



HAL
open science

Le RAFT-RGD radiomarqué avec un émetteur $^{\circ}$ - comme nouvel agent de radiothérapie interne vectorisée

Aurélie Petitprin

► To cite this version:

Aurélie Petitprin. Le RAFT-RGD radiomarqué avec un émetteur $^{\circ}$ - comme nouvel agent de radiothérapie interne vectorisée. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS002 . tel-00820235

HAL Id: tel-00820235

<https://theses.hal.science/tel-00820235>

Submitted on 3 May 2013

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Aurélie PETITPRIN

Thèse dirigée par **Jean-Philippe VUILLEZ** et
codirigée par **Catherine GHEZZI**

préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques
Biocliniques, INSERM U1039,**
dans l'**École Doctorale d'Ingénierie pour la Santé, la Cognition
et l'Environnement.**

LE RAFT-RGD RADIOMARQUE AVEC UN EMETTEUR β^- COMME NOUVEL AGENT DE RADIOTHERAPIE INTERNE VECTORISEE.

Thèse soutenue publiquement le « **19 février 2013** »,
devant le jury composé de :

M. Didier BOTURYN

Directeur de recherche UMR CNRS 5250, Grenoble

Invité

M. Frédéric COURBON

Professeur de médecine de l'Université de Toulouse III

Rapporteur

Mme Catherine GHEZZI

Directrice de recherche UMR INSERM 1039, Grenoble

Co-directrice

Mme Françoise KRAEBER-BODERE

Professeur de médecine de l'Université de Nantes

Rapporteur

Mme Mireille MOUSSEAU

Professeur de médecine de l'Université de Grenoble

Examineur

M. André PELEGRIN

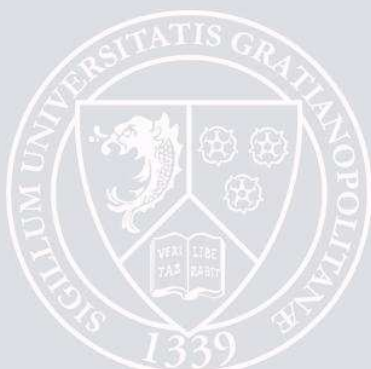
Directeur de recherche UMR INSERM 896, Montpellier

Examineur

M. Jean-Philippe VUILLEZ

Professeur de médecine de l'Université de Grenoble

Directeur



Remerciements

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma gratitude :

Aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et dont les remarques vont permettre d'améliorer les perspectives de ce travail.

A Catherine Ghezzi, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour son soutien et son amitié.

A Jean-Philippe Vuillez qui est le porteur de ce projet, pour m'avoir encadrée, conseillée, transmis une partie de ses connaissances et pour la relecture attentive de mon mémoire.

A Anne-Sophie Gauchez pour m'avoir conseillée, soutenue et pour avoir pris le temps de relire mon manuscrit.

A Danièle Marti Batlle pour m'avoir si bien accompagnée dans la réalisation de mes travaux, pour son soutien, sa gentillesse et son amitié.

A l'ensemble des personnes qui ont participé à la réalisation de ces travaux : Sandrine Martin et Mitra Ahmadi dont les compétences et l'efficacité ont donné de bonnes bases à ce travail, Jean-Cyril Bourre et Lucienne Duru qui ont également contribué de près à l'aboutissement de ma thèse.

A l'ensemble des personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail dans le département de Chimie Moléculaire, UMR 5250 CNRS et à l'institut de Biologie et Pathologie du CHU de Grenoble.

A tous les membres du Laboratoire des Radiopharmaceutiques Biocliniques actuels et tous les anciens, pour leur accueil, leur aide précieuse et leur amitié.

A Ludovic, Aymeric et sa future petite sœur, mes parents, ma famille et l'ensemble de mes proches pour leur soutien et leur amour.

Partie 1 : Revue bibliographique	6
A. Introduction	6
B. Radiothérapie interne vectorisée	11
1. Contexte	11
1.1. La médecine nucléaire	11
1.2. Radiobiologie	13
1.2.1. Les étapes d'une irradiation.....	13
1.2.2. Le transfert d'énergie linéique (TEL).....	14
1.2.3. Lésions moléculaires cellulaires.....	16
1.2.4. Dommages cellulaires	21
1.2.5. Lésions tissulaires. Effets pathologiques.....	28
1.2.6. La radiobiologie appliquée à la radiothérapie	32
1.2.7. Grandeurs et unités	35
2. Définition de la radiothérapie interne vectorisée (RIV).....	38
2.1. Cibles.....	38
2.2. Paramètres à prendre en compte.....	39
3. Différents vecteurs	39
3.1. Radionucléides et analogues métaboliques	40
3.2. Anticorps	41
3.3. Peptides	42
4. Différents radioéléments	45
C. Intérêt de l'intégrine $\alpha\beta3$ comme cible.....	47
1. Les intégrines	47
1.1. Structure et fonctions.....	47
1.1.1. Une famille de récepteurs	47
1.1.2. Fonctions des intégrines	49
1.2. Intégrines et cancer.....	52
2. L'intégrine $\alpha\beta3$	54
2.1. Généralités.....	54
2.2. Molécules associées à l'intégrine $\alpha\beta3$	55
2.3. Localisation	57
2.4. Fonctions biologiques.....	58
2.4.1. Angiogenèse	58
2.4.2. Survie et prolifération cellulaires	62
2.4.3. Migration cellulaire et invasion tumorale : formation de métastases	63

3. Les thérapies ciblées anti-$\alpha\upsilon\beta 3$	64
3.1. Anticorps	64
3.2. Peptidomimétiques	65
3.3. Autres types de molécules	65
3.4. Peptides RGD	66
3.5. Association de thérapies	69
3.6. Molécules ciblant $\alpha\upsilon\beta 3$ utilisées comme vecteurs	71
D. Intérêt du RAFT-RGD comme vecteur	77
1. Etudes in vitro	79
2. Etudes in vivo	81
2.1. Imagerie.....	81
2.2. Thérapie.....	85
E. Conclusion de la partie bibliographique	87
Partie 2 : Matériel et Méthode	89
A. Produits radiomarqués	89
1. RAFT(c[-RGDfK-])₄ ou RAFT-RGD et RAFT(c[-RADfK-])₄ ou RAFT-RAD .	89
2. Radiomarquages	91
2.1. Radiomarquage à l'yttrium-90	91
2.2. Radiomarquage au lutétium-177	92
B. Etudes cellulaires	92
1. Lignées cellulaires	92
1.1. U-87 MG, glioblastome humain, $\alpha\upsilon\beta 3+$	92
1.2. MCF-7, Adénocarcinome mammaire humain, $\alpha\upsilon\beta 3-$	94
1.3. TS/A-pc, carcinome mammaire murin, $\alpha\upsilon\beta 3$?	95
2. Méthodes de culture cellulaire	95
3. Western blot	97
4. Cytométrie en flux	99
5. Cinétique de captation cellulaire	100
C. Expérimentation animale	102
1. Les souris	102
2. Induction tumorale	103
3. Suivi de la croissance tumorale	104
3.1. Mesures	104

3.2.	Point limite	105
4.	Analyses sanguines	105
4.1.	Analyses hématologiques	105
4.2.	Dosage de la créatinine sérique	105
5.	Traitements des souris.....	106
5.1.	Gélofusine® 4%	106
5.2.	Tumeurs exprimant $\alpha v\beta 3$ au niveau cellulaire : U-87 MG	107
5.3.	Tumeurs n'exprimant pas $\alpha v\beta 3$ au niveau cellulaire	111
5.3.1.	TS/A-pc	111
5.3.2.	MCF-7	112
6.	Biodistribution	113
7.	Imagerie corps entier.....	114
8.	Autoradiographie.....	115
8.1.	Tumeurs U-87 MG	115
8.2.	Tumeurs TS/A-pc	116
9.	Immunohistochimie	116
D.	Analyses statistiques.....	117
 Partie 3 : Résultats.....		 118
A.	Caractérisation et validation des produits et modèles utilisés	118
1.	Qualité des radiomarquages du RAFT-RGD et du RAFT-RAD	118
1.1.	Radiomarquage à l'yttrium-90	118
1.2.	Radiomarquage au lutétium-177	119
2.	Modèles cellulaires.....	120
2.1.	Culture cellulaire	120
2.2.	Western blot	121
2.3.	Cytométrie en flux	123
2.4.	Résumé : Caractéristiques des modèles cellulaires utilisés	126
2.5.	Cinétique de captation	127
3.	Modèles animaux	129
3.1.	Induction tumorale.....	129
3.2.	Autoradiographies	131
3.3.	Analyses immunohistochimiques	133
3.4.	Effet dose du RAFT-RGD non radiomarké.....	135

3.5. Biodistribution.....	136
3.6. Imagerie corps entier au ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD.....	139
B. Effets des traitements au RAFT-RGD radiomarqué à l'⁹⁰Y ou au ¹⁷⁷Lu sur les différents modèles animaux	145
1. Tumeurs exprimant $\alpha v \beta 3$ au niveau cellulaire : U-87 MG.....	145
1.1. Traitements au ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	145
1.2. Traitement au ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD	160
1.3. Synthèse des résultats obtenus sur les tumeurs U-87 MG.....	164
2. Tumeurs n'exprimant pas $\alpha v \beta 3$ au niveau cellulaire : TS/A-pc.....	165
C. Toxicité des traitements	170
1. Analyses hématologiques	170
1.1. Séries U-87 MG.....	170
1.2. Séries TS/A-pc	174
2. Dosage de la créatinine sérique	176
D. Discussion générale	179
1. Choix des lignées cellulaires	180
2. Caractérisation des modèles cellulaires utilisés.....	180
3. Fixation du RAFT-RGD et du RAFT-RAD à l'intégrine $\alpha v \beta 3$	181
4. Modèles tumoraux in vivo	182
5. Effet dose du RAFT-RGD « froid » ou non radiomarqué.....	183
6. Biodistribution du ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	184
7. Imagerie au ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD	186
8. Efficacité du traitement au ⁹⁰ Y-RAFT-RGD.....	187
9. Efficacité du traitement au ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD	191
10. Comparaison des traitements au ⁹⁰ Y-RAFT-RGD et au ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD.....	192
11. Toxicité des traitements.....	194
12. Comparaison de l'efficacité et de la toxicité des traitements au RAFT-RGD radiomarqué avec de l'Y-90 ou du Lu-177 avec celles d'autres peptides RGD couplés à des radionucléides de thérapie	197
13. Comparaison de l'efficacité des traitements au RAFT-RGD radiomarqué avec de l'Y-90 ou du Lu-177 avec celles d'autres peptides utilisés en RIV.....	201
14. Comparaison de l'efficacité et de la toxicité des traitements au RAFT-RGD radiomarqué avec de l'Y-90 ou du Lu-177 avec celles d'un anticorps anti-intégrine $\alpha v \beta 3$ utilisé en RIT au niveau préclinique	202
E. Conclusions et perspectives	204

Sommaire

Références bibliographiques.....	206
Annexe.....	220

Partie 1 : Revue bibliographique

A. Introduction

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Depuis 2004, le cancer est la **première cause de mortalité en France** devant les maladies cardiovasculaires (Aouba, BEH 2011). Chaque année, il est responsable de près d'un tiers des décès dans notre pays, soit plus de 160 000 morts (Figure 1). En 2008, 12,7 millions de nouveaux cas de cancer étaient répertoriés et 7,6 millions de décès associés au cancer dans le monde sont survenus, soit environ 13% de la mortalité mondiale (Ferlay, GLOBOCAN 2008). D'après les projections, la mortalité due au cancer va continuer à augmenter pour dépasser 13,1 millions de décès en 2030.

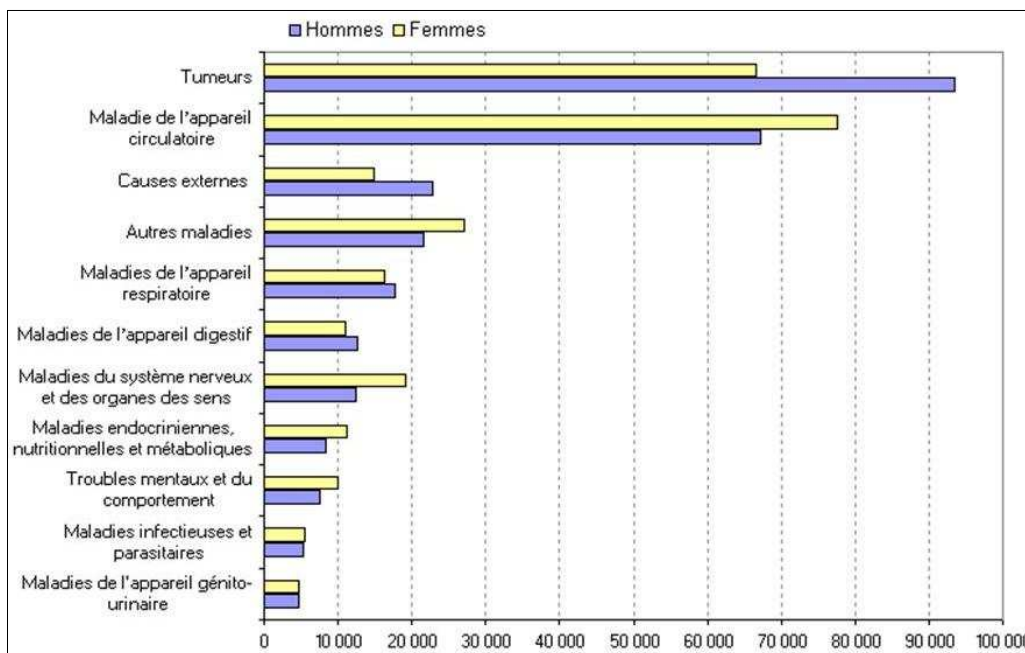


Figure 1 : Causes médicales des décès par sexe, en France, en 2009. Source : Inserm, Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDc).

Les différentes thérapies anticancéreuses

Le traitement du cancer implique la sélection soignée d'une **stratégie thérapeutique définie pouvant inclure chirurgie, radiothérapie et traitement médicamenteux**. L'objectif est de guérir la maladie ou de maîtriser sa progression afin de prolonger le plus possible la vie du patient, tout en maintenant une qualité de vie correcte.

