

CALIF

Biodistribution de nano-cargos lipidiques par imagerie de fluorescence: de la cellule à l'animal

S. Hirsjärvi, C. Passirani, E. Garcion, F. Hindré, J-P. Benoît
(Inserm U1066, LUNAM Université, Angers)

J. Gravier, I. Texier
(DTBS, CEA/LETI, Grenoble)

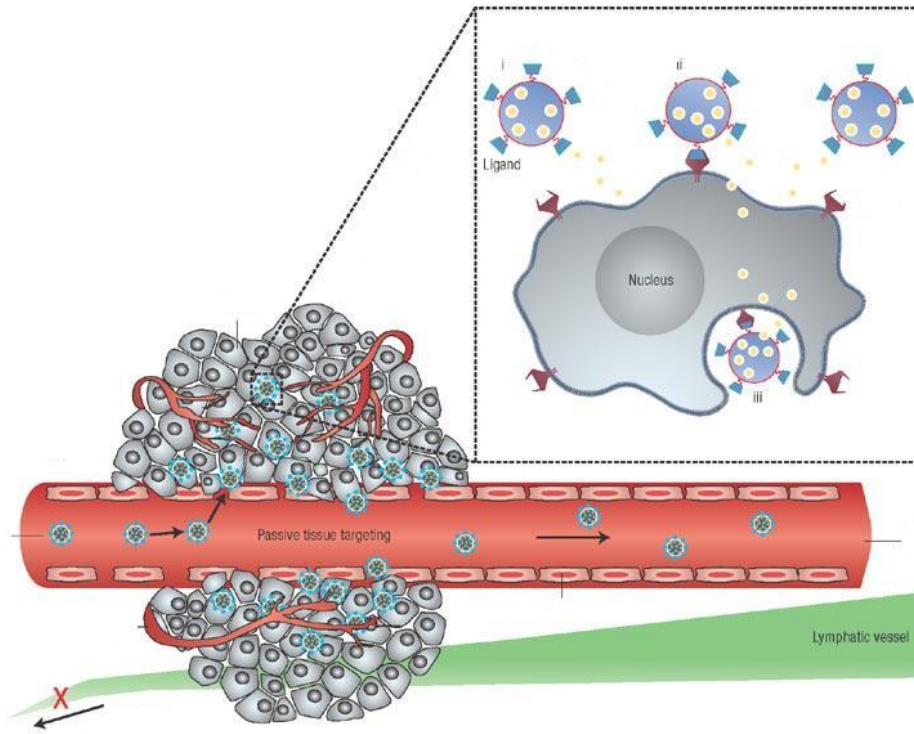
Y. Qiao, A. Royère, J. Bibette
(Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés, ESPCI, Paris)

S. Dufort, L. Sancey, A. Karageorgis, J-L. Coll
(Inserm U823, IAB, Université J. Fourier, Grenoble)

Journées Nationales Nanosciences et Nanotechnologies 2012



Nanomédecines et tumours ciblage passif vs ciblage actif – Imagerie optique vs Scintigraphie



Effet EPR (Enhanced Permeability and Retention Effect)

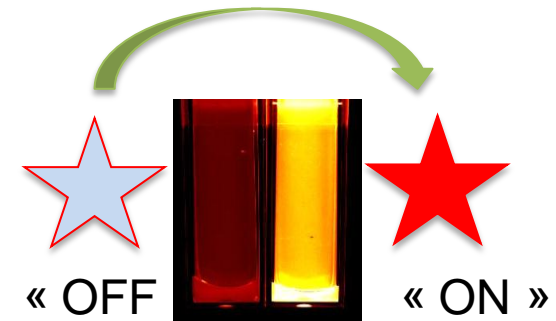
-Méthode rapide, sensible (pico molaire) et multi-échelle (de la cellule au corps entier)

-Suivi dans le temps (pas de décroissance)

-Sans rayonnement ionisant

-Faible coût des équipements et infrastructures

-Possibilité de sondes activables :

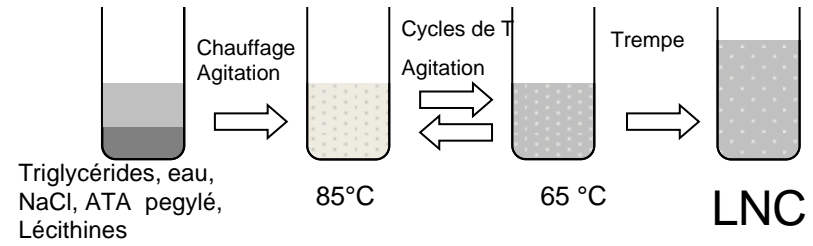


Objectifs

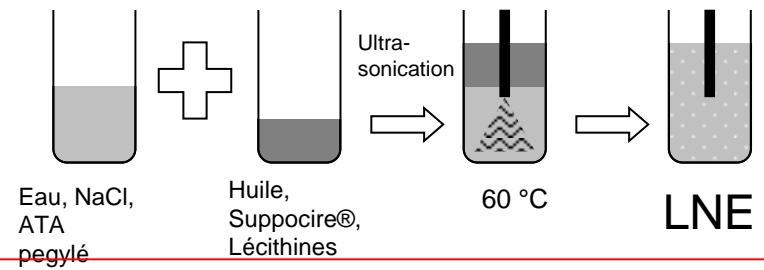
- Influence de la taille et des caractéristiques de surface sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de nanovecteurs **lipidiques** (nanoémulsions et nanocapsules)
- Développement de techniques d'imagerie de fluorescence pour le suivi des biodistributions et d'intégrité *in vivo* des vecteurs
- Ciblage actif de tumeurs à l'aide de ces nanovecteurs décorés de peptides RGD

Formulation des nanovecteurs lipidiques (Procédés sans solvant)

