



L'imagerie in vivo, ressource stratégique pour la recherche biomédicale et l'innovation thérapeutique

Alain LE PAPE, DR-CNRS

Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA) TAAM, UPS 44 CNRS, Orléans
INSERM U618, Imagerie de ciblage et vectorisation pulmonaires, Tours

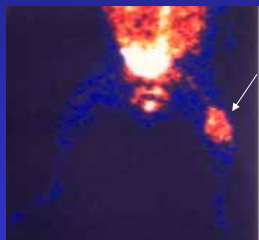


Apport de l'imagerie dans les études de biodistribution d'un futur médicament

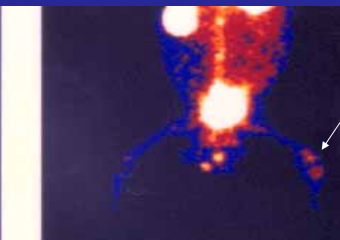
PHASES :	Exploratoires	Développement	Etudes Précliniques
Informations Fournies :	Quels sont les organes cibles? Activité/Tox. Pharmacocinét.	La bonne dose est-elle bien arrivée au bon endroit?	La dose théorique est-elle bien délivrée dans les organes cibles
Objectifs :	Sélection des molécules candidates	Optimisation : *Galénique *Ciblage	Validation des études toxicologiques
<p>← Concept de recherche translationnelle →</p> <p>Rapidité +++ d'obtention des résultats</p>			
Avantages :	Ethique : diminution du nombre d'animaux – Examen atraumatique Démarche transposable chez l'homme		

Application de l'imagerie scintigraphique à l'exploration d'un modèle de pathologie articulaire inflammatoire et au ciblage d'un agent anti inflammatoire chez le rat ou le lapin

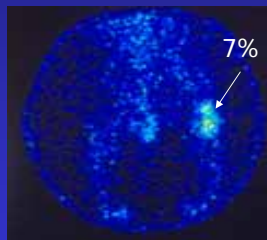
- Screening in vivo de molécules peptidiques candidates, marquées à l'Indium



Recrutement des macrophages activés



Métabolisme osseux



Concentration du peptide dans la cible (% de D.I.)



➤ Séquençage du génome de la souris : décembre 2002

➤ Séquençage du génome humain : avril 2003



90% du génome en commun

Recherche et étude de gènes homologues

Relation Génotype - Phénotype

Souris normale
(phénotype « sauvage »)



Transgénèse,
mutagénèse



Programmes
post-génome :
étude de la
fonction des
gènes

Souris mutantes ou transgéniques de phénotypes différents

Evolution des imageurs médicaux vers l'imagerie de la souris

1 humain = 70 kg

1 rat = 200g

1 souris = 20g

Ruptures technologiques

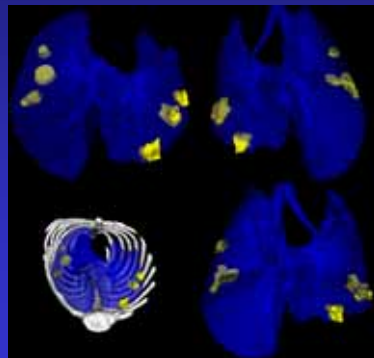
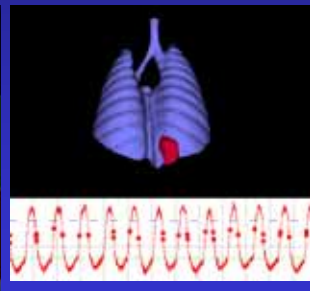
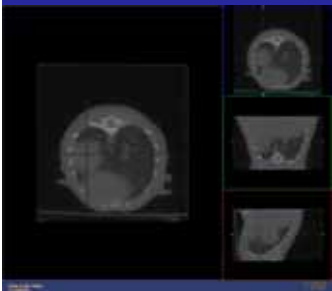
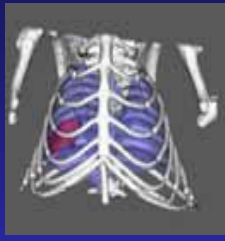
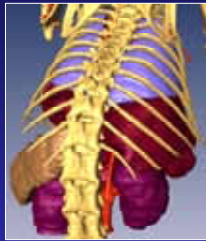
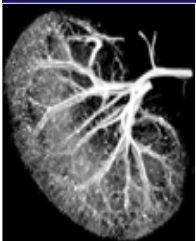
Miniaturisation des systèmes