➤ **Chirurgie**

La plus ancienne des stratégies thérapeutiques anticancéreuses est l'exérèse chirurgicale qui lorsqu'elle est possible est effectuée de manière précoce avant l'apparition de métastases. Elle est alors très efficace et a peu d'effets secondaires. Cette technique est cependant impossible dans certaines localisations, notamment dans le cas des cancers hématologiques. C'est pour cette raison qu'ont été développés les traitements médicamenteux et la radiothérapie. En présence de tumeurs secondaires disséminées dans l'organisme, la chirurgie est souvent indiquée en première intention et complétée par une radiothérapie et/ou une chimiothérapie.

➤ **Traitements médicamenteux : chimiothérapie, hormonothérapie et thérapie ciblée**

L'objectif des traitements anticancéreux est de stopper la prolifération cellulaire (effet cytostatique) et/ou de tuer les cellules cancéreuses (effet cytotoxique). On recherche les meilleurs résultats avec un minimum d'effets secondaires en développant des médicaments avec des index thérapeutiques importants (écarts entre les premières doses efficaces et les doses maximales tolérées).

Les chimiothérapies conventionnelles utilisent des agents chimiques qui ciblent l'ADN, l'ARN ou les protéines pour interrompre le cycle cellulaire. Leur but ultime est de provoquer des lésions suffisamment importantes de l'ADN (directement ou indirectement) pour induire la mort cellulaire.

La chimiothérapie peut être prescrite dans trois cas de figure différents :

- La chimiothérapie en phase métastatique est administrée pour prolonger le contrôle de la maladie.

- La chimiothérapie adjuvante fait suite à la chirurgie. Le but de cette prescription est de réduire l'incidence des rechutes locales et métastatiques.
- La chimiothérapie néo adjuvante (ou d'induction) précède l'exérèse chirurgicale. Elle permet de réduire la taille de la tumeur pour faciliter son extraction.

La chimiothérapie agit sur toutes les cellules qui se divisent. De fait, les cellules de l'organisme se divisant rapidement telles que les cellules des follicules pileux, l'épithélium intestinal et les cellules hématopoïétiques sont donc affectées. Cela engendre des effets secondaires courants tels que de l'alopécie et des ulcères. L'aplasie médullaire provoquée par la disparition des cellules hématopoïétiques entraîne des anémies, des infections et des hémorragies. **L'efficacité des chimiothérapies est donc limitée par la sensibilité des cellules tumorales (par défaut de ciblage) et la forte toxicité pour les tissus sains.**

L'action de la plupart de ces médicaments est ensuite limitée par le développement d'une résistance tumorale aux drogues. Les cellules tumorales évoluent au cours du temps : leur instabilité génétique, leur hétérogénéité et leur important taux de mutation permet la sélection de sous-populations résistantes aux médicaments (Chen X, J Med Chem 2005).

L'hormonothérapie utilise le blocage de l'action sur les tumeurs hormonodépendantes (comme les cancers du sein et de la prostate) des hormones dont elles ont besoin pour croître. Ce blocage peut s'effectuer par l'élimination de la source de production (ovariectomie, orchidectomie). Des méthodes pharmacologiques permettent de bloquer la sécrétion des hormones (comme l'administration d'analogues de la LH-RH qui empêchent la sécrétion des hormones sexuelles) ou d'antagoniser leur action (comme l'administration d'anti-œstrogènes dans le cancer du sein, cas du tamoxifène, agoniste partiel du récepteur des oestrogènes à faible activité intrinsèque).

D'une manière générale, ces différentes stratégies thérapeutiques ne sont pas suffisantes pour atteindre toutes les cellules cancéreuses et les effets secondaires occasionnés sont importants. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc développées, comme les thérapies ciblées, pour améliorer les traitements.

Les thérapies ciblées agissent spécifiquement sur les mécanismes moléculaires qui permettent à la tumeur de se développer. A ce titre, l'hormonothérapie est la première thérapie ciblée à être apparue. L'émergence des thérapies ciblées correspond en fait à une nouvelle approche dans le développement des agents thérapeutiques. La mise en évidence de l'activité anti-tumorale des agents pharmacologiques « traditionnels » précédait l'identification de leurs

mécanismes d'action. A l'inverse, dans le cadre des thérapies ciblées, **le potentiel thérapeutique d'une molécule particulière au rôle oncogénique connu est spécifiquement évalué**. Les thérapies ciblées découlent d'une meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux des processus oncogéniques (Vignot et Soria, Thérapies moléculaires ciblées, 2008). **Ces médicaments ont une action ciblée en intervenant à un niveau précis du développement de la cellule tumorale**. Ils peuvent bloquer la croissance des cellules cancéreuses (comme le trastuzumab ou Herceptin®, anticorps anti-HER2, dans le cas des cancers du sein qui surexpriment HER2), s'opposer à la formation de nouveaux vaisseaux (comme le bevacizumab ou Avastin®, anticorps monoclonal anti-VEGF ou le sunitinib ou Sutent®, inhibiteur de récepteurs à activité tyrosine kinase dont le VEGF-R), diriger les réactions immunitaires contre la tumeur ou encore stimuler l'apoptose.

Au sein des thérapies ciblées, les thérapies anti-angiogéniques sont cytostatiques, ralentissent la croissance tumorale et la formation de métastases. Cependant ces thérapies ne sont pas suffisantes pour éradiquer les tumeurs à des stades avancés. La combinaison d'agents anti-angiogéniques avec une chimio- ou une radiothérapie a prouvé son efficacité sur de nombreux modèles tumoraux (Wu, Expert Opin Drug Discov 2012 ; Kraeber-Bodéré, J Nucl Med 2010). La synergie résulte de l'impact du traitement anti-angiogénique qui, en rétablissant une vascularisation tumorale normale, diminue la pression interstitielle tumorale, améliore le flux sanguin et permet une meilleure distribution des médicaments délivrés en systémique dans un second temps (Jain, Nat med 2001).

➤ Radiothérapie

Cette technique majeure est utilisée chez plus de la moitié des patients atteints d'un cancer en France, seule ou en association avec la chirurgie ou les traitements médicamenteux. Elle utilise l'action des rayonnements ionisants pour la destruction des cellules malignes. Les rayons peuvent provoquer des lésions sur toutes les cellules qu'ils touchent, qu'elles soient cancéreuses ou saines. L'enjeu consiste donc à focaliser les rayonnements sur la tumeur pour minimiser la toxicité sur les tissus sains et les organes voisins. On distingue trois grandes techniques de radiothérapie que sont la radiothérapie externe, la radiothérapie interne et la radiothérapie interne vectorisée (RIV).

La radiothérapie externe est une méthode de thérapie par irradiation au moyen d'une source externe au patient. Il existe plusieurs types de rayons qui pénètrent plus ou moins dans le corps et y déposent leur énergie de manière différente. Dans 90 % des cas, cette technique utilise un faisceau de photons X à haute énergie. Les électrons sont également couramment utilisés. Plus rarement, on peut utiliser des protons (on parle alors de protonthérapie) ou des ions carbone (hadronthérapie).

La radiothérapie interne, également appelée curiethérapie ou brachythérapie, est une technique de radiothérapie où la source radioactive scellée (fils d'iridium-192, grains d'iode-125) est placée à l'intérieur ou à proximité immédiate de la zone à traiter. Ce type de radiothérapie peut être interstitielle (implant placé directement dans la tumeur), intracavitaire (implant inséré dans une cavité du corps, comme l'utérus ou le vagin) ou endoluminale (implant inséré dans un canal ou une voie de passage du corps, comme l'œsophage ou les bronches). La curiethérapie est couramment utilisée dans le traitement des cancers de l'utérus, de la prostate, du sein, de la peau et de la sphère ORL. Elle peut également être utilisée associée à la chirurgie, par exemple dans le traitement des sarcomes (Delannes, Cancer Radiother 2006). Les caractéristiques de la curiethérapie sont avantageuses par rapport à la radiothérapie externe car les tumeurs peuvent être traitées avec des doses très élevées de radiations localisées, avec une technique qui permet de réduire la probabilité de dommages pour les tissus sains environnants. Mais cette technique n'est envisageable que dans le cas de petites tumeurs primaires non disséminées. La curiethérapie représente alors une approche alternative à la chirurgie (même probabilité de guérison et effets secondaires comparables) voire même plus indiquée dans le cas de tumeurs plus avancées localement.

Ces deux premières approches sont limitées par la présence de foyers secondaires. La radiothérapie externe est utilisée pour le traitement de métastases mais dans un but palliatif (traitement des métastases osseuses par exemple). Il est impossible de traiter les petites tumeurs disséminées dans l'organisme avec ces techniques.

Le troisième volet de la radiothérapie, la radiothérapie interne vectorisée (RIV) cible à la fois les tumeurs primaires et secondaires. Cette technique, qui est au centre de notre intérêt, sera développée en détail dans le prochain chapitre.

B. Radiothérapie interne vectorisée

1. Contexte

La radiothérapie interne vectorisée fait partie du domaine de la médecine nucléaire thérapeutique. Après avoir défini ce qu'est la médecine nucléaire et détaillé les effets des rayonnements au niveau cellulaire (radiobiologie), les différentes caractéristiques de la RIV seront développées.

1.1. La médecine nucléaire

La médecine nucléaire est une spécialité médicale qui utilise des radioéléments en sources non scellées à des fins diagnostiques mais aussi thérapeutiques. Les médicaments radiopharmaceutiques utilisés sont des vecteurs radiomarqués. Le vecteur organique ou biologique sur lequel est greffé l'isotope radioactif ou radionucléide est choisi pour ses propriétés d'accumulation sélective au niveau de la cible (un organe ou une tumeur). L'utilisation à des fins diagnostiques ou thérapeutiques dépend du type de rayonnements émis par le radionucléide.

La médecine nucléaire offre principalement deux domaines d'application différents :

- L'imagerie scintigraphique in vivo consiste en l'administration au patient d'un agent pharmacologique radiomarqué qui, fixé sur sa cible, permet sa détection externe : ce sont les scintigraphies par émission de rayonnements γ (TEMP pour tomographie par émission monophotonique, SPECT en anglais pour « Single photon emission computed tomography ») ou les tomographies par émission de positons (TEP ou PET en anglais pour « Positron emission tomography »)). Elles ont en commun de fournir des informations biochimiques, moléculaires et cellulaires renseignant sur la physiopathologie des maladies.

Les applications actuelles des rayonnements γ sont nombreuses : scintigraphies osseuses avec des biphosphonates marqués au technétium-99m, scintigraphie de la perfusion, scintigraphie de la thyroïde à l'iode-123, scintigraphie pulmonaire de ventilation au

krypton-81m. Tous ces examens de diagnostic médical apportent des informations nécessaires à la prise en charge thérapeutique dans de nombreuses circonstances.

Les émetteurs de positons (tels que l'oxygène-15 et le fluor-18) servent de marqueurs en TEP. Cette technique a permis un nouveau mode d'exploration dans l'étude du cerveau et des maladies cérébrales. Aujourd'hui, elle permet la détection à un stade très précoce des tumeurs et des métastases alors même que les autres techniques d'imagerie ne peuvent les révéler. Le ^{18}F -fluorodéoxyglucose (^{18}F -FDG) est un analogue du glucose qui s'accumule dans les cellules dont le métabolisme glucidique est augmenté. La plupart des cellules cancéreuses présentent une augmentation du métabolisme glucidique et captent donc ce traceur de façon préférentielle. La TEP au ^{18}F -FDG est indiquée dans le diagnostic, le bilan d'extension et le suivi des tumeurs solides et peut aussi être utilisée en cardiologie.

- La radiothérapie interne vectorisée : les vecteurs utilisés en imagerie peuvent être utilisés couplés à des radionucléides à visée thérapeutique : émetteurs β^- , α et d'électrons Auger. On profite alors de l'effet délétère des rayonnements ionisants pour obtenir un effet tumoricide thérapeutique, curatif ou palliatif.

Avant de développer les différentes caractéristiques de la RIV, nous allons détailler les effets des rayonnements ionisants au niveau cellulaire afin de mieux comprendre les mécanismes d'action mis en jeu pour détruire les cellules tumorales, l'importance du contexte biologique dans lequel est appliquée la RIV et les conditions nécessaires pour en optimiser l'efficacité thérapeutique.

1.2. Radiobiologie

La radiobiologie étudie les effets biologiques des radiations ionisantes.

1.2.1. Les étapes d'une irradiation

On distingue quatre étapes successives: physique, chimique, biochimique et biologique (Lacave 2005).

La phase physique initiale de l'irradiation dure de 10^{-18} à 10^{-13} seconde. Les particules directement ionisantes (électrons, positons, protons, noyaux) ou celles mises en mouvement par les rayonnements indirectement ionisants (les photoélectrons et les électrons Compton dans le cas des photons X, gamma et des photons d'annihilation, les protons dans le cas des neutrons) agissent sur les atomes rencontrés en leur transférant de l'énergie (Gambini 2007). Selon l'énergie transférée, elles peuvent soit expulser un électron du cortège ou le faire sauter sur une couche d'énergie inférieure et induire respectivement des ionisations ou des excitations atomiques qui sont à l'origine des lésions biologiques radio-induites.

La phase chimique dure de 10^{-13} à quelques secondes. Les ions formés lors de la phase physique interagissent avec le milieu composé essentiellement d'eau et produisent ainsi des radicaux libres (le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$ principalement et les radicaux $\text{H}\bullet$, e^-_{aq} et $\text{O}_2\bullet^-$) par **radiolyse de l'eau**.

Les cibles sensibles aux radiations dans les cellules sont l'ADN, les protéines du cytoplasme et les membranes (avec la peroxydation des lipides membranaires). Ces cibles sont ionisées soit directement par les radiations lors de la phase physique (effet direct) soit oxydées secondairement par l'attaque radicalaire de la phase chimique (effet indirect). La radiolyse de l'eau produit également des espèces non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui fait partie des espèces réactives de l'oxygène, au même titre que les radicaux $\bullet\text{OH}$ et $\text{O}_2\bullet^-$, très délétères vis-à-vis des cibles biologiques.