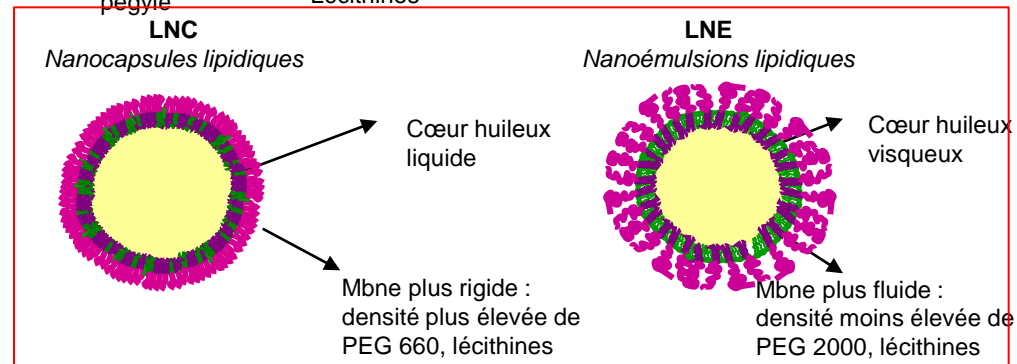
- Nanocapsules lipidiques (LNC)



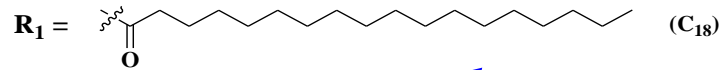
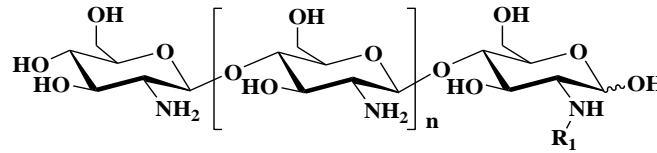
- Nanoémulsions lipidiques (LNE)



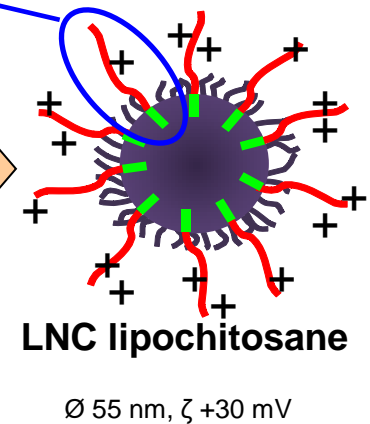
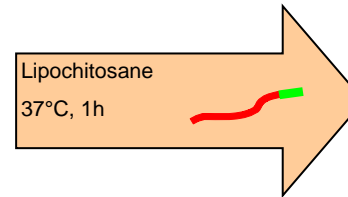
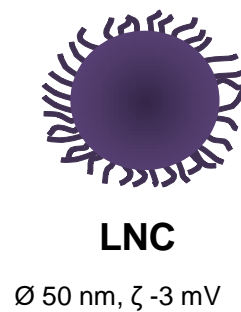
- Structure de lipoprotéines
- 3 tailles : 25, 50 et 100 nm



Formulation des nanovecteurs lipidiques

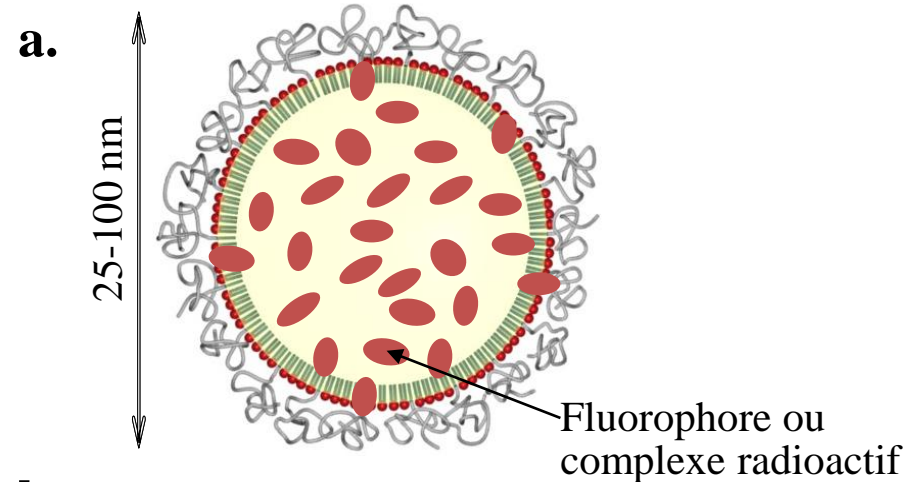


- Modification de surface : **chitosane, dextrane...**



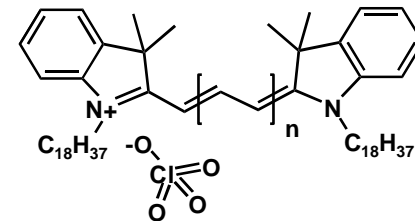
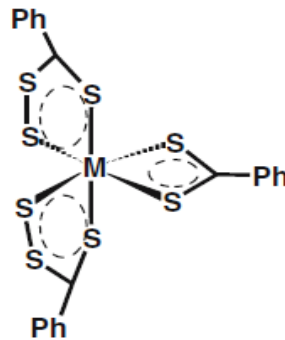
Marquage des nanovecteurs (*in vitro* & *in vivo*)

- Encapsulation de
 - Sondes fluorescentes
 - Complexe radioactif (γ)

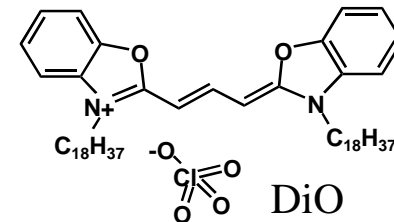


b.

