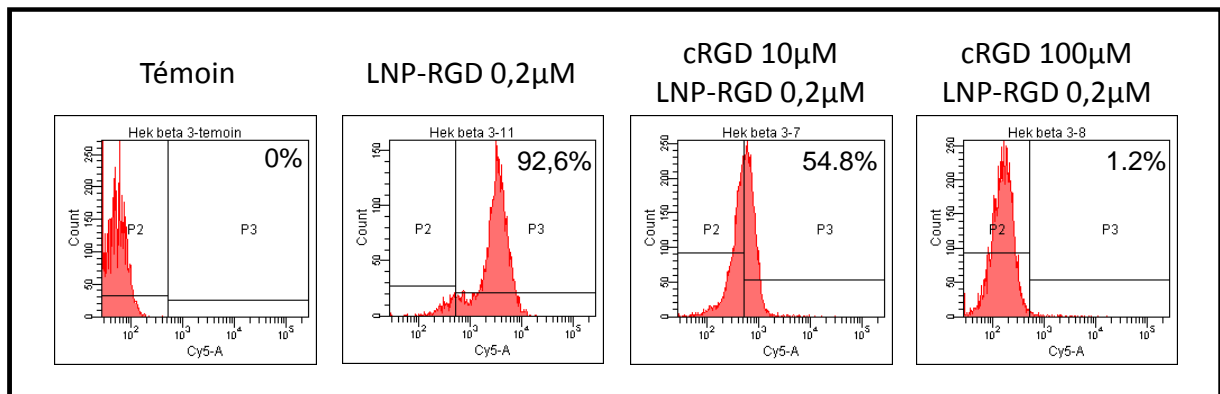


Figure 73. Expérience de compétition de la fixation des LNP-cRGD sur les cellules HEK293(β3).

Les cellules HEK293(β3) sont incubées avec 10 ou 100 μM de cRGD libre pendant 5 minutes avant incubation avec les LNP-cRGD (0,2 μM en DiD). Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux.

3.4. Vers des particules ciblantes

Selon leur taille et leur fonctionnalisation de surface les LNE (= LNP) et les LNC ont plus ou moins la capacité de s'accumuler de manière passive dans les tumeurs par effet EPR. Dans le but d'obtenir un ciblage spécifique des tumeurs *in vivo*, l'introduction de PEG-maléimide dans la formulation a permis la fonctionnalisation de ces particules avec des ligands spécifiques, tel le -cRGD. Les résultats obtenus avec les LNP-cRGD ont fait l'objet d'une publication dans *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* en 2010 dans laquelle je suis en co-premier auteur.

3.4.1. Présentation de l'étude et principaux résultats

Le but de cette étude était d'étudier la fonctionnalité et la spécificité du -cRGD après greffage sur des LNP, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Les LNP ont été synthétisées par Mathieu Goutayer (CEA-LETI de Grenoble, dans l'équipe d'Isabelle Texier-Nogues).

La fonctionnalisation des LNP par le -cRGD a tout d'abord été évaluée *in vitro*. Trois particules ont été testées : les LNP-cRGD, les LNP-cRAD (le -cRAD est le peptide contrôle) et les LNP-OH non fonctionnalisées. Les tests de ciblage et d'internalisation ont été réalisés par cytométrie en flux et microscopie de fluorescence sur deux lignées cellulaires : les HEK293(β_3) qui sur-expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les HEK293(β_1) qui sont utilisées comme contrôle négatif et expriment une intégrine proche ($\alpha_v\beta_1$), mais qui ne reconnaît pas efficacement le motif -cRGD que nous utilisons.

Les résultats obtenus pour les HEK293(β_3) sont résumés dans la Figure 2 de l'article. L'incubation à 4°C permet l'étude du ciblage spécifique alors que l'incubation à 37°C renseigne sur l'internalisation des particules. Les expériences de cytométrie en flux et de microscopie mettent en évidence un ciblage spécifique des LNP-cRGD, en comparaison aux LNP-cRAD ou aux LNP-OH, après 15 minutes d'incubation à 4°C. Cette interaction spécifique avec les HEK293(β_3) conduit à l'internalisation des LNP-cRGD après 1h d'incubation à 37°C, certainement par la voie endosomale. De plus, une pré-saturation des cellules par 10 μM ou 100 μM de cRGD libre 5 minutes avant incubation avec les LNP-cRGD inhibe la fixation des particules de façon dose-dépendante (Figure 73).

Les résultats obtenus sont similaires en absence ou en présence de SVF dans le milieu d'incubation, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'interaction non spécifique entre les LNP et les

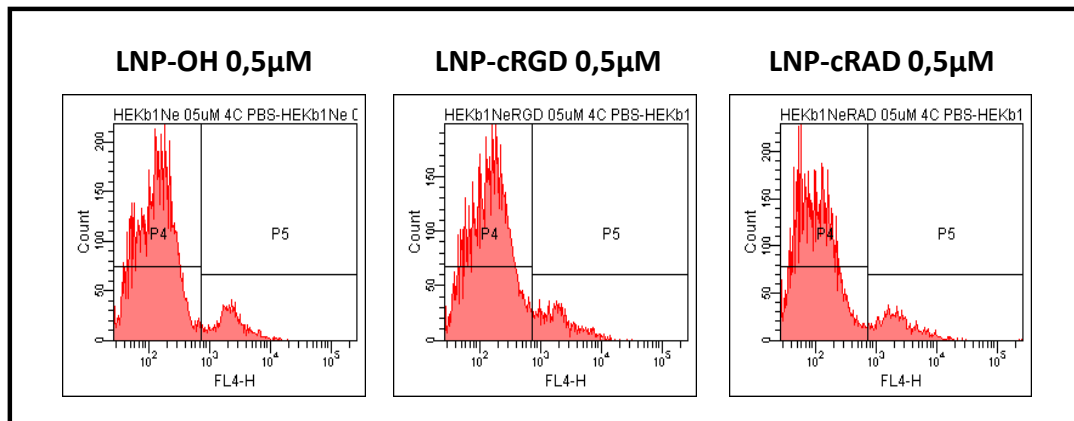


Figure 74. Interaction des LNP (-OH, -cRGD et -cRAD) avec les cellules HEK293(β 1) *in vitro*.

Les cellules HEK293(β 1) sont incubées avec les différentes LNP (0,5 μ M en DiD) pendant 1h à 37°C. Elles sont ensuite analysées par cytométrie en flux

protéines du sérum. La densité de PEG utilisée semble suffisante pour éviter les interactions avec les protéines du sérum.

Enfin, les expériences réalisées sur les HEK293(β 1) ne montrent pas de marquage des cellules, quelle que soit la particule utilisée, ce qui confirme la spécificité de ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les LNP-cRGD (Figure 74).

Dans un second temps, le comportement des LNP-cRGD a été évalué *in vivo* sur un modèle de souris *nude* xéno greffée avec des cellules HEK293(β 3) en sous-cutané. De la même manière que pour les tests *in vitro*, une accumulation active est observée dans les tumeurs pour les LNP-cRGD en comparaison aux LNP-OH (Figure 3 de l'article). Le maximum de signal fluorescent dans la tumeur est obtenu 24h après injection IV, avec un ratio tumeur/peau de 1.56 +/- 0.07 versus 1.18 +/- 0.09 pour les LNP-OH. D'autre part, pour les LNP-cRAD, le ratio tumeur/peau est de 1.37 +/- 0.09, alors qu'aucun ciblage ou internalisation n'a été détectable *in vitro*. Le greffage d'un peptide (-cRGD ou -cRAD) améliore la biodistribution et plus modestement l'accumulation passive dans les tumeurs, en comparaison aux LNP-OH. Cependant les résultats obtenus sont en faveur d'une accumulation tumorale faible avec les LNP-cRGD.

Le devenir des LNP-cRGD a également été testé dans un second modèle *in vivo* : TS/A-pc. Dans ce modèle tumoral à croissance rapide, l'accumulation tumorale est identique quelque soit la fonctionnalisation de la particule (Figure 4 de l'article). Les ratios tumeur/peau obtenus 24h après injection sont de 2.60 +/- 0.48 pour les LNP-cRGD, 2.40 +/- 0.13 pour les LNP-cRAD et de 2.61 +/- 0.21 pour les LNP-OH. L'observation des organes après dissection confirme l'absence de différences de ciblage entre les trois fonctionnalisations. D'une manière générale, la biodistribution de ces particules est homogène et similaire quelle que soit la fonctionnalisation. Une accumulation est observée dans le foie et les intestins, ce qui est en faveur d'une élimination hépato-biliaire. De plus, la persistance du signal fluorescent dans le plasma 24h après injection est en faveur de particules ayant un long temps de circulation.

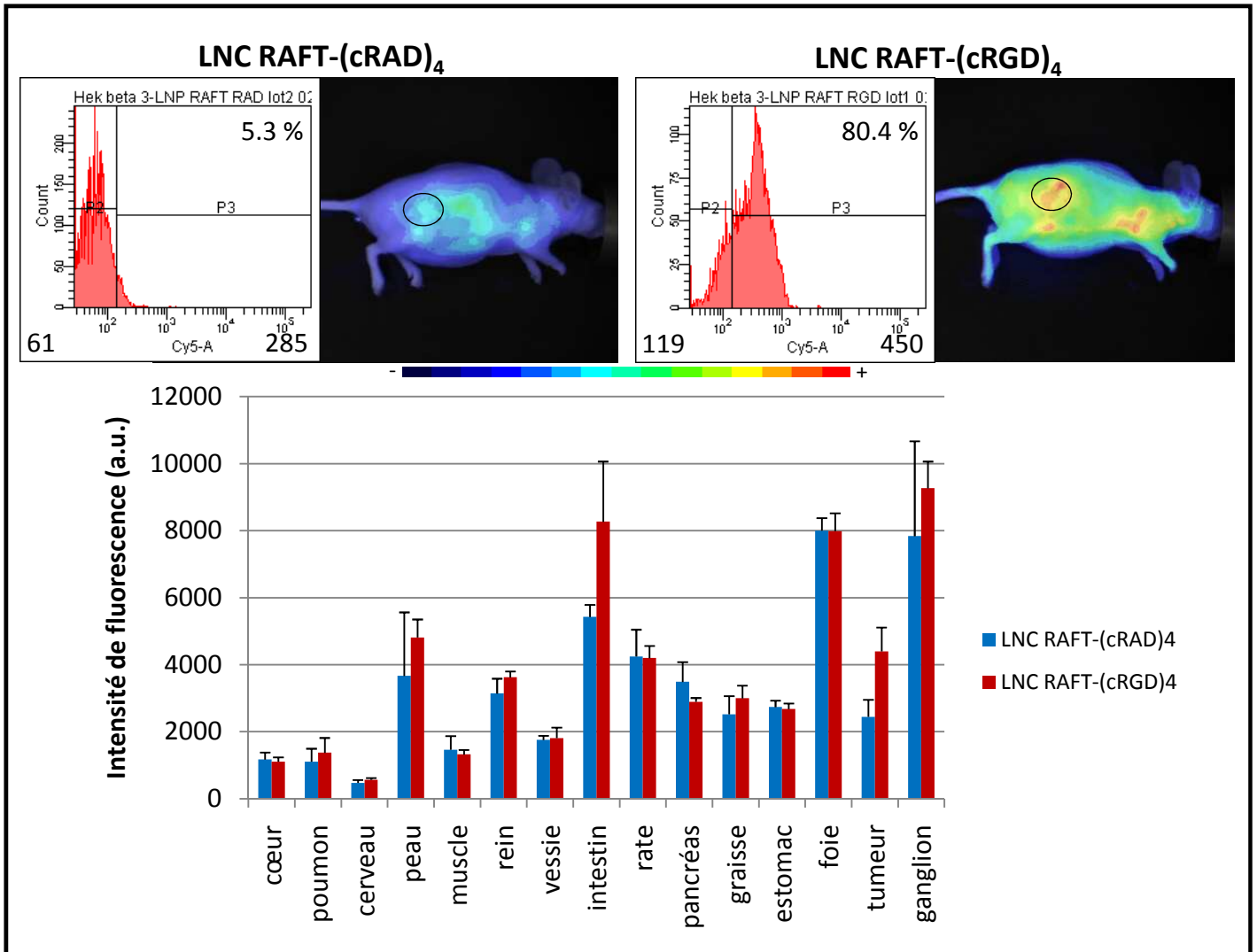


Figure 75. Interaction des LNC-RAFT-(cRGD)₄ et des LNC-RAFT-(cRAD)₄ *in vitro* et biodistribution *in vivo*.

Les LNC sont incubées 15 minutes à 4°C en présence de cellules HEK293(β3). L'analyse du ciblage est réalisée par cytométrie en flux. Les souris, porteuses d'une xéno greffe sous-cutanée de HEK293(β3), sont injectées par voie intra-veineuse par 200 μl d'une solution de LNC-RAFT-(cRGD)₄ ou de LNC-RAFT-(cRAD)₄ (50 μM en DiD). Les images des souris illustrent la biodistribution des nanoparticules 24 h après injection (M500ms 2121-18757). Les quantifications ont été réalisées après dissection des organes, 24 h post injection.

3.4.2. Article 4

Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by *in vivo* fluorescence imaging.

Goutayer M.* and **Dufort S.***, Josserand V., Royere A., Heinrich E., Vinet F., Bibette J., Coll J-L., Texier I.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2010 Jun ; 75 (2) : 137-47.

*co-premiers auteurs

3.4.3. Conclusions

En conclusion, ces particules répondent aux différentes spécifications nécessaires aux applications *in vivo*. Elles sont constituées d'éléments approuvés par la FDA, elles présentent une forte stabilité colloïdale, une petite taille (35 nm) et une bonne fonctionnalisation de surface. De plus, elles peuvent être fonctionnalisées par des ligands spécifiques, tel de -cRGD, qui restent fonctionnels après greffage, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant ce ciblage doit encore être amélioré, notamment en augmentant la quantité de -cRGD greffé à la surface des particules ou en greffant du RAFT-(cRGD)₄.

Les premiers résultats obtenus avec le greffage du RAFT-(cRGD)₄ sur des LNC-solutol sont encourageants mais doivent être améliorés. *In vitro*, l'analyse par cytométrie en flux montre un marquage spécifique des cellules HEK293(β3) par les LNC-RAFT-(cRGD)₄, aucun marquage n'étant détecté pour les LNC-RAFT-(cRAD)₄ (Figure 67). *In vivo*, les biodistributions des deux particules sont similaires, la seule différence est une accumulation plus importante (d'un facteur 2) des LNC-RAFT-(cRGD)₄ dans les tumeurs 24h après injection (Figure 75).

**Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles :
Assessment by *in vivo* fluorescence imaging.**

Goutayer M* and **Dufort S***, Josserand V, Royere A, Heinrich E, Vinet F, Bibette J, Coll JL,
Texier I.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,

2010 Jun;75(2):137-47



Research paper

Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by *in vivo* fluorescence imaging

Mathieu Goutayer^{a,1,2}, Sandrine Dufort^{b,c,1}, Véronique Josserand^b, Audrey Royère^d, Emilie Heinrich^a, Françoise Vinet^a, Jérôme Bibette^d, Jean-Luc Coll^b, Isabelle Texier^{a,*}

^aCEA, LETI-DTBS, Grenoble cedex, France

^bINSERM U823, Institut Albert Bonniot, La Tronche, France

^cUF Cancérologie Biologique et Biothérapie, CHU de Grenoble, La Tronche, France

^dLaboratoire des Colloïdes et Matériaux divisés, ESPCI, Paris cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 October 2009

Accepted in revised form 3 February 2010

Available online 10 February 2010

Keywords:

Lipid nanoparticles

cRGD functionalization

Fluorescence imaging

Cellular targeting

In vivo targeting

Tumor nanoparticle uptake

ABSTRACT

Lipid nanoparticles (LNP) coated by a poly(oxyethylene) polymer have been manufactured from low cost and human use-approved materials, by an easy, robust, and up-scalable process. The incorporation in the formulation of maleimide-grafted surfactants allows the functionalization of the lipid cargos by targeting ligands such as the cRGD peptide binding to $\alpha_v\beta_3$ integrin, a well-known angiogenesis biomarker. LNP are able to encapsulate efficiently lipophilic molecules such as a fluorescent dye, allowing their *in vivo* tracking using fluorescence imaging. *In vitro* study on HEK293(β_3) cells over-expressing the $\alpha_v\beta_3$ integrins demonstrates the functionalization, specific targeting, and internalization of cRGD-functionalized LNP in comparison with LNP-cRAD or LNP-OH used as negative controls. Following their intravenous injection in *Nude* mice, LNP-cRGD can accumulate actively in slow-growing HEK293(β_3) cancer xenografts, leading to tumor over skin fluorescence ratio of 1.53 ± 0.07 ($n = 3$) 24 h after injection. In another fast-growing tumor model (TS/A-pc), tumor over skin fluorescence ratio is improved (2.60 ± 0.48 , $n = 3$), but specificity between the different LNP functionalizations is no more observed. The different results obtained for the two tumor models are discussed in terms of active cRGD targeting and/or passive nanoparticle accumulation due to the Enhanced Permeability and Retention effect.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of effective cancer chemotherapy drugs is mainly hindered by their low aqueous solubility, which complicates their administration, and their high toxicity, necessary in regards to cancer cells but detrimental and the origin of severe side effects for healthy tissues. A wide range of pharmaceutical nanocarriers, such as polymeric or lipid nanoparticles or micelles [1–3] and even inorganic nanoparticles [4], have been screened for reducing the administrated doses and enhancing the *in vivo* accumulation of therapeutic agents into the areas to be cured. Polymeric nanomaterials are very often composed of FDA-approved biodegradable polymers, such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid)

(PGA), and poly(ϵ -caprolactone) (PCL). However, their structure and therefore their synthesis process have to be tailored for each specific application. Lipid materials are more versatile and present the advantage of a lower intrinsic toxicity, because of their compositions similar or close to those of physiological lipids.

Numerous lipid nanocarriers with different structures have been studied for therapy or imaging [5–7]: micelles [8], lipoproteins [9,10], liposomes [11], micro-emulsions [12] and nanoemulsions [13,14], solid-lipid nanoparticles (SLN) [6,15,16] and nanocapsules [17]. Because of the limited size of their core, micelles cannot store high drug payload. Lipoproteins must be isolated from fresh plasma or designed from synthetic peptides [18]. Due to their phospholipid bilayer and hydrophilic cavity, liposomes display outstanding properties for the encapsulation of hydrophilic/amphiphilic therapeutic agents. However, they are not optimized for the encapsulation of high concentrations of lipophilic drugs. They are not stable enough for being stored in injection-ready formulations for long durations, and their use usually requires the reconstitution of the solution just before injection to the patient. Lipid core nanocarriers present the advantage of a higher volume reservoir for lipophilic drug encapsulation. Nanocapsules have a liquid-lipid core encapsulated within a solid

* Corresponding author. CEA, LETI-DTBS, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France. Tel.: +33 438 784 670; fax: +33 438 785 787.

E-mail addresses: mathieu.goutayer@gmail.com (M. Goutayer), SDufort@chu-grenoble.fr (S. Dufort), veronique.josserand@ujf-grenoble.fr (V. Josserand), Audrey.Royere@espci.fr (A. Royère), emilie.heinrich@cea.fr (E. Heinrich), francoise.vinet@cea.fr (F. Vinet), Jerome.Bibette@espci.fr (J. Bibette), jean-luc.coll@ujf-grenoble.fr (J.-L. Coll), isabelle.texier-nogues@cea.fr (I. Texier).

¹ These authors contributed equally to the work.

² Present address: Capsum, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 5, France.

polymeric or phospholipid shell [17]. Micro-emulsions (self-assembled, thermodynamically stable) [12] and nanoemulsions (thermodynamically unstable, requiring energy for their processing) [13,14] have a liquid core, whereas solid-lipid nanoparticles (SLN) have in principle a solid one [6,15,16]. However, the frontiers between the different categories of lipid particles are not so well defined. As an example, super-cooled liquid state has been observed in different SLN formulations. The solid crystalline core of SLN can present several drawbacks, such as problems of reproducibility in the particle growth, possibility of polymorphic transitions, which can induce drug expulsion during storage, and low drug incorporation capacities due to the crystalline structure [19]. Therefore, the concept of “nanostructured” lipid carriers has been introduced by Müller et al. [5]. The idea is to obtain lipid nanoparticles with a solid but not crystalline core, in order to improve the efficiency and stability of drug encapsulation.

In this manuscript, we report the design and *in vivo* bio-distribution of new lipid nanoparticles (LNP), which lipid core is composed of a mixture of oil and wax, solid at room temperature for improved stability and liquid at body temperature (≈ 37 – 40 °C melting point). The core of the LNP therefore provides a reservoir suitable for the encapsulation and controlled release of lipophilic drugs and molecules. In order to demonstrate the potential of these new nanocarriers and to assess their *in vivo* fate, whole body non-invasive fluorescence imaging (FLI) in mice is used. We have recently reported the efficient loading of a lipophilic near infrared dye, DiD, within the lipid core of the LNP and the benefits of encapsulation on the dye properties (improved fluorescence quantum yield and reduced photobleaching) [20]. FLI now allows to scan in real time the bio-distribution of near infrared dye-labeled molecules (μM payloads) in whole body live mice in a few seconds with a few millimeters resolution [21–23]. FLI is a fast, low cost, sensitive, non-ionizing, non-invasive, and easy-handled screening technique.

Using DiD-loaded nanoparticles, the bio-distribution of LNP decorated by the cRGD peptide able to target $\alpha_v\beta_3$ integrins has therefore been studied *in vivo* in two mice models using the FLI technique. The functionalization of nanocargos in order to improve their vectorization and targeting properties has been a major issue explored to improve therapy and diagnostics efficiencies in the last three decades [1–3]. $\alpha_v\beta_3$ Integrins are receptors over-expressed on the angiogenic vessels grown during tumor development [24,25]. Moreover, these membrane receptors are also expressed in 25% of human cancer cells of different types (melanoma, glioblastoma, ovarian, breast cancer) [24,25]. They therefore constitute targets of choice for favoring the specific binding and uptake in malignant cells of nanoparticles loaded with a drug or contrast agent. The well-known triad peptide sequence RGD (Arg-Gly-Asp), which recognizes the $\alpha_v\beta_3$ integrins has been identified 20 years ago [26], and its cyclic form c[-RGDfK-] designed from the peptides developed by Kessler's group provides easy conjugation to imaging and/or therapeutic moieties [24,27,28]. Grafting onto the LNP of the cRGD targeting ligand, the cRAD peptide negative control or a non-targeting -OH group is hereafter assessed by *in vitro* test on HEK293(β_3) cultured cells, before the functionalized LNP are injected intravenously in two mice models, HEK293(β_3) and TS/A-pc. The HEK293(β_3) cell line (human embryonic kidney) has been genetically modified to strongly express $\alpha_v\beta_3$ integrins and has been successfully used as a study model for a few years [29–31]. TS/A-pc (mice mammary carcinoma cells) is another model which express naturally $\alpha_v\beta_3$ integrins [32]. Whenever injected subcutaneously in a *Nude* mouse model, TS/A-pc cells will grow faster (10 days) than HEK293(β_3) cells (6 weeks) before reaching the size at which tumor imaging is performed. It is important whenever designing a new fluorescent probe or a drug delivery vector to demonstrate its potentialities in different animal models. In this study, LNP-cRGD-specific targeting is studied in

comparison with negative control LNP-cRAD and non-targeted LNP-OH in the two different mice models, HEK293(β_3) and TS/A-pc, which can be targeted using the same ligand, but differ in their growing process.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Suppocire NC™ is a kind gift from Gatéfosse (France), Mirj® 53 a kind gift from Croda Uniqema (France). The thio-acetylated peptides c(RGDfK(Ac-S-CH₂CO)) (cRGD) and c(RADfK(Ac-S-CH₂CO)) (cRAD) are purchased from Asynth service B.V. (The Netherlands). DiD is purchased from Invitrogen, soybean oil, $\text{L-}\alpha$ -lecithin and other chemical products from Sigma–Aldrich (France). The DSPE-POE₅₀₀₀-maleimide surfactant is prepared starting from distearyl phosphatidyl ethanolamine (DSPE, Sigma–Aldrich) and NHS-POE₅₀₀₀-maleimide (NHS = N-succinimidyl ester, POE = poly(ethyleneoxide), Nektar, USA). To 25 mg of distearyl phosphatidyl ethanolamine (DSPE) dissolved in 1 mL anhydrous dichloromethane are added 100 mg of NHS-POE₅₀₀₀-maleimide and 5 μL of triethylamine. The advancement of the reaction is controlled by thin layer chromatography. After 2 h stirring under argon, the solvent is evaporated under reduced pressure and the product dissolved in dichloromethane to yield a 2 mL solution that will be used directly in the functionalized formulations.

2.2. Preparation of DiD-loaded LNP

For preparation of a 2 mL dispersion batch of non-functionalized LNP, 150 mg of Suppocire® NC, 50 mg of soy bean oil, 138 mg of $\text{L-}\alpha$ lecithin, and 800 nmol of DiD (766 μg) are dissolved in 1 mL of dichloromethane and mixed at 45 °C. After homogenization, the organic solvent is evaporated under reduced pressure and the lipid phase is crudely mixed with the continuous phase composed of 228 mg of Mirj® 53, 50 mg of glycerol and NaCl 154 mM (1.38 mL). For the functionalized formulations, the compositions of both the dispersed and continuous phases are slightly modified. In this case, for the preparation of a 2 mL dispersion batch of LNP-maleimide, 150 mg of Suppocire® NC, 50 mg of soy bean oil, 138 mg of $\text{L-}\alpha$ lecithin, 49 mg of DSPE-POE₅₀₀₀-maleimide (880 μL of the solution prepared as described earlier), and 800 nmol of DiD (766 μg) are dissolved in 0.5 mL of dichloromethane and mixed at 45 °C. After homogenisation, the organic solvent is evaporated under reduced pressure, and the lipid phase is crudely mixed with the continuous phase composed of 207 mg of Mirj® 53, 50 mg of glycerol, and 1.36 mL of buffer (HEPES 0.05 M, EDTA 0.01 M, pH 7.4). After crude mixing at 45 °C of the dispersed and continuous phases, emulsification is carried out by sonication (AV505 Ultrasonic processor, Sonics, USA) performed at 40 °C for 5 min. A translucent blue solution is obtained, which is then purified by overnight extensive dialysis carried out at room temperature against 1000 times its volume in the appropriate aqueous buffer (NaCl for LNP, HEPES/EDTA buffer for LNP-maleimide) using a 12–14,000 Da MW cut-off membrane (ZelluTrans, Roth, France). When further functionalization is carried out, 600 μL of crude LNP-maleimide are diluted in 400 μL of grafting buffer (HEPES 0.05 M, EDTA 0.01 M, pH 7.4). In an aqueous 40 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine solution, 3.75 μmol of the cRGD or cRAD peptides are dissolved and stirred for 30 min before being added to the LNP-maleimide solution. After stirring for 2 h in dark at ambient temperature, 7.5 μmol of 2-mercapto-ethanol are added to the dispersion in order to quench the surface maleimide groups that would not have reacted. After 30 min stirring in dark at room temperature, extensive dialysis against NaCl 154 mM is performed

using a 12–14,000 Da MW cut-off membrane (ZelluTrans) to yield purified LNP-cRGD or LNP-cRAD. To obtain LNP-OH, only the quenching step with the addition of 2-mercaptoethanol and the further purification are performed. Finally, all the LNP dispersions are filtered through a 0.22- μm Millipore membrane for sterilization before characterization and/or injection.

2.3. Physico-chemical characterizations

Cryo-TEM (Transmission Electron Microscopy) analysis is performed using a MET microscope (JEOL 2100HC) with a LaB₆ electron source operating at 200 kV. The sample is deposited onto a holey carbon grid, blotted to remove excess liquid, and frozen by plunging rapidly into liquid ethane (−185 °C). The hydrodynamic diameter and zeta potential of the lipid nanoparticles are measured with a Malvern Zeta Sizer Nano instrument (NanoZS, Malvern, UK) in 0.1× PBS buffer. The absorbance and fluorescence measurements are performed, respectively, using a Cary 300 Scan (Varian, Massy, France) UV–visible spectrophotometer and a Perkin Elmer LS50B fluorimeter (Perkin, Coutaboeuf, France). The absolute fluorescence quantum yields QY are calculated by comparison with a standard of known QY (Nile blue perchlorate in ethanol (QY = 0.27) [33] at 600 nm excitation, as previously described [20].

2.4. Cell lines and culture conditions

HEK293(β 3), stable transfectants of human β 3 from the human embryonic kidney cell line (kindly provided by J.-F. Gourvest, Aventis, France), are cultured as previously described in DMEM supplemented with 1% glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, and 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Geneticin (G418 sulfate, Gibco, Paisley, UK) [29,30]. TS/A-pc are mouse mammary cancer cells cultured in RPMI 1640 supplemented with 1% glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS), 25 nM 2-mercaptoethanol, 50 units/mL penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin [32]. All cell lines are cultured at 37 °C in a humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere. All the cells used here are integrin $\alpha_v\beta_3$ -positive [29,30,32].