La radiolyse de l'eau et donc l'effet des radiations sont augmentés par la présence d'oxygène dans le milieu (Semenza, Cancer cell 2004). **L'effet radiosensibilisateur de l'oxygène** relève de l'effet de stress oxydant qui **amplifie la production de radicaux libres** initiée par l'ionisation initiale. Le radical $\text{H}\bullet$ réagit avec l'oxygène pour former le radical hydroperoxyde $\text{HO}_2\bullet$ ($\text{H}\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2\bullet$) qui permet la formation de peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée

($\text{HO}_2^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$; $\text{HO}_2^\bullet + \text{H}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$). La présence d'oxygène permet également la création du radical superoxyde ($\text{e}^-_{\text{aq}} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet -}$) et de radicaux peroxydes ($\text{R}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\bullet$).

La phase biochimique commence quelques secondes après l'irradiation et s'étend sur quelques heures. Pendant cette phase, les mécanismes de **réparation de l'ADN** entrent en action pour restaurer l'ADN endommagé. La viabilité de la cellule, du tissu ou de l'organisme irradiés dépend de la rapidité et de la fidélité de cette réparation.

La phase biologique représente toutes les conséquences de la phase biochimique au niveau de la cellule et de l'organisme et peut s'étendre sur des années. Les radiations ionisantes peuvent entraîner des lésions des différents compartiments cellulaires, une expression protéique altérée, l'expression de nouveaux récepteurs membranaires, l'activation de voies de signalisation, la mise en place de mécanismes de réparation ou de mort cellulaire comme l'apoptose dite radio-induite (Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011).

1.2.2. Le transfert d'énergie linéique (TEL)

Le transfert d'énergie linéique (TEL) est l'énergie moyenne transférée au milieu par la particule (dE) par unité de longueur de la trajectoire parcourue (dx). Il caractérise le ralentissement progressif et continu des particules dans la matière. Plus le TEL est grand et plus une grande quantité d'énergie est cédée sur une courte distance et donc plus la nuisance biologique est importante (Figure 2).

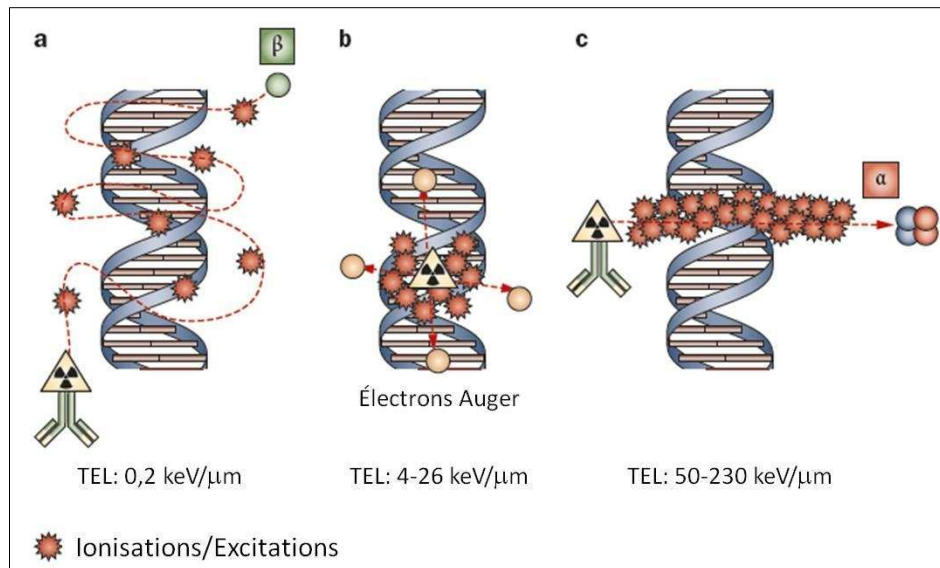


Figure 2 : Influence de la valeur du transfert linéique d'énergie sur le type de lésions radio-induites. Traduit de Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011.

Les émetteurs α ont un TEL élevé de 100 keV/ μ m en moyenne (Kim, Tumeur Biol 2012). Ils délivrent une dose importante sur une très courte trajectoire de l'ordre de quelques dizaines de micromètres.

Les électrons Auger présentent un TEL intermédiaire, relativement élevé sur les premiers nanomètres de leur trajectoire (Sastry, Med Phys 1992). Ils peuvent provoquer des lésions importantes s'ils sont acheminés au sein même de la molécule d'ADN.

Les émetteurs β^- ont un TEL faible de 0,2 keV/ μ m en moyenne et leur parcours est plus long (Figure 3). Leur utilisation en RIV permet d'envisager la destruction de cellules adjacentes aux cellules ciblées. Ce phénomène de « **feux croisés** » augmente l'efficacité du traitement puisqu'il suffit de cibler un nombre suffisant de cellules dans la zone à traiter pour irradier toute la zone.

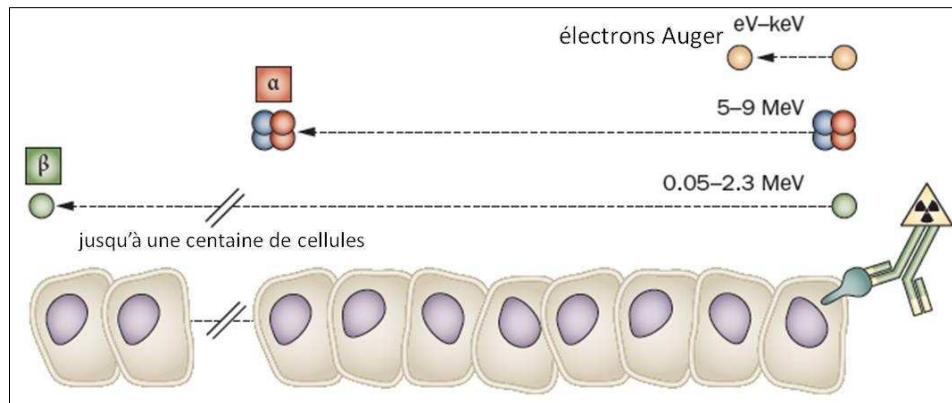


Figure 3 : Longueur du parcours des particules β , α et des électrons Auger par rapport à la taille des cellules. Traduit de Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011.

Le fait de connaître la valeur du TEL d'un rayonnement permet d'estimer les dégâts biologiques qu'il occasionnera lors de son utilisation en radiothérapie. S'il paraît évident qu'un rayonnement avec un TEL élevé est plus approprié dans ce cas, nous verrons plus loin pourquoi ce sont au contraire les rayonnements β^- , alors qu'ils ont un TEL faible, qui sont le plus utilisés en pratique. Avant d'en arriver là, nous allons d'abord voir quelles sont les différentes lésions radio-induites et leurs conséquences au niveau cellulaire et tissulaire.

1.2.3. Lésions moléculaires cellulaires

Les lésions radio-induites peuvent toucher toutes les macromolécules cellulaires, protéines, chaînes peptidiques, sucres, lipides, enzymes, ARN, ADN. Les lésions des molécules vitales ont le plus de conséquences. Il s'agit surtout de l'ADN aux faibles doses et des membranes cellulaires aux fortes doses.

➤ La principale cible moléculaire : l'ADN

○ Types de lésions de l'ADN

Plusieurs types de lésions au niveau de l'ADN peuvent apparaître : des cassures simples ou doubles-brin, une altération des bases, des pontages ADN-ADN et des liaisons entre ADN et protéines (Tableau 1). Le nombre de ces lésions est proportionnel à la dose absorbée.

En l'absence de toute agression externe, l'ADN des cellules est altéré par les radicaux libres formés au cours du métabolisme normal de l'oxygène. Une irradiation engendre davantage de lésions plus complexes comme les cassures doubles-brins et les lésions multiples localisées (cassures de l'ADN associés à des dommages oxydatifs de bases sur une distance de 10 à 20 nucléotides). La concentration de ces lésions dans l'espace et le temps augmente en fonction du débit de dose. Les lésions multiples localisées sont causées principalement par les particules très ionisantes qui donnent des grappes d'ionisations. C'est le cas des rayonnements à TEL élevé, mais également en proportion bien moindre (5% des lésions de l'ADN) des rayonnements de faibles TEL (comme les β^- qui provoquent des grappes d'ionisations en fin de parcours d'un électron).

Type de dommage	Dommages endogènes dus au métabolisme à 37°C	Dommages radio-induits
	Nombre de lésions naturelles par noyau et par jour	Nombre de lésions ajoutées par un gray d'irradiation à faible TEL
Cassures simple-brin	55000	1000
Pertes de bases puriques	12000	
Pertes de bases pyrimidiques	600	
Dommages de bases :		2000
Déaminations de la cytosine	200	
Oxydations de bases	>1000	
Méthylations de la guanine	3000	
Cassures doubles-brins	8	40
Pontages ADN/ADN	8	30
Pontages ADN/protéine	Quelques-uns	150

Tableau 1 : Dommages endogènes et radio-induits de l'ADN (d'après Ward 1988 et Burkart 1999).

○ Réponses aux lésions de l'ADN

En réponse aux lésions de l'ADN, des cascades de signalisation sont mises en route dans la cellule (Figures 4 et 5). Ces cascades comprennent :

- des protéines détectrices des lésions (telles que RAD17, RAD9 et Hus1),
- des médiateurs (comme BRCA1 et le complexe MRN),
- des transmetteurs du signal (comme la sérine kinase ATM et la sérine-thréonine kinase ATR),
- des protéines d'exécution (telles que p53, cdc25 et les CDKs), servant à contrôler la réplication de l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire par l'activation des points de contrôle (« checkpoints ») et à induire l'expression de gènes, la réparation ou la synthèse d'ADN (Valerie, Mol Cancer Ther 2007).

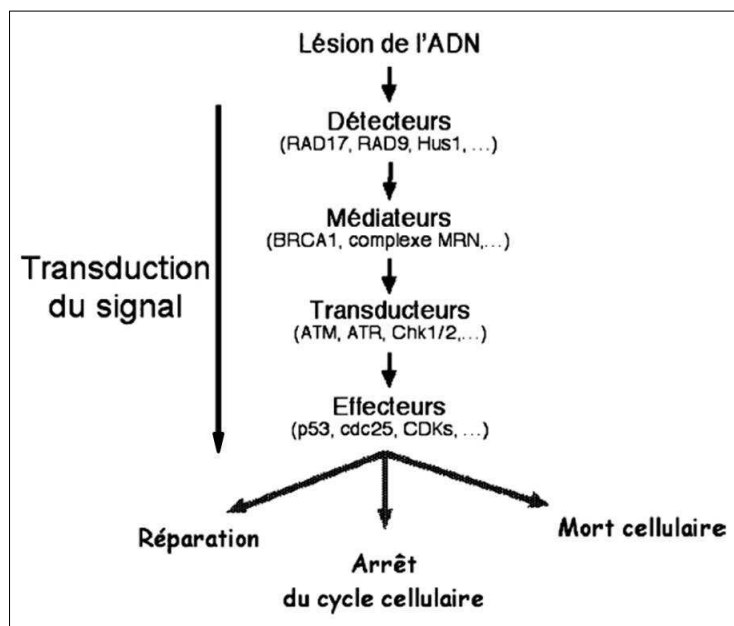


Figure 4 : La cascade des protéines activées après irradiation. D'après Hennequin, Cancer Radiother 2008.

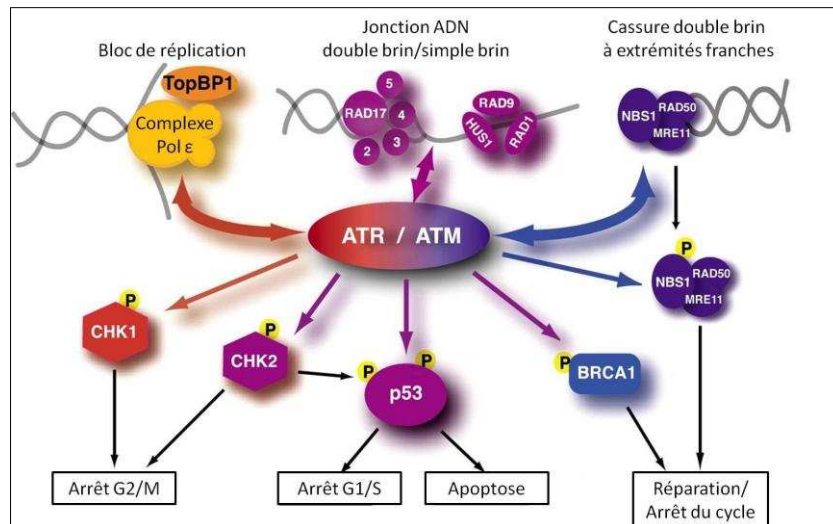


Figure 5 : Schéma global des cascades de signalisation mises en route après endommagement de l'ADN. Adapté d'après Nyberg, Annu Rev Genet 2002.

– Arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est constitué par la succession des événements biologiques qui se déroulent entre 2 mitoses successives. Il conduit généralement à la formation de deux cellules filles identiques. Il est constitué de 4 phases de durées inégales : G1, S, G2, M. Les cellules qui ne se divisent pas, quiescentes, sont en phase G0.

La phase G1 (pour « gap 1 ») qui suit la mitose permet à la cellule d'accumuler les matériaux indispensables à la division cellulaire, comme les nucléotides. La phase S de synthèse est la phase où l'ADN est décompacté et répliqué. La phase G2 (pour « gap 2 ») est un temps de latence qui permet à la cellule d'augmenter sa masse et de synthétiser les enzymes nécessaires à l'entrée en mitose. La phase M correspond à la mitose et donc à la séparation des chromosomes dans deux cellules filles.

Chez les mammifères, la progression dans le cycle cellulaire est régulée par une famille de sérine/thréonine kinases, appelées kinases dépendantes du cycle (« cell cycle- » ou « cyclin- » « dependent kinases », CDKs) qui pour être actives doivent être associées à d'autres protéines, appelées cyclines intervenant pendant les phases successives du cycle et dont l'action activatrice peut être freinée par de nombreux inhibiteurs.