Performances sensibilité / résolution
compatible avec la taille de la souris
pour assurer la pertinence des
études

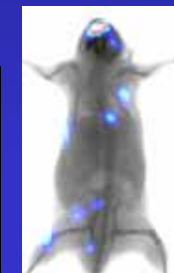
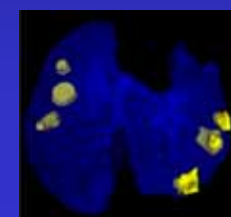
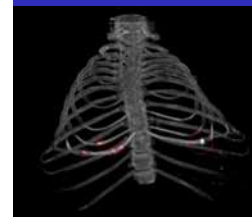


Tomodensitométrie X ou scanner



Imagerie X et dosimétrie

- Comme chez l'homme, la tomodensitométrie X est l'examen le plus irradiant pour le sujet, surtout si on augmente le nb de coupes et/ou la résolution : pas de danger pour les souris, DL 50=7000 mGy, mais attention aux multi-modalitéspour garantir la pertinence des études en cancérologie .
- Une évaluation de la dose reçue par la tumeur est indispensable, surtout en cas de répétition des examens: 70-80 mGy par examen

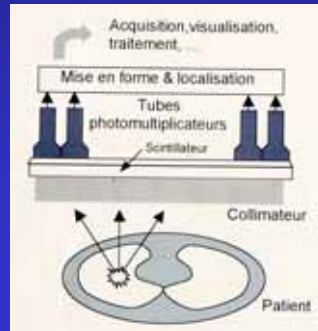


Imagerie scintigraphique

• Isotopes à vie courte pour le marquage des molécules

- Technétium 99m (T1/2 = 6h) → marquage par chélation (SH, NH₂, ligands bi-fonct.)
- Indium 111 (T1/2 = 2,8 j) →
- Iode 123 (T1/2 = 12 h) → marquage covalent

- Radioisotopes : commercialement disponibles
- Radiomarquage et contrôle qualité (radioHPLC) extemporanés
- Durée d'un examen : 1 à 15 min, immobilisation stricte : anesthésie



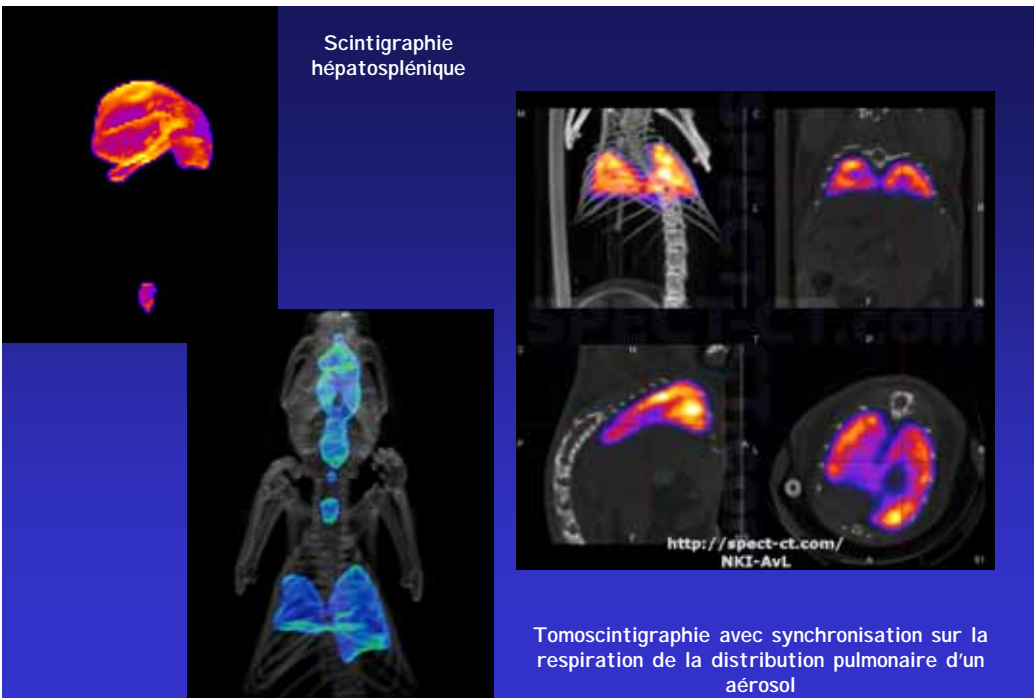
Tomoscintigraphie: multi pinholes SPECT

Plusieurs images obtenues simultanément (multipinholes)
Déconvolution et sommation
Reconstruction