2.5. Fluorescence microscopy analysis of functionalized LNP incubated in the presence of HEK293(β 3) cells

HEK293(β 3) cells – 10⁶ per well – are grown on coverslips overnight at 37 °C, rinsed once with PBS, then with PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. They are then incubated for 15 min at 4 °C (binding analysis) or 1 h at 37 °C (internalization analysis) in the presence of either LNP-cRGD, LNP-cRAD, or LNP-OH at a concentration of 0.2 μM DiD and 141 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of total lipids. They are subsequently rinsed with PBS Ca²⁺/Mg²⁺ (1 mM) and fixed (10 min with 0.5% paraformaldehyde). Nuclei are labeled with Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) (5 μM) during 10 min. After being rinsed with PBS, coverslips are mounted in Mowiol. Fluorescence microscopy is performed on Axiophot (Carl Zeiss, Jena, Germany). The same experiment is performed also in serum conditions (culture medium with 10% of fetal bovine serum).

2.6. Flow cytometry analysis of functionalized LNP incubated in the presence of HEK293(β 3) cells

For binding analysis, adherent cells are resuspended with trypsin, washed once with cold PBS, and another time with PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. One million cells in a final volume of 200 μL are resuspended in LNP suspension (0.2 μM DiD, 141 $\mu\text{g}/\text{mL}$ total lipids) in PBS Ca²⁺/Mg²⁺ (1 mM) and incubated 15 min at 4 °C. LNP solutions are removed and pellets care-

fully rinsed twice with PBS Ca²⁺/Mg²⁺ (1 mM) at 4 °C. Cells are then rapidly analyzed by flow cytometry (FACS Arial, Becton Dickinson, France). The results are reported as DiD fluorescence (FL4) histogram counts. For internalization analysis, the same experiment is performed with reagents at 37 °C, and the LNP suspensions are incubated 1 h at 37 °C.

2.7. In vivo fluorescence imaging

Female NMRI Nude mice (6–8 weeks old, JANVIER, Le Genest Saint Isle, France) receive a sub-cutaneous xenograft of HEK293(β 3) cells (20 × 10⁶ per mouse) or TS/A-pc cells (10 × 10⁶ per mouse). After tumor growth, mice ($n = 3$ for each group) are anesthetized (isoflurane/oxygen 4%/3.5% for induction and 2% thereafter) and are injected intravenously in the tail vein with 200 μL of LNP suspension (10 nmol DiD, 7.1 mg of total lipids), then they are illuminated by 660-nm light-emitting diodes equipped with interference filters. Fluorescence images as well as black and white pictures are acquired by a back-thinned CCD camera at −80 °C (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu, Massy, France) fitted with high pass filter RG 9 (Schott, Jena, Germany) [29,30,32,34,35]. All the animal experiments are performed in agreement with the EEC guidelines and the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH Publication No. 86-23, revised 1985). After imaging, the mice are killed and dissected for imaging organs. Image display and analysis are performed using the Wasabi software (Hamamatsu, Massy, France). Semi-quantitative data are obtained from the fluorescence images by drawing regions of interest (ROI) on the sub-cutaneous tumors. Similar ROI are also positioned on the skin of the back of each mouse, in a similar position to the tumor, but on the other side of the mouse. The number of photons collected into each ROI is then used to calculate the tumor/skin ratios. The results of organ fluorescence quantifications are expressed as a number of relative light units (RLU) per pixel.

2.8. Statistical analysis

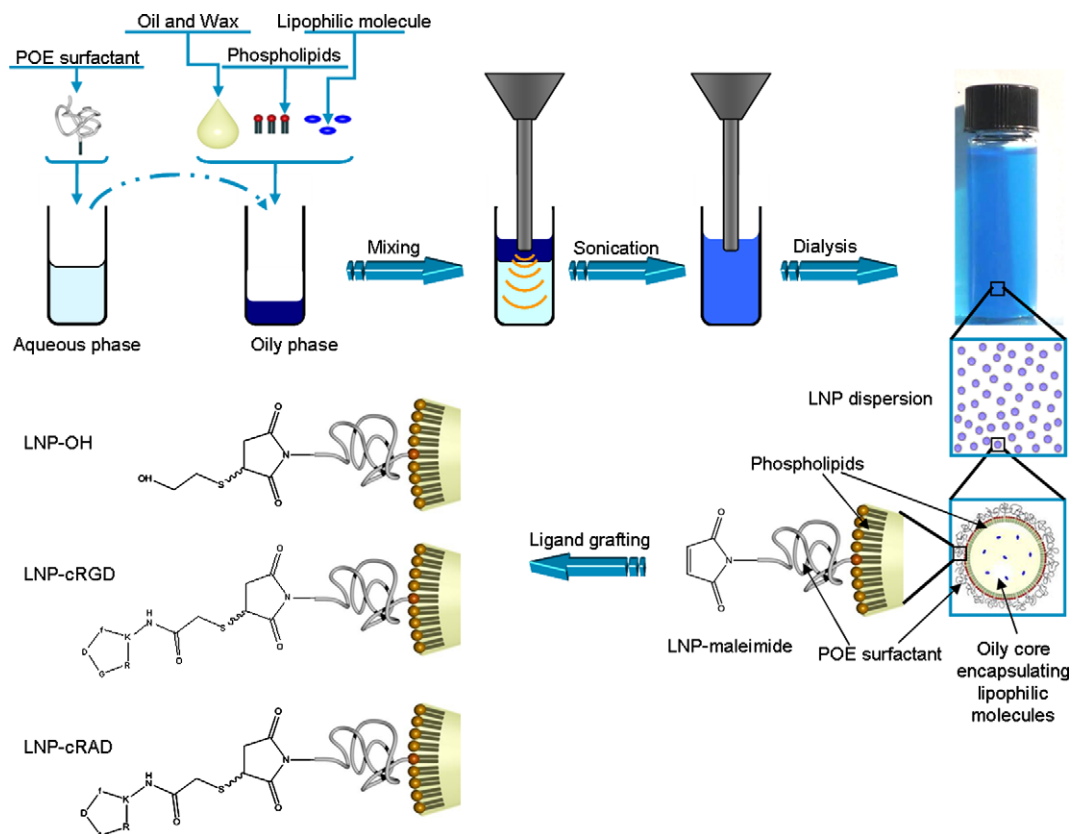
All the data are given as mean ± standard deviation (SD) of three independent measurements. Statistical analysis is performed using two-tailed nonparametric Mann–Whitney *t*-test. Statistical significance is assigned for values of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Design and characterization of lipid nanoparticles

Numerous active pharmaceutical ingredients are efficient *in vitro* at the cellular level, but cannot be used *in vivo* because of their high hydrophobicity that precludes their direct administration. Nanoparticles with a lipid core constitute ideal cargos for the vectorization of high payloads of these lipophilic compounds. We here report the design of new lipid nanoparticles (LNP) based on the use of low cost, Generally Recognized As Safe (GRAS) ingredients, such as oil, lecithine, and poly(oxyethylene) (POE) surfactants. LNP are manufactured by sonication, a versatile and up-scalable process. The lipid core is composed of a mixture of oil and wax, solid at ambient temperature, but melting at body temperature (≈37–40 °C), which should favor both the stability of the colloidal suspension during storage and controlled drug delivery *in vivo*. LNP can moreover be efficiently loaded by a lipophilic dye, DiD, in order to allow their *in vitro* and *in vivo* tracking [20].

In practice, LNP are manufactured following the steps described in Scheme 1. The oily phase composed of lipids with very low aqueous solubility (soybean oil and Suppocire[®] wax), phospholipids (lecithine), and the lipophilic molecule to be vectorized (in this



Scheme 1. Manufacturing process and structure of functionalized lipid nanoparticles. The aqueous phase containing the POE surfactant (Myrj[®] 53) is mixed with the lipid phase, constituted by oil and wax, phospholipids, the lipophilic dye (DiD), and eventually the DSPE-POE-maleimide surfactant. After mixing and sonication, the LNP dispersion is dialyzed against NaCl 154 mM buffer. The lipid droplets are 35 nm diameter, which leads to a translucent colloidal dispersion. The maleimide groups of the functionalized LNP particles can further be derivatized by thiol-bearing molecules such as 2-mercaptoethanol or peptides c(RGDfK(Ac-SH)) and c(RADfK(Ac-SH)), leading, respectively, to LNP-OH, LNP-cRGD, or LNP-cRAD particles. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

work the DiD dye) is mixed with the continuous phase composed of physiological buffer, poly(oxyethylene) surfactant (Mirj[®] 53, ≈ 50 oxyethylene motifs), and glycerol. The role of glycerol is to facilitate the emulsification step, which is carried out at 45 °C by 5 min ultrasonication (Scheme 1). A dispersion of lipid droplets encapsulating the DiD dye and stabilized in surface by the mixture of phospholipids (lecithine) and POE surfactants (Mirj[®] 53) is thus obtained. The typical droplet size as measured by dynamic light scattering in NaCl 154 mM is 35 ± 2 nm, with a polydispersity index of 0.17 ± 0.02 (Table 1). The zeta potential of the particles is -5 ± 2 mV, demonstrating that their surface can be considered as neutral.

In order to be able to graft targeting ligands, such as the cRGD peptide, onto the LNP surface, 9.2% of Mirj[®] 53 is replaced by DSPE-POE₅₀₀₀-maleimide (DSPE = distearyl phosphatidyl ethanol-

amine), while keeping constant the total quantity of POE surfactants. DSPE-POE₅₀₀₀-maleimide is a surfactant which poly(oxyethylene) chain contains ≈ 110 oxyethylene motifs (longer than the ≈ 50 oxyethylene motifs of the Mirj[®] 53 surfactant) and to which is grafted a maleimide coupling group at the hydrophilic extremity. After dialysis purification of the LNP-maleimide particles, classical thiol-maleimide coupling is performed in the presence of 2-mercaptoethanol, cRGD-SH, or cRAD-SH, in order to lead, respectively, to non-targeting LNP-OH, targeting LNP-cRGD, or negative control LNP-cRAD (Scheme 1).

The functionalization of the LNP does not modify dramatically their physico-chemical properties, as reported in Table 1 and Fig. 1. The introduction of the DSPE-POE₅₀₀₀-maleimide surfactants in the particle shell that already contains Myrj[®] 53 does not increase the particle hydrodynamic diameter (35 ± 2 nm), probably because the long polymer chains are in a coiled configuration. The polydispersity index is slightly increased for LNP-maleimide and LNP-OH (Table 1), which could be indicative of a lower stability for these colloidal suspensions. Interestingly, the shape of the particles as observed by cryo-transmission electronic microscopy (cryo-TEM) is not spherical but rather the lipid droplets appear oblong (Fig. 1). Similar non-spherical shapes have been reported for SLN and other lipid nanoparticles when observed by this technique [15]. The introduction of the functional groups does not affect the zeta potential either, which remains close to neutrality (Table 1): the introduced peptides or hydroxyl functions are globally neutral at pH 7–8. Moreover, the encapsulation of the DiD dye is not affected by the surface functionalization, and the fluorophore displays similar optical properties once loaded within the LNP core

Table 1
Physico-chemical properties of functionalized lipid nanoparticles.

Particles	Hydrodynamic diameter (nm) ^a	Polydispersity index ^a	Zeta potential (mV) ^a	QY ^b
LNP	35 ± 2	0.17 ± 0.02	-5 ± 2	0.38
LNP-maleimide	34 ± 2	0.21 ± 0.02	–	0.39
LNP-OH	35 ± 2	0.22 ± 0.02	-3 ± 2	0.39
LNP-cRGD	35 ± 2	0.16 ± 0.03	-3 ± 2	0.40
LNP-cRAD	35 ± 2	0.15 ± 0.03	-3 ± 2	0.40

^a The error bar represents the standard deviation for at least three measurements per batch on two different batches.

^b The fluorescence quantum yields (QY) of DiD-loaded LNP are recorded at 600 nm excitation; the estimated error on the values is 5%.

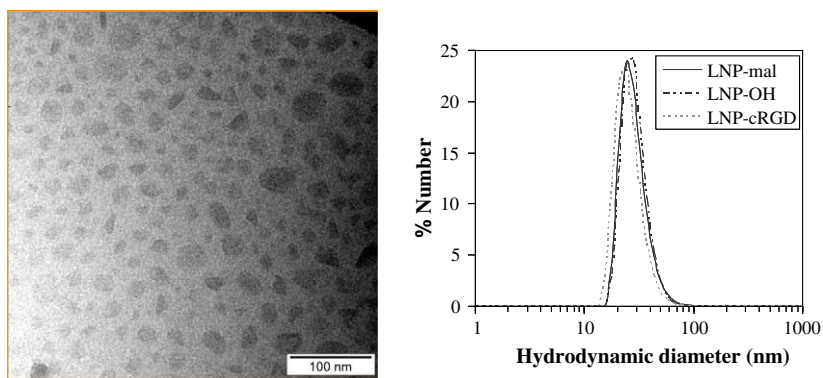


Fig. 1. Structural characterization of lipid nanoparticles. Cryo-TEM microscopy photograph (left) evidences non-spherical particles, probably with an oblong shape, and of characteristic dimension ≈ 35 nm. Diffusion light scattering measurements (right) in dilute PBS buffer ($0.1\times$) evidences one population of particles with a hydrodynamic diameter of 35 nm, whatever the functional group on the surface (maleimide, -OH, cRGD). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(absorption and emission maximum, respectively, at 646 and 668 nm, similar fluorescence quantum yield, Table 1).

The maximum number of targeting peptides (cRGD or cRAD) grafted onto the nanoparticle surface can be estimated by the

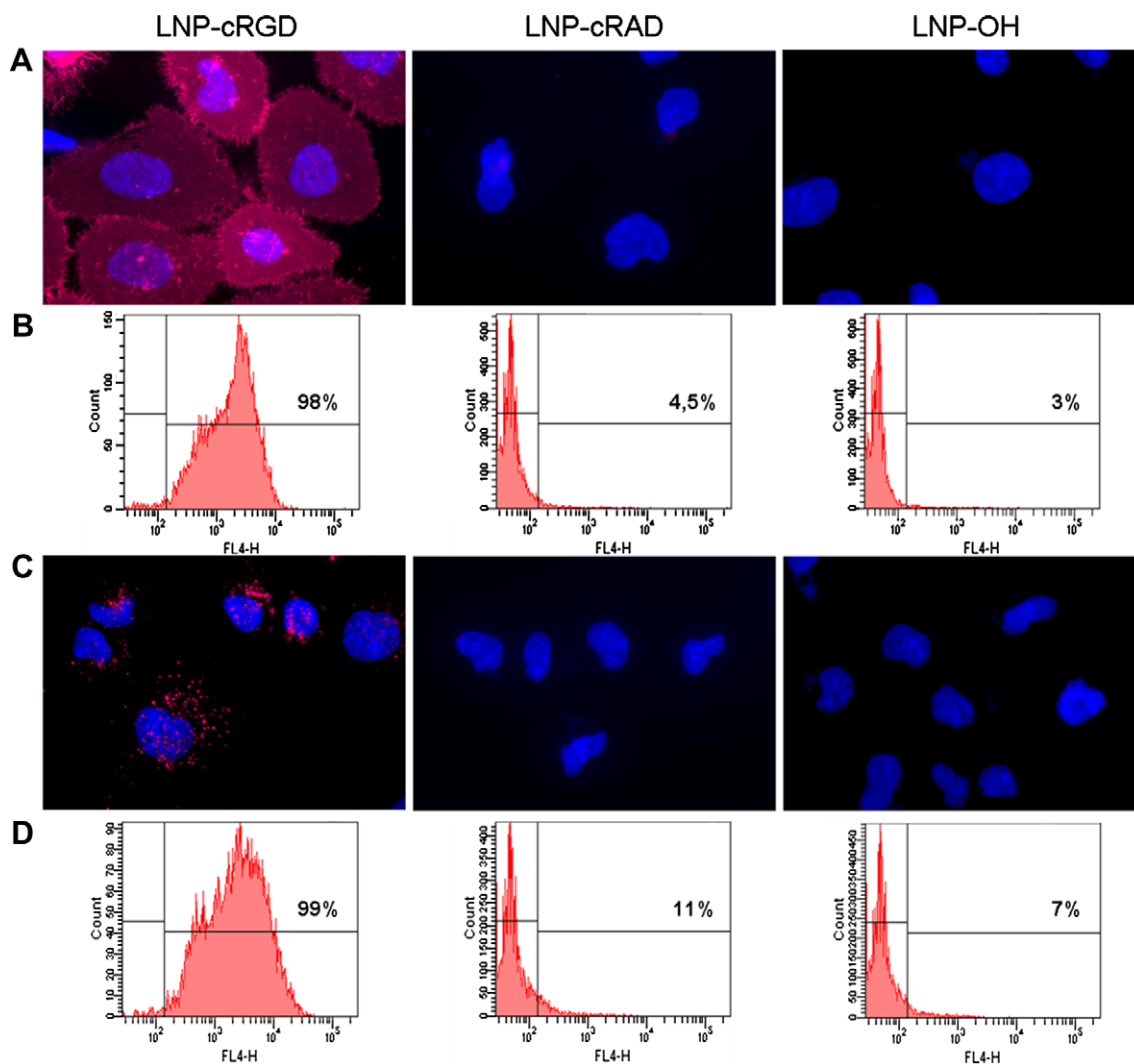


Fig. 2. *In vitro* test of LNP-cRGD, LNP-cRAD, LNP-OH ($0.2 \mu\text{M}$ DiD, $141 \mu\text{g}/\text{mL}$ of lipids) in the presence of HEK293($\beta 3$) cells after 15 min incubation at 4°C (A and B) or 1 h at 37°C (C and D) in the presence of 10% fetal bovine serum. Fluorescence microscopy images (A and C) and flow cytometry analysis (B and D) evidence the specific LNP-cRGD (red) binding (A and B) and internalization (C and D), in comparison with negative control LNP-cRAD and non-functionalized LNP-OH. The cell nuclei are labeled in blue (Hoechst) on the fluorescence microscopy photographs (A and C). The figures on the flow cytometry plots (B and D) represent the percentages of labeled cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

rough calculation of the number of maleimide groups incorporated in the LNP surface during the emulsification process. Assuming all the DSPE-POE₅₀₀₀-maleimide surfactants are incorporated in the LNP surface and for an estimated concentration of 1.2×10^{16} particles/mL (35 nm diameter particles) [20], a maximum number of 208 maleimide groups and therefore cRGD or cRAD peptides per particle is obtained (roughly 1 function par 20 nm² on the particle surface, for a total of 3850 nm² per particle).

As already observed for DiD-loaded LNP [20], the LNP-cRGD, LNP-cRAD, and LNP-OH, functionalized particles display a high colloidal stability when dispersed in NaCl 154 mM: no modification of either the particle size or zeta potential have been observed for 1 month storage at 4 °C in dark. Therefore, functionalized LNP can be confidently tested for *in vivo* and *in vitro* applications.

3.2. *In vitro* targeting and internalization of LNP

Functionalization of the LNP by the cRGD targeting ligand is first checked *in vitro*. Targeted LNP-cRGD, negative control LNP-cRAD, and non-functionalized LNP-OH are incubated in the presence of HEK293(β3) cells. The HEK293(β3) cell line has been genetically modified to over-express α_vβ₃ integrins. Fig. 2 summarizes the results obtained both by flow cytometry and fluorescence microscopy after incubation of 6.0×10^{12} particles/mL (0.2 μM of DiD dye, 141 μg/mL of total lipids) with HEK293(β3) cells in the

presence of 10% fetal bovine serum. The incubation at 4 °C is suitable for studying specific targeting (Fig. 2A and B), whereas incubation at 37 °C allows particle internalization (Fig. 2C and D). Both flow cytometry and fluorescence microscopy evidence specific HEK293(β3) targeting of cRGD-functionalized LNP, in comparison with LNP-cRAD and non-functionalized LNP-OH after 15 min of incubation at 4 °C. The specific interaction of HEK293(β3) cells with LNP-cRGD leads to the internalization of the particles with an endosome-like pattern after 1-h incubation at 37 °C, as evidenced by fluorescence microscopy (Fig. 2C). Pre-saturation of the HEK293(β3) cells with 10 μM free cRGD for 5 min before LNP-cRGD incubation inhibits cell fluorescence labeling (results not shown). The results are similar whatever absence or presence of 10% fetal bovine serum in cell culture medium, indicating that non-specific interactions should not occur between the LNP and serum proteins. The dense poly(oxyethylene) coating of the nanoparticles seems to be efficient in preventing protein binding.

3.3. *In vivo* targeting of LNP

The *in vivo* behavior of LNP is then assessed following their intravenous injection in the tail vein of *Nude* mice bearing HEK293(β3) xenografts in their right flank. The fluorescence images obtained at different times after LNP injection (50 μM DiD, 35 mg of total lipids) are presented in Fig. 3. Similarly to the

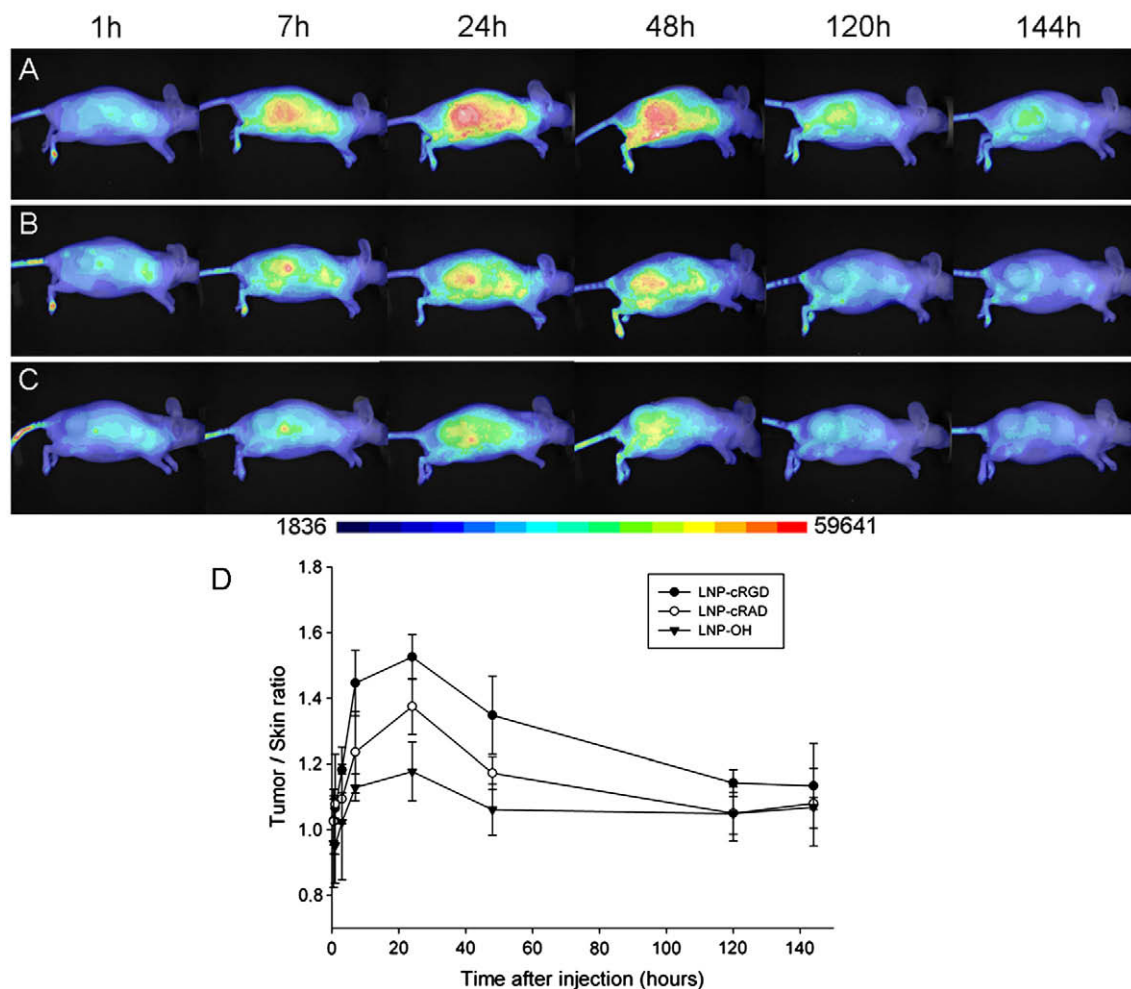


Fig. 3. *In vivo* injection of LNP-cRGD (A), LNP-cRAD (B), or LNP-OH (C) (10 nmol DiD, 7.1 mg of lipids dispersed in 200 μL) in HEK293(β3) xenografted *Nude* mice. Fluorescence images (200 ms integration time, color scale with contrast fixed between 1836 and 59,641) are recorded at different times after injection and superimposed to visible light images (in white and black) (A–C). Tumor over skin fluorescence ratio (D) is calculated by drawing regions of interest (ROI). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

results obtained on cell cultures *in vitro*, an active accumulation of cRGD-targeted particles is observed in the tumor area, in comparison with LNP-OH. The maximum of the fluorescence signal is achieved 24 h after injection, and the tumor is still clearly delimited 48 h after injection. Further quantification of the tumor over skin ratio 24 h after injection sustains LNP-cRGD targeting ($T/S = 1.53 \pm 0.07$, $n = 3$) in comparison with non-functionalized LNP-OH ($T/S = 1.18 \pm 0.09$, $n = 3$). Surprisingly, a slight effect of the cRAD peptide functionalization ($T/S = 1.37 \pm 0.09$, $n = 3$) is observed *in vivo* (Fig. 3), which is far less pronounced *in vitro* on the percentage of LNP-cRAD binding and internalization (Fig. 2). However, the

tumor over skin contrasts overall remain poor in the HEK293(β_3) tumor model.

Another tumor model is therefore tested *in vivo*. The TS/A-pc model is issued from a mouse mammary cancer cell line, known to express low levels of $\alpha_v\beta_3$ integrins on the cell membrane. However, because of their murine origin, TS/A-pc tumors are growing much faster than the human HEK293(β_3) xenografts (10 days for TS/A-pc, 6 weeks for HEK293(β_3)). Fig. 4 presents the results obtained *in vivo* after injection of targeting LNP-cRGD, negative control LNP-cRAD, and non-functionalized LNP-OH (50 μ M DiD, 35 mg of total lipids) in *Nude* mice bearing TS/A-pc tumors. As evidenced

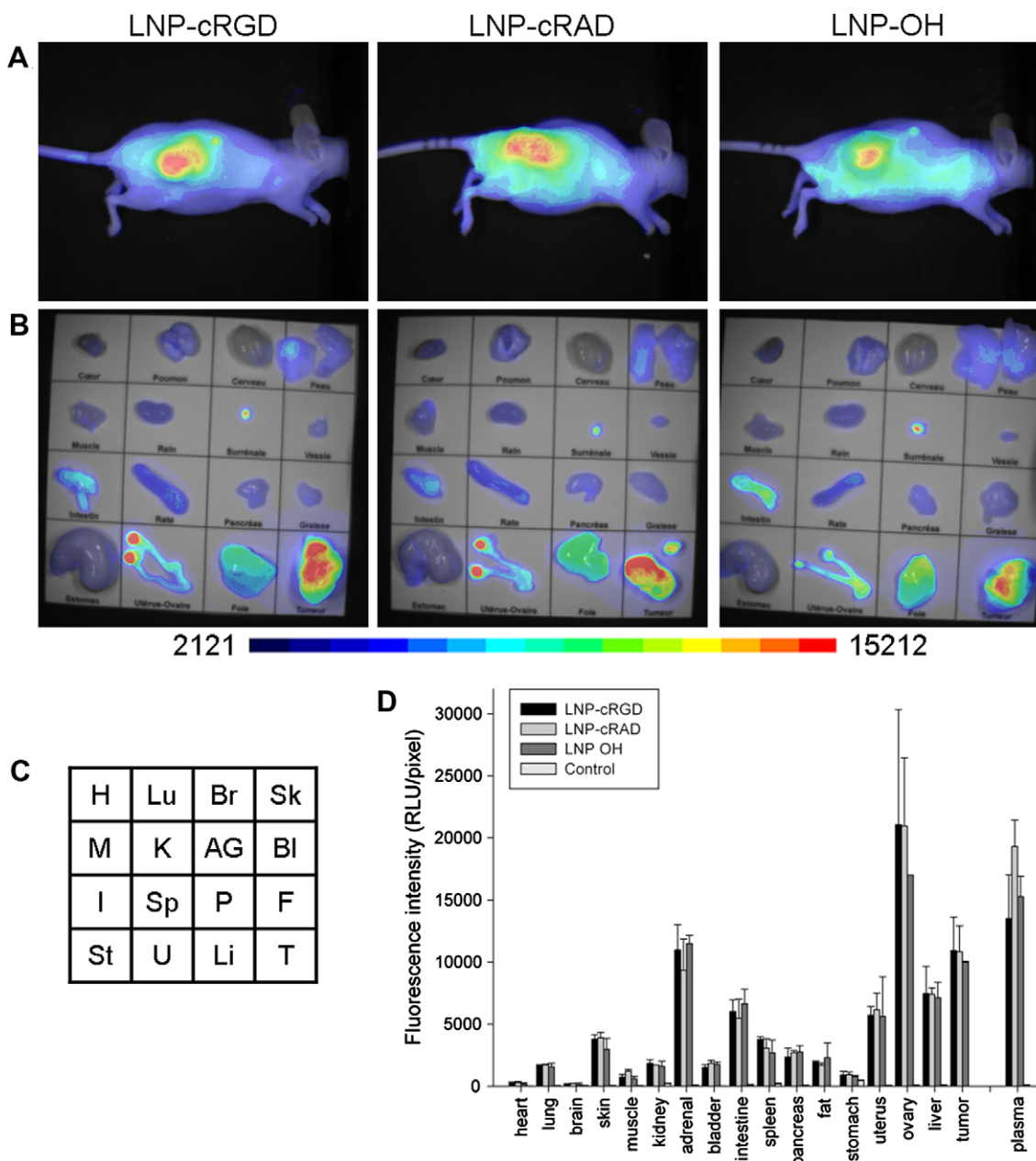


Fig. 4. *In vivo* injection of LNP-cRGD, LNP-cRAD, or LNP-OH (10 nmol DiD, 7.1 mg of lipids dispersed in 200 μ L) in *Nude* mice carrying sub-cutaneous TS/A-pc tumors. (A) Fluorescence images obtained 24 h after injection evidence important accumulation of all the particles in the tumor area. Fluorescence images (20 ms integration time, color scale with contrast fixed between 2121 and 15,212) are superimposed to visible light images (in white and black). (B) Accumulation of all types of particles in tumor is confirmed by fluorescence images (20 ms integration time, color scale with contrast fixed between 2121 and 15,212, superimposed to visible light images) recorded after organ dissection (24 h after injection). The grid indicating the order of the organs is in (C). H: heart; Lu: lungs; Br: brain; Sk: skin; M: muscle; K: kidneys; AG: adrenal gland; Bl: bladder; I: intestine; Sp: spleen; P: pancreas; F: fat; St: stomach; U: uterus–ovaries; Li: liver; T: tumor. (D) Quantification of the fluorescence signal of the different organs after dissection (24 h after injection). Fluorescence is expressed in relative light unit per pixel (RLU/pix). Controls are non-injected mice. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

by the fluorescence images 24 h after injection, contrarily to the HEK293(β 3) tumors for which small active targeting of LNP-cRGD is achieved, accumulation of LNP in the TS/A-pc tumors is obtained whatever the particle coating (cRGD, cRAD, -OH) (Fig. 4A). This is also evidenced by the tumor over skin fluorescence ratio 24 h after injection: 2.60 ± 0.48 for LNP-cRGD ($n = 3$), 2.40 ± 0.13 for LNP-cRAD ($n = 3$), 2.61 ± 0.21 for LNP-OH ($n = 3$). Observation of the organs 24 h after injection and animal dissection confirms a similar tumor accumulation for the three coatings (Fig. 4B–D). The whole body and organ fluorescence images evidence a rather homogeneous bio-distribution of the fluorescence signal in areas different from the tumor and the brain. The brain is not labeled, indicating that the LNP cannot cross the Blood Brain Barrier. A few organs appear more fluorescently labeled: uterus/ovaries, adrenals, liver, and intestine. The intestine fluorescence signal cannot be attributed to auto-fluorescence from the food but is significantly related to a partial elimination of the LNP (Fig. 4D). The mouse plasma also displays important fluorescence levels 24 h after injection (Fig. 4D), which could be indicative of a long circulation time of the particles in blood.