Un contrôle de qualité de l'ADN à des moments cruciaux du cycle (Figure 6) permet l'arrêt de la progression du cycle cellulaire (Gambini 2007) :

- La présence de lésions de l'ADN, recherchée en G₁, S, G₂, conduit à un blocage à la transition G₁/S (« DNA damage checkpoint ») donnant à la cellule davantage de temps pour réparer les lésions avant la réplication ;
- Les anomalies de la réplication, surveillée en S et G₂, provoquent l'interruption du cycle en G₂/M (« replication checkpoint ») pour réduire le risque de séparation de chromosomes altérés ;
- Le défaut d'attachement des centromères au fuseau avant la ségrégation des chromosomes, bloque la métaphase de la mitose (« mitotic checkpoint »), évitant les anomalies de leur répartition.

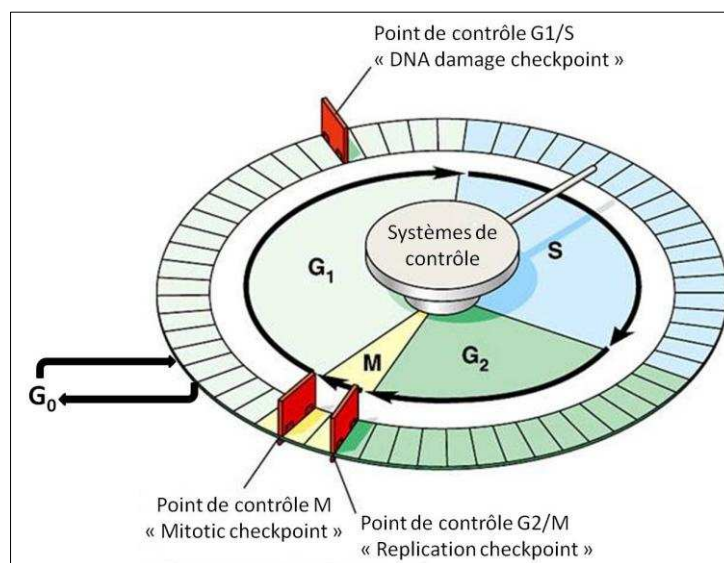


Figure 6 : Cycle cellulaire chez les mammifères. Adapté d'après Campbell et Reece, *Biology* 2008.

– Réparation de l'ADN

Les voies de réparation les plus importantes peuvent être classées en deux parties (Averbeck, *Cancer Radiother* 2000) :

- La réparation par excision–resynthèse comprenant l'**excision de bases** (BER pour «base excision repair») et l'**excision de nucléotides** (NER pour «nucleotide excision repair») qui prennent en charge les dommages de base ainsi que les cassures simple-brin et la **réparation des mésappariements de bases** («mismatch repair») qui intervient sur les erreurs de réplication de l'ADN.

- Les mécanismes de réparation des cassures double-brin comprenant la **recombinaison homologue** (HR pour «homologous recombination») dans laquelle la cassure double-brin située sur un chromosome est réparée en utilisant l'ADN du chromosome homologue comme matrice et la **suture non homologue** (NHEJ pour «non-homologous endjoining »).

➤ Lésions cellulaires hors ADN nucléaire

Les radiations peuvent activer des récepteurs de facteurs de croissance (comme ERBB), des récepteurs de mort cellulaire (comme FAS/CD95 ou DR5/TRAIL), la sphingomyélinase acide ou d'autres tyrosines kinases de la membrane plasmique. Après activation, ces protéines régulent les voies de signalisation des MAP kinases (ERK5, ERK1/2, p38, JNK1/2) ou les voies de signalisation AKT/PI3K et peuvent entraîner la mort cellulaire (via JNK1/2) ou la survie cellulaire (à travers ERK1/2, AKT) ou encore l'apoptose déclenchée par les céramides.

La peroxydation des lipides des membranes provoque des altérations de leur fluidité et de leur perméabilité causant ainsi la désorganisation de certaines organelles telles que les mitochondries. Lorsque des mitochondries isolées sont irradiées, il en résulte une chute du potentiel de la membrane interne des mitochondries, une ouverture des pores protéiques présents dans cette membrane et la libération du cytochrome C dans le cytoplasme (Taneja, Oncogene 2001). Une fois libéré ce cytochrome c se complexe avec d'autres protéines pour activer l'apoptose.

1.2.4.Dommages cellulaires

➤ Courbes de survie

La radiosensibilité des cellules est déterminée par la réalisation de courbes de survie après irradiation. La courbe obtenue permet de définir le modèle mathématique représentant la proportion de cellules ayant survécu à l'irradiation. Dans ces modèles, la mort cellulaire est corrélée au nombre et à la gravité des lésions de l'ADN. On obtient des courbes de survie différentes selon la valeur du TEL du rayonnement.

- Pour les cellules de mammifères exposées à un rayonnement de faible TEL,

on obtient des courbes de survie qui suivent le modèle linéaire-quadratique d'équation suivante :

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)},$$

où S représente la survie cellulaire, D la dose délivrée et α et β sont des coefficients semi-logarithmiques.

Les courbes de survie obtenues sont biphasiques avec première partie linéaire caractérisé par le coefficient α suivie par un épaulement caractérisé par le coefficient β (Figure 7). Le **coefficient α correspond aux lésions létales** comme les cassures double-brin non réparées. Le **coefficient β correspond aux lésions sublétales** qui sont considérées comme réparables si la cellule est maintenue dans des conditions d'arrêt de cycle cellulaire. L'accumulation de ces lésions sublétales entraîne la saturation progressive des systèmes de réparation et donc la mort des cellules.

- Pour les cellules de mammifères exposées à un rayonnement de TEL élevé,

on obtient des courbes de survies linéaires dont l'équation ne fait intervenir que le coefficient α . Les rayonnements de TEL élevé sont hautement ionisants et forment des grappes d'ionisations qui provoquent des lésions multiples localisées avec des cassures double-brin qui sont très difficilement réparables, ce qui conduit à une relation linéaire entre la dose absorbée et la survie cellulaire.

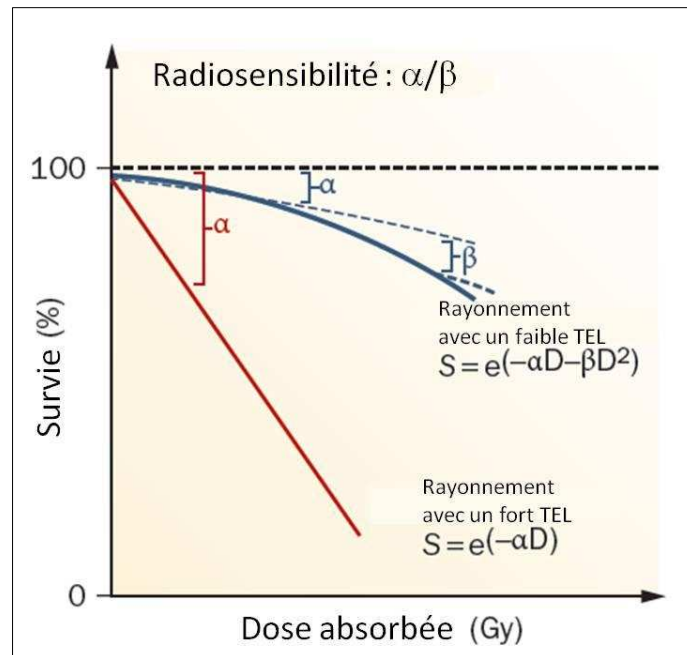


Figure 7 : Courbes de survie cellulaire après irradiation. Modèles linéaire et linéaire-quadratique. Traduit de Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011.

➤ Les facteurs de la radiosensibilité cellulaire

- La réparation de l'ADN : Comme évoqué précédemment, les capacités de réparation de l'ADN jouent un rôle fondamental sur le devenir d'une cellule irradiée.

Selon les capacités de réparation de la cellule, les conséquences d'une exposition aux radiations ionisantes peuvent être soit la survie, soit la mort cellulaire ou encore la carcinogénèse.

La découverte des déterminants majeurs de la radiosensibilité est venue de la caractérisation de mutations somatiques ou germinales, homo- ou hétérozygotes de gènes de réparation chez les bactéries, les levures, les rongeurs et enfin chez l'homme. Chez l'homme, ces mutations produisent des « réparatoses » caractérisées par des syndromes d'une exceptionnelle gravité. Ces mutations sont très rares et ne peuvent donc expliquer les différences de radiosensibilité interindividuelle observées en pratique clinique. Les **polymorphismes** (SNPs pour « single nucleotid polymorphisms ») **des gènes de réparation de l'ADN** ont des conséquences fonctionnelles plus discrètes (à cela près qu'ils sont souvent associés à une prédisposition au cancer) et pourraient être plus fréquemment mis en cause. Les SNPs portent sur la substitution d'une seule base dans la

séquence de l'ADN et sont observés entre différents individus au sein d'une population. Un polymorphisme est défini comme la présence d'un allèle chez plus de 1% de la population (Brookes, Gene 1999). Un polymorphisme portant sur les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN peut induire une diminution des capacités de réparation et est souvent impliqué dans la susceptibilité aux cancers (De Boer, Mutat Res 2002).

- L'effet oxygène : Comme précédemment décrit, l'oxygène présent dans les cellules a un effet radiosensibilisateur. En conséquence, on constate un **effet radioprotecteur de l'hypoxie**. Des cellules hypoxiques sont presque deux fois plus résistantes aux radiations que des cellules normoxiques. Pour obtenir le même effet biologique, il faut doubler la dose face à des cellules hypoxiques par rapport à des cellules normales. Dans un organisme humain, l'hypoxie cellulaire est un phénomène qui n'existe pratiquement que dans les tumeurs. Et cette hypoxie est considérée depuis longtemps comme un des moyens principaux qu'ont les tissus tumoraux de résister à la radiothérapie.

Les **systèmes de défense antioxydants** jouent également un rôle dans la radioprotection des cellules. Les systèmes de défense antioxydants non enzymatiques (gluthathions, acide L ascorbique, thiols intracellulaires...) et enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase...) exercent un fort effet radioprotecteur en neutralisant les produits de radiolyse de l'eau (Weiss, Ann N Y Acad Sci 2000). En complément de ces mécanismes de défense, il existe également des systèmes de réparation ou d'élimination des différentes molécules endommagées. L'ensemble de ces processus a un impact sur la survie cellulaire post irradiation.

- Le stade du cycle cellulaire : La **radiosensibilité est maximale en G2 et en M et minimale à la fin de la phase S** car l'activité des enzymes de polymérisation et de réparation est alors à son apogée (Gravina, Mol Cancer 2010). La radiosensibilité en G1 varie beaucoup selon la lignée cellulaire et peut y être élevée. La phase G0, où les cellules sont quiescentes est une phase de radiorésistance.

L'état conformationnel de la chromatine varie au cours du cycle cellulaire et joue également un rôle dans la radiorésistance. En effet, les protéines associées à l'ADN, très majoritairement les histones, exercent un effet radioprotecteur (Ljungman, Radiat Research 1991) et il existe une corrélation entre le degré de compaction de la chromatine

et le rendement radiolytique de dommages de l'ADN dans des modèles acellulaires reconstitués in vitro (Chavaudra, Radiother Oncol 2004).

- Médicaments : La réponse cellulaire aux radiations peut être modulée par certains médicaments qualifiés d'agents chimiques radiosensibilisants. Le taxol par exemple va permettre de bloquer le cycle cellulaire à la transition entre les phases G2 et M au moment où les cellules sont plus sensibles aux radiations (Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011).

➤ Mort cellulaire

Lorsque les dommages cellulaires sont trop importants, les cellules meurent principalement soit par **nécrose** (mort dite passive, par cytolyse, suivant le passage en mitose), soit par **apoptose** (mort dite programmée par laquelle les cellules s'autodétruisent). Les fortes doses d'irradiation ont tendance à induire des morts nécrotiques alors que les faibles doses provoquent des morts apoptotiques.

La voie principale intrinsèque de l'apoptose radio-induite est initiée par la stabilisation de p53 par phosphorylation ATM-dépendante et se poursuit par inversion de la stœchiométrie Bax/Bcl2, entraînant le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme, la formation de l'apoptosome, l'activation des caspases 9 et 3 et l'activation de nucléases. L'apoptose est largement médiée par les mitochondries (Hennequin, Cancer Radiother 2008).

L'apoptose joue un rôle majeur dans la réponse des cellules hématopoïétiques aux radiations. Elle survient dans les heures qui suivent l'exposition et est principalement mise en route par la voie de la protéine p53. A l'inverse, **l'apoptose joue un rôle mineur dans les tumeurs solides** car soit la protéine p53 y est mutée, soit les protéines pro-apoptotiques (comme BAX et APAF1) sont inactivées, soit les protéines anti-apoptotiques (comme BCL-2 et la survivine) sont suractivées. Les principales conséquences de l'exposition aux radiations ionisantes dans les tumeurs solides sont la **mort mitotique** (conséquence d'une mitose asymétrique, perte de la capacité de prolifération, s'achève par une lyse cellulaire) et de manière moins fréquente la **sénescence** (processus de vieillissement biologique aboutissant à la mort, typique des fibroblastes irradiés).

➤ Les effets particuliers des faibles doses (inférieures à 0,2 Gy)

○ Effet de proximité

La radiosensibilité d'une cellule peut être augmentée ou diminuée du fait de ses interactions avec les cellules voisines, soit par les jonctions, soit par le milieu extracellulaire. On regroupe sous le terme d'effets de proximité (« **bystander effect** ») les effets d'une radioexposition sur les cellules non irradiées. Les mécanismes de cet effet de proximité reposent sur la **communication intercellulaire à travers les jonctions gap** et la **sécrétion de facteurs solubles** (comme TGFβ et NO) (Prise, Nat Rev Cancer 2009). La signalisation mitochondriale joue également un rôle central dans ce phénomène (Hei, Curr Mol Pharmacol 2011). Cet effet de proximité contribue à l'augmentation de la mort dans les cellules tumorales (Kassis, Hum Exp Toxicol 2004). **Cet effet est prédominant aux faibles doses d'irradiation inférieures à 0,2 Gy** (Prise, Radiat Prot Dosimetry 2003) et atteint un plateau à partir de 1 Gy (Prise, Nat Rev Cancer 2009).