Sensibilité et résolution +++
4 têtes de 9 multipinholes
Temps d'acquisition réduit

[tp://spect-ct.com/](http://spect-ct.com/)

Scintigraphie hépatosplénique



Imagerie du petit animal

Anatomie | Physiologie | Métabolisme | Moléculaire

• Ultrasons	→	→	→	→
• IRM	→	→	→	→
• RX (radio, µscanner)	→	→	→	→
• Ry (scinti., µTEP)	→	→	→	→
• Optique	→	→	→	→
• Autoradiogra.	→	→	→	→
• Histologie	→	→	→	→

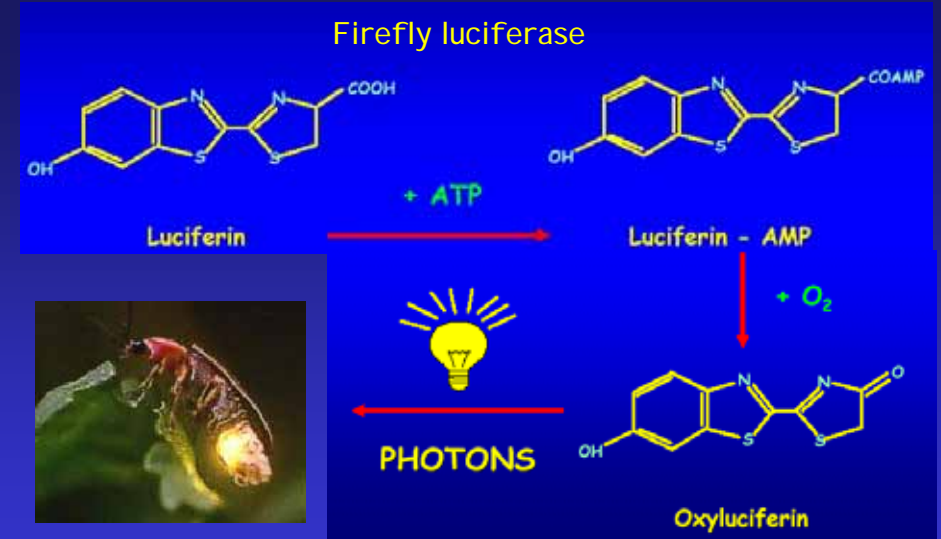
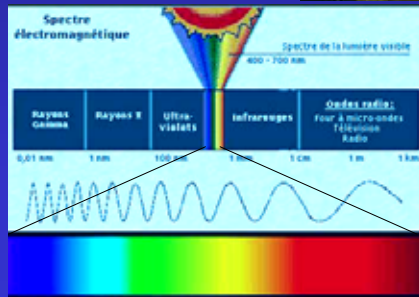
INVASIF (for Autoradiogra. and Histologie)

La Bioluminescence: une révolution en imagerie du petit animal

Emission de lumière par les organismes vivants via les luciférases

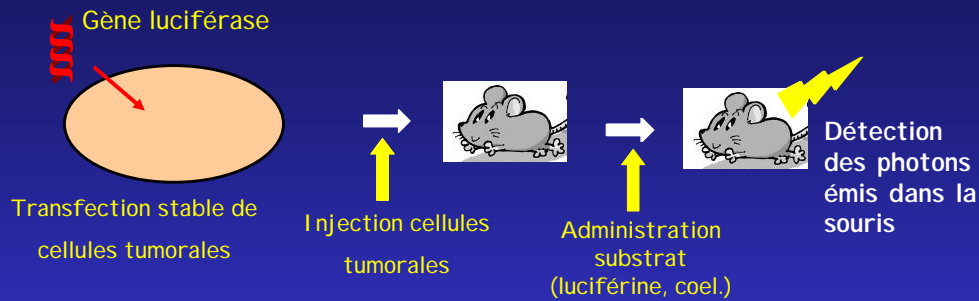
-luciole (firefly luciferase, pic émission max ~ 560 nm)

-anémone de mer (renilla luciferase, pic émission max ~ 480 nm)