4. Discussion

4.1. Specifications for efficient particle targeting

Nanocarriers dedicated to drug or contrast agent targeting and delivery *in vivo* (animal and ultimately human applications) should fulfill several specifications. First of all, these nanocarriers should of course display no toxicity at the administrated doses. It has to be kept in mind from the design of clinical grade particles that pharmaceutical approval will be necessary. Second, they should display prolonged circulation in blood in order to accumulate progressively in the diseased tissues, and ultimately reach specific delivery only in targeted cells [1,36].

Achieving prolonged circulation in blood implies several constraints on the physico-chemical parameters of the nanocarriers. First, the nanometer size (<100 nm) and second, colloidal stability (no risk of *in vivo* particle aggregation) are of tremendous importance for ensuring no risk of embolism and for potentially achieving targeted cell internalization. Moreover, the nanometer size has been demonstrated to favor passive accumulation of nanoparticles in tumors [37]. This process is accounted for by the increased porosity in the tumor vasculature, along with the low lymphatic drainage of cancer tissues, in comparison with the healthy ones (Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect) [37]. Even if fenestrations of the vasculature at the tumor sites strongly depend on the cancer models [38], 20–100 nm range often appears as an optimal diameter for an efficient extravasation and retention of the nanoparticles from capillaries to the tumor interstitial tissues [39]. Particle charge constitutes the third key physico-chemical parameter to control the nanovector bio-distribution. Positively charged nanocarriers are known to be very efficiently stocked in the liver as soon as they are injected [40]. Coating of the particles by poly(oxyethylene) polymers has been a well-described strategy to limit opsonin binding and therefore rapid uptake of nanoparticles by the RES (Reticulo-Endothelial System) organs, such as liver, spleen, and bone marrow [1,2,41–43]. Mastering all these physico-chemical parameters (size, stability, surface charge, and coating) is therefore of tremendous importance for *in vivo* applications of nanovectors.

4.2. Achieving *in vivo* specifications with LNP

The idea that long-lasting blood circulation will lead to a better tumor accumulation and targeting for oncology applications has

driven the LNP design. The lipid nanoparticles described in this work are composed of vegetable oil and wax containing long chain triglycerides (LNP core), C₁₆–C₁₈ phosphatidylcholine (lecithine phospholipids), and poly(oxyethylene)-based surfactants. All these products are already approved by the FDA for human use. The similarity of structures of the LNP ingredients and naturally encountered lipids and phospholipids should ensure a good biocompatibility and metabolism of the LNP nanocarriers (further biocompatibility and cellular toxicity studies are in progress). Moreover, long chain triglycerides (LNP core), C₁₆–C₁₈ phosphatidylcholine (lecithine phospholipids, LNP shell), and poly(oxyethylene)-based surfactants (LNP shell) are ingredients known for promoting slow elimination from the blood circulation when used in emulsion formulations [16]. In addition to a suitable ingredient choice, new manufacturing process has to be used in order to achieve small particle size with high colloidal stability, and therefore long blood circulation time. Lipid nanovectors have presently diameters classically around 70–200 nm, and few formulations below 50 nm have been described [6,15,19,44]. The use of very high surfactant concentrations should ensure a small particle size while maintaining their colloidal stability. Neutral surfactants are chosen in order to achieve a near-neutrality surface of the nanocargos: (i) phospholipids (soybean lecithin) and (ii) poly(oxyethylene)-based surfactants known to improve the stealth character of nanocarriers because they reduce opsonin binding and particle macrophage uptake [1,2,41–43]. Several processes have been described for the preparation of nanometric emulsions and SLN: hot or cold homogenization, solvent emulsification/evaporation, and dilution of micro-emulsions. These methods classically rely on the solubilization of the surfactants in the aqueous phase or the use of organic solvents [6,15,19,44]. In this work, in order to be able to increase the phospholipid ratio in the LNP formulation (up to 6.9% w/w phospholipids for 10% w/w total lipids) and therefore achieve smaller nanoparticle size, lecithin is introduced in the oily phase, thanks to the solubilizing power of the mixture of soybean oil and wax. In order to obtain a dense poly(oxyethylene) coating on the particle surface, very high content of stearate-POE₂₀₀₀ (Myrj[®] 53, 11.4% w/w for 10% w/w total lipids) is used. Emulsification is achieved using the sonication technique. Different emulsification processes have been described for the production of nanoemulsions. Low-energy processes, such as PIT (Phase Inverse Temperature) [17,44] or Catastrophic Phase Inversion (CPI) [45,46] are advantageous for the encapsulation of fragile drugs and macromolecules but are highly dependent on the formulation composition [44]. Moreover, the introduction of modified phospholipids for the surface functionalization of the nanocarriers by targeting ligands is rather difficult in these conditions. High energy methods encompass mainly high pressure homogenization and sonication [47]. One advantage of sonication, however not widely used, is the fact that low to large volumes of highly viscous solutions can be easily processed. Moreover, as a high energy method, it allows the manufacturing of a wide range of formulations, and the incorporation in the composition of maleimide modified surfactants for further grafting of targeting ligands on the nanoparticles does not modify the processing. Thanks to this new manufacturing process, particle size of 35 nm diameter can be easily achieved (Table 1, Fig. 1). Moreover, the colloidal stability of the formulation is more than 1 year for LNP [20] and at least 1 month for LNP-cRGD, LNP-cRAD, and LNP-OH kept at 4 °C. This very good colloidal stability should be accounted for, at least partly, by the very dense POE coating that prevents particle coalescence. The use of non-ionic POE and zwitterionic phospholipid (lecithine) surfactants ensures a particle charge as measured by zeta potential in solution close to neutrality ($\zeta = -5 \pm 2$ mV). This should also limit opsonin binding whenever particles are in blood circulation. Therefore, LNP seem to fulfill the different chemo-physical constraints

associated to *in vivo* applications of nanoparticles: small size, high colloidal stability, neutral charge, and POE coating. In addition, these sub-100-nm nanocarriers can be sterilized using micro-filtration, a process easier to manipulate than thermal or X-ray treatments, which can destabilize the lipid nanoparticles [15,19].

4.3. *In vivo* bio-distribution of LNP

Indeed, the small size and the POE coating of LNP seem to limit protein adsorption onto the nanoparticle surface. No effect of serum addition is observed on the specific targeting and internalization of LNP-cRGD assessed *in vitro* while incubation in the presence of HEK293(β_3) cells (Fig. 2). The functionalized LNP seem to have a relatively long blood half life since all the organs (except brain) are able to be fluorescently labeled at similar levels, and since the fluorescence signal is clearly evidenced in plasma 24 h after injection (Fig. 4). It should be underlined here that fluorescence imaging is still not an absolutely quantitative method to assess bio-distribution, mainly because the different tissues (blood, plasma, organs) absorb and diffuse visible light in different manners. However, it is possible to make relative comparisons for a same organ between different particles and a non-injected animal and to draw conclusions on the fluorescence evolution over time. Another point is that fluorescence imaging allows the *in vivo* tracking of the fluorescent dye, but not truly the nanovector it is loaded into, and which might dissociate *in vivo*. The encapsulation stability of the DiD dye in the LNP core has been demonstrated to be superior to 1 year at room temperature on the laboratory shelf [20]. A very stable fluorescence signal (less than 30% decay in 48 h at 37 °C) is observed when DiD-loaded LNP dispersions are incubated in human plasma or whole blood *in vitro* (data not shown). The fluorescence signal cannot come from free DiD dye in solution, since this dye is not fluorescent in aqueous medium [20]. Therefore, the stability of the fluorescence signal is indicative either of leakage of the dye from the LNP, but followed by its adsorption on plasma proteins, or indicative of the stability of the dye encapsulation within the particle core while in plasma. Combined with the fact that a high density POE coating is present on the surface of the particle, which should prevent protein binding (no effect of calf serum proteins has been observed in *in vitro* binding study, see Section 3.2), and the fact that the lipid dye should have a very good affinity for the particle lipid core, we believe that the particle's integrity is therefore probably maintained *in vitro* in plasma and blood for a few hours at least. *In vivo*, the particle fate can of course be very different. The hydrophilic counterpart of the DiD dye, Cy5, has been shown to be readily eliminated by the kidneys when injected free *in vivo* (no similar test can be carried out with the DiD dye because of its low water solubility) [35]. All these points could indicate that the DiD dye remains loaded within the LNP core for at least a few hours while in blood circulation and that LNP DiD-loading really allows the *in vivo* tracking of the functionalized nanovectors. Further pharmacokinetics experiments, particularly using radiolabeling to allow a "true" quantitative bio-distribution, are currently planned to check this hypothesis. Assuming that the fluorescence signal reflects the LNP bio-distribution, the nanovectors seem to distribute quite uniformly in the body and have a long blood circulation time, whatever their functionalization (Figs. 3 and 4). Thorough data analysis shows that tumor is the most fluorescent tissue along with uterus/ovaries and adrenal glands. Uterus/ovaries [40] and adrenals [48] have already been noticed to accumulate efficiently nanoparticles. Other organs in which a significant fluorescent signal is observed are liver and intestine. It has to be noticed that in comparison with other previously described nanovectors, number of which are known to accumulate in high doses in the liver [1,2,49], LNP accumulation in this RES organ is limited. There is

no indication of a possible clearance of the fluorescence signal by the kidneys, which is consistent with the 35 nm diameter size of the LNP, larger than the few (1–3) nm of the DiD or Cy5 dyes. There rather exist signs indicative of a hepato-biliary metabolism mechanism, classical for lipids, such as the relatively important fluorescence signal in the intestine. This hypothesis is currently being checked by complementary experiments specially focused on that point. However, it already appears that ligand-functionalized LNP should present all the specifications for achieving *in vivo* specific targeting, all the more than the relatively small size of the particles (35 nm diameter), and therefore their high surface/volume ratio should allow the presentation at their surface of a relatively dense coating of targeting ligands (presumably 50–200 per particle).

4.4. cRGD targeting in HEK293(β_3) and TS/A-pc models

In vitro test of cRGD-functionalized LNP in the presence of HEK293(β_3) cells validates the functionalization step, as well as the specificity of $\alpha_v\beta_3$ integrin binding and internalization, in comparison with LNP-cRAD and LNP-OH. Once the functionalization of the particles assessed *in vitro*, *in vivo* tests are carried out using two different tumor models – HEK293(β_3) and TS/A-pc – implanted subcutaneously in *Nude* mice. Both tumor models express $\alpha_v\beta_3$ integrins on the cell membranes [29–32]. In both cases, significant tumor over skin fluorescence signal is observed a few hours (6–48 h) following intravenous injection of LNP-cRGD (10 nmol of dye, 7.1 mg of total lipids). In the case of HEK293(β_3), this fluorescence signal is more pronounced in the presence of LNP-cRGD, in the sense that the same injected doses of LNP-cRAD and LNP-OH lead to lower tumor over skin fluorescence ratio (LNP-cRGD: $T/S = 1.53 \pm 0.07$ ($n = 3$), LNP-OH: $T/S = 1.18 \pm 0.09$ ($n = 3$), LNP-cRAD: $T/S = 1.37 \pm 0.09$ ($n = 3$) 24 h after injection). Concerning the TS/A-pc model, no specificity due to the particle functionalization is observed: tumor over skin fluorescence ratio is similar for LNP-cRGD (2.60 ± 0.48 ($n = 3$)), LNP-cRAD (2.40 ± 0.13 ($n = 3$)), LNP-OH (2.61 ± 0.21 ($n = 3$)). Both cell lines express $\alpha_v\beta_3$ integrins [29–32]; however, the growth of the tumor is very different in the two models. After sub-cutaneous injection in mice, the human HEK293(β_3) cells that over-express high levels of integrin are growing slowly (≈ 6 weeks for reaching 5-mm-diameter tumor), inducing a well-organized and structured neo-angiogenic vessel network for tumor supply [29–31]. On the contrary, TS/A-pc cells grow very fast (≈ 10 days for reaching 5-mm-diameter tumor) and express low level of $\alpha_v\beta_3$ integrin: the fast-build angiogenic vessels display very leaky fenestrations [32]. In such a tumor model, nanoparticles are known to extravasate very efficiently due to the passive (i.e. non-targeted) EPR effect. This passive extravasation and tumor tissue accumulation of the particles could occur whatever the LNP coating groups and would account for the similar fluorescence over skin ratio obtained for LNP-cRGD, LNP-cRAD, and LNP-OH in the TS/A-pc model. In the HEK293(β_3) model, particle passive accumulation due to the EPR effect should be reduced because of the tight endothelial junction of the well-built neo-angiogenic vessels. In addition, a strong capture of RGD-targeted nanoparticles can be obtained by the tumor cells themselves since they express high amounts of the $\alpha_v\beta_3$ integrin. Therefore, no significant EPR effect should occur, and it could become possible to assess a different particle behavior according to their coating. In this case, a slight augmented uptake is observed with LNP-cRGD in comparison with LNP-OH. Surprisingly, a small effect of the cRAD peptide functionalization is observed *in vivo* (Fig. 3), which is far less pronounced *in vitro* on the percentage of LNP-cRAD binding and internalization (Fig. 2). This could be explained by subtle modifications of the surface of the particles after addition of the different peptides, which may favor their bio-availability. These

first results underline the disparity that might exist between different study models, such as the slow-growing tumor model (HEK293(β_3)) and the fast-growing tumor model (TS/A-pc). Future work should encompass the validation of functionalized LNP in an even more extended range of biological models, such as for example tumor-induced models.

These results constitute a first proof of concept of LNP vectorization for imaging and drug delivery purposes. Whatever the biological model use, improving targeting efficiency in the future will imply both an optimization of the number of targeted ligands present at the particle interface, and an optimization of their presentation pattern. It has been shown that the number of targeting ligands present on the surface of nanocarriers should be optimized to find out the right balance. *In vitro* targeting efficiency might increase with the density of ligands grafted onto the nanoparticle surface, but screening the POE coating to achieve high ligand density is detrimental for the plasma circulation of the vectors, leading ultimately to poor *in vivo* results [50]. In the present study, long POE₅₀₀₀ chains (DSPE-POE₅₀₀₀-maleimide, 9% of the whole POE coating of the particle) have been used to present the cRGD targeting ligands “above” the nanoparticle POE coating (Mirj[®]53, POE₂₀₀₀), at a moderate ligand density of probably ≈ 50 –200 motifs per particle. It has been demonstrated that the length of the POE chain linking the ligand to the nanoparticles also displays an optimum: if the tethering spacer is too small, but also too long (because of folding), the ligand is embedded in the POE coating and cannot interact efficiently with the cell membrane [51]. Optimization of the ligand density and the length of the POE tethering chain will be carried out in the future, but increasing the number of DSPE-POE-maleimide surfactants or modifying their nature could impact the particle stability, and this point has to be studied carefully. Concerning the presentation of the ligands, it has been shown by our group [29,52–54] and others [25,26,55] that multimeric presentation of the cRGD peptide favors the efficiency of the cRGD/ $\alpha_v\beta_3$ integrin recognition and ultimately its internalization in the targeted cell. In particular, the use of a cyclodecapeptide scaffold allowing tetrameric presentation of cRGD [52–54] is expected in the future to improve the LNP targeting efficiency in comparison with the monomeric cRGD ligands used in this study. The results have also stressed out the need to compare active nanoparticle targeting obtained because of the presence of specific ligands, like cRGD, with nanovectors functionalized by reliable negative control, like cRAD, since the simple addition of an organic coating on the surface may strongly affect the behavior of the particles. This observation should therefore be taken into consideration in further studies focused on the optimization of the number and presentation of the ligands onto the LNP surface.

Dye-loaded lipid nanoparticles can be used as *in vivo* imaging agents as themselves, but also constitute a proof-of-principle of the potentialities of cRGD-LNP nanocarriers for vectorizing other imaging agents or therapeutic drugs. Therapeutic applications will require suitable release of the transported active ingredient. Depending on the aimed therapeutic application, prolonged continuous plasma release or specific targeting followed by local release are desired. Study of LNP release profile is beyond the scope of the present work and will be addressed in the future. However, LNP vectorization seems promising for applications requiring an efficient and plasma-stable encapsulation of highly lipophilic loads, such as the DiD dye ($\log P \approx 10$). The preliminary bio-distribution results obtained in this study tend to demonstrate that the very strong lipophilicity of the DiD dye which is encapsulated within the oily core and not at the particle surface, and the high density of the LNP POE coating which prevents protein binding, should minimize any burst release effect observed for other particles such as liposomes [3], while lipophilic drug-loaded LNP circulate in plasma. However, once cells of interest are targeted (in this

case $\alpha_v\beta_3$ integrin over-expressing cells), it might be highly desirable that particle release occurs. LNP release profile and mechanisms will be addressed in the future.

5. Conclusions

In conclusion, new lipid nanoparticles (LNP) responding to the specifications of *in vivo* applications have been designed: they are constituted of ingredients that have been approved by the FDA for human use, have a high colloidal stability, a small size (35 nm diameter), and a neutral POE coating ($\zeta = -5$ mV). They can be functionalized by different peptide ligands, such as cRGD known to specifically bind to $\alpha_v\beta_3$ integrins expressed in neo-angiogenic process and at the surface of numerous tumor cell lines [24,25], while keeping their functionality and targeting effect *in vitro* and *in vivo*. Further *in vivo* experiments are necessary to better assess LNP potentialities, especially as drug delivery systems. However, along with an easy to scale-up and very reproducible manufacturing process, based on low cost ingredients, LNP nanovectors present the suitable physico-chemical parameters for realistic and promising *in vivo* applications.

Acknowledgements

This work is supported by the Commissariat à l’Energie Atomique and the French National Research Agency (ANR) through Carnot funding and Contract No. ANR-08-PNANO-006-02. We acknowledge Anne-Claude Couffin (CEA, LETI-DTBS) for helpful remarks and discussion in writing the manuscript.

References

- [1] V.P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1532–1555.
- [2] P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1417–1450.
- [3] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751–760.
- [4] W. Jiang, B.Y. Kim, J.T. Rutka, W.C. Chan, Advances and challenges of nanotechnology-based drug delivery system, *Expert Opin. Drug Deliv.* 4 (2007) 621–633.
- [5] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *Int. J. Pharm.* 242 (2002) 121–128.
- [6] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) S131–S155.
- [7] N. Düzgünes, Lipid assemblies for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2001) 137–138.
- [8] V.P. Torchilin, Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1–15.
- [9] J.D. Glickson, S. Lund-Katz, R. Zhou, H.S. Choi, I.W. Chen, H. Li, I. Corbin, A.V. Popov, W. Cao, L. Song, C. Qi, D. Marotta, D.S. Nelson, J. Chen, B. Chance, G. Zheng, Lipoprotein nanoplatform for targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents, *Mol. Imag.* 7 (2008) 101–110.
- [10] J.C. Frias, M.J. Lipinski, S.E. Lipinski, M.T. Albeda, Modified lipoproteins as contrast agents for imaging atherosclerosis, *Contrast Media Mol. Imag.* 2 (2007) 16–23.
- [11] V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 145–160.
- [12] S. Heuschkel, A. Goebel, R.H. Neubert, Microemulsions-modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 603–631.
- [13] T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *J. Phys. Condens. Mater.* 18 (2006) R635–R666.
- [14] S. Tamilvanan, Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems (review), *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 489–533.
- [15] W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 165–196.
- [16] H.L. Wong, R. Bendayan, A. Rauth, Y. Li, X.Y. Wu, Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 491–504.
- [17] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharm. Res.* 19 (2002) 875–880.

- [18] S. Liu, S. Wang, R. Lu, Lipoproteins as pharmaceutical carriers, in: V.P. Torchilin (Ed.), *Nanoparticles as Drug Carriers*, Imperial Press College, 2006.
- [19] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, *Biomaterials* 24 (2003) 4283–4300.
- [20] I. Texier, M. Goutayer, A. Da Silva, L. Guyon, N. Djaker, V. Josserand, E. Neumann, J. Bibette, F. Vinet, Cyanine loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging, *J. Biomed. Opt.* 14 (2009) 054005.
- [21] T.F. Massoud, S.S. Gambhir, Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light, *Genes Dev.* 17 (2003) 545–580.
- [22] J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi, H. Yao, Fluorescence imaging in vivo: recent advances, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 17–25.
- [23] M. Rudin, M. Rausch, M. Stoeckli, Molecular imaging in drug discovery and development: potential and limitations of nonnuclear methods, *Mol. Imag. Biol.* 7 (2005) 5–13.
- [24] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H.-J. Wester, Ligands for mapping $\alpha_v\beta_3$ -integrin expression in vivo, *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 969–980.
- [25] A.J. Beer, M. Schwaiger, Imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression, *Cancer Metast. Rev.* 27 (2008) 631–644.
- [26] K. Temming, R.M. Schiffelers, G. Molema, R. Kok, RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumor vasculature, *Drug Resist. Updates* 8 (2005) 381–402.
- [27] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 7461–7472.
- [28] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 36 (1997) 1374–1389.
- [29] Z.H. Jin, V. Josserand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M.C. Favrot, J.L. Coll, In vivo optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors, *Mol. Cancer* 6 (2007), doi:10.1186/1476-4598-6-41.
- [30] Z.-H. Jin, J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, A. Grichine, I. Texier, M. Favrot, P. Dumy, J.L. Coll, In vivo noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)-4, *Mol. Imag.* 6 (2007) 43–55.
- [31] J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.L. Coll, I. Texier, Activatable fluorescent probes for tumor-targeting imaging in live mice, *ChemMedChem* 1 (2006) 1069–1072.
- [32] L. Sancey, V. Ardisson, L.M. Riou, M. Ahmadi, D. Marti-Batlle, D. Boturyn, P. Dumy, D. Fagret, C. Ghezzi, J.P. Vuille, In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer Tc-99m-RAFT-RGD, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 34 (2007) 2037–2047.
- [33] R. Sens, K.H. Drexhage, Fluorescence quantum yield of oxazine and carbazine laser dyes, *J. Lumin.* 24–25 (1981) 709–712.
- [34] Z.H. Jin, V. Josserand, J. Razkin, E. Garanger, D. Boturyn, M.C. Favrot, P. Dumy, J.L. Coll, Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)-4, *Mol. Imag.* 5 (2006) 188–197.
- [35] I. Texier, V. Josserand, E. Garanger, J. Razkin, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, D. Boturyn, J.-L. Coll, Luminescent probes for optical in vivo imaging, *Proc. SPIE* 5704 (2005) 16–23.
- [36] M. Ferrari, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 161–171.
- [37] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release* 65 (2000) 271–284.
- [38] P. Carmeliet, R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature* 407 (2000) 249–257.
- [39] P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari, Intravascular delivery of nanoparticulate systems: does geometry really matter?, *Pharm Res.* (2008), doi:10.1007/s11095-008-9697-x.
- [40] A.-C. Faure, S. Dufort, V. Josserand, P. Perriat, J.L. Coll, S. Roux, O. Tillement, Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethyleneglycol) coatings, *Small* 5 (2009) 2565–2575.
- [41] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, Pharmacokinetic consequences of pegylation, *Drug Deliv.* 13 (2006) 399–409.
- [42] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 283–318.
- [43] C. Monfardini, F.M. Veronese, Stabilization of substances in circulation, *Bioconj. Chem.* 9 (1998) 418–450.
- [44] N. Anton, J.P. Benoit, P. Saulnier, Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review, *J. Control. Release* 128 (2008) 185–194.
- [45] S. Sajjadi, Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion, *Langmuir* 22 (2006) 5597–5603.
- [46] L. Wang, X. Li, G. Zhang, J. Dong, J. Eastoe, Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations, *J. Colloid Interf. Sci.* 314 (2007) 230–235.
- [47] S.M. Jafari, Y.H. He, B. Bhandari, Nano-emulsion production by sonication and microfluidization – a comparison, *Int. J. Food Prop.* 9 (2006) 475–485.
- [48] R. Weissleder, Y.M. Wang, M. Papisov, A. Bogdanov, B. Schaffer, T.J. Brady, J. Wittenberg, Polymeric contrast agents for MR imaging of adrenal glands, *JMRI – J. Magn. Reson. Imag.* 3 (1993) 93–97.
- [49] T.J. Daou, L. Li, P. Reiss, V. Josserand, I. Texier, Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots, *Langmuir* 25 (2009) 3040–3044.
- [50] K.M. McNeeley, A. Annapragada, R.V. Bellamkonda, Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma, *Nanotechnology* 18 (2007) 385101.
- [51] R.R. Sawant, R.M. Sawant, A.A. Kale, V.P. Torchilin, The architecture of ligand attachment to nanocarriers controls their specific interaction with target cells, *J. Drug Target.* 16 (2008) 596–600.
- [52] D. Boturyn, J.L. Coll, E. Garanger, M. Favrot, P. Dumy, Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5730–5739.
- [53] E. Garanger, D. Boturyn, J.L. Coll, M. Favrot, P. Dumy, Multivalent RGD synthetic peptides as potent $\alpha_v\beta_3$ integrin ligands, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 1958–1965.
- [54] E. Garanger, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.L. Coll, New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging and therapy of tumors, *Mol. Ther.* 12 (2005) 1168–1175.
- [55] Z. Cheng, Y. Wu, Z. Xiong, S.S. Gambhir, X. Chen, Near-infrared fluorescent RGD peptides for optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in living mice, *Bioconj. Chem.* 16 (2005) 1433–1441.

4. Vers la thérapie

Les particules lipidiques de type LNE et LNC ont été développées pour pallier certains inconvénients liés à l'utilisation des liposomes, tels leur faible stabilité lors de la conservation ou de l'administration, leur processus complexe de fabrication ou leur faible potentiel d'encapsulation de principes actifs lipophiles. Ainsi de nombreuses applications thérapeutiques sont envisageables pour les LNE et les LNC. Elles peuvent notamment être utilisées pour encapsuler diverses drogues anti-tumorales, notamment des molécules hydrophobes dont l'administration systémique est délicate. Leur encapsulation améliore leur biodisponibilité en augmentant leur demi-vie plasmatique, en permettant une libération prolongée et en diminuant ainsi leurs effets secondaires. Diverses autres applications sont également développées, comme d'encapsulation d'ADN pour la thérapie génique des cancers, mais aussi l'encapsulation de siRNA ou de peptides thérapeutiques.

Dans ce contexte, nous avons testé des LNC encapsulant de l'ADN et une formulation de paclitaxel (LNC paclitaxel).

4.1. Les LNC : un vecteur prometteur pour la transfection de gène *in vivo*

A ce jour, l'objectif de la thérapie génique est le développement de vecteurs permettant d'encapsuler et de délivrer des acides nucléiques au niveau de cellules cibles après administration intra-veineuse.

4.1.1. But de l'étude et principaux résultats

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Marie Morille et Catherine Passirani (INSERM U646, Angers), qui ont synthétisé les nanoparticules.