Fig. 1. M-SSS complex structure (M= ^{99m}Tc or ^{188}Re)



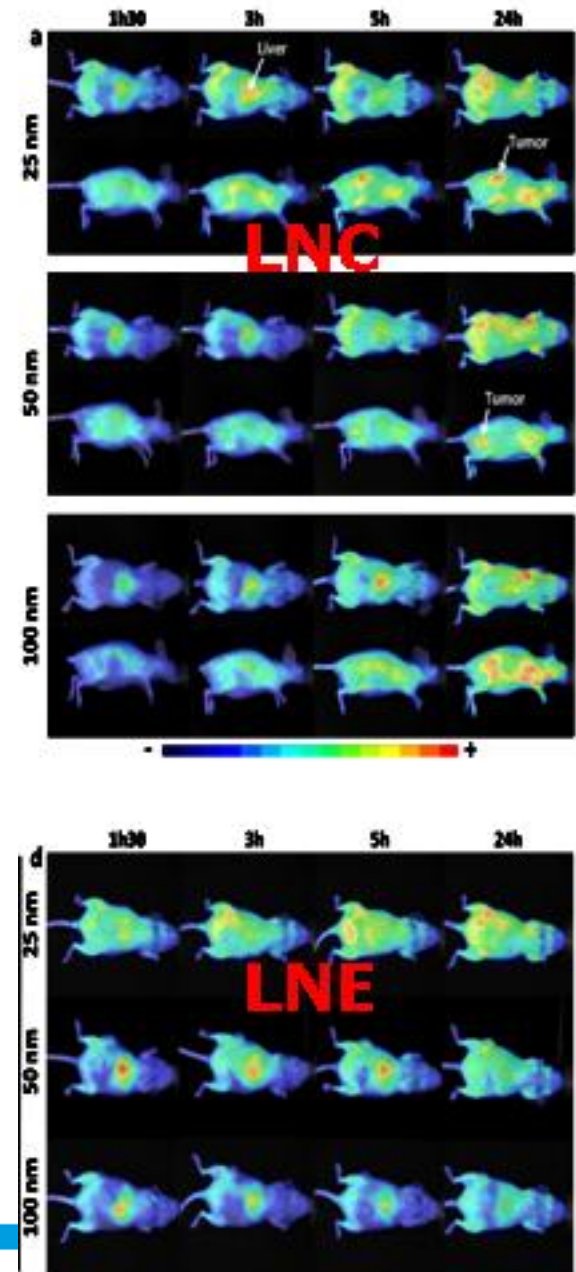
DiI, DiD, DiR (n = 1, 2, 3 resp.)



Ciblage passif : Biodistribution par imagerie optique dans un modèle murin de tumeur

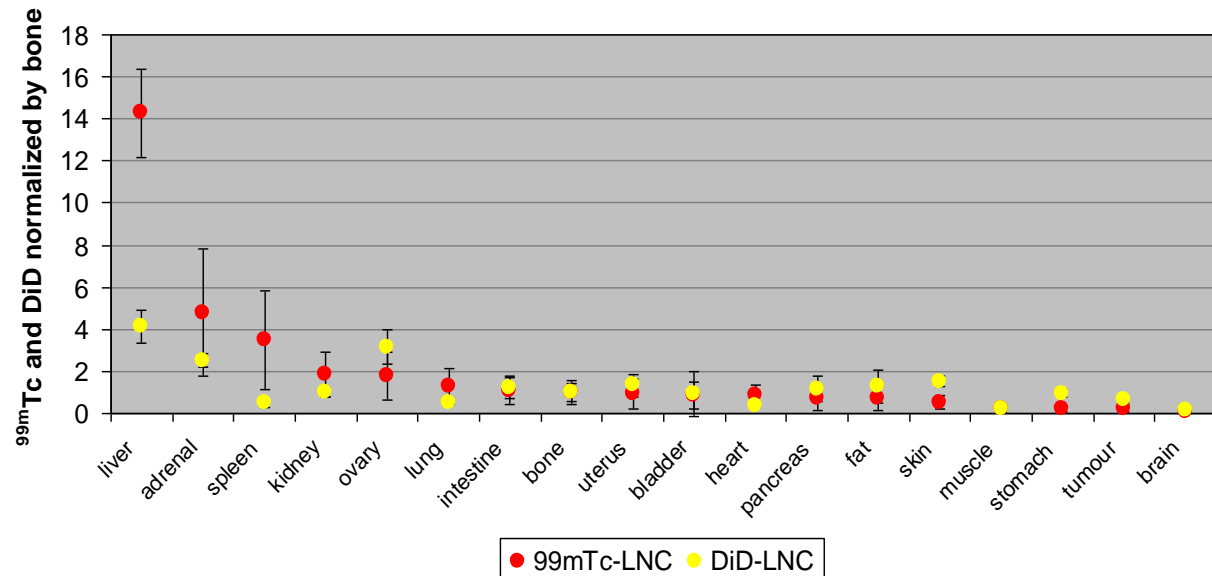
DiD-LNC et DiD-LNE 25-100 nm
Modèle HEK293(β 3), IV

- Temps précoces
 - Marquage de la périphérie avec les plus petites particules (effet plus net avec LNE)
- Biodistribution à 24h
 - Profils semblables avec accumulation dans la tumeur



Imagerie optique vs. Scintigraphie

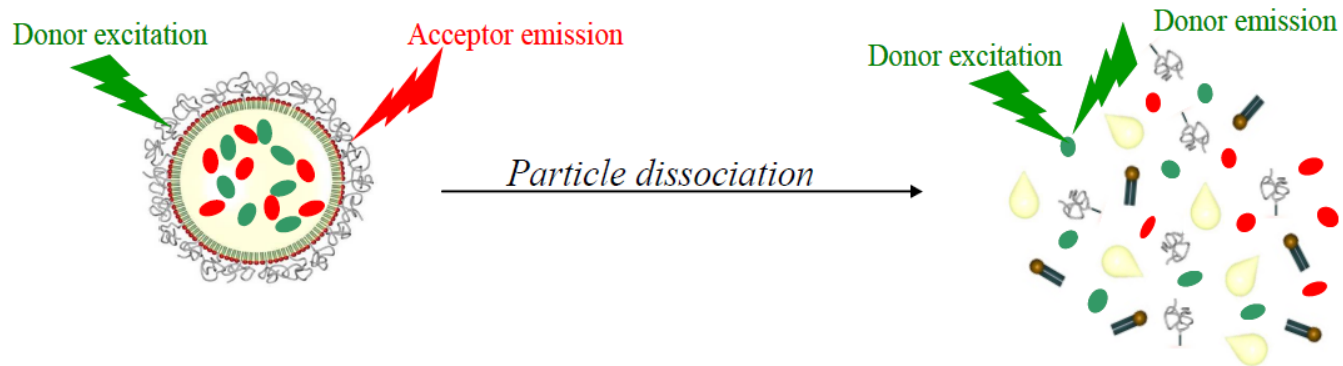
- Injection IV de LNC 50 nm contenant à la fois le ^{99m}Tc et le DiD, modèle HEK293(β 3)
 - Comparaison des profils de biodistribution (24h)