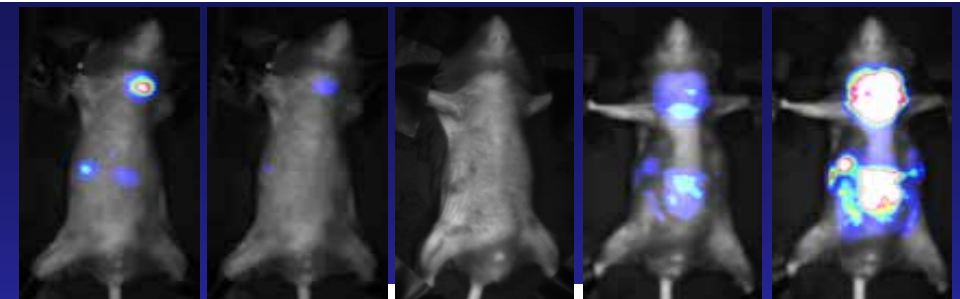


Bioluminescence par le système luciférase-luciférine

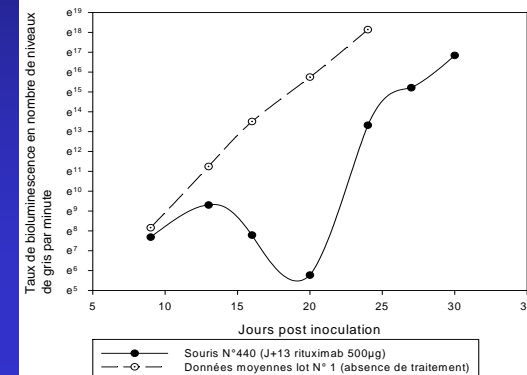
Application en cancérologie

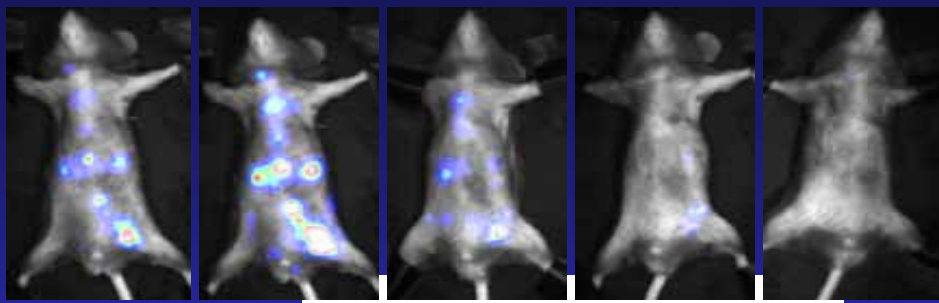


Application en infectiologie

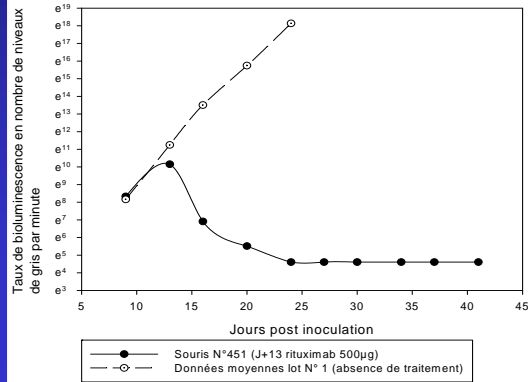


D. Daydé et al., Blood, 2009

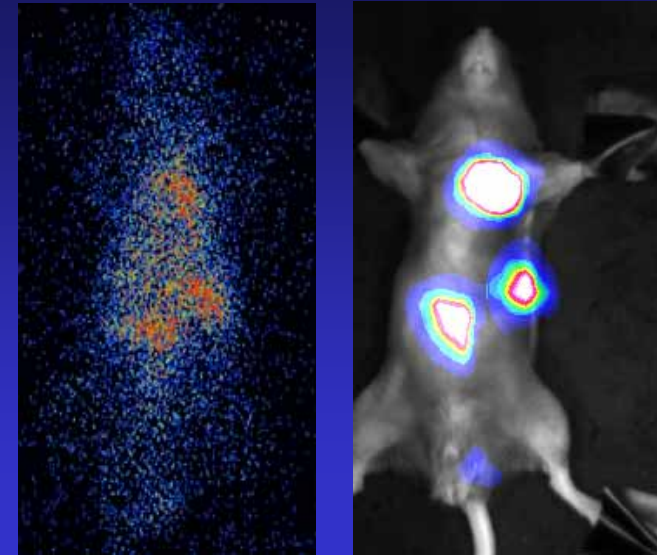




Col. Pr H. Watier
UMR 6239 CNRS, Tours



scintigraphie anti CD20 Mab 111n versus bioluminescence

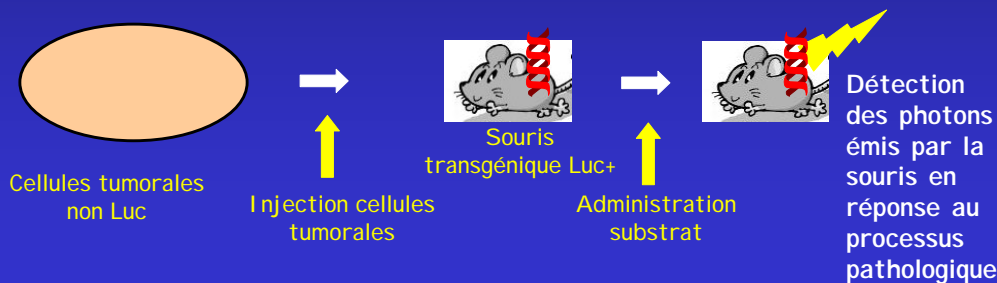


biodistribution de l'agent antitumoral

activité proliférative

Animaux transgéniques bioluminescents

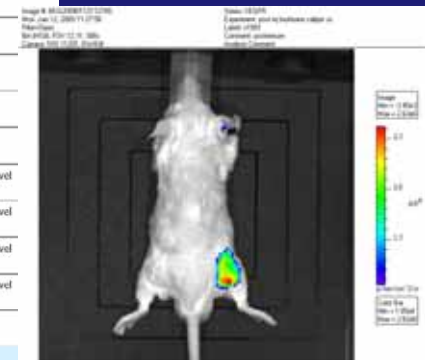
Principe : obtenir une expression luciférase sous contrôle promoteur judicieusement choisi



Souris transgéniques bioluminescentes développées par Caliper Inc.

Inflammation

Animal Model	Background Strain	Applications
Gadd45b (growth arrest & DNA damage inducible 45-Beta)	CD-1	Cancer-apoptosis; MAP kinase- and NF-κB-mediated signaling pathways; inflammation