Le but de cette étude est de générer un vecteur fonctionnel pour la délivrance de gène *in vivo* après administration systémique. Ainsi, des LNC encapsulant des lipoplexes DOTAP/DOPE (LNC ADN) ont été PEGylées par des polymères flexibles dans le but d'améliorer leur biodistribution et de permettre la transfection de gènes *in vivo*. Deux polymères ont été testés : le DSPE-mPEG2000 et le copolymère à bloc F108.

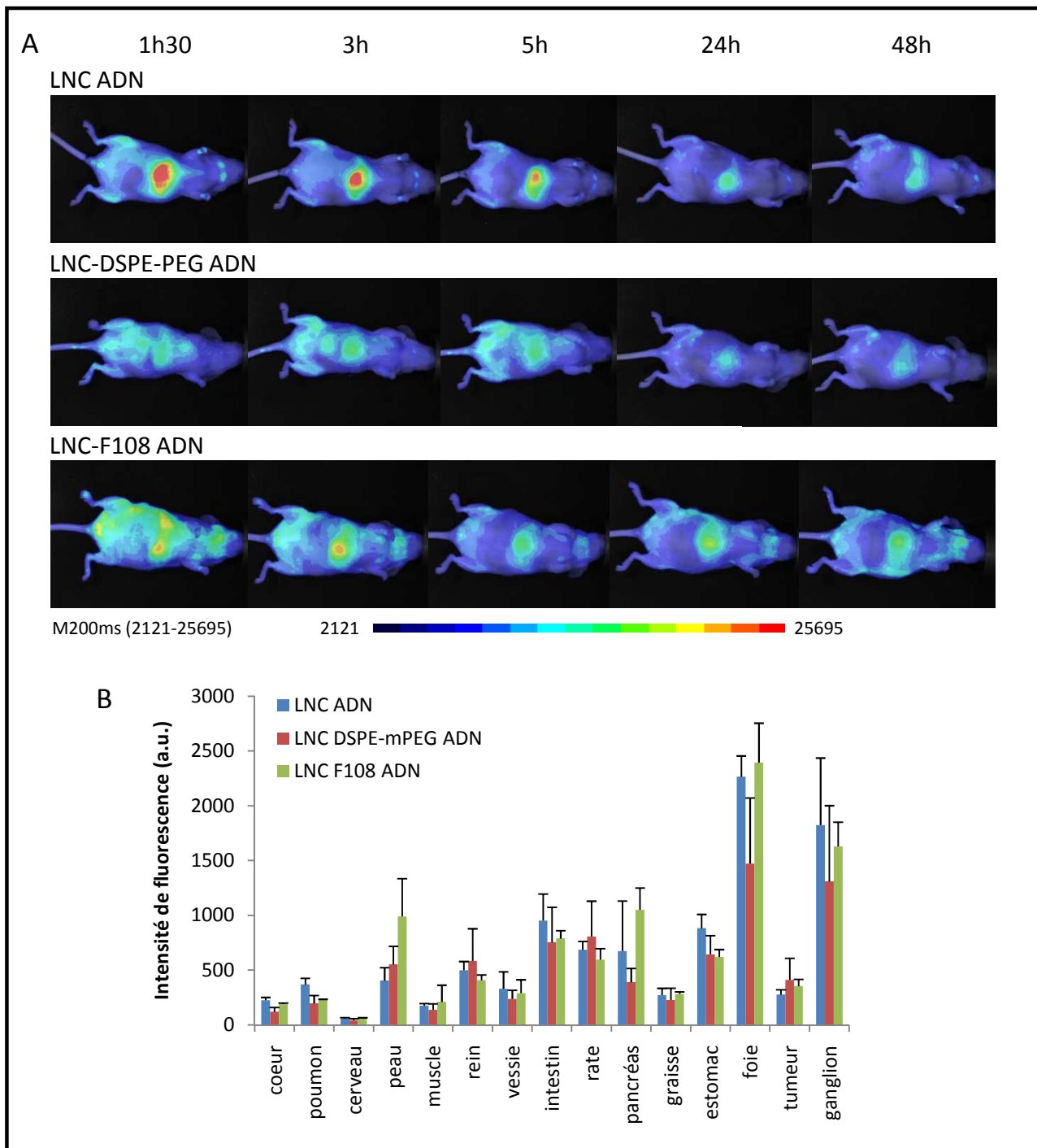


Figure 76. Biodistribution *in vivo* des LNC ADN, LNC-DSPE-mPEG2000 ADN et des LNC-F108 ADN après administration intra-veineuse.

Les souris, porteuses d'une xénogreffe sous-cutanée de cellules HEK293(β 3), sont injectées par voie intra-veineuse avec 200 μ l d'une suspension de LNC (50 μ M en DiD).

[A] Images de fluorescence enregistrées à différents temps post injection.

[B] Quantification de la fluorescence émise par les différents organes après dissection (48h après injection).

La biodistribution des différentes particules encapsulant des lipoplexes DOTAP/DOPE et du DiD a été réalisée sur un modèle de souris *nude* xéno greffée avec des cellules HEK293(β 3) en sous-cutané.

Les différentes LNC présentent une biodistribution relativement homogène et comparable (Figure 76). Hormis une accumulation hépatique prédominante des LNC ADN et des LNC-F108 ADN. Cette accumulation est moins prononcée pour les LNC-DSPE-mPEG2000 (diminution de la fluorescence d'un facteur 1,6). Les LNC sont également très fortement captées par les ganglions lymphatiques. La fluorescence quantifiée est comparable à celle du foie et elle est environ trois fois plus importante que celle des autres organes. En ce qui concerne les autres organes, un signal fluorescent est observé dans les intestins, les reins, la rate et le pancréas.

L'efficacité de transfection des LNC ADN encapsulant le pCMVluciférase comme gène rapporteur a ensuite été évaluée *in vitro* sur les HEK293(β 3) après 24h de traitement. Les résultats montrent que les LNC ADN possèdent un faible pouvoir transfectant. Celui-ci est faiblement augmenté par l'ajout de DSPE-mPEG2000. En revanche, l'ajout du copolymère à bloc F108 augmente d'un facteur 4 l'activité de transfection en comparaison au DSPE-mPEG2000 (Figure 4 de l'article).

In vivo l'activité de transfection a été évaluée 48h après injection intra-veineuse. L'expression de la luciférase est mesurée uniquement dans les tumeurs transfectées par les LNC-DSPE-mPEG2000 ADN. Elle est 44 fois supérieure à celle détectée dans les poumons ou le foie, et 84 fois supérieure à celle de la rate (Figure 5 de l'article).

La différence d'association du DSPE-mPEG2000 (ancrage) et du F108 (adsorption) aux LNC ADN peut expliquer ces différences de comportement *in vitro* et *in vivo*. L'adsorption qui est une interaction faible est connue pour ne pas résister à de longs temps de circulation *in vivo*. De plus, l'expression préférentielle de la luciférase avec les LNC-DSPE-mPEG2000 ADN est corrélée avec une accumulation passive dans les tumeurs (biodistribution par imagerie de fluorescence et résultats précédemment observés (Morille et coll., 2010)). L'effet EPR compense probablement la faible expression génique obtenue *in vitro*.

4.1.2. Article 5

***In vivo* gene expression in tumor after systemic injection of PEGylated DNA lipid nanocapsules.**

Morille M., Passirani C., **Dufort S.**, Bastia G., Garcion E., Pitard B., Coll J-L., Benoit J-P.

Soumis dans Nanoletters, 2010

4.1.3. Conclusions

La présence de chaînes de DSPE-mPEG2000 à la surface des LNC ADN, a permis l'obtention d'un vecteur furtif aux yeux du système immunitaire capable de s'accumuler de manière significative au niveau des tissus tumoraux, grâce à un effet EPR et permettant la transfection de gènes *in vivo*.

***In vivo* gene expression in tumor after systemic injection of PEGylated DNA lipid nanocapsules.**

Morille M, Passirani C, Dufort S, Bastia G, Garcion E, Pitard B, Coll J-L, Benoit J-P.
Soumis dans *Nanoletters*, 2010.

***In vivo* gene expression in tumor after systemic injection of PEGylated DNA lipid nanocapsules**

Morille M.¹, Passirani C.^{1}, Dufort S.², Bastia G.¹, Garcion E.¹, Pitard B.^{3,4}, Coll J-L.², Benoit J-P.¹*

¹Inserm U646, Université d'Angers, 10 rue André Boquel, F-49100 Angers, France; ²Institut Albert Bonniot, INSERM U82, GRCP, La Tronche, France; ³Inserm U915, F-44000 Nantes, France; ⁴Université de Nantes, Faculté de Médecine, Institut du Thorax, F-44000 Nantes, France.

*Corresponding author. Tel.: +33 241 735850 Fax: +33 241 735853

E-mail: catherine.passirani@univ-angers.fr

Abstract

With the goal of generating an efficient vector for systemic gene delivery, a new kind of nanocarrier consisting of lipid nanocapsules encapsulating DOTAP/DOPE lipoplexes (DNA LNCs) was pegylated by the post-insertion of amphiphilic and flexible polymers. Thanks to this PEGylation, after intravenous injection, gene expression was up to 84 fold more important in tumors compared to other tested organs. The present results indicate that PEGylated DNA LNCs constitute promising carriers for an efficient cancer gene therapy.

Developing new therapies against cancer, including gene therapy is a major health priority and, two-thirds of all gene therapy trials have focused on the treatment of cancer (www.wiley.co.uk/genmed/clinical). However, the initial enthusiasm for cancer gene therapy has been dampened by the poor efficiency of the delivery systems, especially when the DNA has to be administered by the intravenous route. Up to day, viral vectors are still the vectors of choice for efficient gene expression, but they suffer from important disadvantages such as risks of mutagenesis, immunogenicity, and high production costs. In parallel, synthetic vectors based on the use of electrostatic interactions between cationic lipids or polymers and anionic DNA molecules are efficient *in vitro* due to their global, positive charge, but are not suited to *in vivo* transfection of tumors^{1, 2}. As an exemple, polyethylenimine (PEI) is one of the most efficient gene delivery system *in vitro* and *in vivo*²⁷, but its efficacy to transfect tumors and its possible toxicity is still an issue^{28, 29}

Indeed, their positive charge provides adsorption by seric proteins and elimination from the blood circulation. Finally, when injected intravenously, a nanocarrier has to be small (50-200nm) and neutral or weakly charged if it is to escape recognition by cells of the mononuclear phagocyte system (MPS).

In this way, lipid nanocapsules (LNCs) covered with poly (ethylene glycol)₆₆₀ hydroxystearate (HS-PEG₆₆₀) were developed according to a solvent-free process based on emulsion phase-inversion³. In a previous work, these standard LNCs were modified to allow the encapsulation of positively-charged DOTAP/DOPE-DNA lipoplexes, providing nanocarriers named DNA LNCs which efficiently protected DNA in their lipid core⁴.

Nevertheless, the encapsulation of these complexes still resulted in systems carrying a positive surface charge, incompatible with an intravenous *in vivo* injection. In order to extend the disappearance half-life time in blood, by dissimulating this surface charge and avoiding opsonisation⁵, the surface of DNA LNCs was modified by the post-insertion of longer PEG chains⁶. Two kinds of polymers were chosen: amphiphilic PEG derivative 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-mPEG₂₀₀₀) (Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, USA; Mean Molecular Weight (MMW) = 2,805g/mol) and poloxamer F108 (poly(ethyleneoxide)₁₃₂-poly(propyleneoxide)₅₀-poly(ethyleneoxide)₁₃₂; = PEO₁₃₂-PPO₅₀-PEO₁₃₂) (kindly provided by BASF; MMW = 14,600g/mol). These polymers were associated to LNCs following a post-insertion process on pre-formed LNCs as already

described^{7, 8}. This method consists of a co-incubation step of DNA LNCs with different concentrations of PEG derivatives (2, 5 and 10mM for DSPE-mPEG₂₀₀₀ and 1, 2, 3mM for F108) for 4h at 30°C, followed by a cooling step which stabilized the system⁸.

To check the association of polymers and DNA LNCs, the average hydrodynamic diameter of the LNCs was determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer[®] (Nano Series DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) at a 1:100 dilution of nanoparticles in deionised water. The evolution of the hydrodynamic diameter after post-insertion proved the association of DSPE-mPEG₂₀₀₀ and F108 molecules with the LNC shell at each concentration (Figure 1). Therefore new objects, named PEGylated DNA LNCs, were created. This size increase was stable for 12h at 37°C, without swelling, micelle apparition, nor aggregation (data not shown). Depending on the polymer structure (Figure 2A) and based on different studies⁸⁻¹¹, two kinds of association can be hypothesised: an anchorage of the lipid part of DSPE-mPEG₂₀₀₀ (DSPE) into the core of the LNCs and a physical adsorption of PPO parts of the F108 block copolymer by hydrophobic interactions (Figure 2B).

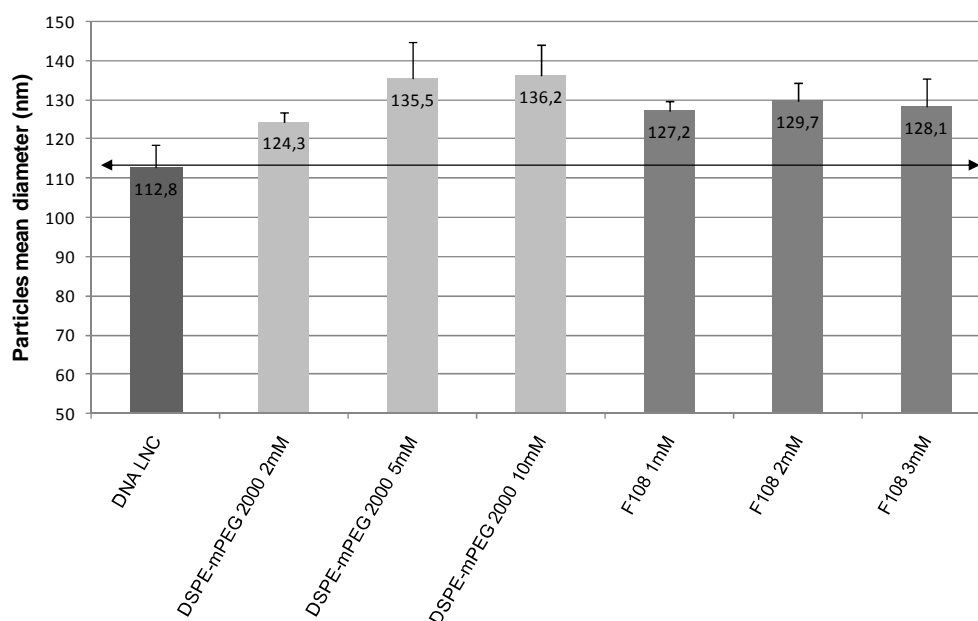


Figure 1. Size evolution after the post-insertion of DSPE-mPEG₂₀₀₀ and F108 block copolymer at different concentrations.

Wong *et al.*¹² exposed that the overall lengths of a coiled and an extended PEG₂₀₀₀ chain were about 5 and 10-15nm, respectively. The size variation when adding DSPE-mPEG₂₀₀₀ to the DNA LNC surface, whatever the concentration, was from +11nm (2mM DSPE-mPEG₂₀₀₀) to +22nm (10mM DSPE-mPEG₂₀₀₀), indicating a probable extended chain conformation (Figure 2B). By contrast, the size increase provided by F108 post-insertion was smaller (around 15nm), whereas F108 polyethylene oxide chains are 3 times longer than DSPE-mPEG₂₀₀₀ ones (132 vs. 45 ethylene oxide units) (Figure 2A). These results suggest a probable coiled configuration of the F108 chains, as schematically represented in Figure 2B.

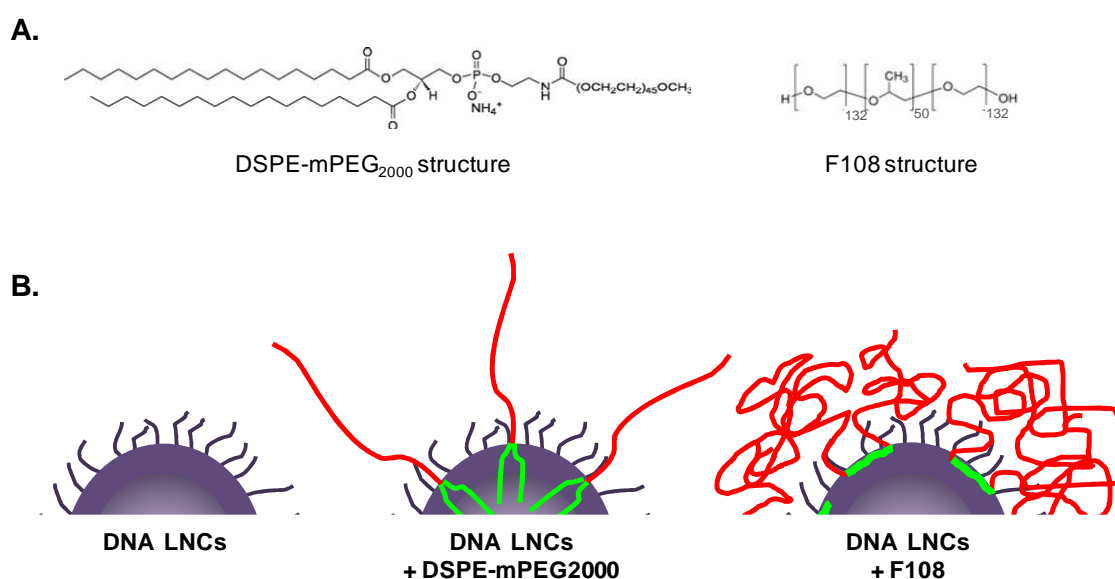


Figure 2. Chemical structure of the different post-inserted polymers (A) and schematic representation of the polymer association to DNA LNCs (B).

PEG density, thickness and length, are important parameters to consider in order to avoid opsonisation¹³. Furthermore, it has been reported that the dominant factor to control the interactions with the biological cell surface is not only linked to the surface charge carried by the particle but also to the softness of the polymer surface¹⁴. Thus, the surface of DNA LNCs, covered or not with DSPE-mPEG₂₀₀₀ or F108 block copolymers, was analysed using Ohshima's electrokinetic theory for "soft" or "hairy" particles¹⁵. This theory applies to a spherical, hard, colloidal particle coated with a layer of polyelectrolytes or non-charged

polymers, and is based on the ion permeability of the polymer layer present in the particle shell. This theory was already applied to LNCs without DNA^{16, 17}. Briefly, nanoparticles were dispersed in electrolyte solutions with various ionic strengths (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 5, 10, 25 and 50mM NaCl) at pH 7.4 and an electrophoretic mobility measurement was performed using a Malvern Zetasizer[®] (Nano Series DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). With increasing ionic strength, the absolute mobility values of all the nanoparticles decreased because of the enhancement of the shielding effect of electrolyte ions in the medium.

Following Ohshima theory, two parameters of the surface layer of the different particles were determined: the spatial charge density (ZN) and softness ($1/\lambda$). Values of ZN and $1/\lambda$ were determined by a curve-fitting procedure already described¹⁴. The theoretical values of Eq. (1) (supporting informations) were plotted versus the ionic strength in comparison with the experimental data. The best fit values of the charge density ZN and the softness parameter $1/\lambda$ are shown in Table 1.

The spatial charge density (ZN) present in the layer of DNA LNCs was higher than that of the 100nm LNCs without DNA (+1.44 compared to $-0.64 \times 10^6 \text{C.m}^{-3}$) (Table 1) due to the presence of highly, positively-charged lipoplexes in the core of DNA LNCs¹⁸.

	$ZN (10^6 \text{C.m}^{-3})$	$1/\lambda (\text{nm})$
100nm LNCs [8]	-0.64	0.1
DNA LNCs	1,44	1.5
DNA LNCs + DSPE-mPEG2000 2mM	0,16	1
DNA LNCs + DSPE-mPEG2000 5mM	-0,12	1.5
DNA LNCs + DSPE-mPEG2000 10mM	-0,48	1
DNA LNCs + F108 1mM	0.88	0.7
DNA LNCs + F108 2mM	0.72	0.7
DNA LNCs + F108 3mM	0,48	0.5

Table 1. ZN and $1/\lambda$ parameters for classic LNCs of 100nm, DNA LNCs and coated DNA LNCs.

As observed by several authors¹⁹⁻²², it was found that PEGylation decreased the surface charge density of the outer layer. This effect was observed for F108 in proportion to its concentration (0.88, 0.72, 0.48 $\times 10^6 \text{C.m}^{-3}$). Moreover, the increase of DSPE-mPEG₂₀₀₀ concentration at the surface of DNA LNCs induced a decrease of the charge from positive to negative values. Vonarbourg *et al.*¹⁶ demonstrated that PEG chains can carry negative dipolar charges and that the higher the charge density, the more ordered the chain configuration. Furthermore, the similarity of $1/\lambda$ values between DSPE-mPEG₂₀₀₀ coated LNCs and DNA LNCs implies that the DSPE-mPEG₂₀₀₀ chains do not disturb counter-ion penetration (comparison between Figures 3A and 3B). So, ZN and $1/\lambda$ values indicate a DSPE-mPEG₂₀₀₀ coating organized in a brush conformation, as represented in Figure 2B and 3B. $1/\lambda$ values obtained with F108 are inferior to DNA LNC and DSPE-mPEG₂₀₀₀-coated DNA LNC ones (0.5 to 0.7nm compared to 1 to 1.5nm, Table 1). Therefore, the accessible layer to ions is thinner for F108-coated DNA LNCs. This tends to confirm that there is a super-coiled conformation of the long F108 chains at the surface of DNA LNCs, limiting the deep penetration of counter-ions into the layer (Figure 3C). This result is in a good correlation with the previous results linked to size measurement.

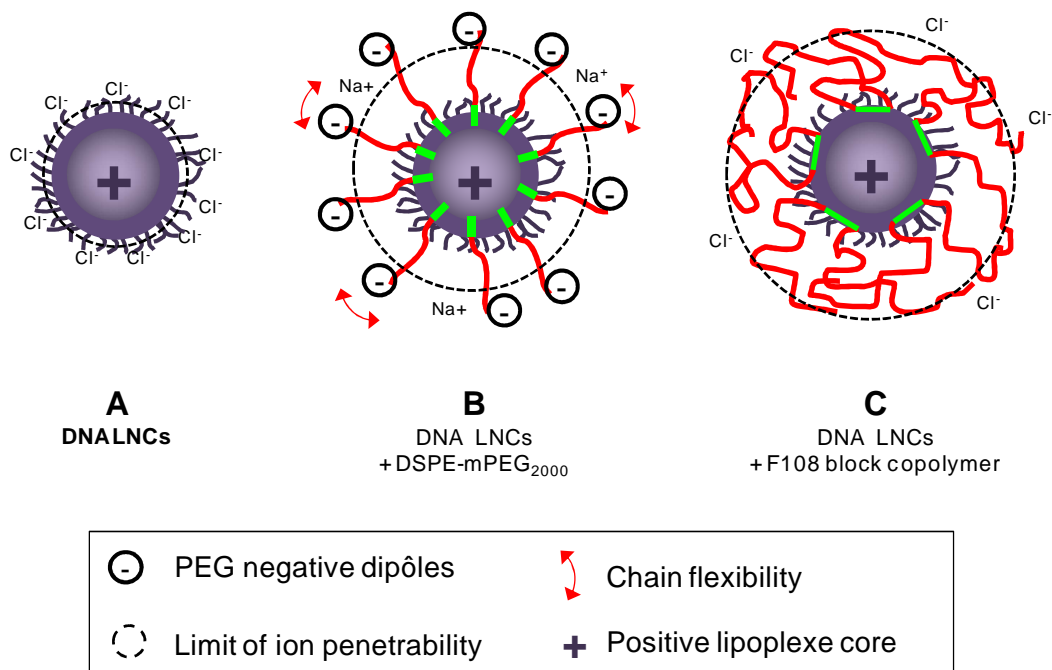


Figure 3. Schematic representation of the PEG chain conformation at the DNA LNC surface in the case of DNA LNCs (A), DNA LNCs + DSPE-mPEG₂₀₀₀ at 5 or 10mM (B), and DNA LNCs + F108 at 1, 2, 3mM (C).

The transfection ability of DNA LNCs and PEGylated DNA LNCs, encapsulating pCMVluciferase as a reporter gene, was then investigated in HEK293(β_3) cell line. HEK293(β_3) is a stable transfectant derivative of the HEK293 cell line transfected with the human integrin β_3 subunit³⁰.

In order to compare the *in vitro* transfection efficiency of the different LNCs into HEK293(β_3) cells, transfection assay were performed thanks to the study of luciferase expression after a 24h incubation of LNCs with these cells (Figure 4).

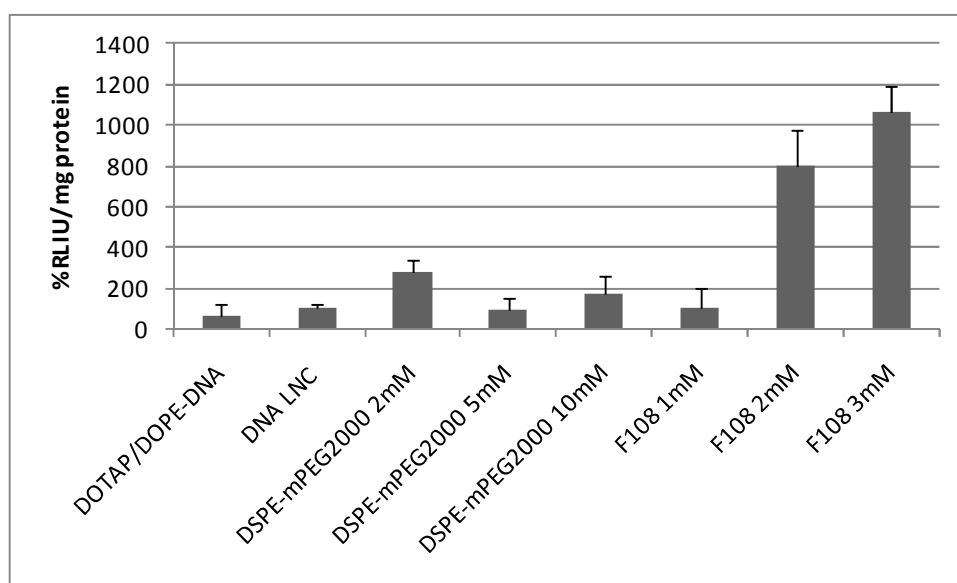


Figure 4. *In vitro* transfection activity of the different kinds of nanoparticles on Hek β_3 cell line.

Non coated DNA LNCs were weakly able to transfect Hek β_3 cells. As expected, the presence of increasing concentrations of long chains of DSPE-mPEG₂₀₀₀ at the surface of DNA LNCs (2, 5 and 10mM) did not significantly enhance the transfection efficiency probably due to the steric repulsion provided by the flexible chains of PEG. By contrast, the transfection activity was increased for the F108 coated particles, especially at 2 and 3mM concentrations. This efficiency could be attributed to the presence of hydrophobic interactions between polypropylene oxide parts and the cells²³ and was already observed in a previous study on different cell lines²⁴.

In vivo transfection activity in tumor bearing mice (Hek β 3) was tested 48h after intravenous injection of three kinds of nanoparticles (DNA LNCs, DNA LNCs + DSPE-mPEG₂₀₀₀ 10mM and F108 2mM) by measuring luciferase expression after dissection of the main elimination organs (liver, lung, spleen, and kidney) and the tumor. This study evidenced a dramatic increase of luciferase expression in tumor after injection of DNA LNCs coated with DSPE-mPEG₂₀₀₀ whereas this was not observed for others kinds of nanoparticles (Figure 5). This marked difference between the gene expression in tumor tissue and in lung or liver was 44 fold increased. This was even superior when tumor was compared to kidney or spleen (68 and 84 fold higher respectively).

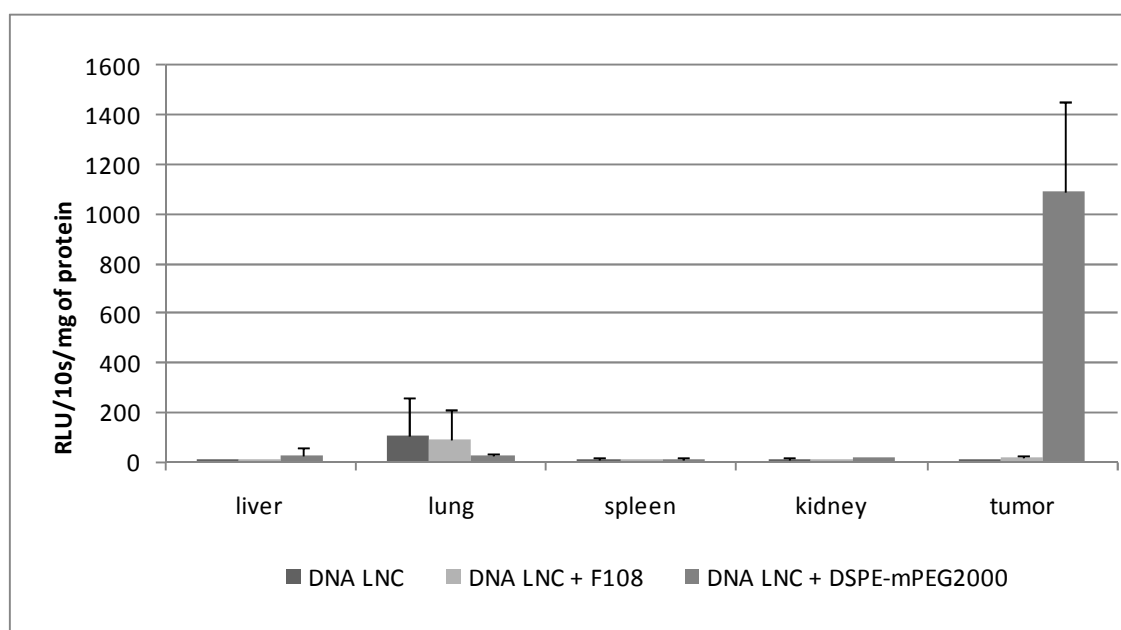


Figure 5. *In vivo* transfection efficiency after intravenous injection of DNA LNCs, DNA LNCs + F108, or DNA LNCs + DSPE-mPEG₂₀₀₀ in tumor bearing mice.

