UMH
UNIVERSITE DE MONS-HAINAUT

Téléviie

NMR
UNIVERSITY OF MONS-HAINAUT

Développement d'un agent de contraste superparamagnétique spécifique du récepteur au folate sur-exprimé dans certains types tumoraux

David Rouzé, *Sophie Laurent, Luce Vander Elst et Robert N. Muller*
Laboratoire de RMN, Département de Chimie Organique
20 place du Parc, 7000 Mons - Université de Mons-Hainaut
david.rouze@umh.ac.be

Principe

Les récepteurs au folate sont sur-exprimés dans un grand nombre de tumeurs humaines (ovaires, reins, utérus, testicules, cerveau, colon et poumons). Ces récepteurs peuvent fixer avec une forte affinité ($K_D \sim 10^{-10}$ M) les molécules de folate, puis les internaliser. Nous espérons faire de même avec nos « Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide » (USPIO) (diamètre : 22 nm) sur lesquelles des molécules de folate ont été greffées (USPIO-g-folate). Ces particules superparamagnétiques sont des nano-aimants, qui améliorent fortement le contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM), et qui ont des applications pour le diagnostic et le suivi des traitements des tumeurs. L'internalisation de ces particules devrait augmenter la sensibilité de l'IRM pour la détection précoce des tumeurs.

Avantages

Ces particules se comportent également comme des nano-antennes captant l'énergie de l'onde radiofréquence et la dissipant sous forme de chaleur (figure 1). Si nous pouvons internaliser spécifiquement nos nanoparticules ciblées contre le récepteur au folate dans les cellules tumorales, nous disposerons à la fois d'un agent thérapeutique et diagnostique.

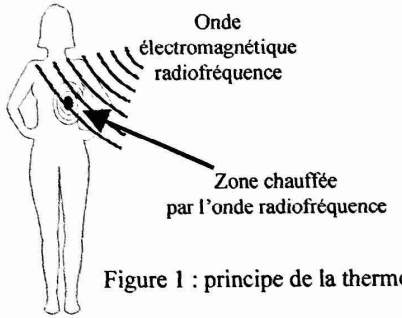


Figure 1 : principe de la thermothérapie

Méthodes

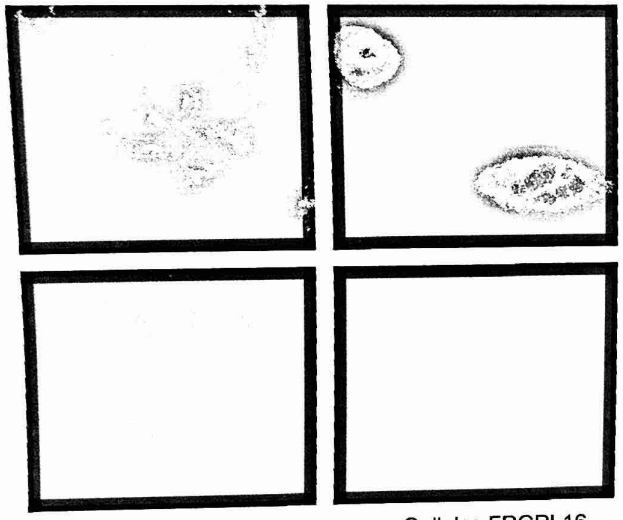
Des nanoparticules spécifiques (USPIO-g-folate) ont été synthétisées au laboratoire.
Différentes lignées cellulaires (HeLa, FRGPI-16 et CHO-K1) ont été incubées en présence des USPIO-g-folate. Les cellules FRGPI-16 sont des cellules CHO-K1 transfectées afin d'exprimer le récepteur au folate fonctionnel en surface. L'internalisation spécifique est vérifiée par les techniques de microscopie confocale à l 'aide d'USPIO-g-folate-FITC (USPIO avec une sonde fluorescéine), par des rayonnements X générés par synchrotron (ESRF-Grenoble) et par IRM.
Les dosages des particules internalisées sont effectués par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy).
Pour les différentes analyses, des boîtes de culture à six puits sont ensemencées avec 2.0 10^5 cellules dans un milieu dépourvu d'acide folique (RPMI 1640). Après 24 heures, les particules sont ajoutées pour une incubation de 3 heures. Après plusieurs rinçages avec du PBS, les cellules sont préparées pour les différentes analyses.