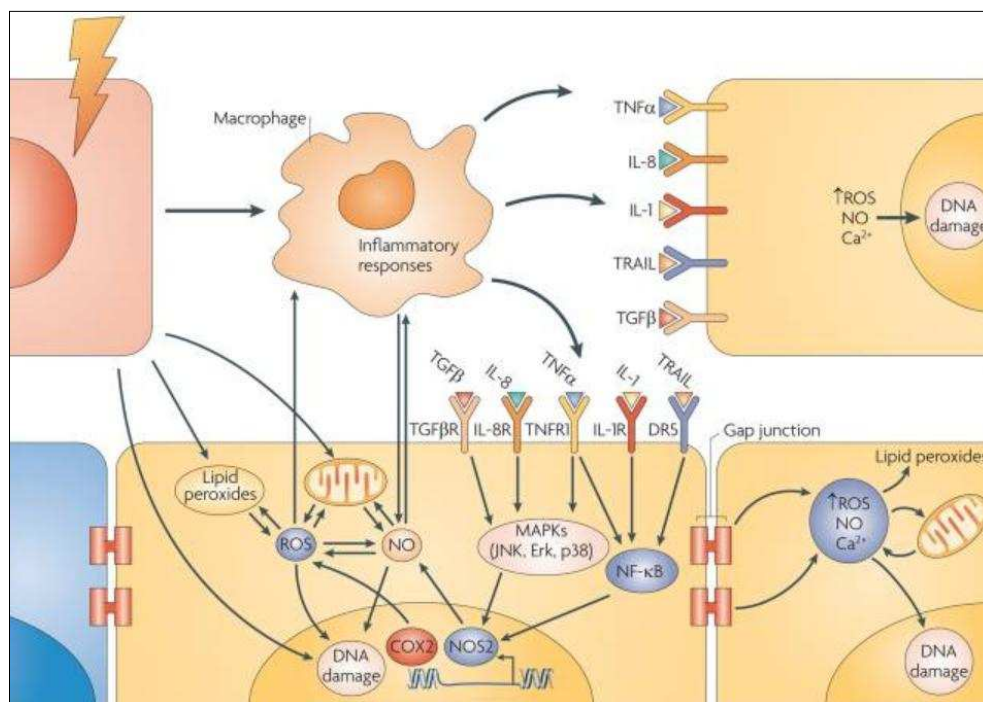


Figure 8 : Mécanismes responsables de l'effet de proximité ou « bystander effect » après irradiation externe. D'après Prise, Nat Rev Cancer 2009.

Les lésions radio-induites seraient causées à 40% par l'effet direct des rayonnements ionisants et à 60% par l'effet indirect conjugué des radicaux libres, des espèces réactives de l'oxygène et de l'effet de proximité (Gambini 2007).

L'effet de proximité a principalement été étudié en radiothérapie externe. Au cours d'une étude d'irradiation interne vectorisée sur des cellules en culture, un effet de proximité a également été observé, mais son mécanisme diffère de celui observé après une irradiation en radiothérapie externe (Boyd, JNM 2006). Les toxines secrétées par les cellules irradiées en radiothérapie interne vectorisée seraient différentes selon la valeur du TEL des rayonnements utilisés. L'effet de plateau observé au-delà de 1-2 Gy d'irradiation externe n'a pas lieu avec une irradiation interne utilisant un rayonnement β^- de faible TEL. En ce qui concerne les rayonnements à plus fort TEL (rayonnements α et électrons d'Auger), le mécanisme cellulaire responsable de l'effet de proximité est inhibé au delà d'une certaine dose-seuil. La compréhension des différents mécanismes sous-jacents à l'effet de proximité observable en cas d'irradiation interne vectorisée ouvrira de nouvelles perspectives d'amélioration de l'efficacité des traitements en RIV.

- Effet abscopal

L'effet abscopal désigne les effets provoqués par une radiation ionisante sur des tissus éloignés du site d'irradiation. Depuis de nombreuses années, des réponses thérapeutiques retardées suite à une radiothérapie externe localisée ont été mises en évidence sur des métastases à distance du site d'irradiation dans le cas notamment de mélanomes (Kingsley, Br J Radiol 1975), de lymphomes (Rees, Clin Radiol 1981), d'adénocarcinomes (Rees, Br J Radiol 1983) et de carcinomes hépatocellulaires (Ohba, Gut 1998).

Plus récemment, il a été démontré qu'il est possible d'induire chez la souris une réponse anti-tumorale après irradiation externe d'une tumeur lorsque le nombre de cellules dendritiques est augmenté sous l'influence de FLT3-L, facteur de croissance des cellules dendritiques (Demaria, Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004).

L'apparition d'un signal « Danger » en réponse aux rayonnements ionisants permet la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (APC pour « Antigen Presenting Cells ») indispensables à la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T qui activent ainsi une réponse spécifique. L'irradiation de la tumeur induit une inflammation

locale des tissus et l'expression de protéines de surface comme les protéines de stress (HSP pour « Heat Shock Proteins ») connues pour participer au signal « Danger ». C'est également le cas des constituants cellulaires relargués lors de la lyse des cellules tumorales tels que l'ADN, les nucléotides ou l'acide urique. L'irradiation des cellules tumorales induit aussi la formation de corps apoptotiques et de débris cellulaires qui seront phagocytés et présentés par les APC aux lymphocytes T spécifiques.

L'effet abscopal est un effet indirect et systémique de nature au moins en partie immunologique puisque porté par les **lymphocytes T** spécifiques de la tumeur (Formenti, Lancet Oncol 2009) qui permet d'augmenter l'effet thérapeutique des rayonnements ionisants. On peut évoquer un effet « vaccinal » induit par l'irradiation.

1.2.5. Lésions tissulaires. Effets pathologiques

Les cellules étant les constituants des tissus, la perte cellulaire provoquée par une irradiation a des conséquences fonctionnelles au niveau des tissus qui varient selon le degré de différenciation des cellules atteintes, de l'organisation et de la fonction tissulaires et de la position dans l'organe (Tubiana 2008).

On distingue deux types de tissus selon leur organisation et dans lesquels les effets des radiations s'expriment à plus ou moins long terme.

– Tissus compartimentaux.

Les tissus compartimentaux ou hiérarchiques sont composés de trois types de cellules composant les trois compartiments. Les **cellules souches**, pluripotentes, sont des cellules non différenciées à fort potentiel mitotique. Elles produisent les cellules du **compartiment intermédiaire de maturation** qui prolifèrent en se différenciant. Le dernier compartiment est celui des **cellules fonctionnelles**, différenciées qui ont perdu la capacité de se diviser et qui meurent par sénescence. Plusieurs tissus présentent ce type d'organisation : la moelle hématopoïétique, l'épiderme, les tubes séminifères et de nombreux épithéliums comme l'intestin.

L'irradiation agit principalement sur les cellules souches et leurs descendantes immédiates qui sont capables de se diviser. Elle produit beaucoup moins d'effet sur les cellules différenciées qui ne divisent pas. Les conséquences de l'irradiation au niveau

tissulaire commencent à apparaître après un délai qui dépend de la durée de vie des cellules différenciées et qui correspond au temps de transit cellulaire entre le compartiment des cellules souches et les cellules différenciées. L'expression pathologique de l'irradiation se fait sous la forme d'une aplasie ou d'une hypoplasie. Dans le cas de la moelle hématopoïétique cela se traduit par une pancytopénie, une thrombopénie et une neutropénie apparaissant dans les jours suivant l'irradiation et une anémie dans les semaines suivantes. Plus la dose est élevée, plus le compartiment de maturation est touché et plus les effets apparaissent rapidement avec une plus grande intensité.

– Tissus non compartimentaux.

Les tissus non compartimentaux sont relativement radiorésistants. En l'absence de toute agression, leurs cellules prolifèrent peu. Il s'agit de tissus tels que le foie, le derme, les reins et le réseau vasculaire. Suite à une irradiation, la différenciation et la longue durée de vie des cellules laissent le temps aux réparations de se faire par accumulation des cellules en phase G2. La protéine p53 qui joue un rôle dans les réparations, contrôle également l'arrêt à la transition G2/M. Lorsque ce blocage est levé, il y a une reprise simultanée des mitoses qui peuvent être abortives au bout de quelques cycles, voire même de quelques années. Ce phénomène est alors responsable de la disparition massive et simultanée d'un grand nombre de cellules et peut causer de graves insuffisances tissulaires. La cinétique d'apparition des lésions après irradiation est d'autant plus précoce que la dose d'irradiation est élevée (Travis, *Semin Radiat Oncol* 2001).

Sur le plan fonctionnel, on distingue schématiquement une organisation tissulaire « en parallèle » et une organisation « en série ».

Dans les tissus constitués d'unités juxtaposées organisées en parallèle, la sévérité des complications induites par l'irradiation est proportionnelle au volume irradié et les unités fonctionnelles sont d'autant plus radiosensibles que leur taille est petite. En pratique, des doses élevées peuvent ne pas altérer de façon significative la fonction globale de l'organe, si l'irradiation n'intéresse qu'une partie de cet organe, tandis que la dose tolérée est beaucoup plus faible si l'organe est irradié en totalité. C'est le cas du poumon avec les lobules et les bronchioles ou du rein avec les glomérules rénaux.

Inversement, dans les tissus organisés en série, comme le système nerveux central, la moelle épinière ou l'intestin grêle, une irradiation à forte dose, même dans un volume limité, peut interrompre définitivement la fonction de l'organe.

➤ Effets déterministes/Effets stochastiques

Les manifestations pathologiques à court, moyen ou long terme d'une radioexposition sont classées en fonction des lois régissant leur apparition en effets déterministes et stochastiques dont les mécanismes de productions sont différents (Figure 9).

– Les effets déterministes.

Les effets déterministes sont provoqués par de fortes doses. Ce sont des **effets dose-dépendants avec effet seuil**. Par exemple une irradiation de 5 Gy au niveau de la moelle osseuse provoquera toujours une aplasie médullaire. Ces effets résultent surtout des morts cellulaires. Ils peuvent apparaître de manière précoce dans les tissus compartimentaux et de manière retardée jusqu'à plusieurs mois après l'irradiation dans les tissus non compartimentaux. La gravité de ces effets est proportionnelle à la dose reçue. Ils sont réversibles si les lésions ne sont pas trop sévères car les cellules intactes repeuplent le tissu lésé.

– Les effets stochastiques.

Ce sont des effets non dose-dépendants, sans effet seuil connu. Ce sont les **conséquences probabilistes à long terme**, chez l'individu ou sa descendance, d'une mutation radio-induite qui associée à d'autres phénomènes, aboutit à la transformation d'une cellule. Les effets stochastiques se manifestent de façon aléatoire. Même à très faible dose, ils ont une certaine probabilité. Quand la dose augmente, leur fréquence augmente mais par leur gravité, ce qui les différencie des effets déterministes.

Nous avons vu quelles sont les conséquences globales de l'exposition à un rayonnement ionisant au niveau cellulaire. La figure ci-dessous en propose un récapitulatif (Figure 9).

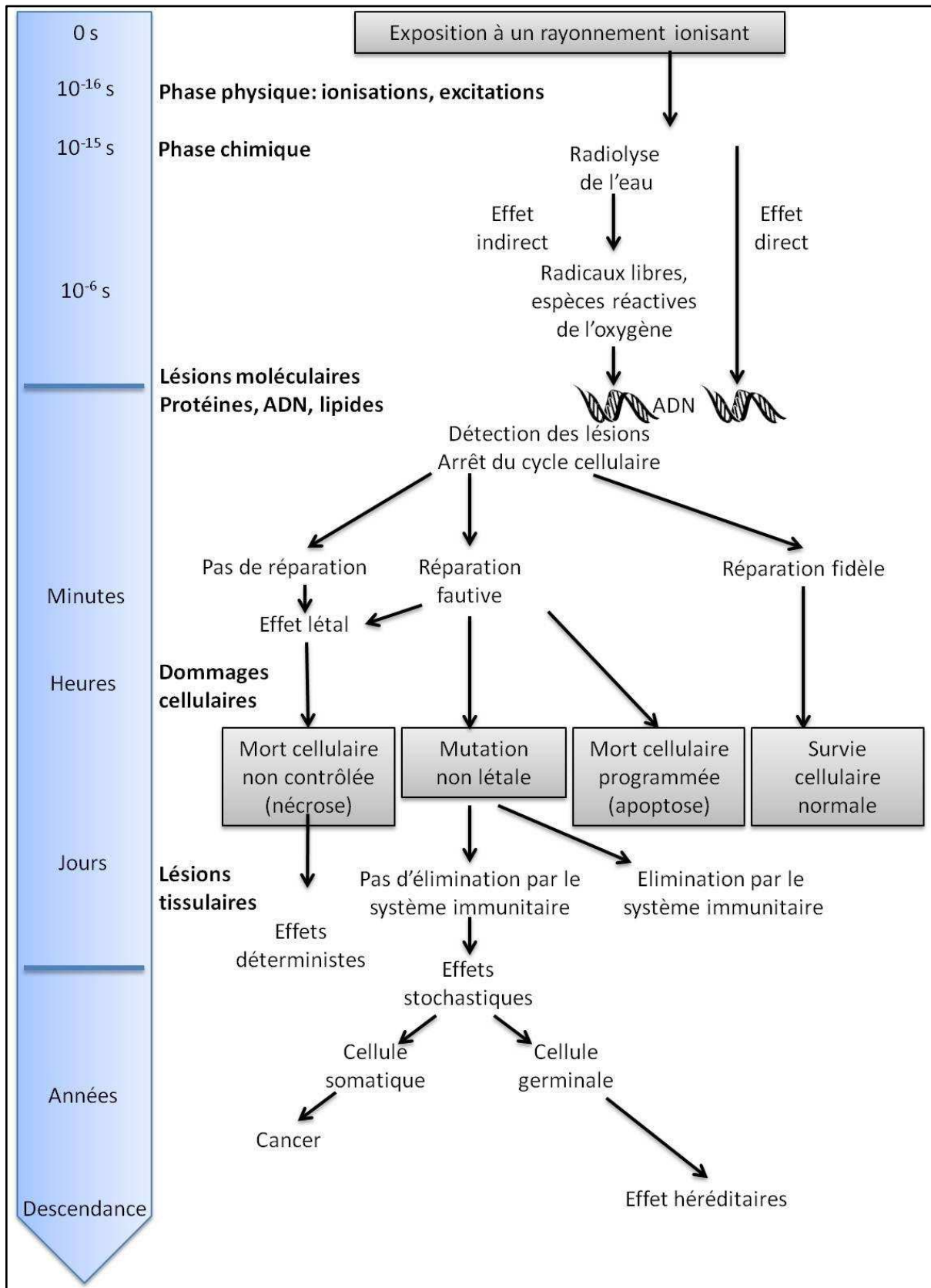


Figure 9 : Schéma récapitulatif des effets des rayonnements ionisants, des interactions physiques initiales aux effets pathologiques. *Adapté d'après Gambini 2007.*

Nous allons maintenant focaliser notre attention sur le versant thérapeutique de la radiobiologie pour mieux comprendre les paramètres à prendre en compte lors de l'utilisation des rayonnements ionisants pour le traitement des cancers en radiothérapie interne vectorisée.