The difference of association of DSPE-mPEG₂₀₀₀ (anchorage) and F108 (adsorption) to DNA LNCs can be the cause of this difference of behavior. Indeed, adsorption is a weak interaction which is known to be unable to resist a long time to *in vivo* conditions²⁵. The preferential luciferase expression found in the tumor after DSPE-mPEG₂₀₀₀ coated DNA LNCs injection has to be correlated to the already observed passive targeting obtained with this kind of particles⁶. Indeed, the enhanced permeability and retention effect (EPR effect)²⁶ probably compensated the low gene expression encountered *in vitro*.

Thus, this pointed out the drawback encountered to synthesize vectors for *in vivo* application. Indeed, the carrier has to be stealth in regards to the cells of immune systems, but has also to be able to enter the targeted cells for transfection efficiency. These two opposed properties are difficult to combine in one single carrier. In this way, these results evidenced the positive influence of the conformation of DSPE-mPEG₂₀₀₀ chains at the surface of DNA LNCs, which transform this vector in both a stealth and transfecting gene delivery system, and above all, in a promising tool for the future of cancer gene therapy.

Acknowledgements

This research was supported by the Biogeneouest[®], 35653 Le Rheu, France. We would like to thanks Pr. Patrick Saulnier for its helpful expertise on Ohshima methods.

REFERENCES

1. Barteau, B.; Chevre, R.; Letrou-Bonneval, E.; Labas, R.; Lambert, O.; Pitard, B. *Curr Gene Ther* 2008, 8, (5), 313-23.
2. Labas, R.; Beilvert, F.; Barteau, B.; David, S.; Chevre, R.; Pitard, B. *Genetica* 2009.
3. Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J. E.; Benoit, J. P. *Pharm Res* 2002, 19, (6), 875-80.
4. Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Desigaux, L.; Allard, E.; Saulnier, P.; Lambert, O.; Benoit, J. P.; Pitard, B. *Biomaterials* 2009, 30, (18), 3197-204.
5. Klibanov, A. L.; Maruyama, K.; Torchilin, V. P.; Huang, L. *FEBS Lett* 1990, 268, (1), 235-7.
6. Morille, M.; Montier, T.; Legras, P.; Carmoy, N.; Brodin, P.; Pitard, B.; Benoit, J. P.; Passirani, C. *Biomaterials* 2010, 31, (2), 321-9.
7. Beduneau, A.; Saulnier, P.; Hindre, F.; Clavreul, A.; Leroux, J. C.; Benoit, J. P. *Biomaterials* 2007, 28, (33), 4978-90.
8. Hoarau, D.; Delmas, P.; David, S.; Roux, E.; Leroux, J. C. *Pharm Res* 2004, 21, (10), 1783-9.
9. Batrakova, E. V.; Miller, D. W.; Li, S.; Alakhov, V. Y.; Kabanov, A. V.; Elmquist, W. F. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, 296, (2), 551-7.
10. Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y. *J Control Release* 2002, 82, (2-3), 189-212.
11. Uster, P. S.; Allen, T. M.; Daniel, B. E.; Mendez, C. J.; Newman, M. S.; Zhu, G. Z. *FEBS Lett* 1996, 386, (2-3), 243-6.
12. Wong, J. Y.; Kuhl, T. L.; Israelachvili, J. N.; Mullah, N.; Zalipsky, S. *Science* 1997, 275, (5301), 820-2.
13. Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoit, J. P. *Biomaterials* 2006, 27, (24), 4356-73.
14. Makino, K.; Umetsu, M.; Goto, Y.; Nakayama, A.; Suhara, T.; Tsujii, J.; Kikuchi, A.; Ohshima, H.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1999, 13, (6), 287-297.
15. Ohshima, H. *Electrophoresis* 1995, 16, (8), 1360-3.
16. Vonarbourg, A.; Saulnier, P.; Passirani, C.; Benoit, J. P. *Electrophoresis* 2005, 26, (11), 2066-75.
17. Beduneau, A.; Saulnier, P.; Anton, N.; Hindre, F.; Passirani, C.; Rajerison, H.; Noiret, N.; Benoit, J. P. *Pharm Res* 2006, 23, (9), 2190-9.
18. Xu, Y.; Hui, S. W.; Frederik, P.; Szoka, F. C., Jr. *Biophys J* 1999, 77, (1), 341-53.
19. Kaper, H. J.; Busscher, H. J.; Norde, W. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003, 14, (4), 313-24.
20. Arnold, K.; Zschoernig, O.; Barthel, D.; Herold, W. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1022, (3), 303-10.
21. Osterberg, E.; Bergstrom, K.; Holmberg, K.; Schuman, T. P.; Riggs, J. A.; Burns, N. L.; Van Alstine, J. M.; Harris, J. M. *J Biomed Mater Res* 1995, 29, (6), 741-7.
22. Webb, M. S.; Saxon, D.; Wong, F. M.; Lim, H. J.; Wang, Z.; Bally, M. B.; Choi, L. S.; Cullis, P. R.; Mayer, L. D. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1372, (2), 272-82.
23. Alakhov, V. Y.; Kabanov, A. V. *Expert Opin Investig Drugs* 1998, 7, (9), 1453-73.
24. Morille, M.; Passirani, C.; Letrou-Bonneval, E.; Benoit, J. P.; Pitard, B. *Int J Pharm* 2009.
25. Milner, S. T. *Science* 1991, 251, (4996), 905-914.
26. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J Control Release* 2000, 65, (1-2), 271-84.
27. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, MA., Mergny, MD., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, JP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92, (16), 7297-301
28. Coll, J.L., Chollet, P., Brambilla, E., Desplanques, D., Behr, J.P., Favrot, M. *Hum Gene Ther.* 1999, 10, (10), 1659-66.
29. Chollet, P., Favrot, M.C., Hurbin, A., Coll, J.L. *Gene Med.* 2002, 4, (1), 84-91.
30. Garanger, E., Boturyn, D., Jin, Z., Dumy, P., Favrot, M.C., Coll, J.L. *Mol Ther*, 2005, 12, (6), 1168-75

Supporting information

Following Ohshima methods, it is supposed that the particle having an ionised group of valency Z on the surface and that is uniformly distributed at a number density of N (m^{-3}) moves in a liquid containing a symmetrical valency ν in the applied electric field. The electrophoretic mobility μ is then expressed by Eq. (1):

$$\mu = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \frac{\psi_0 / \kappa_m + \psi_{DON} / \lambda}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda} + \left(\frac{zeN}{\eta \lambda^2} \right) \quad (1)$$

$$\kappa_m = \kappa [1 + A^2]^{1/4} \text{ with } A = \frac{ZN}{2en} \quad (2)$$

$$\kappa = \left(\frac{2z^2 e^2 n}{\varepsilon_0 \varepsilon_r kT} \right)^{1/2} \quad (3)$$

$$\psi_{DON} = \frac{kT}{ze} \ln [A + (A^2 + 1)^{1/2}] \quad (4)$$

$$\psi_0 = \frac{kT}{ze} \left[\ln [A + (A^2 + 1)^{1/2}] + \frac{1}{A} \times [1 - (A^2 + 1)^{1/2}] \right] \quad (5)$$

In Eq. (1), η is the viscosity of the medium, λ characterises the degree of friction exerted on the liquid flow in the surface layer, ε_r the relative permittivity of the solution, ε_0 the permittivity of a vacuum. κ_m (Eq. (2)) can be interpreted as the Debye-Hückel parameter of the shell, where κ is the Debye-Hückel parameter (the reciprocal of the Debye length). T is the thermodynamic absolute temperature, k (Eq. (3)) is the Boltzmann constant and n is the bulk concentration of the electrolyte solution. ψ_{DON} (Eq. (4)) is the Donnan potential of the surface layer, ψ_0 (Eq. (5)) the potential at the boundary between the surface layer and the surrounding solution.

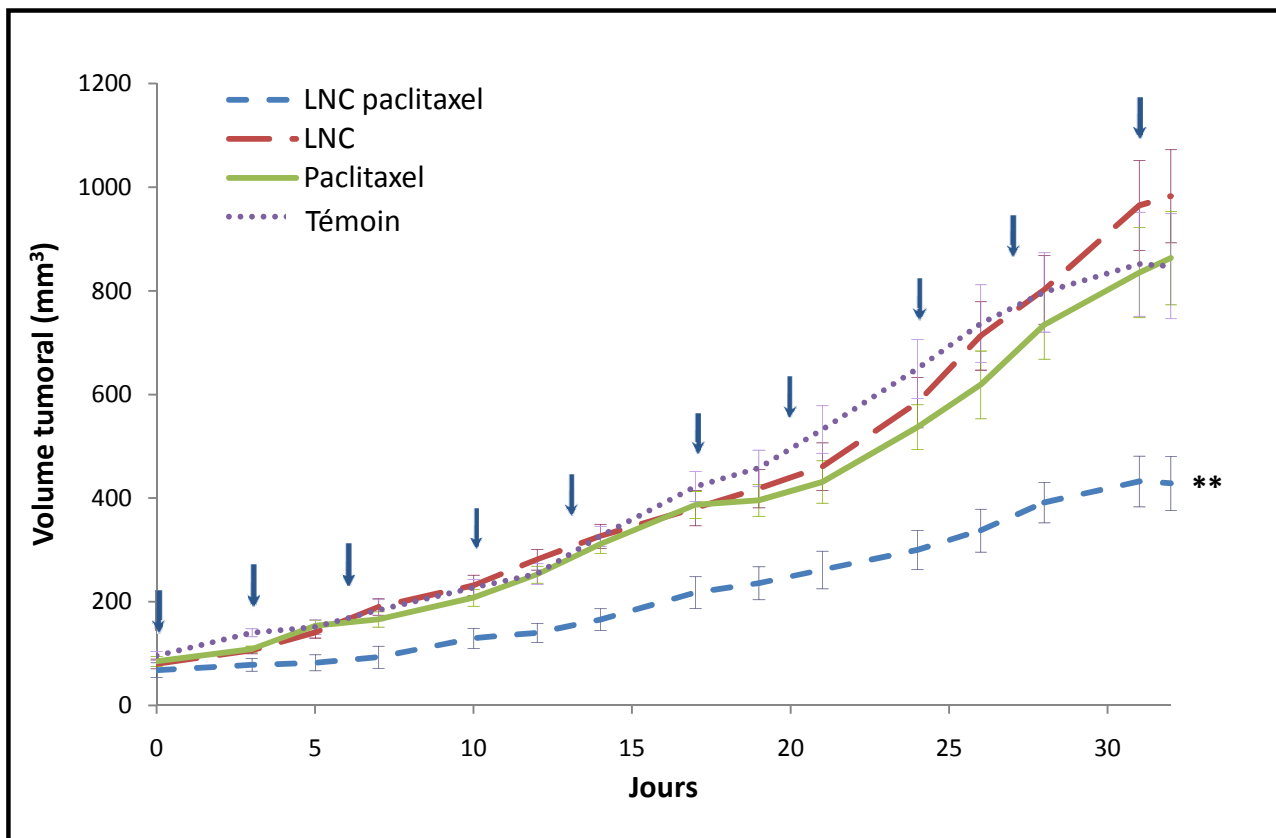


Figure 77. Activité anti-tumorale des LNC-paclitaxel sur des tumeurs sous-cutanées induites par les cellules IGROV1.

Les LNC-paclitaxel les LNC ou le paclitaxel sont administrés par voie intra-péritonéale à la dose de 2 mg/kg. Les jours de traitement sont indiqués par les flèches bleues. Le suivi du volume tumoral a été effectué 3 fois par semaine (n = 9 souris par groupe). (** p < 0,02)

4.2. LNC paclitaxel

La majorité des molécules anti-tumorales sont très efficaces mais présentent de nombreux effets secondaires, par action sur les cellules saines, qui limitent leur utilisation. Ainsi, une des nouvelles stratégies proposées pour améliorer l'efficacité thérapeutique des principes actifs est l'utilisation des systèmes de transport de taille nanométrique, tels que les liposomes ou les LNC.

D'autre part, le Taxol[®], première formulation du paclitaxel, a permis des avancées majeures pour le traitement des tumeurs solides, en particulier les cancers du sein, de l'ovaire et les cancers du poumon non à petites cellules. Le paclitaxel présente de nombreuses activités pharmacologiques : anti-proliférative, anti-angiogénique, anti-métastatique et pro-apoptotique. Cependant sa solubilisation dans l'eau requiert l'ajout d'éthanol et de Cremophor[®] EL. Ce dernier excipient peut induire un syndrome de choc après injection intraveineuse due à la libération d'histamine. Le développement de nouvelles formulations est donc un challenge pour améliorer son administration et la tolérance au traitement.

Dans cette étude, nous avons comparé l'activité anti-tumorale du paclitaxel encapsulé ou non dans des LNC, sur un modèle de tumeur IGROV1 sensible à cette drogue. Nous avons choisi de traiter les animaux (9 souris par groupe) deux fois par semaine à la dose de 2 mg/kg, pendant 5 semaines. L'administration du traitement a été réalisée par injection intrapéritonéale. Le suivi du volume tumoral a été fait trois fois par semaine. Les groupes contrôles ont été traités soit par du sérum physiologique soit par des LNC ne contenant pas de paclitaxel.

La dose de 2 mg/kg est 10 fois inférieure à la dose efficace induisant une inhibition du volume tumoral dans le modèle utilisé (Taylor et coll., 2008).

Les résultats montrent qu'à cette dose le paclitaxel ne modifie pas la croissance des tumeurs IGROV1, qui est comparable à celle des groupes contrôles (Figure 77). En revanche, lorsqu'il est encapsulé dans les LNC, il ralentit la croissance tumorale d'un facteur 2,5.

Ainsi l'encapsulation du paclitaxel dans les LNC améliore son efficacité thérapeutique, ce qui permet d'envisager une réduction des doses à utiliser pour obtenir un effet thérapeutique comparable, tout en limitant les effets secondaires.

DISCUSSION

ET

PERSPECTIVES

Le but de mon travail était d'identifier différents types de molécules vecteurs capables de délivrer des traitements anti-tumoraux innovants dans des modèles précliniques chez la souris. Les vecteurs étudiés sont soit des peptides, comme le RAFT-(cRGD)₄ ou les « Cell Penetrating Peptides » (CPPs : MPG-8 et CAD2), ou des nanoparticules. La procédure choisie pour évaluer ces vecteurs consistait dans un premier temps à optimiser la distribution « passive » de ces macromolécules *in vivo* (temps de circulation sanguine, voie d'élimination,...). Dans un deuxième temps, les molécules ayant des paramètres pharmacocinétiques satisfaisants étaient modifiées par ajout d'un agent de ciblage (peptide -cRGD) pour augmenter le ciblage « actif » des tumeurs et de leur angiogénèse.

Nos vecteurs ont été choisis suivant plusieurs paramètres liés bien sûr à leur ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination), mais également en fonction des caractéristiques de l'agent thérapeutique à délivrer. En effet, des peptides cytotoxiques ou des siRNA varient notamment par leur capacité à agir sur une molécule cible unique ou multiple. Les siRNA ont une activité catalytique et vont dégrader plusieurs ARNm cibles alors qu'un peptide n'agira qu'une fois. Le ratio vecteur/drogue doit donc être adapté à ce mode d'action pour amener sur le site voulu un nombre suffisant de molécules thérapeutiques. D'autre part, les agents thérapeutiques utilisés peuvent par exemple exercer une action directe sur une cible spécifique dans un sous-compartiment cellulaire donné, ou bien agir indirectement sur les cellules tumorales et/ou sur leur microenvironnement. Le mode de libération de la drogue et son ciblage sera donc variable. Enfin, dans certaines conditions, un effet bystander peut être recherché afin de propager l'effet biologique aux cellules voisines de la cellule ayant initialement intégré la biomolécule. Il faudra donc adapter la biomolécule et le vecteur à utiliser en fonction de ces paramètres.

Nous pouvons isoler deux grands cas de figure : soit une molécule vecteur délivre une molécule thérapeutique, soit le vecteur est un réservoir qui contient plusieurs molécules.

I. Vectorisation ciblée de molécules uniques

1. Vectorisation de peptides

Les travaux du laboratoire ont permis de démontrer que le RAFT-(cRGD)₄ est un vecteur peptidique qui permet le ciblage spécifique de cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Au cours de

ma thèse, j'ai démontré que le RAFT-(cRGD)₄ permet également de délivrer le peptide cytotoxique (KLAKLAK)₂ spécifiquement dans ces cellules cibles. De plus, ce peptide est libéré sous une forme active au contact de la mitochondrie et peut ainsi exercer son activité pro-apoptotique, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ceci est une preuve de concept particulièrement importante, qui indique que le RAFT-(cRGD)₄ peut non seulement cibler une cellule particulière, mais qu'il est aussi capable d'apporter un « cargo », d'induire l'endocytose et de médier le trafficking intra-cellulaire d'un peptide non dégradé jusqu'au cœur de la cellule.

Cependant, l'activité anti-tumorale obtenue est trop modeste pour être satisfaisante car l'apoptose induite est faible. Nous attribuons ce résultat à deux points en particulier :

- 1/ La vectorisation dans un ratio de 1 RAFT-(cRGD)₄ pour 1 (KLAKLAK)₂.
- 2/ La faible toxicité intrinsèque du peptide (KLAKLAK)₂.

Différentes études complémentaires doivent être réalisées afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique de ce système. Ainsi, il serait indispensable d'étudier la stabilité du peptide (KLAKLAK)₂ après administration. Il est libéré sous forme biologiquement active et il exerce son activité au niveau intra-cellulaire, mais son temps de demi-vie dans le sang et son élimination (mode de dégradation, délai avant la dégradation) ne sont pas connus. Le peptide (KLAKLAK)₂ que nous utilisons est déjà protégé car nous avons remplacé le groupement -COOH de son extrémité C-terminale par un groupement -NH₂, ce qui limite sa dégradation. Néanmoins, pour plus de protection, il aurait fallu utiliser des acides aminés de la série D (acides aminés non naturels) au lieu des acides aminés de configuration L utilisés dans notre cas. Ainsi, les travaux réalisés par l'équipe d'Ellerby ont montré que l'utilisation d'acides aminés de la série D ou la modification de l'extrémité C-terminale par une amide permettent de conférer au peptide (KLAKLAK)₂ une stabilité métabolique avec une plus grande résistance aux dégradations enzymatiques (del Rio et coll., 2001).

D'autre part, le type de mort cellulaire induit par les peptides de type (KLAKLAK)₂ n'est pas clairement décrit. Certaines études suggèrent que ces peptides provoqueraient la nécrose en déstabilisant la membrane plasmique (Papo et coll., 2006), d'autres rapportent une augmentation des taux d'effecteurs de mort (Chen et coll., 2001) ou encore une dépolarisation létale de la mitochondrie (Ellerby et coll., 1999 ; Chen et coll., 2001 ; Mai et coll., 2001 ; Rege et coll., 2007). De plus, le peptide (KLAKLAK)₂ n'est efficace qu'à de très fortes concentrations (avec des doses létales d'environ 0,5 mM) (Ellerby et coll., 1999 ; Borgne-Sanchez et coll., 2007) ce qui est aujourd'hui considéré comme rédhibitoire. Nos résultats démontrent aussi que l'effet anti-tumoral obtenu n'implique pas prioritairement l'apoptose

comme attendu, mais plutôt une diminution de la prolifération cellulaire. Le mécanisme impliqué n'est pas encore caractérisé, mais il est possible que le peptide (KLAKLAK)₂ induise une diminution de l'activité mitochondriale insuffisante pour induire l'apoptose dans un contexte de cellules tumorales particulièrement résistantes, mais suffisante pour réduire le pool d'ATP et donc l'énergie disponible pour les cellules.

Les applications thérapeutiques de peptides naturels issus de la biodiversité sont prometteuses car le nombre d'agents naturellement sélectionnés (toxines, antibiotiques) est très important et qu'ils ne laissent bien souvent pas la possibilité à leur cible de générer des mécanismes de résistance. De plus, nous pouvons ainsi générer des couples vecteurs/drogues ciblant de petite taille qui diffusent très bien et touchent spécifiquement les cellules tumorales après administration par voie IV ou IP. Il serait donc intéressant d'utiliser de tels peptides en les rendant résistants à la dégradation. Le laboratoire étudie maintenant des peptides dérivant de la séquence BH3 de Bax (Moreau et coll., 2003) ou des toxines issues du venin de crotales.

2. Vectorisation de siRNA

En ce qui concerne la vectorisation de siRNA à l'aide du RAFT-(cRGD)₄ (ratio de un pour un), un problème majeur d'efficacité est observé. En effet, il faut utiliser une concentration de 5 µM de RAFT-(cRGD)₄-siRNA anti-pG13 pour obtenir un effet limité *in vitro*, inférieur à l'effet obtenu lors de la transfection de 5 nM du même siRNA à l'aide de l'Interferin®.

Différentes possibilités s'offrent à nous afin d'améliorer l'efficacité du siRNA anti-pG13 vectorisé par le RAFT-(cRGD)₄, par exemple modifier le siRNA pour augmenter sa stabilité, notamment par ajout d'une ou deux thymidines en 3', qui est la modification la plus couramment utilisée (Watts et coll., 2008). La protection du siRNA peut également être réalisée en utilisant d'autres types de vecteurs comme les CPPs. En effet, grâce à leur nature amphipathique, ces peptides CPPs sont capables de « cager », par interaction faible, le siRNA accroché covalamment au RAFT-(cRGD)₄ et donc de le protéger de la dégradation par des nucléases. De plus, ces CPPs pourraient aussi contribuer à une internalisation accrue des siRNA, mais cela se ferait théoriquement au détriment du ciblage *via* les RGD. L'ajout de CPPs sur des RAFT-(cRGD)₄-siRNA permettrait donc à priori de générer des particules multivalentes permettant la vectorisation ciblée de plusieurs siRNA par particule. Le potentiel « ciblant » RGD-dépendant devrait donc être soigneusement évalué dans ce contexte de particules faiblement caractérisées au niveau moléculaire.

II. Vectorisation multiple de biomolécules : le système des CPPs

Au cours des dernières années, le développement des siRNA a engendré beaucoup d'espoirs pour le ciblage thérapeutique de gènes spécifiques responsables de différentes pathologies. Cependant, leur faible internalisation cellulaire et leur biodisponibilité sont des obstacles majeurs pour leur utilisation en clinique, notamment pour une administration systémique même si les premières applications commencent à apparaître (Davis et coll., 2010). Les différentes approches développées pour améliorer leur vectorisation restent limitées, en particulier pour des applications *in vivo*.

Au cours des dix dernières années, les CPPs ont démontré une certaine efficacité pour améliorer la libération intra-cellulaire de nombreuses molécules biologiquement actives et plus récemment des siRNA, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les CPPs peuvent être liés au cargo de manière covalente, comme c'est le cas pour Tat, VP-22 ou l'homéodomaine d'Antennapedia, et permettre la libération de biomolécules actives (Wadia et Dowdy, 2005 ; Kim et coll., 2007). Ils peuvent également interagir de manière non-covalente avec le cargo, comme les peptides amphipathiques, tels que MPG-8, Pep-1 ou CAD2, et libérer les peptides (Morris et coll., 2001), des oligonucléotides (Morris et coll., 1997) ou des siRNA (Crombez et coll., 2007) sous forme biologiquement active.

La vectorisation de siRNA par les systèmes de CPPs tels que le MPG-8 ou le CAD2 permettent une bonne transfection et une libération des siRNA biologiquement actifs. Les études que nous avons menées ont validé leur utilisation *in vitro* et *in vivo* (Crombez et coll., 2009).

Comparés à des CPPs « covalents », tels que Tat ou la pénétratine, avec lesquels il faut lier chimiquement les siRNA *via* une chimie rédhibitoire, le MPG-8 ou le CAD2 ont l'avantage d'être des systèmes non-covalents qui complexent les siRNA au sein de particules *via* des liaisons de faible intensité après une simple co-incubation. Ces systèmes permettent la vectorisation de plusieurs siRNA au sein de particules. Ce ratio est ajustable, en modulant les concentrations relatives de chaque molécule.

Ces systèmes particuliers s'accumulent dans les tumeurs par effet EPR et ciblent à la fois les cellules endothéliales et les cellules tumorales, avec une meilleure diffusion au sein de la tumeur. Cependant ils ne permettent pas le ciblage spécifique de cellules d'intérêt. La modification du MPG-8 par du cholestérol améliore la biodistribution des complexes, en augmentant leur temps de circulation *in vivo* et leur efficacité de transfection, et cette

modification améliore également l'activité biologique des siRNA (Wolfrum et coll., 2007 ; Soutschek et coll., 2004).

Nous avons donc cherché à former des complexes ciblant en ajoutant du RAFT-(cRGD)₄, lié de manière covalente à un CAD2, en surface des particules SiRNA/CAD2. Le but de cette fonctionnalisation par le RAFT-(cRGD)₄ est d'amener spécifiquement les complexes au niveau des cellules d'intérêt en ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Les CPPs faciliteront ensuite l'internalisation dans les cellules, ainsi que la libération des siRNA. Les résultats préliminaires obtenus avec ces particules sont encourageants, avec un ciblage spécifique des cellules d'intérêt *in vitro*, mais un manque de sélectivité *in vivo*. Cependant, les particules ciblantes évaluées sont mal contrôlées. Il faudrait donc mieux caractériser ces particules au niveau de leur taille, de leur composition (quantité et présentation du RAFT-(cRGD)₄ en surface), de leurs paramètres physico-chimiques (stabilité, taille des particules, ...), mais également mieux caractériser leur ADME.

Parallèlement aux systèmes de type RAFT-(cRGD)₄ bien caractérisés, spécifiques pour le ciblage des cellules intégrines $\alpha_v\beta_3$ mais dont l'efficacité reste limitée, et aux CPPs \pm RAFT-(cRGD)₄ qui engendrent des particules mal caractérisées *via* des interactions électrostatiques, nous nous sommes aussi intéressés des nanoparticules solides ou lipidiques. Les objectifs étaient d'améliorer la capacité de ciblage et la quantité de biomolécules vectorisées, mais également d'avoir un système couplant l'imagerie (une ou plusieurs modalités) et la thérapie.

III . Les nanoparticules

De nombreuses nanoparticules d'origine différentes et de composition très variable ont été évaluées, et plus particulièrement :

- des nanoparticules inorganiques d'oxyde de Gadolinium,
- des nanoparticules inorganiques d'or,
- des nanocargos lipidiques type LNC ou LNE, dont la taille est ajustable.

D'une manière générale, nous avons étudié le potentiel de ces nanoparticules *in vivo* en faisant varier leur taille et en fonctionnalisant leur surface par différents polymères afin d'augmenter leur furtivité. De plus, nous avons essayé d'ajouter un agent de ciblage de type

RGD sur les particules furtives obtenues, pour cibler spécifiquement les tumeurs et leur angiogenèse.

Nous avons choisi ces nanoparticules inorganiques ou lipidiques sur la base de plusieurs raisons.

Concernant les **particules inorganiques** :

- Les nanoparticules inorganiques d'oxyde de Gadolinium et d'or sont visualisables par IRM et rayons X. Un fluorophore peut être facilement incorporé pour les suivre en fluorescence. D'autre part, il est également facile d'incorporer une drogue, un siRNA, un peptide, ...
- Ces particules peuvent être activées à distance par irradiation aux rayons X ou avec des lasers. Elles deviennent alors toxiques (production de radicaux libres, thérapie, production d'électrons Auger, et/ou photothérapie dynamique suivant le composé photosensible introduit, ce qui permet de les utiliser à la fois en imagerie médicale et en thérapie guidée par l'imagerie.
- Grâce à une étroite collaboration avec le groupe du Pr Olivier Tillement (CNRS Lyon) et en particulier avec le Pr Stéphane Roux, nous avons la possibilité de synthétiser à façon ces particules et les faire évoluer chimiquement. La synthèse est parfaitement contrôlée par ces chimistes et il est possible de faire varier les différents paramètres (taille, composition, fonctionnalisation de surface, ...).

Concernant les **nanoparticules lipidiques** :

- La nature lipidique du cœur de ces particules en fait de très bons candidats pour véhiculer des molécules hydrophobes, ce qui est généralement le cas des colorants proche infra-rouge.
- Nous disposons de collaborateurs proches capables de synthétiser ces particules suivant un cahier des charges très précis. Ce projet est validé par un financement ANR PNANO de grande ampleur. Les Nanocapsules Lipides (LNC) sont fabriquées par le laboratoire du Pr Jean-Pierre Benoit (INSERM U646 à Angers), alors que les Nanoémulsions (LNE) sont fabriquées suivant un processus différent mais avec des composés très proches par les laboratoires du Pr Jérôme Bibette (ESPCI à Paris) ou du Dr Isabelle Texier-Nogues (CEA-LETI de Grenoble). Ces collaborations nous permettent d'étudier l'influence des paramètres de taille, de fonctionnalisation de surface et de ciblage, avec des objectifs communs qui sont l'imagerie et la thérapie des tumeurs.