Résultats

Les résultats obtenus en microscopie confocale nous montrent une internalisation spécifique de nos particules ciblées contre le récepteur au folate après des incubations de 3 heures.

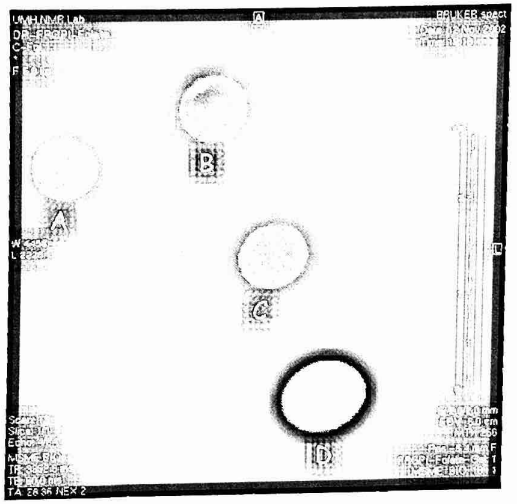
Cette internalisation est confirmée par les données ICP-AES qui mettent en évidence, d'une part, l'efficacité de l'internalisation de nos particules spécifiques par rapport aux particules non spécifiques, et d'autre part, la faible internalisation de nos particules dans les cellules CHO-K1 non tumorales.

Les analyses de ces cellules par rayonnement X ont corroboré ces résultats (tableau 1).

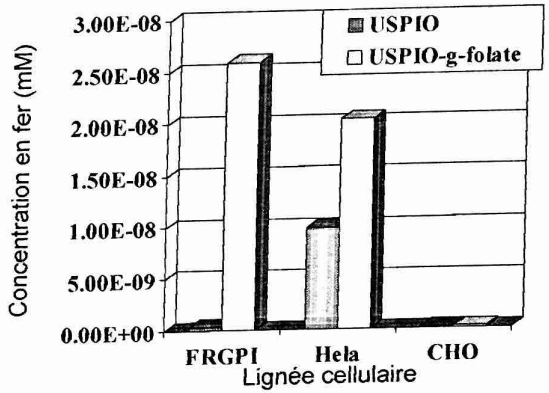


Cellules HeLa Cellules FRGPI-16

Images en microscopie confocale des cellules HeLa et FRGPI-16 incubées 3 heures avec l'USPIO-g-folate-FITC (A-B : cellules dans le milieu RPMI-1640 et C-D : cellules dans le même milieu contenant 1 mM d'acide folique libre



IRM séquence spin-écho, TR 3000 ms, TE 15 ms
A : cellules FRGPI-16 incubées avec USPIO
B : FRGPI-16+ USPIO-g-folate
C : FRGPI-16+ USPIO-g-folate + 1 mM acide folique
D : PBS



Dosages ICP-AES du fer sur les lignées cellulaires incubées avec les particules spécifiques et non-spécifiques

Lignée cellulaire	USPIO-g-Folate	Contrôle
FRGPI-16	2000	160
CHO-K1	300	200
HeLa	1300	nc

Tableau 1 : Dosage du fer internalisé par les cellules incubées avec USPIO-g-folate par rayonnement X émis par le synchrotron (valeurs en coups/seconde)

Conclusions et perspectives

Nous pouvons donc conclure que nous disposons actuellement d'un agent diagnostique s'accumulant d 'une façon spécifique et suffisante dans les cellules tumorales pour générer un signal IRM visible in vitro.

Le comportement de cet agent dans un modèle in vivo constitue l 'étape suivante de cette étude. Pour ces tests, un nouvel agent original, des particules recouvertes de poly(éthylèneglycol) (PEG) à l'extrémité duquel le folate est fixé, a été synthétisé dans notre laboratoire. Nous espérons disposer ainsi d'un agent à plus long temps de circulation et dont l'arrangement stérique permette une meilleure exposition du folate vers son récepteur.

La dernière phase consistera à produire des particules d'une taille adaptée à l'application de la thermothérapie. En effet, cette technique montre son efficacité optimale avec des particules d'un diamètre de 14 nm (22 nm actuellement pour nos USPIO).