1.2.6. La radiobiologie appliquée à la radiothérapie

➤ Facteurs temps et effet différentiel tumeurs/tissus sains

En 1906, les docteurs Jean Bergonié et Louis Tribondeau ont montré que la radiosensibilité d'une cellule varie proportionnellement à sa capacité de division et inversement proportionnellement à son degré de différenciation. La même année, le docteur Claudius Regaud décrit les effets tératogènes des rayons X sur les spermatogonies souches et propose la chromatine comme cible privilégiée des radiations. Il établit les bases biologiques de la « radiothérapie élective ». En 1911, les travaux de Claudius Regaud porteront sur la prise en compte du facteur temporel : le fractionnement et l'étalement des temps de traitement.

Ces principes fondateurs restent à la base de tout traitement de radiothérapie.

Pour une même dose totale, l'efficacité biologique est différente selon la dose par séance, le nombre total de séances (**fractionnement**) et la durée du traitement (étalement).

La **régle des « 5 R »** conditionne l'effet différentiel du fractionnement sur les tumeurs et les tissus sains (Figure 10), le but étant d'altérer préférentiellement le tissu tumoral par rapport au tissu sain :

- La **réparation** : le tissu normal et le tissu tumoral ont des radiosensibilités différentes, les cellules normales sont davantage capables de réparer les lésions de l'ADN que les cellules tumorales. Le fractionnement de l'irradiation en plusieurs séances permet une réparation partielle des lésions sublétales de l'ADN produites à chaque séance, ce qui augmente la survie des cellules où la réparation est la plus grande.
- La **réoxygénation** du tissu tumoral : l'élimination des cellules bien oxygénées radiosensibles lors de la première séance augmente l'oxygénation des cellules qui étaient hypoxiques et diminue ainsi leur radiorésistance.
- La **repopulation** cellulaire entre les séances est bénéfique pour les cellules saines puisqu'elle permet de limiter les effets toxiques sur les tissus sains mais est un phénomène

adverse quand elle concerne les tumeurs. La repopulation tumorale peut être compensée par l'augmentation de la dose totale délivrée.

- La **redistribution** des cellules dans le cycle cellulaire : l'irradiation provoque une accumulation des cellules en phase G2 qui est l'une des phases du cycle cellulaire de radiosensibilité maximale avec la phase M.
- La **radiosensibilité** intrinsèque selon le type cellulaire : certaines cellules sont plus radiosensibles comme les lymphocytes, les cellules souches épithéliales, hématopoïétiques ou de la lignée germinale ou encore les cellules des tumeurs hématologiques (leucémies, lymphomes) ; d'autres au contraire sont des cellules plus radiorésistantes, comme les myocytes, les neurones, les cellules des mélanomes ou des gliomes.

Ces paramètres vont avoir un rôle souvent discordant sur la sensibilité des tumeurs aux radiations ionisantes (protecteur ou sensibilisateur).

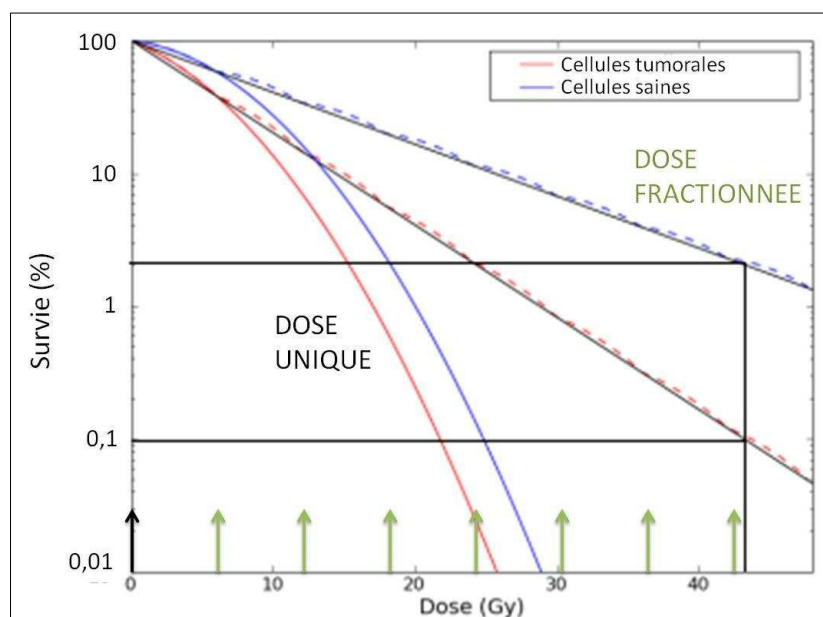


Figure 10 : Effet différentiel lié au fractionnement. Adapté d'après Tubiana 2008.

La sensibilité au fractionnement (ou la sensibilité à la variation de la dose par fraction) s'exprime principalement grâce au rapport α/β des courbes de survie : un rapport α/β bas (2–4 Gy) signifie une sensibilité importante au fractionnement (c'est le cas des tissus responsables des complications tardives), un rapport α/β élevé (10–20 Gy) signifie une sensibilité faible au fractionnement (c'est le cas des tissus responsables des complications précoces et de la plupart des tumeurs malignes). Il est reconnu depuis plusieurs années que **le fractionnement protège**

les tissus sains à prolifération lente, responsables des complications tardives et qu'il joue souvent un rôle limité en matière de contrôle tumoral (Cosset, Cancer Radiother 2005).

➤ Radiosensibilité tumorale

Des **cellules souches** ont été identifiées dans plusieurs tumeurs solides (glioblastomes, cancers du sein, du colon, de l'intestin...) et dans les leucémies (Bao, Nature 2006 ; Phillips, J Natl Cancer Inst 2006). Certaines tumeurs, si ce n'est toutes, seraient donc composées à la fois de cellules tumorales qui se divisent de manière anarchique et de cellules souches cancéreuses (moins de 0,1% de la population totale des cellules tumorales). Ces cellules souches, qui sont à l'origine de la transformation des cellules saines en cellules tumorales, semblent aussi être à l'origine des métastases et de la récurrence de certains cancers (Boman et Wicha, J Clin Oncol 2008).

Les paramètres qui déterminent la radiosensibilité tumorale sont multiples. Le **nombre de cellules souches**, la **cinétique de prolifération** tumorale, la **radiosensibilité intrinsèque** et le **degré d'hypoxie** sont généralement considérés comme les déterminants les plus importants (Hennequin, Cancer Radiother 2008) :

- Il a été montré que les **cellules souches tumorales sont plus radiorésistantes** que les cellules tumorales. Une radiorésistance élevée des cellules souches tumorales pourrait être liée à une meilleure efficacité de la réparation des lésions radio-induites ou au fait que les cellules souches tumorales soient le plus souvent au repos.
- Les tumeurs présentant une cinétique de prolifération élevée sont plus radiosensibles.
- La radiosensibilité intrinsèque des cellules tumorales est déterminée par les capacités de réparation des lésions de l'ADN qui dépendent de l'intégrité des systèmes de détection et de réparation des lésions de l'ADN tels PARP-1, XRCC1, ATM, p53, le complexe MRN ou BRCA1.
- La radiosensibilité intrinsèque est également modulée par les propriétés du stroma environnant, en particulier par l'oxygénation tumorale (Garcia-Barros, Science 2003). La réponse tumorale à la radiothérapie est influencée par de nombreux facteurs biologiques tumoraux intracellulaires mais également par le micro-environnement tumoral : la matrice extracellulaire et ses composants, l'angiogenèse tumorale.

➤ Influence du débit de dose

Les débits de dose se divisent en trois catégories : le bas débit de dose qui délivre jusqu'à 2 Gy/h, le moyen débit de dose qui délivre de 2 à 12 Gy/h et le haut débit de dose qui délivre plus de 12 Gy/h (rapport 38 de l'ICRU).

L'effet bénéfique du fractionnement, en termes de rapport efficacité/toxicité, peut être étendu radiobiologiquement au débit de dose, un **faible débit protégeant mieux la plupart des tissus sains que les tumeurs** (Cosset, Cancer Radiother 2005).

1.2.7. Grandeurs et unités

L'activité d'un radioélément varie en sens inverse de sa durée de vie. Elle est d'autant plus faible que sa période est longue. L'unité de l'activité est le becquerel (Bq). Un becquerel représente une désintégration par seconde. C'est une unité très petite, adaptée à l'échelle de l'atome.

Un gray (Gy) représente l'énergie absorbée par un milieu homogène d'une masse d'un kilogramme lorsqu'il est exposé à un rayonnement ionisant apportant une énergie d'un joule (1 Gy = 1 J/kg).

La dose absorbée D_T est la quantité d'énergie déposée par masse de tissu, elle exprimée en grays. Le gray est notamment utilisé pour apprécier les effets déterministes de fortes irradiations.

La dose équivalente H_T permet de mesurer l'impact sur les tissus biologiques des rayonnements ionisants. Elle se définit comme la dose absorbée corrigée d'un facteur de pondération du rayonnement (W_R) qui prend en compte sa dangerosité relative (Tableau 2). Elle s'exprime en sievert (Sv). Un sievert correspond à un joule par kilogramme. La formule de la dose équivalente est :

$$H_T = \sum W_R D_{T,R}$$

Type de rayonnement	Facteur de pondération radiologique W_R
Photons	1
Electrons	1
Neutrons	Voir figure 11
Protons	2
Particules alpha	20

Tableau 2 : Facteurs de pondération radiologique W_R (ICRP 2007).

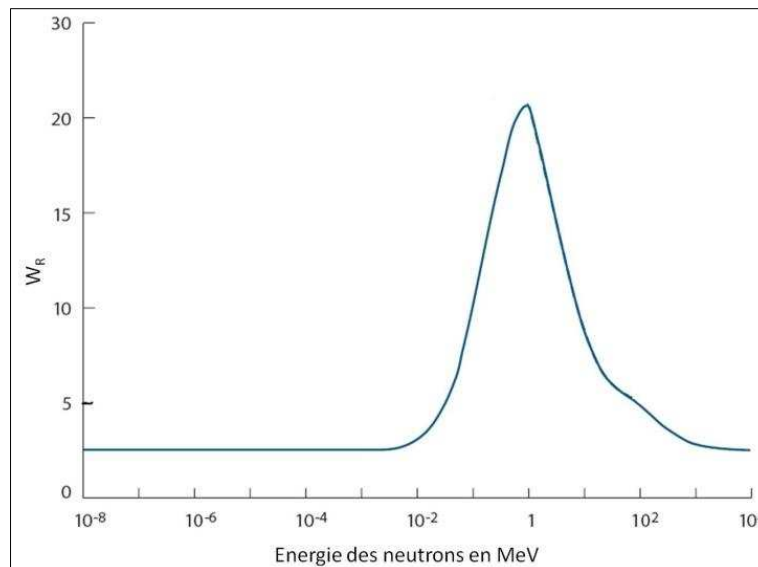


Figure 11 : Facteur de pondération radiologique (W_R) des neutrons (ICRP 2007).

La dose équivalente pondérée par un facteur de sensibilité des tissus (W_T) permet d'obtenir la dose efficace E . Elle est également exprimée en sieverts. La dose efficace est la somme des produits des doses équivalentes H_T délivrées à tous les tissus/organes (T) du corps et des facteurs de pondération tissulaire W_T correspondants (Tableau 3). On a :

$$E = \sum W_T H_T$$

La dose efficace n'est pas véritablement une dose, c'est une grandeur utilisée en radioprotection pour prédire les risques stochastiques, c'est-à-dire les risques de développer à moyen ou long terme un cancer lié à une faible irradiation ou à une irradiation chronique. Elle n'a de sens que pour une irradiation corps entier à faible dose (ou d'une grande partie du corps).

Tissu/Organe	Facteur de pondération tissulaire, W_T
Moelle osseuse	0,12
Colon	0,12
Poumons	0,12
Estomac	0,12
Seins	0,08
Gonades	0,08
Vessie	0,04
Foie	0,04
Œsophage	0,04
Thyroïde	0,04
Peau	0,01
Surface osseuse	0,01
Glandes salivaires	0,01
Cerveau	0,01
Autres*	0,12
Total	1,00

Tableau 3 : Facteurs de pondération tissulaires, W_T (ICRP 2007). * : Surrénales, reins, vésicules biliaires, pancréas, intestin grêle, rate, cœur, région extra-thoracique, ganglions lymphatiques, muscle, muqueuse buccale, thymus, utérus, prostate.

Nous venons de voir le contexte dans lequel s'applique la radiothérapie interne vectorisée, nous allons maintenant en définir les différentes caractéristiques.

2. Définition de la radiothérapie interne vectorisée (RIV)

Cette modalité thérapeutique consiste à irradier des **cibles tumorales de petite taille** et disséminées dans l'organisme au moyen de médicaments radioactifs. La RIV est un **traitement systémique qui délivre une irradiation continue sur une période prolongée, à bas débit de dose.**

2.1. Cibles

Les cibles les plus pertinentes de ce type de traitement sont les **petites masses tumorales**. L'accumulation des radiopharmaceutiques est supérieure dans ces dernières et plus homogène, les cellules sont moins hypoxiques et donc plus radiosensibles (Ansquer, Hépatogastro 2007). Bien que certaines grosses tumeurs fixent des pourcentages élevés de radioactivité, l'efficacité thérapeutique est médiocre du fait d'une distribution hétérogène qui laisse des régions tumorales non irradiées.