- En effet, ces particules sont très versatiles et également capables d'intégrer des drogues pour la thérapie des cancers. Ces drogues peuvent être des molécules conventionnelles de la chimiothérapie (comme le paclitaxel), pour lesquelles l'encapsulation permet d'augmenter leur biodisponibilité dans les tumeurs en limitant leurs effets secondaires. Mais, nous pouvons aussi intégrer des molécules originales comme les agents de photothérapie dynamique, de l'ADN pour la thérapie génique, de siRNA, ...
- Comparées aux particules non-organiques nous pouvons disposer de particules moins rigides et plus bio-dégradables. La rigidité de membrane et la fluidité de la couche de phospholipides présente dans les LNC et les LNE diffèrent, ce qui peut affecter la mobilité latérale des ligands -cRGD que nous greffons. Cette mobilité peut à son tour affecter la reconnaissance multimérique des nanoparticule-cRGD pour les intégrines en surface de la cellule cible, générant des phénomènes de coopérativité, de clustering et d'avidité qui nous intéressent car ils moduleront les propriétés des nanoparticules et leur capacité à être endocytosées. Ces différences sont à priori encore plus marquées lorsque nous comparons des LNC/LNE avec des particules solides et rigides.

1. Optimisation de la biodistribution des différentes nanoparticules

Les différentes nanoparticules ont été testées en évaluant leur comportement *in vitro* (étude de l'interaction avec les cellules par cytométrie en flux et microscopie de fluorescence, test d'activation du complément) et *in vivo* (évaluation de la biodistribution par imagerie non invasive de fluorescence). L'évaluation *in vivo* a été réalisée sur souris *nude* porteuses d'une tumeur sous-cutanée. Deux types tumoraux, présentant des vascularisations différentes, ont été testés. Le modèle murin TS/A-pc étant allogénique, les tumeurs se développent très rapidement (moins de deux semaines pour atteindre un diamètre d'un cm environ). Ces tumeurs présentent une forte vascularisation très anarchique et peu structurée, favorable à l'effet EPR. Ces cellules expriment un faible niveau d'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le modèle humain de xénogreffe HEK293(β_3), qui a une meilleure organisation des vaisseaux, reste faiblement angiogénique (marquage $\alpha_v\beta_3$ faible sur les cellules endothéliales du stroma tumoral) ce qui engendre un effet EPR restreint. Par contre, les cellules HEK293(β_3) expriment un niveau très élevé de cette intégrine à leur surface, ce qui en fait un contrôle positif intéressant pour l'évaluation du ciblage RGD-dépendant.

En accord avec une littérature assez abondante sur l'intérêt de la fonctionnalisation de surface pour l'obtention de particules circulantes, nous avons modifié la surface des nanoparticules pour les rendre furtives, par ajout de divers polymères, essentiellement des PEG, mais également du chitosan ou du dextran. Ces polymères sont les plus couramment utilisés pour améliorer la furtivité des macromolécules et des nanoparticules (Lemarchand et coll., 2004 ; Gref, 2002 ; Barratt et coll., 2003). Nous avons également évalué l'influence de la taille et de la charge électrique portée par la fonction terminale des PEG (à pH 7,4, une particule présentant des fonctions -COOH en surface possède une charge négative, elle est neutre pour des fonctions -OCH₃, et elle possède une charge positive pour des fonctions -NH₂). Ces deux paramètres influencent fortement l'interaction des nanoparticules avec les protéines du milieu dans lequel elles se trouvent. La charge de surface des particules influence la répulsion et/ou l'attraction entre les protéines et les nanoparticules. En effet, le sang est très riche en sérum albumine, fibronectine, immunoglobulines, ... qui sont majoritairement chargées négativement et seront donc fortement attirées par des particules -NH₂. La taille et la densité de PEG influencent, quant à eux, l'isolement de la particule de son environnement et notamment l'adsorption des protéines à leur surface en fonction de la conformation que les PEG adoptent (brosse, champignon, conformation intermédiaire brosse-champignon) (Figure 70) (Vonarbourg et coll., 2006).

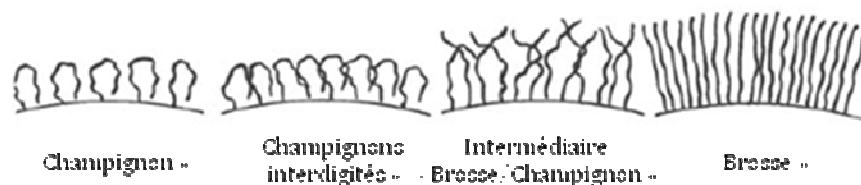


Figure 79. Représentation schématique de différentes conformations observées à la surface de nanoparticules.

D'après Vonarbourg et coll., 2006

En faisant varier ces paramètres, un grand nombre de nanoparticules ont été obtenues. Les biodistributions réalisées confirment que les modifications apportées à la surface des nanoparticules influencent leur biodistribution. Cependant, la prédiction de leur comportement en fonction de ce qui est greffé en surface reste délicate. En effet, la caractérisation précise des nanoparticules testées notamment en termes de densité de greffage de PEG en surface, de variabilité de taille, de quantité de fluorophore encapsulé, ..., est un

problème majeur. Malgré tout, les études de biodistributions ont permis de faire ressortir certaines tendances.

1.1. Pour les nanoparticules inorganiques / solides

Pour ce type de nanoparticules, nous avons montré une influence de la taille des PEG et de la nature de leur fonction terminale :

- Dans tous les cas, la PEGylation améliore la stabilité colloïdale aux pH biologiques (notamment à pH 7,4) et la distribution *in vivo*. Ainsi, le PEG250-COOH confère aux nanoparticules la meilleure furtivité sans accumulation particulière hormis les organes d'élimination (reins et vessie).
- La taille des PEG et la nature de la fonction terminale influencent la biodistribution et la clairance des nanoparticules. Ainsi, pour une même particule, la distribution et la clairance sont ajustables :
 - Avec les PEG de petite taille (250 g/mol) et une fonction -COOH, l'élimination est rénale et très rapide.
 - L'augmentation de la taille de la chaîne PEG (de 250 à 2000 g/mol) améliore la biodistribution, en augmentant le temps de circulation.
 - Le PEG2000-OCH₃ favorise l'accumulation tumorale par effet EPR, alors que les nanoparticules circulent librement dans le sang sans accumulation dans les organes vitaux (poumons, foie, rate). Cependant, nous ne pouvons pas utiliser cette fonction -OCH₃ pour réaliser le post-greffage des ligands -cRGD sur ces PEG, ce qui limite leur intérêt. Il faudrait donc les mélanger avec des PEG présentant des groupements terminaux -NH₂ ou -COOH, afin de permettre une post-fonctionnalisation des particules ou bien ajouter directement des PEG-cRGD.
- Les données de biodistribution montrent que les charges positives sont délétères et favorisent l'accumulation dans les tissus riches en phagocytes résidents, tels le foie et la rate, alors que le caractère hydrophile du PEG est connu pour prévenir l'adsorption des protéines plasmatiques et la capture par les macrophages. La capacité des PEG à réduire la captation par les macrophages est bien illustrée par les PEG2000-COOH et -OCH₃.

Nous avons également évalué l'effet de la taille des nanoparticules. Les particules de petite taille (entre 5 et 10 nm) présentent une meilleure biodistribution avec une accumulation

tumorale par effet EPR. C'est particulièrement le cas des nanoparticules d'or, qui présentent une accumulation tumorale quasi exclusive et une forte élimination rénale. Ce type de nanoparticule présente la meilleure accumulation tumorale passive de l'ensemble des nanoparticules testées. Il serait maintenant intéressant de greffer des ligands à leur surface pour favoriser une accumulation tumorale active et peut-être modifier la distribution cellulaire fine de ces nanoparticules, une fois accumulées dans la tumeur.

1.2. Pour les nanoparticules lipidiques : LNE et LNC

En ce qui concerne les LNC et les LNE, nous avons également montré que la taille des nanoparticules, ainsi que la taille des PEG influencent leur comportement *in vitro* et leur biodistribution. Cependant, même si le comportement des LNC et des LNE est comparable, des différences significatives existent entre ces deux types de nanoparticules lipidiques.

1.2.1. Effet de la taille des nanoparticules

Les LNC et LNE réagissent de façon quasiment identique *in vitro*. En effet, pour ces deux types de nanoparticules fonctionnalisées par des PEG de petite taille (solutol, un équivalent de PEG660, pour les LNC et PEG900 pour les LNE), lorsque la taille des nanoparticules augmente, l'accumulation cellulaire non spécifique, ainsi que l'activation du complément augmentent (nécessité d'une plus faible quantité de nanoparticules pour avoir une activation équivalente du complément) (Tableau X). Ceci laisse à penser que lorsque la taille des particules augmente, alors que la quantité de PEG en surface varie peu, le taux de recouvrement relatif de la nanoparticule est plus faible. Une faible densité de PEG greffée en surface rendra la particule plus accessible et facilitera l'adsorption non spécifique de protéines de l'environnement (Vonarbourg et coll., 2006). Enfin il faut noter que pour une densité de greffage identique, le rayon de courbure de la particule pourra aussi influencer sa réactivité.

	Taille de la particule	Accumulation cellulaire non spécifique	Activation du complément	Captation hépatique	Accumulation dans les ganglions lymphatiques	Accumulation tumeur
LNC solutol	Augmente	Augmente	Augmente	Diminue	Constante	Constante
LNE PEG1800	Augmente	Augmente	Augmente	Constante	Légère diminution	Diminue

Tableau X : Récapitulatif du comportement *in vitro* et *in vivo* des LNC et LNE en fonction des variations de la taille des nanoparticules.

En revanche, LNC et LNE présentent des comportements différents *in vivo* en ce qui concerne leur accumulation hépatique, tumorale et dans les ganglions lymphatiques. Lorsque la taille des nanoparticules augmente, l'accumulation hépatique des LNE reste constante, alors que celle des LNC diminue. Ces données sont contradictoires avec les résultats de la littérature, qui montrent que les particules de grande taille ont tendance à plus s'accumuler dans le foie, suite à une adsorption plus importante des protéines à leur surface qui favorise leur captation par le RES (Fang et coll., 2006 ; Nagayama et coll., 2007). D'autre part, l'accumulation des LNC dans la tumeur et les ganglions lymphatiques est constante lorsque la taille des nanoparticules augmente, alors que pour les LNE ces deux paramètres diminuent. Ces résultats reflètent la biodistribution des nanoparticules dans l'ensemble des organes. Ainsi, la biodistribution des LNC varie peu quelle que soit leur taille, hormis dans le foie. A l'inverse, les LNE de 20 nm s'accumulent de manière importante dans l'ensemble des organes et présentent une élimination hépato-biliaire importante, alors que les LNE de 50 et 100 nm ont un comportement similaire, avec une accumulation plus faible dans l'ensemble des organes, mais toujours une élimination hépato-biliaire. Ces LNE (50 et 100 nm) semblent plus furtives que celles de 20 nm et présentent un temps de circulation plus long. De même, les LNC de grande taille semblent être plus furtives, avec une diminution de leur captation hépatique. Ainsi, les LNC et les LNE de 50 nm qui ont un comportement intermédiaire ont été choisies pour réaliser une étude de l'influence de la taille des PEG sur leur comportement.

1.2.2. Effet de la taille des PEG

Dans cette étude, nous avons évalué l'influence de deux tailles de PEG pour chaque type de nanoparticule de 50 nm : PEG 660 et 1500 pour les LNC et PEG900 et 1800 pour les LNE. *In vitro*, lorsque la taille des PEG augmente l'interaction non spécifique diminue, ce qui est le signe d'une meilleure couverture des nanoparticules. En effet, plus la taille des PEG augmente, plus leur surface sera masquée et moins elle interagira avec les éléments de l'environnement. En revanche, l'activation du complément est constante quelle que soit la taille des PEG.

	Taille du PEG	Accumulation cellulaire non spécifique	Activation du complément	Captation hépatique	Accumulation dans les ganglions lymphatiques	Accumulation tumorale	Accumulation splénique
LNC 50nm	Augmente	Diminue	Constante	Diminue	Constante	Augmente	Diminue
LNE 50nm	Augmente	Diminue	Constante	Légère augmentation	Légère diminution	Légère diminution	Diminue

Tableau XI. Récapitulatif du comportement *in vitro* et *in vivo* des LNC et LNE en fonction des variations de la taille de PEG en surface des nanoparticules.

En ce qui concerne leur comportement *in vivo*, il diffère considérablement entre LNC et LNE. Pour les LNC, l'accumulation hépatique diminue, l'accumulation dans les ganglions lymphatiques reste constante et l'accumulation tumorale augmente. Ces résultats sont en accord avec la littérature et avec nos résultats *in vitro*, puisque les longues chaînes de PEG diminuent l'opsonisation et la reconnaissance par le RES et donc la captation hépatique. De plus, cette configuration qui améliore la furtivité des particules, augmente également leur temps de circulation plasmatique, ce qui favorise leur accumulation tumorale. Pour les LNE, les tendances sont inversées par rapport aux LNC (légère augmentation de l'accumulation hépatique et légère diminution de l'accumulation dans les ganglions lymphatiques et dans la tumeur).

En revanche pour les deux types de nanoparticules, l'accumulation splénique diminue ce qui peut être expliqué par une diminution de la captation par le RES et donc une augmentation de la furtivité des nanoparticules.

Malgré quelques discordances, l'augmentation de la taille des PEG améliore la furtivité des nanoparticules et leur temps de circulation dans le sang.

1.2.3. Effet de la fonctionnalisation par le chitosan et le dextran

La surface des nanoparticules peut être fonctionnalisée par des polymères autres que les PEG, tels des dextrans et des chitosans, qui sont également décrits pour augmenter l'hydrophilie de la surface des particules et ainsi améliorer leur furtivité et leur comportement *in vitro* et *in vivo* (Lemarchand et coll., 2004). Dans notre cas, le dextran et le chitosan sont liés de manière covalente à une chaîne d'acide gras en C18, afin d'obtenir du lipodextran et du lipochitosan. Ces molécules sont ensuite insérées, de manière non covalente, à la surface des LNC préalablement synthétisées par une technique de post-insertion.

En ce qui concerne la fonctionnalisation des LNC par des chitosans ou des dextrans, nous observons une discordance entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, les nanoparticules fonctionnalisées avec le chitosan diffèrent des autres car elles interagissent de manière « non spécifique » avec les cellules. Cette interaction cellules/particules-lipochitosan pourrait être expliquée par le fait que le test d'interaction est réalisé avec des cellules épithéliales, qui sont connues pour avoir une certaine affinité pour le chitosan. De plus, le chitosan étant électropositif, il a tendance à s'adsorber sur les cellules dont la membrane est négative du fait de la présence d'héparanes sulfates. Par contre *in vivo*, nous n'observons aucune différence entre ces particules solutol/lipochitosan et les équivalentes solutol seul ou solutol/lipodextran. Ce phénomène est mal compris actuellement, car la présence de chitosan devrait modifier le comportement des particules. Notre hypothèse est donc que la présence du « coating » chitosan ou dextran de façon non covalente à la surface des particules PEGylées n'est pas suffisamment résistante *in vivo*. Après administration systémique, les nanoparticules seraient « déshabillées » immédiatement par dissociation des dextrans et des chitosans et la nanoparticule présenterait alors le comportement d'une nanoparticule simplement PEGylée. Cette chimie de fabrication des LNC est donc abandonnée.

Il faudrait donc mieux contrôler la chimie de greffage ou utiliser une chimie qui permette un démantèlement plus contrôlé et contrôlable de la nanoparticule après administration systémique. Il serait également intéressant d'ajouter une liaison activable au niveau de la région d'intérêt, par exemple une liaison clivable par des MMP (-2, -9 ...) qui sont associées à la tumorigénèse et qui sont localisées spécifiquement dans l'environnement tumoral (Kessenbrock et coll., 2010 ; Cudic et Fields, 2009), ou un clivage par les cathépsines B et D, qui sont associées à la progression tumorale (Cudic et Fields, 2009).

Ces différentes études montrent ainsi que pour que les nanoparticules présentent une biodistribution satisfaisante (distribution dans l'ensemble de l'organisme et accumulation passive dans la tumeur), elles doivent être de relativement petite taille (20-50 nm) et être fonctionnalisées avec des PEG à chaînes longues, afin d'améliorer leur furtivité, leur temps de circulation et permettre ainsi une meilleure accumulation tumorale. Les résultats obtenus sont très encourageants, mais le manque de caractérisation et de contrôle des nanoparticules testées reste un problème majeur, que nous devons mieux maîtriser afin de pouvoir prédire plus précisément leur comportement en fonction de leur fonctionnalisation de surface.

2. Les systèmes ciblant

En jouant sur les différents paramètres, nous avons obtenu des particules prometteuses c'est-à-dire avec une biodistribution homogène et une accumulation tumorale passive par effet EPR. Afin d'optimiser le ciblage tumoral, par un ciblage actif, des motifs -cRGD ont été greffés en surface des nanoparticules. *In vitro*, les LNP-cRGD (LNC et LNE) interagissent spécifiquement avec les cellules d'intérêt (exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$) alors qu'aucune interaction n'est détectée avec les nanoparticules contrôles (-cRAD ou non fonctionnalisées). *In vivo* par contre, l'influence globale du ciblage actif est très limitée dans le meilleur des cas. De plus, les résultats obtenus avec les nanoparticules d'oxyde de Gadolinium fonctionnalisées avec le -cRGD sont encore moins bons car nous ne détectons pas de gain lié à la présence du -cRGD aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Malheureusement, nous ne disposons pas de test capable d'évaluer et de quantifier le nombre de motifs -cRGD greffés à la surface de la nanoparticule. Dans la mesure où elles ne réagissent pas *in vitro* sur des cellules cibles, nous pouvons douter du fait que le -cRGD ait réellement été lié de manière covalente à la particule. Par ailleurs la chimie utilisée sur les particules solides et LNP diffère. Sur les LNP, le greffage du -cRGD est réalisé sur des PEG5000-maléimide, alors que pour les nanoparticules d'oxyde de Gadolinium, il est réalisé sur un PEG250-COOH ou PEG2000-COOH ou -NH₂. Une meilleure spécificité de greffage sur le maléimide, ainsi qu'une meilleure présentation du motif -cRGD, pourraient expliquer les différences de ciblage spécifique obtenues, tout du moins pour les tests d'interaction *in vitro*.

Par ailleurs, il faut noter qu'un des avantages du -cRGD, en comparaison à d'autres agents de ciblage des tumeurs publiés, est que nous disposons du contrôle négatif -cRAD. Le -cRAD diffère du -cRGD par un méthyle, ce qui abolit totalement sa reconnaissance avec l'intégrine (Sancey et coll., 2009). Ceci nous a permis de montrer que si le greffage *per se* d'un cyclopeptide qu'il soit -cRAD ou -cRGD modifie la biodistribution de la particule et son effet EPR, nous ne pouvons pas mettre en évidence l'effet propre du -cRGD comparé au -cRAD. Il est donc possible dans certain cas d'augmenter l'accumulation d'une particule par effet EPR dans la tumeur, mais ceci est indépendant de la reconnaissance avec le récepteur. Il ne s'agit donc pas d'une vectorisation active, et de nombreuses publications dans ce domaine sont certainement trop optimistes par faute d'avoir choisi un bon contrôle négatif.

Une meilleure caractérisation de ces nanoparticules est donc indispensable, et il nous faudra notamment être capable d'évaluer précisément le nombre de -cRGD réellement greffés, et leur fonctionnalité après greffage. L'étude de la distribution fine des particules par analyse histologique des tumeurs devra être réalisée pour permettre d'identifier de possibles différences dans la répartition cellulaire et sub-cellulaire des particules ciblantes *versus* « furtives » au sein de la tumeur. En effet, il est possible que nous n'ayons pas pu détecter de différence sur le nombre de particules -cRAD ou -cRGD globalement « arrêtées » dans les tumeurs, mais que la distribution fine de ces particules diffère au sein même de la tumeur. En d'autres termes, il se peut que l'effet EPR soit responsable de l'accumulation d'une particule dans la tumeur, alors que le ligand de ciblage n'interviendrait que sur la distribution finale de la particule au sein de ces tumeurs, en l'adressant préférentiellement vers les cellules exprimant le récepteur. Suivant cette hypothèse, l'effet EPR serait fonction des paramètres physico-chimiques de la particule, et le ciblage actif n'interviendrait que dans un deuxième temps. Cette hypothèse est intéressante et pourrait notamment sous-entendre que l'utilisation des nanoparticules comme agent d'imagerie des tumeurs ne nécessiterait pas l'ajout d'agent de ciblage, mais que la présence de ces agents de ciblage pourrait jouer un rôle lorsqu'une drogue est délivrée, puisque les cibles finalement touchées pourraient différer.

Il faut néanmoins noter que dans certains cas nous observons tout de même une légère tendance à avoir une accumulation active des nanoparticules-cRGD par rapport aux nanoparticules-cRAD mais la différence observée dans notre étude n'est pas significativement différente.

3. Applications thérapeutiques et diagnostiques des nanoparticules

Quoi qu'il en soit, l'accumulation souvent très significative des nanoparticules par effet EPR dans les tissus tumoraux en font des vecteurs prometteurs pour des applications diagnostiques et/ou thérapeutiques. Ainsi, nous avons obtenu des résultats prometteurs avec l'encapsulation de drogues anti-tumorales et plus particulièrement avec le paclitaxel. Les résultats montrent une amélioration de la tolérance et une diminution des doses nécessaires de nanoparticules-paclitaxel pour obtenir un effet comparable au paclitaxel utilisé seul. En effet, l'administration des LNC-paclitaxel, à la dose de 2 mg/kg, inhibe la croissance tumorale *in vivo*, alors qu'avec la même dose de paclitaxel non vectorisé, nous n'obtenons pas de modification de la

croissance tumorale. Une dose dix fois supérieure de paclitaxel est nécessaire pour observer une inhibition de la croissance tumorale de notre modèle tumoral (IGROV1) *in vivo* (Taylor et coll., 2008).

Les résultats préliminaires de vectorisation d'ADN sont eux aussi encourageants. Ils montrent qu'il est possible de transfecter un plasmide encapsulé dans les LNC très spécifiquement et uniquement dans la tumeur. Il faut noter que l'étude de la distribution de ces particules par fluorescence montrait une forte accumulation hépatique et une accumulation tumorale comparable à celle des autres organes alors que l'expression du gène n'est détectée que dans la tumeur. Les résultats de la distribution sont en accord avec la plupart des travaux de thérapie génique non-virale, qui indiquent que l'ADN est souvent ingéré sous une forme dégradée et/ou incapable d'aller jusqu'au noyau cellulaire pour s'exprimer, en particulier dans les cellules du foie. Par contre, ces travaux sont particulièrement encourageants car nous observons un taux d'expression du transgène faible mais significatif dans la tumeur, ce qui est extrêmement rare lorsque les plasmides sont injectés par voie IV en étant vectorisés par des molécules synthétiques telles que les PEI ou des lipides cationiques.

IV . Avantages et limites de notre système d'évaluation *in vivo*

L'imagerie optique de fluorescence, méthode non invasive, constitue une aide majeure pour évaluer rapidement le comportement des nanoparticules *in vivo* en fonction des modifications apportées. Comparée à des méthodes de radiomarquage, la fluorescence est incontestablement plus facile à manipuler en chimie et en biologie, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et permet un suivi longitudinal sur plusieurs jours car les fluorophores sont plus stables dans le temps que nombre de radiotraceurs courants à demi-vies trop courtes. Cela permet également de faire de l'imagerie multi-échelle, allant du cellulaire jusqu'au préclinique, voire clinique. La sensibilité est très bonne (picomolaire) chez la souris. Néanmoins, il ne faut pas oublier que ce que nous voyons est le signal émis par le fluorophore, qui peut souvent se dissocier du principe actif étudié. Ceci est propre à toutes les techniques de marquage. Les résultats doivent donc toujours être confortés par d'autres méthodes souvent plus invasives, qui devront permettre de confirmer la présence de la molécule d'intérêt et si possible son état, dans les tissus.

Ceci est « facilement » réalisable lors de l'évaluation des nanoparticules d'or ou d'oxyde de Gadolinium, car ces métaux peuvent, par exemple, être dosés par ICP (Inductively Coupled Plasma), et confirmer que le métal s'accumule dans les mêmes organes que la fluorescence. Ceci est beaucoup plus délicat avec les particules lipidiques. Mais il est envisageable de synthétiser des nanoparticules lipidiques marquées avec deux fluorophores. Par exemple, un fluorophore pourrait être incorporé dans la particule et un second serait greffé en surface, ou la particule pourrait encapsuler deux fluorophores (couple FRET), avec détection d'une fluorescence lorsque la particule est intacte et de deux fluorescences lorsqu'elle est dégradée. Ces systèmes permettraient ainsi de suivre le devenir des particules après administration. Des techniques histologiques ou biochimiques peuvent également être utilisées. Les études biochimiques permettent de confirmer l'activité biologique de la macromolécule vectorisée (par exemple, mise en évidence de l'activation de la voie apoptotique par western blot, dans le cadre de la vectorisation de molécules apoptotiques). L'analyse histologique permet quant à elle la localisation des nanoparticules au sein d'un tissu.

Enfin, les études par imagerie de fluorescence nécessitent l'ajout d'un fluorophore sur les molécules étudiées afin d'effectuer leur suivi. Cependant ce fluorophore modifie la molécule donc modifie sa biodistribution. Les fluorophores étant en général d'assez grosses molécules, contrairement au radio-marquage qui engendrerait peu de modifications, les propriétés de la molécule marquée seront donc significativement affectées par ce marquage. Il est donc peu envisageable d'appliquer cette méthode au suivi de petites molécules. En revanche, l'utilisation des nanoparticules est plus favorable et la présence du fluorophore moins perturbante. Enfin, et ce concept est particulièrement intéressant, les nanoparticules pourraient être synthétisées en intégrant directement leurs fonctions d'imagerie et de thérapie. Une seule particule serait donc développée, qui contiendrait l'ensemble des principes actifs et des agents de contraste, même si nous ne ferions appel aux différentes fonctions qui la composent que séquentiellement au cours de son développement. Ainsi, un seul objet, bien caractérisé, serait évalué du développement préclinique (études *in vitro* et *in vivo*) à l'utilisation clinique.

CONCLUSION

Pour compléter les travaux réalisés, des études complémentaires doivent être menées afin de mieux comprendre leur biodistribution, d'améliorer la sélectivité de ces nano-transporteurs, ou encore d'étudier leur toxicité. Il est également nécessaire de poursuivre les études de vectorisation de biomolécules et d'agents anti-tumoraux et d'optimiser les protocoles d'administration afin de mieux évaluer le potentiel prometteur de ces nano-vecteurs.

MATERIEL
ET
METHODES

Les stratégies de ciblage de cellules d'intérêt constituent des stratégies prometteuses car elles pourraient être employées aussi bien pour les systèmes de vectorisation de médicaments, tels que les anticancéreux, que pour les biomolécules de type peptides, ADN ou siRNA. Bien que peu d'essais se soient avérés positifs jusqu'à présent, ils représentent un réel espoir pour les traitements et doivent être améliorés afin d'obtenir des vecteurs efficaces. Toutefois, il est acquis qu'il n'existe pas un système universel de vectorisation mais qu'il faut adapter et optimiser les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du vecteur à chaque indication thérapeutique envisagée.

Les différents systèmes de vectorisation étudiés présentent chacun des avantages et des inconvénients, tant au niveau de leur biodistribution que du ciblage tumoral passif ou actif.

Le RAFT-(cRGD)₄ couplé à un fluorophore constitue un bon agent de contraste pour la détection spécifique des cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, mais son utilisation comme vecteur ciblant de peptides ou de siRNA est relativement limitée. Les CPPs sont plus efficaces pour la libération de biomolécules mais elle n'est pas spécifique d'un type cellulaire. Enfin, les nanoparticules présentent des propriétés particulières, ajustables, liées à leur taille et à leur composition, qui en font des candidats prometteurs pour la vectorisation de biomolécules et de molécules thérapeutiques conventionnelles. De plus, selon leur nature (inorganique ou lipidique) leurs applications potentielles seront différentes.

Ainsi, les nanoparticules inorganiques seront plutôt développées comme agents de contraste pour de l'imagerie multimodale (IRM et fluorescence, rayons X et fluorescence) ou comme agent thérapeutique avec une activation externe. Les développements en cours portent sur le potentiel radio-sensibilisant des nanoparticules d'or ou d'oxyde de Gadolinium, et sur les applications pour la thérapie photodynamique après activation par des lasers des nanoparticules contenant des agents photo-sensibilisants.

Les nanoparticules lipidiques sont quant à elles plutôt utilisées pour l'encapsulation d'agents conventionnels de chimiothérapie. Elles constituent une nouvelle forme galénique permettant de réhabiliter des drogues dont les propriétés physico-chimiques et la toxicité limitent l'utilisation. Ces particules présentent également un fort potentiel pour la vectorisation de biomolécules. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus pour la vectorisation d'ADN ou de siRNA (Tao et coll., 2010 ; Zimmermann et coll., 2006 ; Bondi et Craparo, 2010). Il serait également intéressant d'utiliser le potentiel de ciblage des ganglions lymphatiques par les LNC pour la détection du ganglion sentinelle.