iNos or Nos2 (macrophage nitric oxide synthase)	FVB/N	Inflammation; sepsis
Epx* or Epo (eosinophil peroxidase)	FVB/N	Eosinophila-parasitism or asthma; bone marrow transplantation
Saa1 (serum amyloid A-1)	BALB/C	Arthritis, amyloidosis, sepsis
IL-2 (interleukin-2)	CD1	Inflammation, cancer
Cox2 or Ptg2 (cyclooxygenase-2)	BALB/C	Inflammation, pain
TNFα (tumor necrosis factor-alpha)	BALB/C	Inflammation-arthritis or inflammatory bowel disease; cancer-apoptosis; sepsis
NFκB-RE (NFκB response elements)	BALB/C	Inflammation-arthritis or inflammatory bowel disease; cancer-apoptosis
NFκB-RE (Oslo) (NFκB response elements)	BALB/C & DBA/1	Inflammation-arthritis or inflammatory bowel disease; cancer-apoptosis
IκBα (inhibitor of NFκB)α	BALB/C	Inflammation-arthritis or inflammatory bowel disease; cancer-apoptosis; sepsis

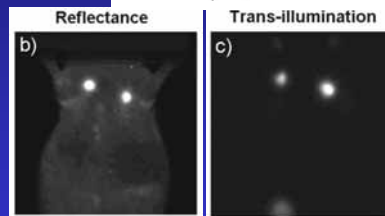
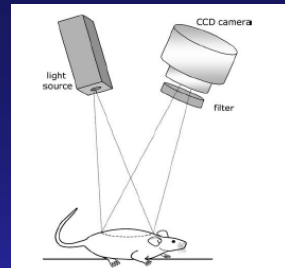
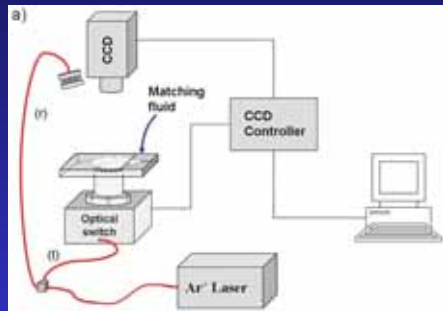