La **maladie résiduelle** est typiquement une situation mettant en jeu de petites masses tumorales. Elle est ce qui reste de cellules tumorales lorsque le traitement a bien fonctionné. On peut considérer qu'il existe toujours une maladie résiduelle puisqu'on ne peut pas affirmer l'éradication totale des cellules malignes, toutes les techniques ayant des limites de sensibilité (Vuillez, Médecine nucléaire 2009). Il est probable qu'en dessous d'une certaine masse tumorale, l'organisme reprenne le contrôle des processus de transformation et que la tumeur ne soit plus une menace pour l'organisme. Même si la masse tumorale restante est faible, sa composition est très importante : l'efficacité à long terme des traitements varie selon qu'ils ont atteint ou non le compartiment des cellules souches.

Le problème de la maladie résiduelle est de connaître la limite en dessous de laquelle on peut considérer le risque de rechute comme très faible, voire nul. Cette limite justifie les traitements adjuvants ou de consolidation et correspond en pratique clinique à la décision d'arrêt ou de poursuite du traitement. C'est dans ce contexte que la RIV peut être un moyen thérapeutique adapté.

2.2. Paramètres à prendre en compte

La RIV est un traitement systémique qui peut agir à la fois sur la tumeur primitive et sur ses métastases, mais qui nécessite une **réention précoce, élevée et sélective du radiopharmaceutique par la tumeur** avec un temps de présence prolongé dans celle-ci.

Avec la RIV, on réalise une **irradiation à (très) faible débit de dose, hétérogène, continue, prolongée mais décroissante au cours du temps.**

Les caractéristiques physiques du radionucléide (période, type d'émission et énergie) et les caractéristiques biologiques du vecteur (biodistribution et cinétique d'élimination) conditionnent l'efficacité thérapeutique anti-tumorale du radiopharmaceutique (Rao, J Nucl Med 1993). La période effective combine la période physique du radionucléide et la période biologique du radiopharmaceutique, elle dépend en partie de l'isotope utilisé et l'irradiation interne peut donc durer de quelques heures à quelques semaines. La période biologique varie pour chaque organe en fonction de son métabolisme. La période effective du radiopharmaceutique doit être longue dans la tumeur et courte dans les tissus normaux.

Les rapports d'activité dans la tumeur par rapport aux tissus normaux (muscles par exemple) doivent être les plus élevés possibles. Idéalement, le radionucléide utilisé doit avoir une demi-vie 1,5 à 3 fois plus longue que le temps nécessaire à la molécule vectrice pour atteindre la valeur maximale du rapport tumeur/tissus normaux (Yorke, Int J Rad Appl Instrum B 1991).

Le choix du radionucléide utilisé dépend également du mode de production et des paramètres biologiques relatifs à l'utilisation (facilité de marquage, fixation, biodistribution, élimination et coût).

Nous avons défini la RIV et les paramètres à prendre en compte pour son utilisation, nous allons maintenant voir quels types de vecteurs sont utilisés pour cibler les tumeurs.

3. Différents vecteurs

Le vecteur peut être le **radionucléide lui-même**, un **analogue métabolique**, un **anticorps monoclonal** ou un **peptide**.

3.1. Radionucléides et analogues métaboliques

Des radionucléides comme l'iode-131 et le phosphore-32 possèdent la propriété de s'intégrer au métabolisme de certaines cellules. Ils peuvent être utilisés directement sans vecteur.

La radiothérapie métabolique est née dans les années 1950 avec le traitement du cancer différencié de la thyroïde par l'iode-131. Plus de 90% des foyers résiduels post thyroïdectomie de ce type de cancer sont depuis traités avec succès par cette méthode. Cette efficacité est liée à la propriété spécifique de fixation de l'iode par les tissus thyroïdiens. La thyroïde étant le seul tissu humain à fixer aussi spécifiquement un radionucléide, il aura fallu de nombreuses années de recherches avant que la RIV ne rencontre d'autres succès dans le traitement des cancers.

Le phosphore-32 est incorporé directement dans l'ADN des cellules à prolifération rapide. Il était utilisé depuis 1936 pour le traitement des pathologies myéloprolifératives telles que les polycythémies vraies et les thrombocythémies essentielles, mais son utilisation est de plus en plus rare.

Par la suite, des formes moléculaires plus complexes ont été développées. La méta-iodobenzylguanidine (mIBG) est une molécule dérivée de la guanéthidine, analogue de la noradrénaline, qui s'accumule sélectivement dans les organes qui contiennent des catécholamines (médullo-surrénale, paraganglions sympathiques, fibres nerveuses du système sympathique) et dans les tumeurs qui dérivent de ces organes (notamment phéochromocytomes, neuroblastomes et autres paragangliomes sympathiques, carcinomes médullaires thyroïdiens, tumeurs carcinoïdes). Depuis les années 80, la mIBG marquée à l'iode-131 est utilisée en RIV pour le traitement de ces tumeurs. Elle est également utilisée comme radiomarqueur pour le diagnostic, elle est alors marquée avec un iode-123. La sensibilité de l'examen diagnostique et par conséquent l'efficacité du traitement sont variables selon les pathologies (Sisson, Semin Nucl Med 2012). La sensibilité d'une scintigraphie à la mIBG marquée à l'¹²³I est d'environ 90 % pour le diagnostic des phéochromocytomes ou des neuroblastomes, 70 % pour celui des tumeurs carcinoïdes et des paragangliomes et 35 % pour celui du cancer médullaire de la thyroïde.

3.2. Anticorps

La radio-immunothérapie (RIT) est la modalité de la RIV qui obtient le plus de résultats cliniques actuellement. La RIT cible des tumeurs disséminées. Elle utilise des anticorps monoclonaux radiomarqués ciblant des antigènes tumoraux ou du microenvironnement tumoral. De nombreux antigènes spécifiques de tumeurs solides ou hématologiques ont été identifiés comme des cibles possibles de RIT.

Jusqu'à présent les meilleurs résultats cliniques sont obtenus avec deux anticorps marqués, l'un avec l'iode-131, l'autre avec l'yttrium-90, tous deux ciblant l'antigène CD20 et le lymphome malin non hodgkinien. Il s'agit du ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®; Cell Therapeutics Inc., Seattle, USA) et du ¹³¹I-tositumomab (Bexxar®; GlaxoSmithKline LLC, Delaware, USA). Tous deux ont reçu l'autorisation de mise sur le marché de la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis, en 2002 et 2003 respectivement.

Depuis, pour le traitement des tumeurs solides, un seul anticorps radioactif a réussi à progresser au-delà de la phase II des essais cliniques. Il s'agit du ⁹⁰Y-pentumomab, anticorps monoclonal murin dirigé contre la protéine HMFG1 exprimée dans plus de 90% des adénocarcinomes dont les cancers ovariens. Mais cet anticorps a échoué à prouver son efficacité en terme d'amélioration de la survie au cours de cette phase III (Verheijen, J Clin Oncol 2006 ; Oei, Int J Cancer 2007). Il existe néanmoins de nombreux anticorps à l'étude pour le traitement des leucémies, des cancers colorectaux, pancréatiques, ovariens, de la prostate, du poumon, du sein, ou encore des cancers médullaires de la thyroïde.

Les difficultés rencontrées pour le traitement des tumeurs solides par la RIT s'expliquent par le fait que les tumeurs solides sont moins sensibles que les lymphomes aux rayonnements ionisants et qu'elles nécessitent la mise en place de stratégies thérapeutiques plus sophistiquées (Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011). Par exemple, des techniques de préciblage à l'étude améliorent la qualité du ciblage et les résultats obtenus en RIT (Barbet, Med Sci 2009). Ce concept repose sur la dissociation du ciblage par l'anticorps et l'irradiation par le radionucléide. Dans un premier temps, un anticorps dirigé contre l'antigène tumoral cible est injecté. Puis dans un second temps, une molécule spécifique de l'anticorps et portant la radioactivité est injectée. Cette dernière molécule doit être de petite taille afin de se distribuer rapidement vers la tumeur et être rapidement éliminée de la circulation. Entre ces deux injections, une étape d'élimination des anticorps circulants est effectuée grâce à l'injection

d'une molécule non radioactive spécifique de l'anticorps qui en plus de bloquer son site de fixation, accélère son élimination.

La toxicité médullaire, causée par les anticorps circulants est l'inconvénient principal de la RIT. La greffe de cellules souches hématopoïétiques est une solution efficace pour résoudre ce problème et peut en plus permettre d'augmenter les doses délivrées (Sharkey, J Nucl Med 2005 ; Devizzi, J Clin Oncol 2008).

3.3. Peptides

Les cellules tumorales surexpriment de nombreux récepteurs membranaires qui sont autant de cibles thérapeutiques. Les peptides, comme les hormones et les neurotransmetteurs, ont une grande affinité pour leurs récepteurs membranaires spécifiques, mais ont une courte demi-vie biologique et sont de ce fait inutilisables en clinique.

La synthèse de peptides analogues avec des demi-vies plus longues et pouvant être radiomarqués permet d'envisager leur utilisation en oncologie nucléaire.

De nombreux analogues de peptides sont ainsi à l'étude, comme la somatostatine, la bombésine, le peptide intestinal vasoactif (VIP pour « vasoactive intestinal peptide »), la gastrine, la neurotensine, l'exendine et les peptides contenant la séquence Arginine-Glycine-Acide aspartique ou peptides RGD (Fani, Theranostics 2012).

L'acronyme anglais PRRT pour « peptide receptor-mediated radionuclide therapy » n'a pas de réelle traduction en français. On peut parler de radio-peptide-thérapie par analogie avec la radio-immunothérapie (RIT).

➤ Avantages de la radio-peptide-thérapie

L'utilisation des radiopeptides procure de nombreux avantages par rapport aux protéines ou aux anticorps. **Leur petite taille leur permet de présenter une pharmacocinétique appropriée à leur utilisation en RIV.** Ils sont rapidement distribués au niveau de la tumeur et sont rapidement captés par le tissu tumoral. La fixation des radiopeptides sur leurs récepteurs entraînent souvent **l'internalisation du complexe**, ce qui permet d'obtenir une rétention intra-tumorale de longue durée et d'augmenter ainsi leur cytotoxicité (Mariani, J Nucl Med 2006). Les peptides peuvent être facilement synthétisés et modifiés à façon pour changer leurs caractéristiques biologiques telles que leurs demi-vies ou leurs voies d'élimination.

➤ Inconvénients de la radio-peptide-thérapie

L'un des principaux problèmes rencontrés avec l'utilisation des radiopeptides est leur **accumulation rénale** et donc leur potentielle néphrotoxicité (Valkema, J Nucl Med 2005 ; Imhof, J Clin Oncol 2011). Les cellules épithéliales du tube contourné proximal réabsorbent les protéines qui ont échappé à l'ultrafiltration glomérulaire. Les protéines ou les peptides sont internalisés au niveau du pôle apical de ces cellules par endocytose dans les lysosomes pour subir une digestion protéolytique. Les acides aminés chélatés avec des métaux radioactifs se retrouvent coincés dans ces cellules tubulaires augmentant ainsi la dose délivrée aux reins. Deux récepteurs multiligands qui permettent cette activité, la mégaline et la cubiline, sont responsables de la grande majorité de cette réabsorption (De Jong, J Nucl Med 2005).

Plusieurs méthodes permettent de réduire cette accumulation rénale comme la co-injection d'acides aminés positivement chargés, la lysine et l'arginine (Rolleman, EJNM 2003) ou l'administration de substituts plasmatiques tels que la gélofusine. Des études cliniques ont montré que la co-injection du traitement avec une combinaison de lysine et d'arginine pouvait réduire la captation rénale du radiopeptide de 20 à 47% (Teunissen, Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005). La toxicité se retrouve également au niveau de la moelle osseuse et dans une moindre mesure le foie.

Le peptide qui a été le plus utilisé à ce jour est la somatostatine (SST) qui a une demi-vie plasmatique de 2 à 3 minutes. L'analogue de la SST, le $^{111}\text{In-DTPA}^0$ -octreotide (^{111}In -OctreoScan, ^{111}In -pentetreotide) est le seul radiopeptide à avoir été approuvé par la FDA à ce jour. Il est indiqué pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines, des cancers du sein et des cancers du poumon à petites cellules. Il a une demi-vie biologique de 1,5 à 2h. Parmi les tumeurs neuroendocrines, les tumeurs gastroentéropancréatiques (GEP) sont celles qui ont la plus forte expression des récepteurs de la SST. Pour le traitement des tumeurs GEP, la radio-peptide-thérapie avec des analogues de la somatostatine marqués à l'yttrium-90 ou au lutétium-177 est relativement efficace avec jusqu'à 30% de réponses complètes et partielles chez les patients dans certaines études et de 23 à 81% de stabilisations de longues durées (Kaltsas, Endocr Relat Cancer 2005).

Le tableau présenté ci-dessous liste les principaux récepteurs qui sont surexprimés dans les tumeurs et qui sont des cibles potentielles pour la radio-peptide-thérapie (Tableau 4). De nombreuses études précliniques et cliniques sont en cours pour l'étude de ces différents

peptides (Fani, Theranostics 2012), la majorité concerne **l'utilisation diagnostique** de ces radiopeptides.

Peptide	Récepteurs	Tumeurs ciblées
Somatostatine	sst ₁ , sst₂ , sst ₃ , sst ₄ , sst ₅	TNE (GEP), lymphomes, paragangliomes, tumeurs carcinoïdes, sein, cerveau, reins, poumon à petites cellules, médullaire de la thyroïde
Bombésine/GRP	BB ₁ (NMB-R), BB₂ (GRP-R) , BB ₃ , BB ₄	Prostate, sein, pancréas, estomac, colon/rectum, poumon à petites cellules
VIP	VPAC₁ , VPAC ₂	Adénocarcinomes du sein, prostate, estomac et foie, TNE
α-M2	α-M2-R	Cancer du sein
α-MSH	MC1-5R	Mélanomes
CCK/Gastrine	CCK ₁ , CCK₂	Cancer médullaire de la thyroïde, poumon à petites cellules, stroma gastrointestinal, astrocytomes
Neurotensine	NTR₁ , NTR ₂ , NTR ₃	Poumon à petites cellules, colon, cancer exocrine ductal du pancréas, sarcome d'Ewing, méningiome, astrocytome, sein, prostate
LHRH	LHRH-R	Prostate, cancer du sein
Substance P	NK₁ , NK ₂ , NK ₃	Glioblastomes, cancer médullaire de la thyroïde, pancréas, sein, poumon à petites cellules
Exendine	GLP-1	Insulinomes, Gastrinomes, phéochromocytomes, paragangliomes, cancer médullaire de la thyroïde
RGD	Intégrine αvβ3	Gliomes, sein, prostate, etc

Tableau 4 : Liste des principaux peptides étudiés en oncologie et leurs récepteurs. En gras, sont mentionnés les principaux récepteurs surexprimés dans les tumeurs. D'après Fani, Theranostics 2012.