I. Culture cellulaire

Les lignées **HEK293(β3)** et **HEK293(β1)** sont des sous-clones de la lignée de cellules embryonnaires humaines de rein HEK293, transfectée de manière stable par un plasmide codant respectivement pour la sous-unité humaine de l'intégrine β3 et de l'intégrine β1 (lignée donnée par J-F. Gourvest, Aventis, France). Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco), supplémenté avec du glucose 4.5 g/l, 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C, 1 % de glutamine, de la pénicilline (50 U/ml), de la streptomycine (50 µg/ml) et de la G418 (700 µg/ml)(Gibco).

Les lignées **HEK293(β3)-RVLuc** et **HEK293(β1)-RVLuc** sont des sous-clones des lignées HEK293(β3) et HEK293(β1), transfectées par le rétrovirus RVLuc codant pour la luciférase. Ces lignées sont cultivées dans les mêmes conditions que les lignées HEK293(β3) et HEK293(β1).

La lignée **TS/A-pc** est issue d'un modèle de carcinome mammaire murin. Ces cellules sont cultivées dans du milieu RMPI 1640 (Gibco), supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, 1 % de glutamine, de la pénicilline (50 U/ml), de la streptomycine (50 µg/ml) et du beta-mercaptoéthanol (25 µM).

La lignée **TS/A-pc pGI3** est un sous-clone de la lignée TS/A-pc, transfectée par le plasmide pGL3 (Promega, Charbonnières, France) codant pour la luciférase. Les conditions de culture sont identiques à celles de la lignée TS/A-pc, avec ajout de G418 (40 µg/ml).

La lignée **IGROV1** est une lignée d'adénocarcinome ovarien humain (lignée donnée par L. Poulain, Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse, Caen, France). Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco), supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, 1 % de glutamine, de la pénicilline (50 U/ml) et de la streptomycine (50 µg/ml).

La lignée **PC3** est une lignée d'adénocarcinome de prostate humain (lignée donnée par G. Divita, UMR-5237 CNRS, Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier, France). Ces cellules sont cultivées en DMEM-F12, supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, 1 % de glutamine, de la pénicilline (50 U/ml) et de la streptomycine (50 µg/ml).

Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%). Les cellules sont repiquées deux fois par semaine, après dissociation du tapis cellulaire avec un mélange trypsine/EDTA (Gibco).

Les lignées HEK293(β3), HEK293(β3)-RVLuc, TS/A-pc, TS/A-pc pGI3 et IGROV1 sont positives pour l'intégrine α_vβ₃.

La viabilité cellulaire est estimée par la technique d'exclusion du bleu trypan.

II . Molécules et nanoparticules utilisées

Nos nombreuses collaborations, nous ont permis de tester un grand nombre de molécules vecteurs et de nanoparticules.

Les molécules dérivées du **RAFT-(cRGD)₄** ont été synthétisées dans le laboratoire du Pr Pascal Dumy (CNRS UMR 5250 à Grenoble) par Stéphanie Foillard et Didier Boturyn. Il s'agit du RAFT-(cRGD)₄-KLA, du RAFT-(cRAD)₄-KLA, du KLA et du CAD2-RAFT-(cRGD)₄.

Les **CPPs** (MPG, MPG-8, MPG-8-cholestérol et CAD2) ont été synthétisés dans l'équipe du Dr Gilles Divita (CNRS UMR 5237 à Montpellier).

Les **Nanoparticules d'oxyde de Gadolinium** et les **Nanoparticules d'or** ont été respectivement synthétisées par Anne-Charlotte Faure et Christophe Alric, en étroite collaboration avec le Pr Stéphane Roux, dans le laboratoire du Pr Olivier Tillement (CNRS UMR 5620 à Villeubanne).

Les **LNC** ont été synthétisées par Samuli Hirsjärvi dans l'équipe du Pr Jean-Pierre Benoit (INSERM U646 à Angers).

Les **LNE** ont été synthétisées soit par Julien Gravier dans le laboratoire du Dr Isabelle Texier-Nogues (CEA-LETI à Grenoble), soit par Qiao Yan dans le laboratoire du Pr Jérôme Bibette (ESCPI à Paris).

Enfin, les **LNP ciblantes** ont été synthétisées par Mathieu Goutayer dans le laboratoire du Dr Isabelle Texier-Nogues (CEA-LETI à Grenoble) et les **LNC-RAFT-(cRGD)₄** par Samuli Hirsjärvi dans l'équipe du Pr Jean-Pierre Benoit (INSERM U646 à Angers).

III . Techniques de détection de l'apoptose

1. Etude de la morphologie nucléaire par coloration des noyaux par le Hoescht

La morphologie nucléaire des cellules est observée après coloration de l'ADN par un agent intercalant, fluorescent après excitation UV. Les cellules vivantes présentent une chromatine homogène, alors que les cellules en apoptose présentent des noyaux caractéristiques, condensé et fragmentés.

Les cellules sont trypsinées et centrifugées 5 minutes à 1500 rpm. Elles sont fixées avec une solution de PFA 2 % pendant 10 minutes. Les noyaux sont ensuite marqués avec une solution de Hoescht 33342 (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 5 μ M pendant 10 minutes. Les cellules sont déposées sur lames et la morphologie nucléaire est observée à l'aide d'un microscope optique à fluorescence Olympus BX41 (Hamburg, Allemagne). L'induction de l'apoptose est évaluée par comptage de 300 noyaux par condition.

2. Analyse de la caspase 3 clivée par cytométrie en flux

La forme active de la caspase 3 (caspase 3 clivée) est détectée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-caspase 3 active marqué avec de la Phycoérythrine (PE active caspase-3 Apoptosis Kit) (Becton Dickinson, Pont de Claix, France). Le marquage est réalisé selon les instructions du fournisseur. Après traitement, les cellules sont trypsinées, rincées à l'aide de PBS 1X à 4°C puis incubées dans un mélange Cytofix/Cytosperm (PE active caspase-3 Apoptosis Kit) permettant la fixation et la perméabilisation des cellules, pendant 20 minutes dans la glace. Les cellules sont rincées avec du Perm/Wash buffer (PE active caspase-3 Apoptosis Kit) puis sont incubées avec l'anticorps monoclonal anti-caspase 3 active marqué à la phycoérythrine, pendant 30 minutes à température ambiante et dans l'obscurité. Après rinçage, les échantillons sont analysés sur un cytomètre en flux LSRII (Becton Dickinson, Pont de Claix, France), à l'aide du logiciel Diva 6.1.3 (Becton Dickinson).

3. Etude de l'expression protéique de la caspase 3 et de la caspase 3 clivée par western-blot

3.1. Préparation de lysat protéique

Les tissus sont broyés mécaniquement pendant 5 minutes dans 300 µl de tampon de lyse RIPA (PBS, NP40 1%, SDS 0,1 %, PMSF 10 µg/ml, EDTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaPPi 5 mM, NaF 10 mM, aprotinine 0,5 µl/ml) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les échantillons sont ensuite vortexés régulièrement et placés à 4°C pendant 30 minutes. Après 20 minutes de centrifugation à 13200 rpm, le surnageant est récupéré et congelé à - 80 °C.

3.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisée par la méthode de Lowry, à l'aide du kit Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Ivry-sur-Seine, France). Une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'albumine bovine sérique (BSA) diluée dans de l'eau ultra-pure. La prise d'essai pour la gamme de BSA ou les échantillons à doser est de 2 µl. Les dosages sont réalisés en duplicates. La densité optique (DO) de chaque puits est mesurée à 630 nm avec un lecteur de microplaque (Beckman Coulter, Roissy, France). La concentration moyenne en protéines est alors déterminée à partir de la courbe standard $DO_{630} = f(\text{concentration en protéines})$, établies d'après les valeurs obtenues avec la gamme étalon de BSA.

3.3. Electrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose

Après ajustement des quantités de protéines à 100 µg/puits, les échantillons sont mélangés avec du tampon de charge (NuPage[®] LDS Sample Buffer (4X), Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) et un agent réducteur (NuPage[®] Sample Reducing Agent (10X), Invitrogen) en proportions respectives de 1/4 et 1/10. Le tout est complété à 30 µl avec de l'eau ultra pure et porté à 80 °C pendant 10 minutes. Les échantillons sont déposés dans les puits des gels de polyacrylamide 4-12 % (Invitrogen). La migration est réalisée par électrophorèse dans du tampon Tris-Glycine-SDS pendant 45 minutes à 200 V. Avant le transfert, les membranes de nitrocellulose (Invitrogen) sont incubées dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, éthanol 20 %). Le transfert s'effectue dans le tampon de transfert Tris-Glycine-Ethanol à 30 V pendant 1 h 15.

Anticorps dirigé contre	Origine et référence de l'anticorps primaire	Dilution de l'anticorps primaire	Référence de l'anticorps secondaire	Dilution de l'anticorps secondaire
Caspase 3	Souris BD Transduction Laboratories, Clone 19	1/1000	Dako, P0447	1/10000
Caspase 3 clivée	Lapin Cell Signaling, #9661S	1/1000	Cell Signaling, #7074	1/2000
Tubuline	Souris Sigma, Clone B-5-1-2	1/2000	Dako, P0447	1/10000

Tableau X : Références et dilutions des anticorps utilisés en western blot

3.4. Immuno-détection

Après le transfert, les membranes sont rincées dans du TBS-Tween20 0,05 % (T-TBS), puis incubées dans une solution de blocage (T-TBS-lait écrémé déshydraté 5 %) pendant 1 h à température ambiante. Après le blocage, les membranes sont mises en présence de l'anticorps primaire convenablement dilué dans du T-TBS-lait 5 % (Tableau XII). Après 3 rinçages de 10 minutes dans du T-TBS, les membranes sont incubées pendant 1 h avec un anticorps secondaire spécifique de l'espèce couplé à la peroxydase et dilué dans du T-TBS-lait 5 %. Après 3 rinçages de 5 minutes dans du T-TBS et un rinçage de 10 minutes dans du TBS, les complexes immuns sont révélés par utilisation du Kit ECL[®] (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France) et la détection de la chemoluminescence est réalisée avec un film autoradiographique ultrasensible (Genesee Scientific, San Diego, USA) exposé pendant des temps allant de 5 secondes à 30 minutes.

IV . Détermination du contenu cellulaire en ADN par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de déterminer la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, après incorporation par les cellules, fixées et perméabilisées, de l'iodure de propidium (un intercalant de l'ADN et de l'ARN) et dégradation des ARN totaux.

La suspension cellulaire fixée dans le l'éthanol à 70° est centrifugée à 4000 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans du PBS 1X et incubé pendant 30 minutes à 37°C selon la méthode décrite par Darzynkiewicz et coll. (1992). Après centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes, les cellules sont incubées avec 200U/ml de RNase A (Sigma Aldrich) et une solution d'iodure de propidium (10 µg/ml dans du PBS 1X) (Sigma Aldrich) pendant 20 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Les échantillons sont ensuite analysés sur un cytomètre en flux LSRII (Becton Dickinson, Pont de Claix, France), à l'aide du logiciel Diva 6.1.3 (Becton Dickinson).

V. Transfection de siRNA

1. Formation des complexes siRNA/CPPs

Les solutions de CPPs (MPG-8, MPG-8-cholestérol, CAD2 et CAD2-RAFT-(cRGD)₄) sont soniquées avant utilisation. Les particules siRNA/MPG-8 ou siRNA/CAD2 sont obtenues par complexation des siRNA par les CPPs pendant 30 minutes à 37°C, selon un ratio molaire prédéfini. Dans un second temps, l'ajout de MPG-8-cholestérol ou de CAD2-RAFT-(cRGD)₄ et l'incubation pendant 30 minutes à 37°C permet d'obtenir des particules siRNA/MPG-8-cholestérol ou siRNA/CAD2/CAD2-RAFT-(cRGD)₄. Les particules sont préparées dans du PBS 1X.

2. Analyse de la transfection du siRNA anti-pG13 *in vitro*

Les cellules sont incubées pendant 5 minutes avec les particules siRNA/CAD2 et siRNA/CAD2/CAD2-RAFT-(cRGD)₄, avant l'ajout de milieu de culture sans SVF. Après 30 minutes d'incubation, du milieu avec SVF est ajouté pour obtenir une concentration finale de 10 % en SVF. L'analyse de la transfection est réalisée après 72h de traitement, par mesure de l'activité luciférase (cf Dosage de l'activité luciférase *in vitro*, p138). La séquence du siRNA anti-pG13 utilisé est la suivante : 5' - CUUACGCUGAGUACUUCGATT -3'.

Le contrôle positif de transfection est réalisée avec de l'Interferin® (Polyplus Transfection, Illkirch, France), selon les instructions du fournisseur.

VI. Test d'interaction des nanoparticules avec les cellules

L'analyse de l'interaction des nanoparticules avec les cellules est réalisée par cytométrie en flux et par microscopie de fluorescence. Les protocoles décrits ci-dessous correspondent à l'analyse de la fixation de molécules-cRGD sur des cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les incubations sont réalisées à 4°C pendant 15 minutes. L'analyse de l'internalisation des nanoparticules dans les cellules est réalisée des conditions similaires mais avec une incubation à 37°C pendant une heure. Les incubations sont réalisées en PBS 1X Mg²⁺/Ca²⁺ ou en milieu supplémenté avec 10 % de SVF.

1. Analyse par cytométrie en flux

Les cellules adhérentes HEK293(β 3) (ou les cellules HEK293(β 1)) sont mises en suspension avec de la trypsine, puis elles sont rincées une fois avec du PBS 1X à température ambiante et une fois avec du PBS froid à 4°C contenant 1 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de $CaCl_2$. Pour chaque condition expérimentale, un million de cellules est resuspendu dans 200 μ l final de PBS 1X Mg^{2+}/Ca^{2+} ou de DMEM avec 10% de SVF, contenant la nanoparticule à une concentration finale de 40 μ M en cyanine 5 (ou 0,2 μ M en DiD). L'incubation est réalisée à 4°C pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du PBS 1X Mg^{2+}/Ca^{2+} , puis resuspendues dans 500 μ l de PBS 1X Mg^{2+}/Ca^{2+} avant d'être analysées par un cytomètre en flux (FacsAria, Becton Dickinson, France).

Différentes nanoparticules ont été testées : nanoparticules pegylées, nanoparticules pegylées-cRGD, nanoparticules pegylées-cRAD, nanoparticules pegylées-RAFT-(cRGD)₄ et nanoparticules pegylées-RAFT-(cRAD)₄.

Les contrôles ont été réalisés avec du RAFT-(cRGD)₄-Cy5, capable de lier l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et du RAFT-(cRAD)₄-Cy5, ne liant pas cette même intégrine. Ces deux produits ont été utilisés avec une concentration finale de 0,2 μ M en cyanine 5 (Cy5).

2. Analyse par microscopie de fluorescence

Les cellules adhérentes HEK293(β 3) sont cultivées sur des lamelles, en plaque 24 puits, pendant 24h. Les cellules sont rincées une première fois avec du PBS 1X à température ambiante, puis par du PBS 1X froid à 4°C contenant 1 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de $CaCl_2$. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à 4°C dans 200 μ l de PBS 1X Mg^{2+}/Ca^{2+} , contenant la nanoparticule à une concentration finale de 0,2 μ M en DiD. Après deux rinçages avec du PBS 1X Mg^{2+}/Ca^{2+} à 4°C, les cellules sont fixées pendant 10 minutes avec du PFA 0,5 % et les noyaux des cellules sont colorés avec une solution de Hoechst à 5 μ M pendant 10 minutes. Les lames sont montées avec du Mowiol et observées avec un microscope optique à fluorescence Axiophot, équipé d'une caméra CCD (Carl Zeiss, Jena, Allemagne).

VII . Analyse de la biodistribution et du ciblage tumoral par imagerie de fluorescence *in vivo*

Les cellules tumorales sont implantées aux souris *Swiss nude* NMRI femelles (Janvier, Le Genest Saint Isle, France), âgées de 6 semaines, par injection sous-cutanée sur le flanc (10^7 de TS/A-pc, de HEK293(β 3) ou de PC3 dans 200 μ l de PBS 1X stérile). Lorsque les tumeurs présentent un diamètre de 6-8 mm, les souris reçoivent une injection intra-veineuse de 200 μ l d'une suspension de nanoparticules (soit l'équivalent de 10 nmol de Cy5 ou de DiD/souris). L'injection est réalisée dans la veine caudale, de manière relativement lente (injection de 200 μ l en 15-20 secondes).

Elles sont ensuite anesthésiées (isoflurane/oxygène 4 % pour l'induction puis 2 %) et imagées à l'aide d'un système d'imagerie optique de fluorescence par réflectance (Hamamatsu). Les souris sont éclairées par une lumière monochromatique à 633 nm (pour la cyanine 5) ou à 660 nm (pour le DiD, l'Alexa700 ou la cyanine 5.5). La fluorescence ré-émise passe par un filtre (passe-haut à 665nm et bande-passe à 680 nm (cyanine 5) ou passe-haut à 665nm (DiD, Alexa700 et Cyanine 5.5)), puis est captée par une caméra CCD (caméra Hamamatsu OrcaII-BT-512G), préalablement refroidie à -70°C . Les images sont analysées à l'aide du logiciel Wasabi (Hamamatsu).

Pour chaque expérience, trois animaux sont utilisés par groupe. Les acquisitions sont réalisées avec un gain Medium, un binning de 1 x 1 et un temps d'exposition de l'ordre de la milliseconde à la seconde (de 50ms à 2s selon la fluorescence détectée).

VIII . Evaluation de l'activité luciférase *in vivo* et *in vitro*

1. Evaluation de l'activité luciférase *in vivo*

Cinq minutes après l'injection intra-péritonéale de luciférine (150 mg/kg) (Promega, Charbonnières, France) les souris sont euthanasiées et les organes sont prélevés. Les images de bioluminescence, ainsi que les images noir et blanc sont réalisées avec une caméra CCD (caméra Hamamatsu OrcaII-BT-512G), préalablement refroidie à -70°C . Les images sont analysées à l'aide du logiciel Wasabi (Hamamatsu).

2. Dosage de l'activité luciférase *in vitro*

Le dosage de l'activité luciférase est réalisé avec le kit Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières, France). Les organes sont lysés à l'aide de tampon de lyse (Report Lysis Buffer, Promega) afin d'extraire les protéines de l'échantillon. L'intensité de luminescence est mesurée par ajout de 100 µl de substrat (luciferase assay substrate, Promega) à 5 µl d'extrait protéique et la lecture est réalisée avec le luminomètre Lumat LB9501 (Berthold, Illkirch, France) pendant 10 secondes. Le dosage des protéines est réalisé selon le protocole précédemment décrit. L'activité luciférase est exprimée comme le nombre d'unités relatives de lumière émis pendant 10 secondes par mg de protéines (RLU/10s/mg protéines).

IX . Etude de l'activité du RAFT-RGD-KLA *in vivo*

1. Traitement des animaux

Les cellules tumorales sont implantées aux souris *Swiss nude* NMRI femelles (Janvier, France), âgées de 6 semaines, par injection sous-cutanée sur le flanc (10^7 de IGROV1 dans 200 µl de PBS 1X stérile). Les souris sont traitées quotidiennement à partir du jour d'implantation des cellules et jusqu'au jour 14, par injection intra-péritonéale. Les différents groupes (n = 5 à 7 souris par groupe) sont traités par 0,2 ml de PBS ou d'une solution contenant 0,12 µmol/souris de RAFT-RGD-KLA, de RAFT-RAD-KLA ou de KLA. Les tumeurs sont mesurées tous les deux jours. Le volume tumoral est calculé avec la formule suivante : longueur x largeur² x 0,52 (O'Reilly et coll., 1997). Les résultats sont exprimés comme la moyenne du volume tumoral ± S.E.M. (Standard Error of the Mean).

A la fin du traitement, les tumeurs sont prélevées et conservées en TissuTek[®] (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq) à -80°C.

2. Analyse de la prolifération cellulaire tumorale par marquage au Ki67

Les coupes tumorales de 7 µm d'épaisseur sont fixées avec du paraformaldéhyde 3,7 % pendant 10 minutes à température ambiante, puis saturées pendant 5 minutes avec la BSA 0,03 % et incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps monoclonal murin anti-Ki67 humain (1/150 ; Dako, Trappes, France). L'immunomarquage est réalisé à l'aide du kit Histostain-

Plus Bulk (Invitrogen). Le produit de la réaction finale est visualisé avec de la diaminobenzidine. Les contrôles négatifs sont réalisés avec un anticorps irrelevant (IgG de souris 1/30 000).

X . Etude de la transfection d'ADN *in vivo* à l'aide des LNC ADN

Les cellules tumorales sont implantées aux souris *Swiss nude* NMRI femelles (Janvier, France), âgées de 6 semaines, par injection sous-cutanée sur le flanc (10^7 de HEK293(β 3) dans 200 μ l de PBS 1X stérile).

Les nanoparticules injectées présentent différentes fonctionnalisations de surface (solutol, DSPE-mPEG2000 ou F108). Elles encapsulent du DiD et de l'ADN codant pour le gène de la luciférase. Les souris ont reçu une injection intra-veineuse de 200 μ l d'une suspension de nanoparticules (soit l'équivalent de 60 μ g d'ADN/souris).

La biodistribution a été réalisée comme décrit dans le paragraphe VI (*Analyse de la biodistribution et du ciblage tumoral par imagerie de fluorescence in vivo*). L'analyse de l'activité luciférase a été réalisée comme décrit dans le paragraphe VII (*Evaluation de l'activité luciférase in vivo et in vitro*).

XI . Etude de l'activité des LNC paclitaxel *in vivo*

Les cellules tumorales sont implantées aux souris *Swiss nude* NMRI femelles (Janvier, France), âgées de 6 semaines, par injection sous-cutanée sur le flanc (10^7 de IGROV1 dans 200 μ l de PBS 1X stérile). Lorsque le volume tumoral est de l'ordre de 80 mm³, les souris sont traitées deux fois par semaine par injection intra-péritonéale (200 μ l). Les différents groupes (n = 9 souris par groupe) sont traités par du sérum physiologique, du paclitaxel (2 mg/kg) (Ebewe Pharma, Unterach, Autriche), des LNC-paclitaxel (2 mg/kg), ou des LNC (concentration équivalente à la concentration en LNC-paclitaxel injectée).

Les tumeurs sont mesurées tous les deux jours. Le volume tumoral est calculé avec la formule suivante : longueur x largeur² x 0,52. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du volume tumoral \pm S.E.M. (Standard Error of the Mean).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ahrèn M, Selegard L, Klasson A, Söderlind F, Abrikossova N, et al. (2010) Synthesis and characterization of PEGylated Gd₂O₃ nanoparticles for MRI contrast enhancement. *Langmuir* 26: 5753-5762.

Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC (2008) Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 5: 505-515.

Alitalo K, Tammela T, Petrova TV (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438: 946-953.

Allen TM (1994) The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv Drug Del Rev* 13: 285-309.

Allen TM (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2: 750-763.

Allen TM, Cheng WW, Hare JJ, Laginha KM (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nanoparticles in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 6: 513-523.

Alric C, Taleb J, Le Duc G, Mandon C, Billotey C, et al. (2008) Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc* 130: 5908-5915.

Anson DS, Smith GJ, Parsons DW (2006) Gene therapy for cystic fibrosis airway disease- is clinical success imminent? *Curr Gene Ther* 6: 161-179.

Anton N, Benoit JP, Saulnier P (2008) Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. *J Control Release* 128: 185-199.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, et al. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228.

Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A (2005) Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 54: 53-61.

Awwad HK, el Naggar M, Mocktar N, Barsoum M (1986) Intercapillary distance measurement as an indicator of hypoxia in carcinoma of the cervix uteri. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1329-1333.

B

Balogh L, Nigavekar SS, Nair BM, Lesniak W, Zhang C, et al. (2007) Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models. *Nanomedicine* 3: 281-296.

Barratt G (2003) Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cell Mol Life Sci* 60: 21-37.

Batrakova EV, Kabanov AV (2008) Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release* 130: 98-106.

Beaney RP, Lammertsma AA, Jones T, McKenzie CG, Halnan KE (1984) Positron emission tomography for in-vivo measurement of regional blood flow, oxygen utilisation, and blood volume in patients with breast carcinoma. *Lancet* 1: 131-134.

Beer AJ, Grosu AL, Carlsen J, Kolk A, Sarbia M, et al. (2007) [18F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of alphavbeta3 expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 13: 6610-6606.

Beer AJ, Niemeier M, Carlsen J, Sarbia M, Nährig J, et al. (2008) Patterns of alphavbeta3 expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by 18F-Galacto-RGD PET. *J Nucl Med* 49: 255-259.

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165.

Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401-410.

Bigler SA, Deering RE, Brawer MK (1993) Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol* 24: 220-226.

Boisseau S, Mabrouk K, Ram N, Garmy N, Collin V, et al. (2006) Cell penetration properties of maurocalcine, a natural venom peptide active on the intracellular ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1758: 308-319.

Bondi ML and Craparo EF (2010) Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art. *Expert Opin Drug Deliv* 7: 7-18.

Borah B, Gross GJ, Dufresne TE, Smith TS, Cockman MD, et al. (2001) Three-dimensional microimaging (MRmicroI and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis. *Anat Rec* 265: 101-110.

Borgne-Sanchez A, Dupont S, Langonne A, Baux L, Lecoœur H, et al. (2007) Targeted Vpr-derived peptides reach mitochondria to induce apoptosis of alphaVbeta3-expressing endothelial cells. *Cell Death Differ* 14: 422-435.

Boucher Y, Kirkwood JM, Opacic D, Desantis M, Jain RK (1991) Interstitial hypertension in superficial metastatic melanomas in humans. *Cancer Res* 51: 6691-6694.

Boucher Y, Lee I, Jain RK (1995) Lack of general correlation between interstitial fluid pressure and oxygen partial pressure in solid tumors. *Microvasc Res* 50: 175-182.

Boutet J, Herve L, Debourdeau M, Guyon L, Peltie P, et al. (2009) Bimodal ultrasound and fluorescence approach for prostate cancer diagnosis. *J Biomed Opt* 14: 064001.

Bridot JL, Faure AC, Laurent S, Riviere C, Billotey C, et al. (2007) Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for in vivo imaging. *J Am Chem Soc* 129: 5076-5084.

Brignole C, Marimpietri D, Pagnan G, Di Paolo D, Zancolli M, et al. (2005) Neuroblastoma targeting by c-myc-selective antisense oligonucleotides entrapped in anti-GD2 immunoliposome: immune cell-mediated anti-tumor activities. *Cancer Lett* 228: 181-186.

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264: 569-571.

Buensuceso C, de Virgilio M, Shattil SJ (2003) Detection of integrin alpha IIb beta 3 clustering in living cells. *J Biol Chem* 278: 15217-15224.

C

Cai W, Shin DW, Chen K, Gheysens O, Cao Q, et al. (2006) Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett* 6: 669-676.

Cai W, Chen X (2008) Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging. *Nat Protoc* 3: 89-96.

Carlson CB, Mowery P, Owen RM, Dykhuizen EC, Kiessling LL (2007) Selective tumor cell targeting using low-affinity, multivalent interactions. *ACS Chem Biol* 2: 119-127.

Carlson JJ, Garrison LP, Ramsey SD, Veenstra DL (2009) Epidermal growth factor receptor genomic variation in NSCLC patients receiving tyrosine kinase inhibitor therapy: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 1483-1493.

Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.

- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, et al. (2000) Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14608-14613.
- Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y (2008) Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1627-1637.
- Chen J, Corbin IR, Li H, Cao W, Glickson JD, et al. (2007) Ligand conjugated low-density lipoprotein nanoparticles for enhanced optical cancer imaging in vivo. *J Am Chem Soc* 129: 5798-5799.
- Chen J, Jarzyna PA, van Tilborg GAF, Nguyen VA, Cormode DP, et al. (2010) RGD peptide functionalized and reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles as a versatile and multimodal tumor targeting molecular imaging probe. *FASEB J* 24: 1689-1699.
- Chen K, Li ZB, Wang H, Cai W, Chen X (2008) Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35: 2235-2244.
- Chen K, Xie J, Xu H, Behera D, Michalski MH, Biswal S, Wang A, Chen X (2009) Triblock copolymer coated iron oxide nanoparticle conjugate for tumor integrin targeting. *Biomaterials* 30: 6912-6919.
- Chen X, Hou Y, Tohme M, Park R, Khankaldyyan V, et al. (2004) Pegylated Arg-Gly-Asp peptide: ⁶⁴Cu labeling and PET imaging of brain tumor alphavbeta3-integrin expression. *J Nucl Med* 45: 1776-1783.
- Chen Y, Xu X, Hong S, Chen J, Liu N, et al. (2001) RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth. *Cancer Res* 61: 2434-2438.
- Cheon J, Lee JH (2008) Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology. *Acc Chem Res* 41: 1630-1640.
- Cherry SR (2006) Multimodality in vivo imaging systems: twice the power or double the trouble? *Annu Rev Biomed Eng* 8: 35-62.
- Cheson BD (2010) Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 23: 133-143.
- Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, et al. (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 25: 1165-1170.
- Chollet P, Favrot MC, Hurbin A, Coll JL (2002) Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 4: 84-91.
- Cleaver O, Melton DA (2003) Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9: 661-668.
- Coll JL, Chollet P, Brambilla E, Desplanques D, Behr JP, et al. (1999) In vivo delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 10: 1659-1666.
- Coll JL, Negoescu A, Louis N, Sachs L, Tenaud C, et al. (1998) Antitumor activity of bax and p53 naked gene transfer in lung cancer: in vitro and in vivo analysis. *Hum Gene Ther* 9: 2063-2074.
- Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, et al. (1979) Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol* 31: 331-332.
- Crombez L, Charnet A, Morris MC, Aldrian-Herrada G, Heitz F, et al. (2007) A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery. *Biochem Soc Trans* 35: 44-46.
- Crombez L, Morris MC, Dufort S, Aldrian-Herrada G, Nguyen Q, et al. (2009) Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acids Res* 37: 4559-4569.