Expression sous-cutanée du VEGFR chez la souris FVB

Oncology/Angiogenesis

Animal Model	Background Strain	Applications
Kdr or Vegfr2* (vascular endothelial growth factor receptor-2)	FVB/N	Inflammation; angiogenesis processes incl. embryonic or post-natal development, wound healing, cancer
Kdr or Vegfr2* (in NUDE [Nu/Nu] background)	FVB/N	Tumor-induced angiogenesis
Vegf* (vascular endothelial growth factor)	FVB/N	General angiogenesis reporter
PSA (prostate specific antigen)	FVB/N	Tracking prostate tumor cells growth/metastasis

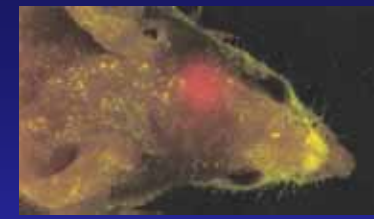
Imagerie en fluorescence par réflectance ou trans-illumination



- ➡ profondeur indéterminée
- ➡ non quantitative absolue
- ➡ résolution ~ 2mm

Applications les plus communes :

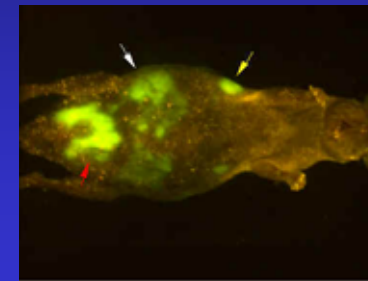
- Protéines : GFP et RFP
- Fluorochromes : PKH, FITC et dérivés



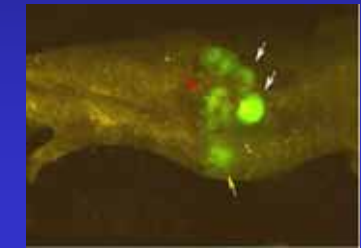
Cerveau



Poumons



Colon



Pancréas

Intérêt de la fluorescence dans le proche infra-rouge

-absorption moins importante par l'hémoglobine et l'eau qu'en fluorescence classique

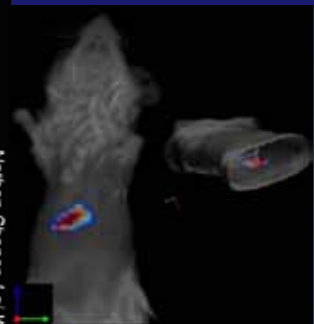
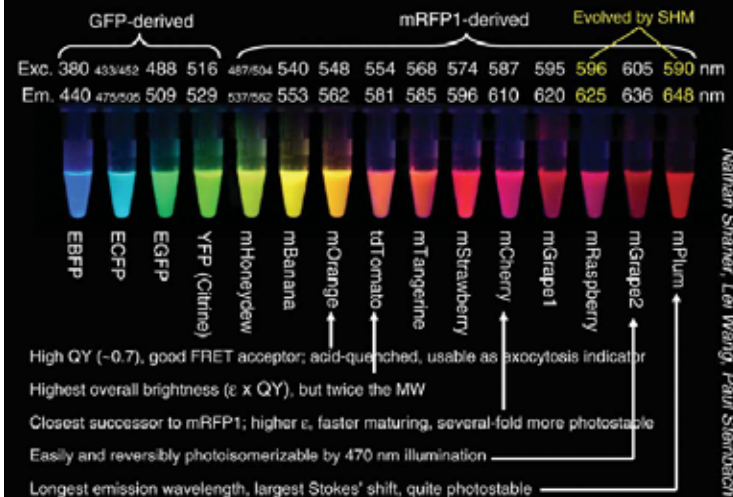


Possibilité pour les photons de traverser plusieurs centimètres d'épaisseur au lieu de quelques mm