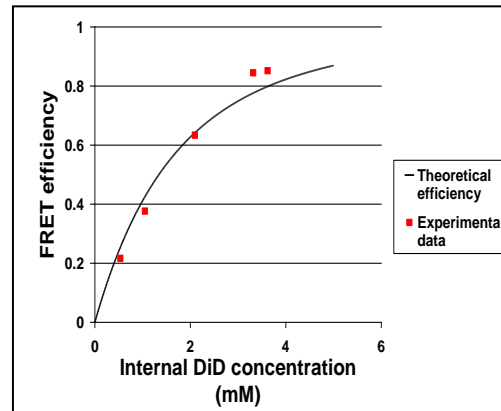
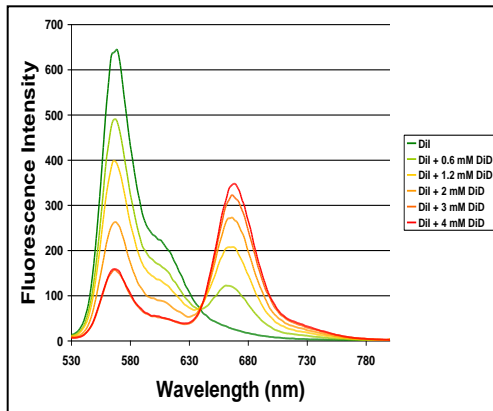
La fluorescence sous-estime la quantité de LNC dans les organes fortement irrigués (foie, rate, rein, poumon, coeur).

La décorrélation plus accentuée pour les LNE pourrait traduire leur métabolisation plus rapide.

FRET pour les nanovecteurs lipidiques



Principe du FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

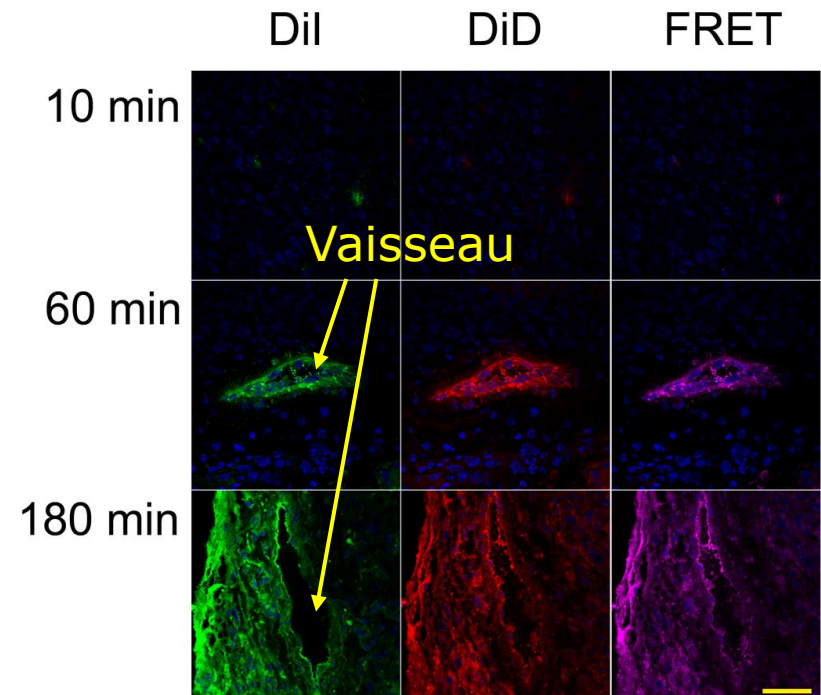


Co-encapsulés dans les LNE, l'émission du DiI diminue tandis que la fluorescence du DiD augmente (à gauche, λ d'excitation 520 nm). Les sondes en solution suivent la même loi (à droite).

Application du FRET *in vivo*

Etude de l'intégrité des nanovecteurs/tumeur

- Injection IV de LNC de 50 nm contenant le Dil et DiD
- Coupes de tumeur HEK
 - Aucune LNC à 10 min
 - LNC intactes dans les néo-vaisseaux à 60 min
 - LNC intactes dans la tumeur à 180 min



Application du FRET *in vivo*

Etude préliminaire de biodistribution

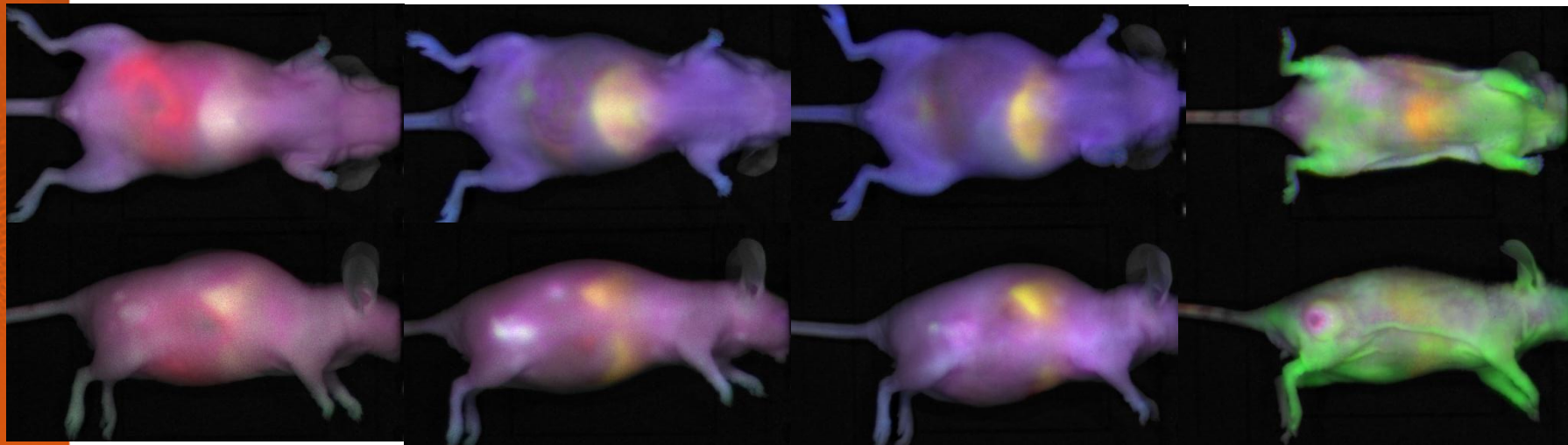
- Injection IV de LNC de 50 nm contenant le DiD et le FP730-C18 (proche infra-rouge) – HEK293 β 3