Cudic M, Fields GB (2009) Extracellular proteases as targets for drug development. *Curr Protein Pept Sci* 10: 297-307.

Curti BD, Urba WJ, Alvord WG, Janik JE, Smith JW, 2nd, et al. (1993) Interstitial pressure of subcutaneous nodules in melanoma and lymphoma patients: changes during treatment. *Cancer Res* 53: 2204-2207.

D

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808.

Davis ME, Zuckerman JE, Choi CHJ, Seligson D, Tolcher A, et al. (2010) Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464: 1067-1071.

del Rio G, Castro-Obregon S, Rao R, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. *FEBS Lett* 494: 213-219.

Delpech B (1991) [Cancer stroma]. *Bull Cancer* 78: 869-900.

Desgrosellier JS, Cheresh DA (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10: 9-22.

Deshpande N, Needles A, Willmann JK (2010) Molecular ultrasound imaging: current status and future directions. *Clin Radiol* 65: 567-581.

Devaraj NK, Keliher EJ, Thurber GM, Nahrendorf M, Weissleder R (2009) 18F labeled nanoparticles for in vivo PET-CT imaging. *Bioconjug Chem* 20: 397-401.

Duconge F, Pons T, Pestourie C, Herin L, Theze B, et al. (2008) Fluorine-18-labeled phospholipid quantum dot micelles for in vivo multimodal imaging from whole body to cellular scales. *Bioconjug Chem* 19: 1921-1926.

Dufort S, Sancey L, Wenk C, Josserand V, Coll JL (2010) Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Biochim Biophys Acta*.

Duncan R (2006) Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer* 6: 688-701.

E

Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM (2004) Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* 6: 597-602.

Ellerby HM, Arap W, Ellerby LM, Kain R, Andrusiak R, et al. (1999) Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* 5: 1032-1038.

Elliott G, O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-233.

Elmqvist A, Lindgren M, Bartfai T, Langel U (2001) VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* 269: 237-244.

Endrich B, Reinhold HS, Gross JF, Intaglietta M (1979) Tissue perfusion inhomogeneity during early tumor growth in rats. *J Natl Cancer Inst* 62: 387-395.

F

Fang C, Shi B, Pei YY, Hong MH, Wu J, et al. (2006) In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur J Pharm Sci* 27: 27-36.

Faraji AH, Wipf P (2009) Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 17: 2950-2962.

- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, et al. (2006) Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6315-6320.
- Fattal E, Barratt G (2009) Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. *Br J Pharmacol* 157: 179-194.
- Faure AC, Dufort S, Josserand V, Perriat P, Coll JL, et al. (2009) Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small* 5: 2565-2575.
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, et al. (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 269: 2550-2561.
- Ferrara N, Kerbel RS (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-974.
- Ferrari M (2005) Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5: 161-171.
- Flamme I, Frolich T, Risau W (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173: 206-210.
- Foillard S, Jin ZH, Garanger E, Boturyn D, Favrot MC, Coll JL, Dumy P (2008) Synthesis and biological characterization of targeted pro-apoptotic peptide. *ChemBioChem* 9: 2326-2332.
- Foillard S, Sancey S, Coll JL, Boturyn D, Dumy P (2009) Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org Biomol Chem* 7: 221-224.
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186.
- Folkman J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6.
- Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.
- Folkman J, Hanahan D (1991) Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp* 22: 339-347.
- Frangioni JV (2003) In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 7: 626-634.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, et al. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 276: 5836-5840.

G

- Gao J, Chen K, Xie R, Xie J, Yan Y, et al. (2010) In vivo tumor-targeted fluorescence imaging using near-infrared non-cadmium quantum dots. *Bioconjug Chem* 21: 604-609.
- Garanger E, Boturyn D, Dumy P (2007) Tumor targeting with RGD peptide ligands-design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers. *Anticancer Agents Med Chem* 7: 552-558.
- Garanger E, Boturyn D, Jin Z, Dumy P, Favrot MC, et al. (2005) New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* 12: 1168-1175.
- Gombotz WR, Wang GH, Horbett TA, Hoffman AS (1991) Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *J Biomed Mater Res* 25: 1547-1562.
- Goodman SL, Holzemann G, Sulyok GA, Kessler H (2002) Nanomolar small molecule inhibitors for α v β 6, α v β 5, and α v β 3 integrins. *J Med Chem* 45: 1045-1051.
- Goutayer M, Dufort S, Josserand V, Royere A, Heinrich E, et al. (2010) Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by in vivo fluorescence imaging. *Eur J Pharm Biopharm* 75: 137-147.

Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, et al. (2000) 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces* 18: 301-313.

Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C, Suit HD, Jain RK (1999) Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res* 59: 3776-3782.

Grillo-Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M, Benyunes M (2002) Rituximab: ongoing and future clinical development. *Semin Oncol* 29: 105-112.

Gros E, Deshayes S, Morris MC, Aldrian-Herrada G, Depollier J, et al. (2006) A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid delivery. *Biochim Biophys Acta* 1758: 384-393.

Gurrath M, Muller G, Kessler H, Aumailley M, Timpl R (1992) Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur J Biochem* 210: 911-921.

Gutmann R, Leunig M, Feyh J, Goetz AE, Messmer K, et al. (1992) Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size. *Cancer Res* 52: 1993-1995.

H

Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kalef-Ezra JA, et al. (2010) Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol* 55: 3045-3059.

Han HD, Mangal LS, Lee JW, Shahzad MMK, Kim HS, et al. (2010) Targeted gene silencing using RGD-labeled chitosan nanoparticles. *Clin Cancer Res* 31: 3910-3922.

Hart SL (2010) Multifunctional nanocomplexes for gene transfer and gene therapy. *Cell Biol Toxicol* 26: 69-81.

Hassan M, Klaunberg BA (2004) Biomedical applications of fluorescence imaging in vivo. *Comp Med* 54: 635-644.

Haubner R, Finsinger D, Kessler H (1997) Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha v \beta 3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* 36: 1374-1389

Haubner R, Wester HJ, Weber WA, Mang C, Ziegler SI, et al. (2001a) Noninvasive imaging of $\alpha(v)\beta 3$ integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* 61: 1781-1785.

Haubner R, Wester HJ, Burkhart F, Senekowitsch-Schmidtke R, Weber W, et al. (2001b) Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J Nucl Med* 42: 326-336.

Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N (2008) Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 876-885.

Heitz F, Morris MC, Divita G (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 157: 195-206.

Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A (2004) High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 806-813.

Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE (2003) Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-421.

Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, et al. (2003) The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 18: 55-61.

Hinnen P, Eskens FA (2007) Vascular disrupting agents in clinical development. *Br J Cancer* 96: 1159-1165.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, et al. (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284: 1994-1998.

Holliger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23: 1126-1136.

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, et al. (1992) Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340: 1120-1124.

Huang HC, Rege K, Heys JJ (2010) Spatiotemporal temperature distribution and cancer cell death in response to extracellular hyperthermia induced by gold nanorods. *ACS Nano* 4: 2892-2900.

Huang M, Khor E, Lim LY (2004) Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res* 21: 344-353.

Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2007) Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 2: 681-693.

Hynes RO (2002) A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 8: 918-921.

I

Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T (2005) Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng* 100: 1-11.

Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* 11: 812-818.

J

Jain RK (1990) Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res* 50: 814s-819s.

Jain RK (1991) Haemodynamic and transport barriers to the treatment of solid tumours. *Int J Radiat Biol* 60: 85-100.

Jain RK (1998) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J Control Release* 53: 49-67.

Jain RK (1999) Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu Rev Biomed Eng* 1: 241-263.

Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693.

Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307: 58-62.

Jain RK, Booth MF (2003) What brings pericytes to tumor vessels? *J Clin Invest* 112: 1134-1136.

Jang SH, Wientjes MG, Lu D, Au JL (2003) Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res* 20: 1337-1350.

Jarver P, Langel U (2004) The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov Today* 9: 395-402.

Jin ZH, Josserand V, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, et al. (2007) In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer* 6: 41.

Jin ZH, Razkin J, Josserand V, Boturyn D, Grichine A, et al. (2007) In vivo noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4). *Mol Imaging* 6: 43-55.

Joliot A, Prochiantz A (2004) Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6: 189-196.

K

- Kabanov AV, Vinogradov SV (2009) Nanogels as pharmaceutical carriers: finitenetworks of infinite capabilities. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 5418-5429.
- Kazatchline M, Hauptmann G, Nydegger U (1986) Techniques du complement. *Livre Ed. INSERM collection technique en immunologie* p22-33.
- Kennel SJ, Davis IA, Branning J, Pan H, Kabalka GW, et al. (2000) High resolution computed tomography and MRI for monitoring lung tumor growth in mice undergoing radioimmunotherapy: correlation with histology. *Med Phys* 27: 1101-1107.
- Keramidas M, Josserand V, Righini CA, Wenk C, Faure C, Coll JL. (2010) Intrazoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg* 97: 737-753.
- Kerbel R, Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2: 727-739.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52-67.
- Kim CH, Woo SJ, Park JS, Kim HS, Park MY, et al. (2007) Enhanced antitumour immunity by combined use of temozolomide and TAT-survivin pulsed dendritic cells in a murine glioma. *Immunology* 122: 615-622.
- Kim M, Carman CV, Springer TA (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301: 1720-1725.
- Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, et al. (2006) Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res* 66: 6732-6740.
- Koenig A, Herve L, Josserand V, Berger M, Boutet J, et al. (2008) In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography. *J Biomed Opt* 13: 011008.
- Kommareddy S, Amiji M (2007) Antiangiogenic gene therapy with systemically administered sFlt-1 plasmid DNA in engineered gelatin-based nanovectors. *Cancer Gene Ther* 14: 488-498.
- Kong HJ, Mooney DJ (2007) Microenvironmental regulation of biomacromolecular therapies. *Nat Rev Drug Discov* 6: 455-463.
- Koutcher JA, Zakian K, Hricak H (2000) Magnetic resonance spectroscopic studies of the prostate. *Mol Urol* 4: 143-152;discussion 153.

L

- Labarre D, Montdargent B, Carrens M, Maillet F (1993) Strategy for in vitro evaluation of the interactions between biomaterials and complement system. *J Appl Biomater* 4 : 231-240.
- Lammers T, Hennink WE, Storm G (2008) Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* 99: 392-397.
- Lanza GM, Wickline SA (2001) Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 44: 13-31.
- Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, Szoka FC (2005) Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 23: 1517-1526.
- Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE (1992) In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm* 79 : 43-48.

- Lemarchand C, Gref R, Couvreur P (2004) Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 327-341.
- Less JR, Posner MC, Boucher Y, Borochoviz D, Wolmark N, et al. (1992) Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res* 52: 6371-6374.
- Less JR, Skalak TC, Sevick EM, Jain RK (1991) Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res* 51: 265-273.
- Li L, Wartchow CA, Danthi SN, Shen Z, Dechene N, et al. (2004) A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 1215-1227.
- Li S, Wang A, Jiang W, Guan Z (2008) Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer* 8: 103.
- Li ZW, Dalton WS (2006) Tumor microenvironment and drug resistance in hematologic malignancies. *Blood Rev* 20: 333-342.
- Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, Kosmidis P, Murray S (2009) Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 352-366.
- Lippert JW, 3rd (2007) Vascular disrupting agents. *Bioorg Med Chem* 15: 605-615.
- Liu S (2006) Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin alphavbeta3 targeted radiotracers for tumor imaging. *Mol Pharm* 3: 472-487.
- Liu Y, Shipton MK, Ryan J, Kaufman ED, Franzen S, et al. (2007) Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers. *Anal Chem* 79: 2221-2229.
- Liu S (2009) Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin alpha(v)beta(3)-targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjug Chem* 20: 2199-2213.
- Lu AH, Salabas EL, Schuth F (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl* 46: 1222-1244.
- Luo BH, Carman CV, Springer TA (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25: 619-647.
- Luo BH, Springer TA (2006) Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* 18: 579-586.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, et al. (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7: 1194-1201.

M

- Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA (1992) Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 340: 145-146.
- Mahler B, Spinicelli P, Buil S, Quelin X, Hermier JP, et al. (2008) Towards non-blinking colloidal quantum dots. *Nat Mater* 7: 659-664.
- Mai JC, Mi Z, Kim SH, Ng B, Robbins PD (2001) A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors. *Cancer Res* 61: 7709-7712.
- Maniatis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, et al. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155: 739-752.
- Massoud TF, Gambhir SS (2003) Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 17: 545-580.

- Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46: 6387-6392.
- Max R, Gerritsen RR, Nooijen PT, Goodman SL, Sutter A, et al. (1997) Immunohistochemical analysis of integrin alpha vbeta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int J Cancer* 71: 320-324.
- Mayer M (1961) Complement and Complement fixation. Dans M.M. Kabat EA (Ed), *Experimental immunochemistry*, 2nd ed. Springfield : Thomas, p133-156.
- Mehnert W, Mader K (2001) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47: 165-196.
- Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, et al. (2005) Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307: 538-544.
- Mobley J et Vo-Dinh T (2003) Chapter 2 : Optical properties of tissues. *Biomedical Photonics Handbook*, CRC Press.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC (2001a) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53: 283-318.
- Moghimi SM, Hunter AC (2001b) Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 18: 527-550.
- Moghimi SM, Szebeni J (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 42: 463-478.
- Morana G, Salviato E, Guarise A (2007) Contrast agents for hepatic MRI. *Cancer Imaging* 7 Spec No A: S24-27.
- Moreau C, Cartron PF, Hunt A, Meflah K, Green DR, et al. (2003) Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem* 278: 19426-19435.
- Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP (2008) Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* 29: 3477-3496.
- Morille M, Montier T, Legras P, Carmoy N, Brodin P, et al. (2010) Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* 31: 321-329.
- Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* 19: 1173-1176.
- Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G (2008) Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell* 100: 201-217.
- Morris MC, Vidal P, Chaloin L, Heitz F, Divita G (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 25: 2730-2736.
- Mosqueira VC, Legrand P, Gref R, Heurtault B, Appel M, et al. (1999) Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol). *J Drug Target* 7: 65-78.
- Mosqueira VC, Legrand P, Gulik A, Bourdon O, Gref R, et al. (2001) Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials* 22: 2967-2979.
- Mukherji SK (2010) Bevacizumab (Avastin). *AJNR Am J Neuroradiol* 31: 235-236.
- Muller RH, Mader K, Gohla S (2000) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 50: 161-177.

N

- Na K, Park KH, Kim SW, Bae YH (2000) Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). *J Control Release* 69: 225-236.
- Nagayama S, Ogawara K, Fukuoka Y, Higaki K, Kimura T (2007) Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int J Pharm* 342: 215-221.
- Nascimento FD, Hayashi MA, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, et al. (2007) Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 282: 21349-21360.
- Nasongkla N, Shuai X, Ai H, Weinberg BD, Pink J, et al. (2004) cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* 43: 6323-6327.
- Neri D, Bicknell R (2005) Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 5: 436-446.
- Nikanjam M, Blakely EA, Bjornstad KA, Shu X, Budinger TF, et al. (2007) Synthetic nano-low density lipoprotein as targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *Int J Pharm* 328: 86-94.
- Ntziachristos V, Tung CH, Bremer C, Weissleder R (2002) Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nat Med* 8: 757-760.

O

- Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E (1999) PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 6: 595-605.
- Ogris M, Wagner E (2002) Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discov Today* 7: 479-485.
- Oishi M, Kataoka K, Nagasaki Y (2006) pH-responsive three-layered PEGylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector. *Bioconjug Chem* 17: 677-688.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285.
- Osterberg E, Bergstrom K, Holmberg K, Schuman TP, Riggs JA, et al. (1995) Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: comparison to PEG. *J Biomed Mater Res* 29: 741-747.
- Owens DE, 3rd, Peppas NA (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307: 93-102.

P

- Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, et al. (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 427: 695.
- Pan XQ, Lee RJ, Ratnam M (2004) Penetration into solid tumor tissue of fluorescent latex microspheres: a mimic of liposome particles. *Anticancer Res* 24: 3005-3008.
- Papo N, Seger D, Makovitzki A, Kalchenko V, Eshhar Z, et al. (2006) Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide. *Cancer Res* 66: 5371-5378.
- Park JW, Benz CC, Martin FJ (2004) Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. *Semin Oncol* 31: 196-205.

- Passirani C, Barratt G, Devissaguet JP, Labarre D (1998) Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate). *Pharm Res* 15: 1046-1050.
- Patra CR, Bhattacharya R, Wang E, Katarya A, Lau JS, et al. (2008) Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. *Cancer Res* 68: 1970-1978.
- Pavey KD, Olliff CJ (1999) SPR analysis of the total reduction of protein adsorption to surfaces coated with mixtures of long- and short-chain polyethylene oxide block copolymers. *Biomaterials* 20: 885-890.
- Pelletier R, Caron SO, Puymirat J (2006) RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases. *Curr Gene Ther* 6: 131-146.
- Pepper MS (2001) Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 7: 462-468.
- Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, et al. (1997) Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 150: 815-821.
- Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, et al. (2000) Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 80: 99-115.
- Pfaff M, Tangemann K, Muller B, Gurrath M, Muller G, et al. (1994) Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem* 269: 20233-20238.
- Pinto-Alphandary H, Andreumont A, Couvreur P (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int J Antimicrob Agents* 13: 155-168.
- Pochon S, Tardy I, Bussat P, Bettinger T, Brochot J, et al. (2010) BR55: a lipopeptide-based VEGFR2-targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of angiogenesis. *Invest Radiol* 45: 89-95.
- Pooga M, Soomets U, Hallbrink M, Valkna A, Saar K, et al. (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* 16: 857-861.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9: 677-684.
- Pujals S, Fernandez-Carneado J, Lopez-Iglesias C, Kogan MJ, Giralte E (2006) Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochim Biophys Acta* 1758: 264-279.
- Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK (2010a) Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol* 65: 500-516.
- Pysz MA, Foygel K, Rosenberg J, Gambhir SS, Schneider M, et al. (2010b) Antiangiogenic Cancer Therapy: Monitoring with Molecular US and a Clinically Translatable Contrast Agent (BR55). *Radiology* 256: 519-527.

R

- Rai M, Yadav A, Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27: 76-83.
- Rameez S, Alost H, Palmer AF (2008) Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: a potential oxygen carrier. *Bioconjug Chem* 19: 1025-1032.
- Rege K, Patel SJ, Megeed Z, Yarmush ML (2007) Amphipathic peptide-based fusion peptides and immunoconjugates for the targeted ablation of prostate cancer cells. *Cancer Res* 67: 6368-6375.
- Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, et al. (2009) Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med* 15: 392-400.

Rijcken CJ, Snel CJ, Schiffelers RM, van Nostrum CF, Hennink WE (2007) Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: synthesis, characterisation and in vivo studies. *Biomaterials* 28: 5581-5593.

Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674.

Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.

Rittner K, Benavente A, Bompard-Sorlet A, Heitz F, Divita G, et al. (2002) New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* 5: 104-114.

Rooks V, Beecken WD, Iordanescu I, Taylor GA (2001) Sonographic evaluation of orthotopic bladder tumors in mice treated with TNP-470, an angiogenic inhibitor. *Acad Radiol* 8: 121-127.

Rosell R, Robinet G, Szczesna A, Ramlau R, Constenla M, et al. (2008) Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 19: 362-369.

Rousselle C, Smirnova M, Clair P, Lefauconnier JM, Chavanieu A, et al. (2001) Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy: saturation kinetics and specificity. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 124-131.

S

Sancey L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, et al. (2007) In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer 99mTc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34: 2037-2047.

Sancey L, Dufort S, Josserand V, Keramidas M, Righini C, et al. (2009) Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. *Int J Pharm* 379: 309-316.

Sancey L, Garanger E, Foillard S, Schoehn G, Hurbin A, et al. (2009) Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther* 17: 837-843.

Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, et al. (2006) RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther* 13: 1360-1370.

Sanvicens N, Marco MP (2008) Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol* 26: 425-433.

Sawant RM, Hurley JP, Salmaso S, Kale A, Tolcheva E, et al. (2006) "SMART" drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjug Chem* 17: 943-949.

Schmidt MC, Rothen-Rutishauser B, Rist B, Beck-Sickinger A, Wunderli-Allenspach H, et al. (1998) Translocation of human calcitonin in respiratory nasal epithelium is associated with self-assembly in lipid membrane. *Biochemistry* 37: 16582-16590.

Schnell O, Krebs B, Carlsen J, Miederer I, Goetz C, et al. (2009) Imaging of integrin alpha(v)beta(3) expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography. *Neuro Oncol* 11: 861-870.

Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5: 147-159.

Schroeder A, Levins CG, Cortez C, Langer R, Anderson DG (2010) Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *J Intern Med* 267: 9-21.

Schroeder JE, Shweky I, Shmeeda H, Banin U, Gabizon A (2007) Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles. *J Control Release* 124: 28-34.

- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285: 1569-1572.
- Sharkey RM, Cardillo TM, Rossi EA, Chang CH, Karacay H, et al. (2005) Signal amplification in molecular imaging by pretargeting a multivalent, bispecific antibody. *Nat Med* 11: 1250-1255.
- Sidhu SS, Fellouse FA (2006) Synthetic therapeutic antibodies. *Nat Chem Biol* 2: 682-688.
- Simeoni F, Morris MC, Heitz F, Divita G (2003) Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31: 2717-2724.
- Sipkins DA, Cheresh DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, et al. (1998) Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat Med* 4: 623-626.
- Snyder EL, Dowdy SF (2005) Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert Opin Drug Deliv* 2: 43-51.
- Soulieres D, Greer W, Magliocco AM, Huntsman D, Young S, et al. (2010) KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol* 17 Suppl 1: S31-40.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, et al. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
- Stasi R (2008) Gemtuzumab ozogamicin: an anti-CD33 immunoconjugate for the treatment of acute myeloid leukaemia. *Expert Opin Biol Ther* 8: 527-540.
- Stohrer M, Boucher Y, Stangassinger M, Jain RK (2000) Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res* 60: 4251-4255.
- Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 8: 473-480.
- Su H, Du Y, Qian Y, Zong Y, Li J, et al. (2010) Targeted Ultrasound Contrast Imaging of Matrix Metalloproteinase-2 in Ischemia-Reperfusion Rat Model: Ex Vivo and In Vivo Studies. *Mol Imaging Biol*.
- Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, et al. (2009) Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* 16: 510-520.
- Sullivan DC, Kelloff G (2005) Seeing into cells. The promise of in vivo molecular imaging in oncology. *EMBO Rep* 6: 292-296.
- Sutcliffe-Goulden JL, O'Doherty MJ, Marsden PK, Hart IR, Marshall JF, et al. (2002) Rapid solid phase synthesis and biodistribution of 18F-labelled linear peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29: 754-759.

T

- Tada H, Higuchi H, Wanatabe TM, Ohuchi N (2007) In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res* 67: 1138-1144.
- Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110: 599-511.
- Tammela T, Alitalo K (2010) Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 140: 460-476.
- Tao W, Davide JP, CAi M, Zhang GJ, South VJ, Matter A, Ng B, Zhang Y, Sepp-Lorenzaino L (2010) Noninvasive imaging of lipid nanoparticle-mediated systemic delivery of small-interfering RNA to the liver. *Mol Ther*.

Taylor SA, Marrinan CH, Liu G, Nale L, Bishop R, Kirschmeier P, Liu M, Long BJ (2008) Combining the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel results in enhanced growth inhibitory effects on human ovarian cancer models in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 109: 97-106.

Temming K, Schiffelers RM, Molema G, Kok RJ (2005) RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat* 8: 381-402.

Torchilin VP, Trubetskoy VS, Whiteman KR, Caliceti P, Ferruti P, Veronese FM (1995) New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes in vivo. *J Pharm Sci* 84: 1049-53.

Torchilin VP (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 4: 145-160.

Torchilin VP (2008) Antibody-modified liposomes for cancer chemotherapy. *Expert Opin Drug Deliv* 5: 1003-1025.

Tripathi L, Kumar P, Singh R (2009) Role of chelates in magnetic resonance imaging studies. *J Cancer Res Ther* 5: 148-153.

Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, Gioux S, Matsui A, et al. (2009) The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol* 16: 2943-2952.

U

Uchegbu IF, Schatzlein AG, Tetley L, Gray AI, Sludden J, et al. (1998) Polymeric chitosan-based vesicles for drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 50: 453-458.

Unger EC, Porter T, Culp W, Labell R, Matsunaga T, et al. (2004) Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 1291-1314.

V

Vallet-Regi M, Balas F, Arcos D (2007) Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* 46: 7548-7558.

Verkhusha VV, Lukyanov KA (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* 22: 289-296.

Vittaz M, Bazile D, Spenlehauer G, Verrecchia T, Veillard M, et al. (1996) Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials* 17: 1575-1581.

Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP (2006) Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27: 4356-4373.

W

Wadia JS, Dowdy SF (2005) Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 579-596.

Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, et al. (1992) Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 168: 257-262.

Watts JK, Deleavey GF, Damha MJ (2008) Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today* 13: 842-855.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8.

Weissleder R (2002) Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 2: 11-18.

- Weissleder R, Pittet MJ (2008) Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452: 580-589.
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, et al. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13003-13008.
- Weskott HP (2008) Emerging roles for contrast-enhanced ultrasound. *Clin Hemorheol Microcirc* 40: 51-71.
- Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS (2008) Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 7: 591-607.
- Winter PM, Caruthers SD, Kassner A, Harris TD, Chinen LK, et al. (2003) Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 63: 5838-5843.
- Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, et al. (2007) Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol* 25: 1149-1157.
- Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Li Y, Wu XY (2007) Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 491-504.
- Woodle MC, Lasic DD (1992) Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1113: 171-199.
- Wu M, Rivkin A, Pham T (2008) Panitumumab: human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Ther* 30: 14-30.
- Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Bohmer D, Henkel T, et al. (2006) Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy--feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperthermia* 22: 673-685.

X

- Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, et al. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294: 339-345.
- Xu L, Tang WH, Huang CC, Alexander W, Xiang LM, et al. (2001) Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv. *Mol Med* 7: 723-734.

Y

- Yamamoto Y, Nagasaki Y, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K (2001) Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *J Control Release* 77: 27-38.
- Yan JL et al. (2007) Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nano Today* 2 : 44-50.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, et al. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248.
- Yang J, Lim EK, Lee HJ, Park J, Lee SC, et al. (2008) Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection. *Biomaterials* 29: 2548-2555.
- Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, et al. (2000) Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1206-1211.
- Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S, O'regan RM (2006) Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol* 7: 657-667.

Z

Zhang Z, Huey Lee S, Feng SS (2007) Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* 28: 1889-1899.

Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, et al. (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114.

VECTORISATION DE BIOMOLECULES POUR L'IMAGERIE ET LA THERAPIE DES CANCERS

Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes principaux de recherche en oncologie. La génération de vecteurs spécifiques capables d'adresser un agent de contraste et/ou un médicament au niveau de la tumeur primaire et des métastases serait un atout majeur pour le diagnostic précoce et la thérapie des cancers. Dans une double optique de diagnostic et de thérapie, les nanoparticules sont apparues comme des candidats prometteurs pour la mise en place de protocoles thérapeutiques incluant le ciblage de la tumeur, son diagnostic par des techniques d'imagerie optique, ainsi que sa thérapie. Dans ce contexte notre laboratoire développe des appareils d'imagerie optique du petit animal (2D et 3D), afin de permettre le suivi de la biodistribution à long terme et de manière non invasive de sondes fluorescentes et de nanoparticules *in vivo*. La caractérisation du comportement de différentes nanoparticules (nanocapsules lipidiques, nanoparticules d'oxyde de Gadolinium et nanoparticules d'or) présentant différentes fonctionnalisations de surface a été réalisée *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles tumoraux. Les résultats obtenus montrent l'influence de la fonctionnalisation et de la taille des nanoparticules sur leur biodistribution *in vivo* et sur leur voie d'élimination. D'autre part, la fonctionnalisation des nanoparticules par le motif RGD permet le ciblage spécifique des cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* et améliore l'accumulation tumorale *in vivo*.

VECTORIZATION OF BIOMOLECULES FOR CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY

Early and accurate detection of tumors, as well as the development of targeted-treatments are major field of research in oncology. The generation of specific vectors, capable of addressing a drug or a contrast agent to the primary tumor site as well as in the remote (micro-) metastasis would be thus a major asset for early diagnosis and cancer therapy. In this double goal of diagnosis and therapy, nanoparticles emerged as promising candidates for the establishment of therapeutic protocols, including targeting, diagnosis with optical imaging techniques and cancer therapy. In this context, our laboratory developed 2D and 3D optical imaging devices, designed for small animal imaging, to enable the long term non-invasive follow-up of the *in vivo* biodistribution of fluorescent probes and nanoparticles. The characterization of the behavior of different nanoparticles (lipidic nanocapsules, gadolinium oxide nanoparticles and gold nanoparticles) with various surface functionalizations was carried out *in vitro* and *in vivo* on different tumor models. The results show the influence of the functionalization and the size of nanoparticles on their *in vivo* biodistribution and on their way of elimination. On the other hand, the functionalization of the nanoparticles by the RGD motif allows a specific targeting of cells expressing the $\alpha_v\beta_3$ integrin *in vitro* and improves the *in vivo* accumulation in tumors.

Mots Clés : tumeur, thérapie ciblée, imagerie de fluorescence *in vivo*, nanoparticules

Keywords : tumor, targeted therapy, *in vivo* fluorescence imaging, nanoparticles

Centre de Recherche INSERM U823 – Institut Albert Bonniot

Equipe 5 : « Cibles diagnostiques ou thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer du poumon »