-autofluorescence des organes très limitée

Evolution des protéines fluorescentes du visible vers l'IR

The 2004 palette of nonoligomerizing fluorescent proteins



X. Shu, Sciences ; 804-807 (2009)

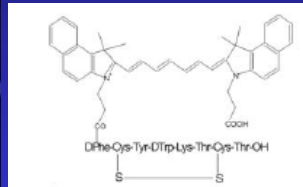
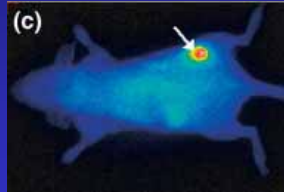
Protéine fluo à 680nm développée à partir d'un phytochrome bactérien

RY Tsien, FEBS Letters 579 ; 927-932 (2005)

Applications de la fluorescence infra rouge

- vectorisation et ciblage: marquage du vecteur/principe actif
- Apoptose : annexine V-Cy5.5 et caspase-1 par substrat quenché
- Reconnaissance antigène-anticorps, ligand-récepteur

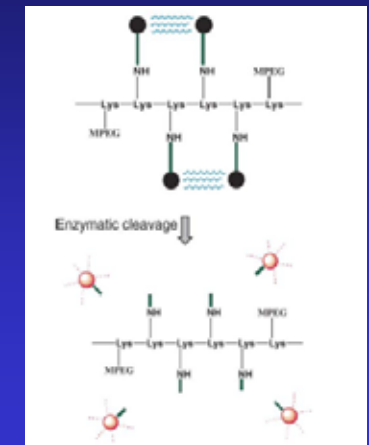
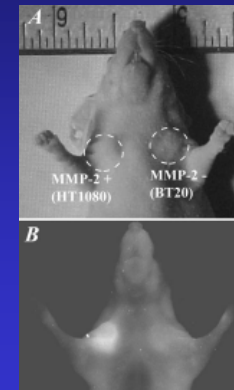
Imagerie d'une tumeur exprimant le récepteur à la somatostatine



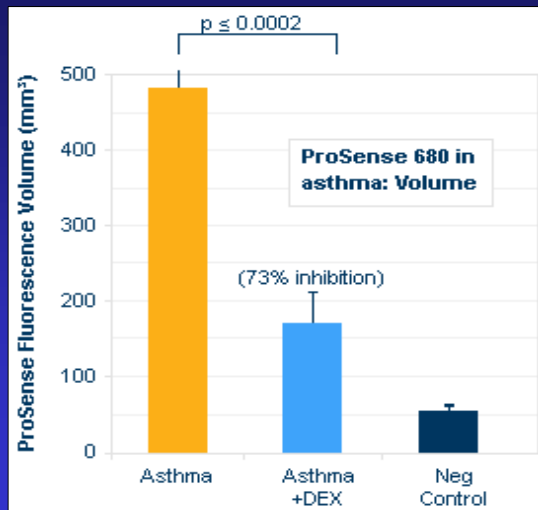
Octapeptide conjugué au tricyanocyanine

- Imagerie des activités enzymatiques +++

Sondes de fluorescence IR activables par les protéases pour l'imagerie des cathepsines B, L, S, K, et des MMP 2, 3, 7, 9, 13

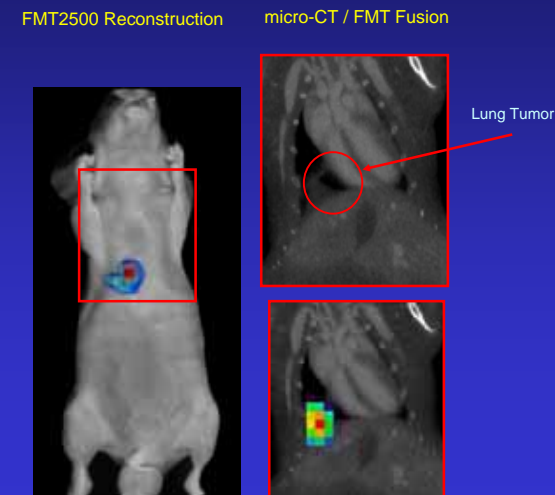


La Tomographie de fluorescence permet la quantification y compris pour les foyers profonds



Mouse asthma model
Fluorescence agent: ProSense (cathepsin B activity)

bi-modalité en imagerie moléculaire par bioluminescence, Tomo Fluo IR et TDM X d'un carcinome bronchique chez la souris