1h

3h

5h

24h

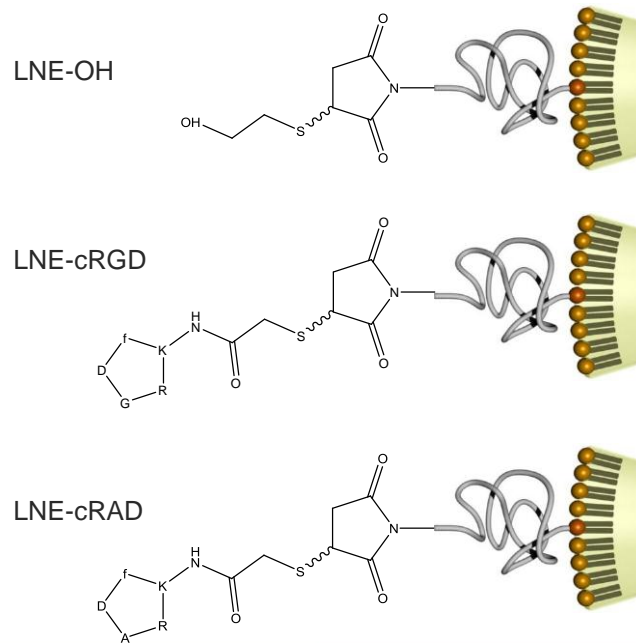


● DiD

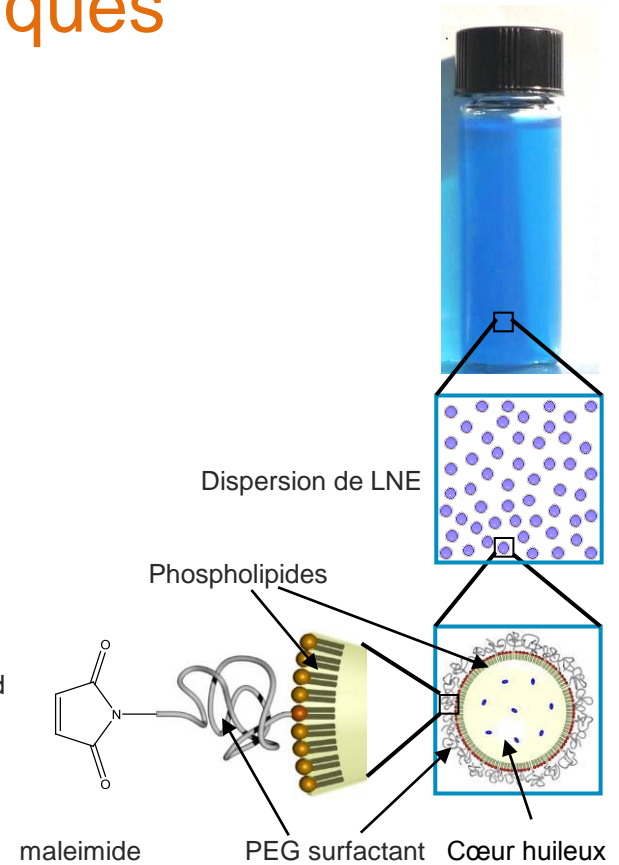
● FRET

● FP730-C18

Ciblage actif : Greffage de peptides sur des nanovecteurs lipidiques



Greffage du ligand

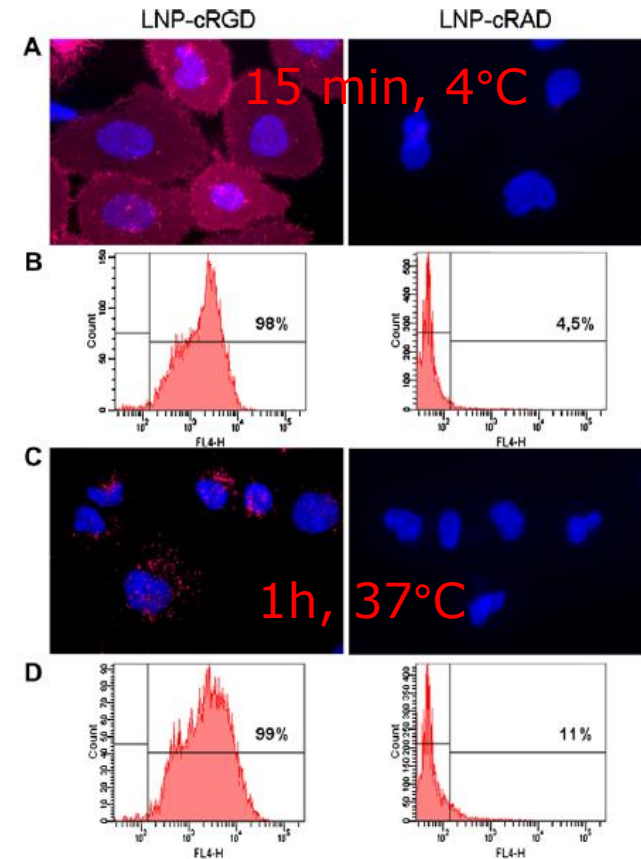


Goutayer *et al.* Eur. J. Pharm. Biopharm. (2010), 75, 137

Nanovecteurs lipidiques portant cRGD/cRAD

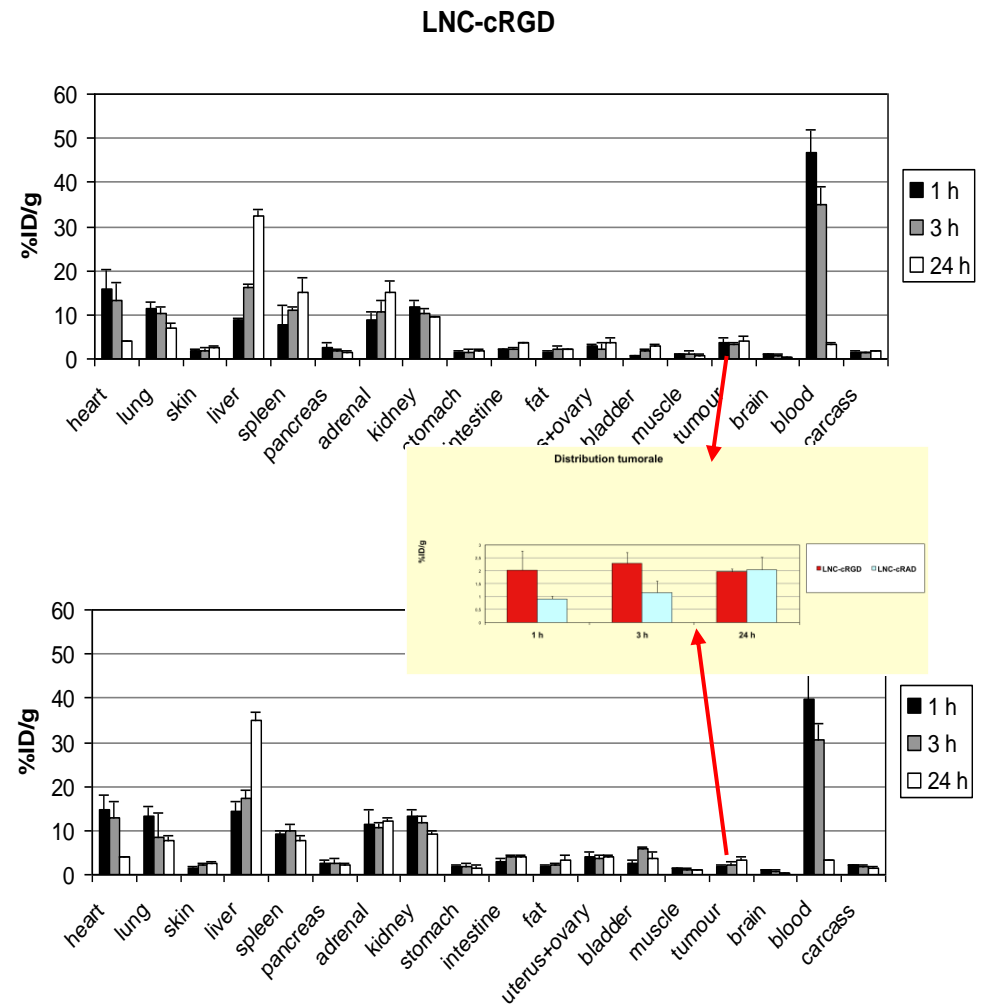
Etudes *in vitro*

- Reconnaissance (4° C) et internalisation (37° C) de LNE par les cellules HEK293(β_3)
 - La reconnaissance des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ par le peptide cRGD induit l'internalisation
 - Pas d'effet avec le contrôle négatif cRAD
- Résultats semblables avec les LNC



Ciblage actif : LNC portant cRGD/cRAD - Etudes *in vivo*

- LNC 50 nm, IV, modèle U87MG
- Le profil de biodistribution n'est pas influencé par le greffage
- Meilleure accumulation tumorale des LNC-cRGD/temps précoces (1-3h)



Conclusions CALIF

- Nouveaux outils, nouvelles caractérisations obtenues
 - Lipochitosane, résistance mécanique de la membrane des nanovecteurs (tensiométrie à goutte...)
- Avancées dans l'apport de l'imagerie optique par fluorescence
 - Outil de screening mais difficilement quantifiable
 - Etude de l'intégrité des vecteurs par FRET *in vitro* et *in vivo*
- Ciblage actif de certaines tumeurs (vascularisées) démontré en utilisant les peptides RGD

Production scientifique

- 9 publications
 - Hirsjärvi *et al.* Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the *in vitro* reactivity and *in vivo* biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. Nanomedicine: NBM *in press*.