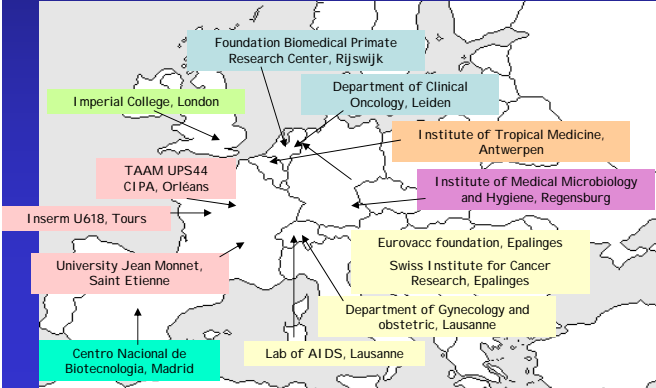
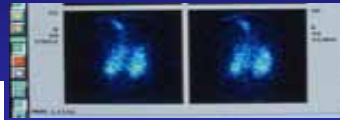
L'imagerie en recherche translationnelle



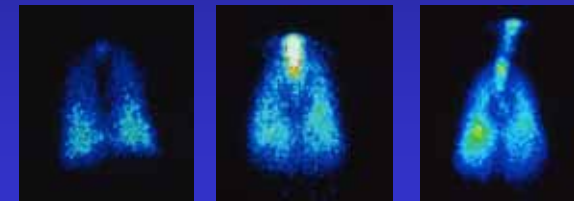
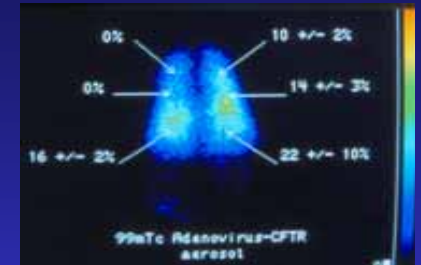
Aerosol immunization with NYVAC and MVA vectored vaccines is safe, simple, and immunogenic

Max Corbett¹, Willy M. Bogers², Jonathan L. Heeney³, Stefan Gerber⁴, Christian Gerin⁵, Amaud Didierlaurent⁶, Herman Oostermeijer⁷, Rob Dubbers⁸, Geroo Braakkamp⁹, Stéphanie Leventhal¹⁰, Carmen E. Gomez¹¹, Mariano Esteban¹², Ralf Wagner¹³, Ivanela Kondova¹⁴, Petra Mooij¹⁵, Sunita Balla-Jhaghoorsingh¹⁶, Niels Beenhakker¹⁷, Gerrit Koopman¹⁸, Sjoerd van der Burg¹⁹, Jean-Pierre Kraehenbuhl²⁰, and Alain Le Pape²¹

2046–2051 | PNAS | February 12, 2008 | vol. 105 | no. 6



Administration par aérosol dans le poumon central sous contrôle scintigraphique



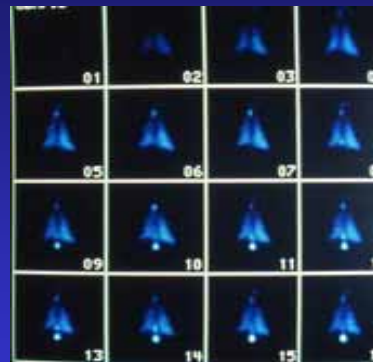
Radioisotopic imaging allows optimization of adenovirus lung deposition for cystic fibrosis. S. Lerondel *et al.*, *Hum Gen Ther* 2001 ; 12 : 1-11.

Modalité d'administration par aérosol d'agents thérapeutiques nécessitant un confinement

Ex. : chimiothérapie, vaccin viral anti-Papillomavirus, nano aérosols



Système de confinement dédié avec filtration absolue pour éviter tout rejet dans l'environnement



Monitoring scintigraphique

1 image / minute pour détermination en temps réel de la dose délivrée, optimiser sécurité et efficacité

Nouvelle stratégie thérapeutique du cancer bronchique par administration de chimiothérapies en aérosol

First clinical trial, 2008
 11 patients, 9 weekly administrations
 Escalating dose from 0.5mg/kg
 Maximum Tolerated Dose
 1.5mg/kg
 C_{max}= 10 to 37 micromol/l
 AUC= 0.033 to 0.137 mg/L/h

Phase 2 study at 1.5mg/kg, 2009

Pr E. Lemarié INSERM U618, Tours,



Gagnadoux et al *Eur. Resp. J.* 2005
Gagnadoux et al *J. Aerosol Med.* 2008