 - Hirsjärvi *et al.* Evaluation of surface deformability of lipid nanocapsules by drop tensiometer technique, and its experimental assessment by dialysis and tangential flow filtration. Int. J. Pharm. (2012) 434, 460.
 - Dufort *et al.* Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. Adv. Drug Deliv. Rev. (2012) 64, 179.
 - Gravier *et al.* Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for *in vivo* fluorescence imaging. J. Biomed. Optics (2011) 16, 096013.
 - Dufort *et al.* Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors *in vivo*. J. Drug Targeting (2011) 19, 582
 - Hirsjärvi *et al.* Passive and active tumour targeting with nanocarriers. Curr. Drug Discov. Technol. (2011) 8, 188.
 - Dufort *et al.* Optical small animal imaging in the drug discovery process. Biochim. Biophys. Acta (2010) 1798, 2266.
 - Hirsjärvi *et al.* Layer-by-layer surface modification of lipid nanocapsules. Eur. J. Pharm. Biopharm. (2010) 76, 200.
 - Goutayer *et al.* Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by *in vivo* fluorescence imaging. Eur. J. Pharm. Biopharm. (2010) 75, 137.
- 7 manuscrits soumis / en préparation
- 7 articles/résumés de conférences

European Doctorate in nanomedicine and pharmaceutical innovation

Coordinator: Pr. Frank Boury

Erasmus Mundus
Joint Doctorate :
Action 1B

Consortium partners



Associate partners

- Advancell
- Affilogic
- Atlanpôle Biotherapies
- Biowin
- Carlina Technologies
- In-Cell-Art
- IPSEN
- Kitozyme
- PHAST
- Regentech

- CSIR (South Africa)
- University of La Plata (Argentina)

- Hospitals of Angers, Nantes, Liège,
Santiago de Compostela

Création d'une start up en 2010

Lauréat du Concours National OSEO



CarlinaTechnologies

Micro & nano encapsulation platforms

Olivier MEYER

CARLINA Technologies SAS

Amsler Biotech II

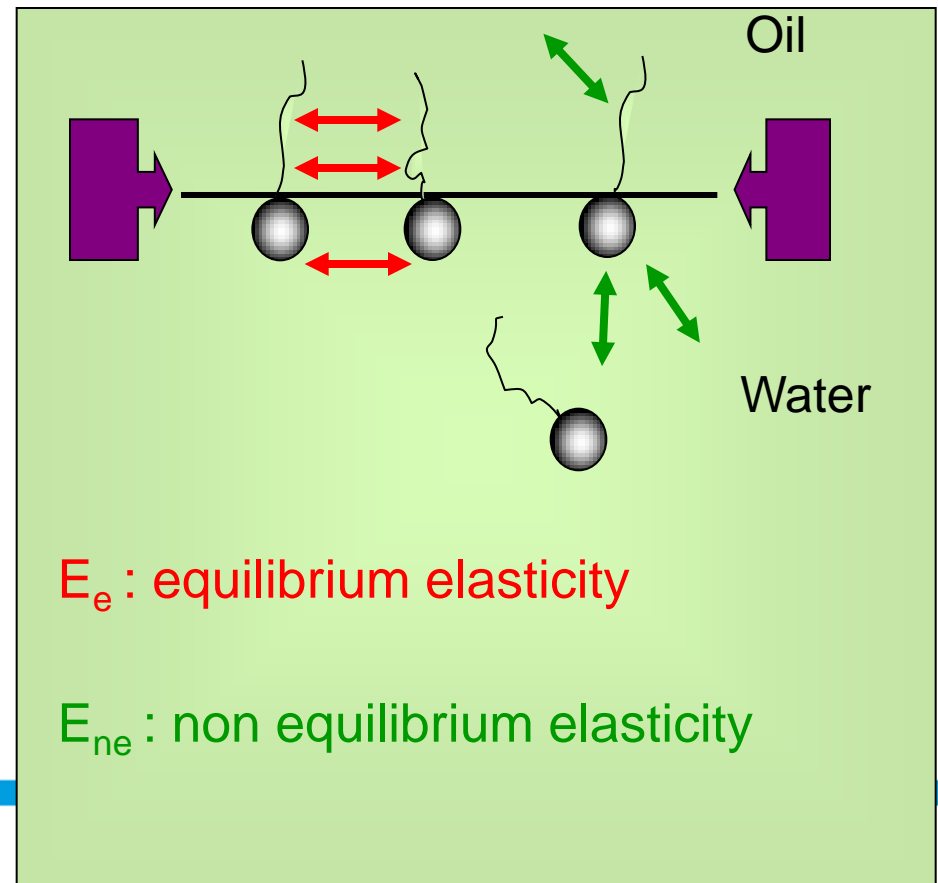
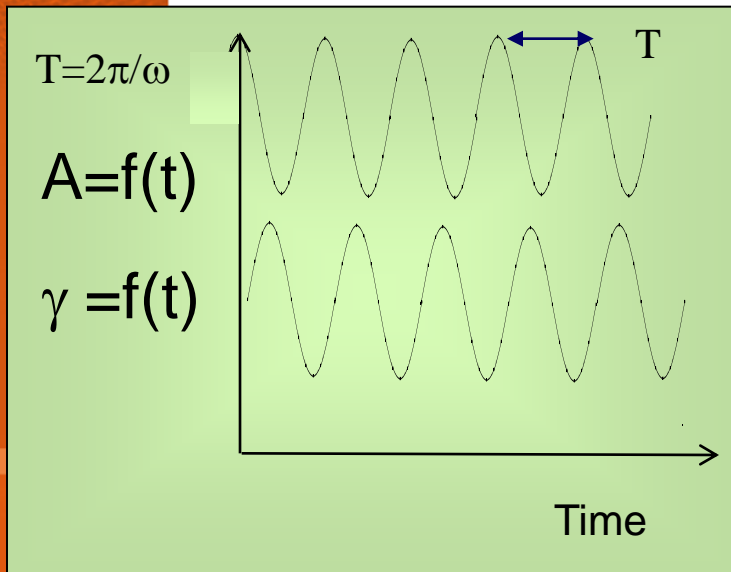
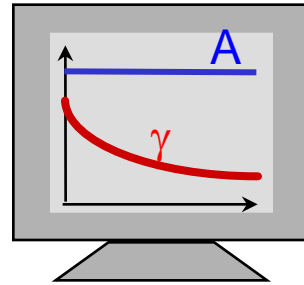
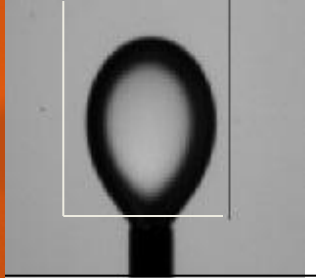
22 rue Roger Amsler

49100 Angers

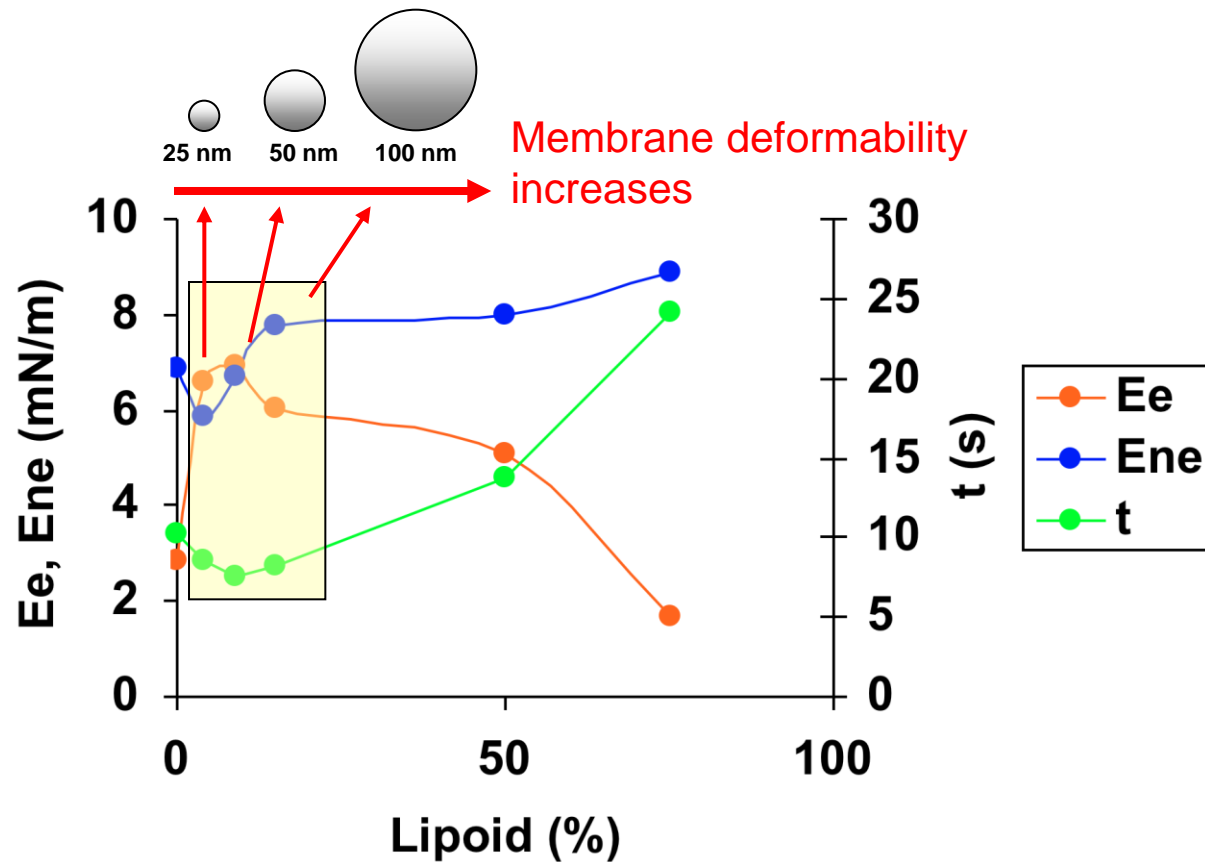
Tél: 06 66 76 53 41

omeyer@carlinatech.com

WP1. Synthesis and physico-chemical characterization of the nano-cargos



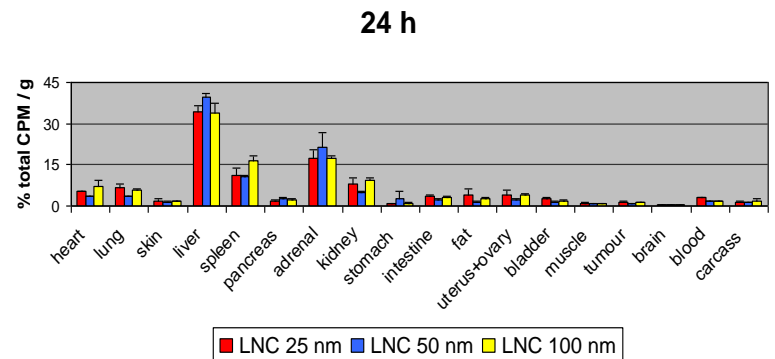
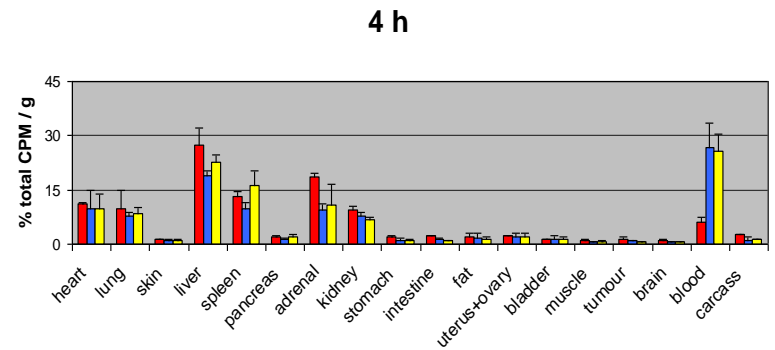
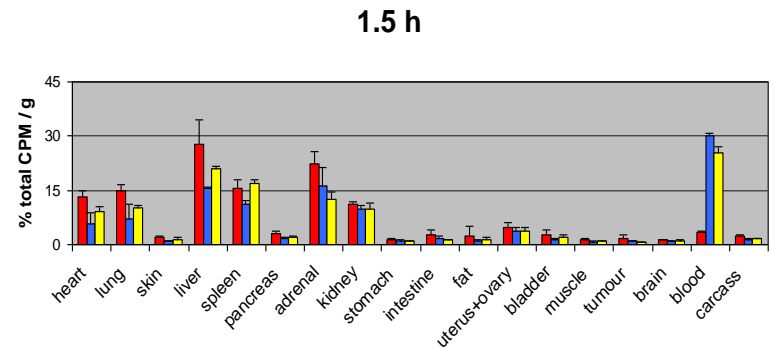
WP1. Synthesis and physico-chemical characterization of the nano-cargos



Hirsjärvi et al. *to be submitted*

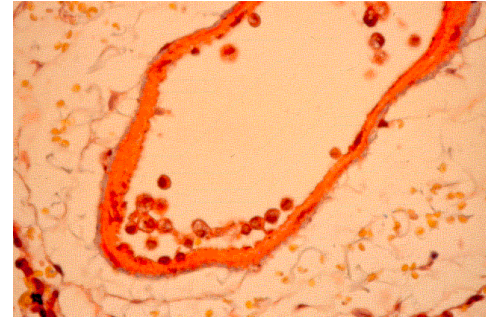
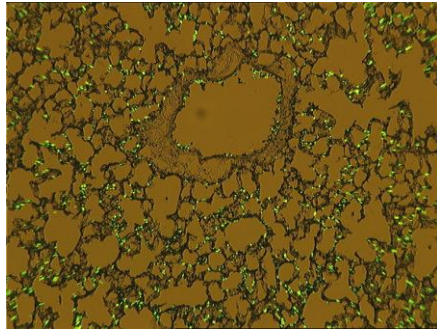
Biodistribution par γ -scintigraphie dans un modèle murin de tumeur

- Biodistribution de ^{99m}Tc -LNC 25-100 nm
- Modèle HEK293(β 3), IV
 - les LNC de 50 & 100 nm se retrouvent dans la circulation aux temps précoces; les LNC de 25 nm diffusent en périphérie
 - Profils semblables à 24h



Distribution *In vivo* – comparaison des LNC et LNE

- Accumulation des LNE dans les PIMs (Macrophages Pulmonaires Intravasculaires) induits par la tumeur



Coll. A Le Pape
CIPA, Orléans