Après avoir passé en revue les différents vecteurs qui existent pour cibler spécifiquement la tumeur et notamment les peptides, qui sont au centre de notre intérêt, nous allons maintenant voir quels sont les différents radionucléides que l'on peut leur associer.

4. Différents radioéléments

Les émetteurs β^- sont les radionucléides les plus employés en RIV (Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011) notamment l'iode-131 et l'yttrium-90. Les émetteurs β^- avec leur TEL faible provoquent des lésions éparses qui sont plus facilement réparables par les cellules que celles induites par les rayons α et les électrons Auger. Ces derniers présentent des TEL et une cytotoxicité associée beaucoup plus élevés. De plus, les rayonnements β^- ont un parcours plus long, ce qui est à la fois un avantage et un inconvénient puisqu'ils induisent de ce fait une certaine toxicité au niveau de la moelle osseuse. Cependant ce sont eux qui sont les plus utilisés en radiothérapie interne vectorisée. En effet, **les applications médicales des particules α et des électrons Auger sont limitées par les caractéristiques radiophysiques des radionucléides disponibles.**

En ce qui concerne les émetteurs α , une étude clinique de phase III dans le traitement du cancer de la prostate résistant au traitement hormonal et les métastases osseuses associées montre l'efficacité du chlorure de radium-223 (Alpharadin®) qui permet d'augmenter le temps de survie globale des patients de presque 3 mois par rapport aux 11 mois du groupe placebo (Vengalil, Curr Opin Support Palliat Care 2012). Le radium-223 (^{223}Ra) a une demi-vie de 11,43 jours et une énergie maximale de 5,56 MeV. Le radium présente des similitudes avec le calcium : il tend à se fixer sur les zones de fort renouvellement osseux, ce qui est le cas des métastases des cancers de la prostate.

Plusieurs émetteurs α sont testés en RIT au niveau préclinique, notamment l'astate-211, les bismuth-212 et 213 et l'actinium-225 (Couturier, EJNM 2005). Mais les émetteurs α disponibles comme l'astate-211 et le bismuth-213 ont des périodes physiques courtes (respectivement 7 h et 40 min) qui imposent un radiomarquage rapide et une distribution également rapide du radiopharmaceutique après son injection intraveineuse dans les cibles tumorales (Pèlerin, Bulletin du cancer 2000). **En pratique, la période physique des émetteurs α est souvent plus courte que le délai de captation tumorale** des anticorps. L'alpha-immunothérapie est donc actuellement limitée aux cancers hématologiques de petite taille comme les leucémies, dont les cibles tumorales sont circulantes ou dans la moelle osseuse et donc rapidement accessibles aux anticorps marqués au bismuth 213. Le myélome multiple est également une cible clinique bien adaptée à l'alpha-immunothérapie.

Les électrons Auger quant à eux sont également peu utilisés car leur parcours est tellement court qu'ils doivent être délivrés directement au niveau du noyau des cellules ciblées (Rao, J

Nucl Med 1993). Plusieurs émetteurs d'électrons Auger ont été testés en RIV au niveau préclinique, notamment l'iode-125, l'indium-111 et le gallium-67.

Les différents radioéléments utilisés en RIV sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Isotopes	T _{1/2} (heures)	E max (keV)	Parcours max (µm)	Emissions associées	Vecteurs	Avantages	Inconvénients	
Emetteurs bêta								
⁹⁰ Y	64,1	2284	11300	NS	peptides, anticorps, microsphères	commercial	énergie élevée, pas de rayonnement γ	
¹³¹ I	193	606	2300	γ	seul, anticorps, lipiodol	faible coût, énergie faible, demi-vie longue	γ de haute énergie, instabilité du marquage si internalisation	
¹⁷⁷ Lu	161	497	1800	γ, X, Auger	peptides, anticorps	énergie faible, demi-vie longue, imagerie γ		
⁶⁷ Cu	61,9	575	2100	γ, X, Auger	peptides, anticorps	énergie faible, demi-vie intermédiaire, métabolisme favorable	très difficile à produire (cyclotron de haute énergie et de haute intensité)	
¹⁸⁸ Re	17	2120	10400	γ, X, Auger	anticorps, lipiodol	disponible sous forme de générateur, imagerie γ	énergie élevée, chimie complexe, demi-vie courte	
Emetteurs d'électrons Auger								
¹²⁵ I	1442,4 (60,1 j)	31	20	γ, CI, X	anticorps, peptides	imagerie γ	demi-vie très longue	
¹¹¹ In	67,3	26	17	γ, CI, X	anticorps, peptides	imagerie γ		
⁶⁷ Ga	78,3	10	3	γ, CI, X	anticorps	imagerie γ	parcours très court	
¹²³ I	13,3	31	20	γ, CI, X	anticorps			
^{195m} Pt	96,5	64	76	γ, CI, X	anticorps		pas d'imagerie γ	
Emetteurs alpha								
Isotopes	Isotopes fils	T _{1/2}	E max (keV)	Parcours max (µm)	Emissions associées	Vecteurs	Avantages	Inconvénients
²²⁵ Ac	-	240 h	5830	48	γ, X, Auger	anticorps	imagerie γ (²²¹ Fr et ²¹³ Bi)	
	²²¹ Fr	4,9 min	6341	55	α, γ, Auger			
	²¹⁷ At	32 ms	7069	65	α			
	²¹³ Bi	45,6 min	5870	48	α, γ, X, Auger, β ⁺			
²¹¹ At	²¹³ Po	4,2 µs	8377	85	NS	anticorps	imagerie γ, demi-vie assez longue	disponibilité, chimie de marquage, instabilité du marquage
	-	7,2 h	5867	48	γ, X, Auger			
	²¹¹ Po	516 ms	7450	70	NS			
²¹³ Bi	-	45,6 min	5870	48	α, γ, X, Auger, β ⁺	anticorps	imagerie γ, disponible sous forme de	demi-vie très courte
	²¹³ Po	4,2 µs	8377	85	NS			
²¹² Bi	-	1 h	6051	51	α, γ, X, Auger, β ⁻	anticorps	imagerie γ	demi-vie très courte
	²¹² Po	0,3 µs	8785	92	NS			

Tableau 5 : Principaux radionucléides utilisés en radiothérapie interne vectorisée. CI : Electrons de conversion interne. *D'après Barbet, Medecine Sciences 2009 et Pouget, Nat Rev Clin Oncol 2011.*

Au cours de cette première partie, nous avons défini la place de la radiothérapie interne vectorisée dans le traitement du cancer, son intérêt et ses effets biologiques. Nous avons également focalisé notre attention sur les avantages de la radio-peptide-thérapie. Maintenant que nous avons une idée précise du contexte dans lequel se placent ces travaux de thèse, nous allons nous intéresser à la cible choisie, l'intégrine $\alpha\beta3$ ainsi qu'au vecteur dont nous disposons, le RAFT-RGD.

C. Intérêt de l'intégrine $\alpha\beta3$ comme cible

1. Les intégrines

1.1. Structure et fonctions

Les intégrines sont les **principaux récepteurs d'adhésion cellulaire**. Elles jouent un rôle central dans le **support** des infrastructures complexes formées par les cellules et dans la **communication** des cellules avec leur environnement.

1.1.1. Une famille de récepteurs

Les intégrines représentent une famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques. Ces récepteurs sont présents depuis très longtemps dans l'histoire de l'évolution chez tous les métazoaires, mais pas chez les procaryotes, les plantes, ni les champignons.

Cette famille de **glycoprotéines** est composée de **18 sous-unités α et 8 sous-unités β** liées de façon non covalente, formant **24 couples** (Hynes, Cell 2002). Chaque sous-unité α ou β est constituée d'un important domaine extracellulaire (entre 750 et 1000 acides aminés), d'un seul domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique (entre 20 et 50 acides aminés, sauf pour $\beta4$ qui a un domaine cytoplasmique de 1088 acides aminés).

Leur famille est subdivisée en 4 groupes ayant des ligands différents ou exprimés par des cellules particulières (Figure 12) :

- Une partie d'entre eux reconnaît la **séquence d'acides aminés RGD** (R : Arginine, G : Glycine, D : Acide aspartique) présente sur des molécules de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine ou la vitronectine.
- Une autre partie des intégrines se fixe aux laminines de la lame basale.
- D'autres intégrines, comme le groupe des récepteurs du collagène, sont capables de se lier à la fois aux protéines de la matrice extracellulaire et à des membres de la superfamille des immunoglobulines comme VCAM-1.
- Les vertébrés ont également un groupe d'intégrines qui sont spécifiquement exprimées par les leucocytes et qui reconnaissent également des immunoglobulines spécifiques, participant ainsi à l'adhésion cellulaire hétérotopique.

La spécificité du ligand est portée par les deux sous-unités d'une intégrine donnée (Xiong, Science 2002). Il semble que chaque intégrine ait une fonction spécifique, non redondante.

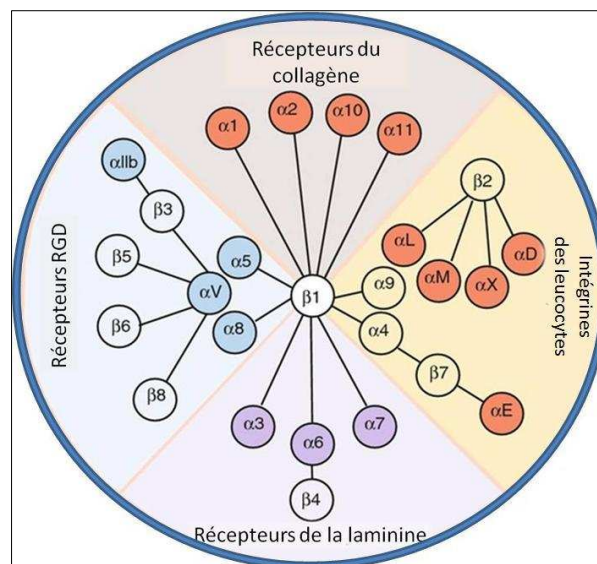


Figure 12 : La famille des intégrines : les différents couples possibles. Adapté d'après Barczyk, Cell and Tissue Research 2010.

1.1.2. Fonctions des intégrines

Les intégrines jouent un rôle dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, et dans l'adhésion intercellulaire. A travers ces phénomènes d'adhésion, les intégrines font également partie de voies de signalisation cellulaire.

➤ Adhésion des cellules à la matrice extracellulaire

Les cellules animales possèdent une matrice extracellulaire (MEC) élaborée en réseau principalement composé des glycoprotéines qu'elles sécrètent (Figure 13). La MEC joue un rôle dans le soutien structural, l'adhérence et la régulation de la cellule ; des fibres de collagène y traversent un réseau de protéoglycanes fixés à de longs polysaccharides. D'autres glycoprotéines, les plus connues étant les fibronectines, concourent à fixer les cellules à la matrice extracellulaire.

Les composants de la matrice, tels que la fibronectine, la vitronectine, le collagène et la laminine, se lient aux intégrines, enchâssés dans la membrane plasmique.

Du côté cytoplasmique, les intégrines sont attachées aux protéines du cytosquelette. La plupart des intégrines d'adhésion à la MEC se lient aux microfilaments d'actine du cytosquelette par l'intermédiaire de protéines comme la taline, la paxilline, l' α -actinine, la tensine et la vinculine. D'autres intégrines se lient aux filaments intermédiaires, comme β 4 dont la partie cytoplasmique est plus longue (Campbell et Reece, « Biologie » 2^{ème} édition, De Boeck).

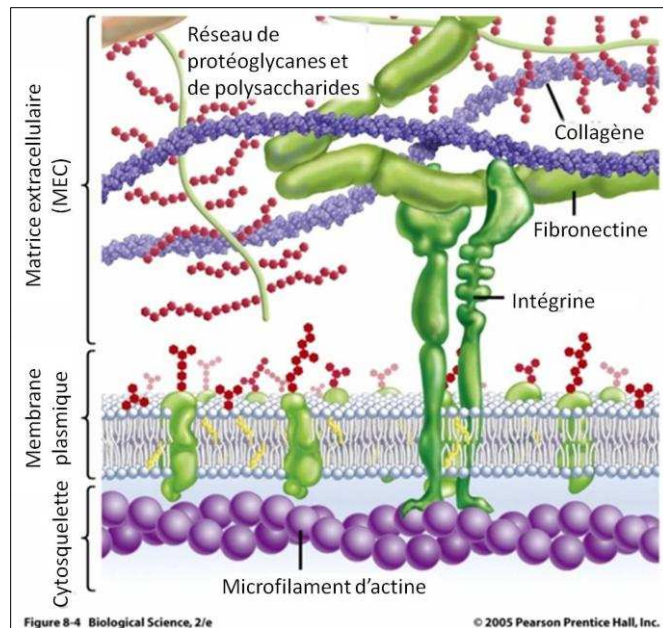


Figure 13 : Vue schématique des différents constituants de la matrice extracellulaire. Adapté d'après Freeman, « Biological Science », 2005.

➤ Adhésion entre cellules

D'autres intégrines ont des fonctions plus spécialisées. Par exemple, les leucocytes présentent des intégrines spécifiques, $\alpha L\beta 2$, qui leur permettent notamment de s'attacher aux cellules endothéliales lors de la phase de migration transendothéliale pour rejoindre les sites d'inflammation. Les plaquettes présentent également des intégrines spécifiques, $\alpha IIb\beta 3$, se liant au fibrinogène, au facteur von Willebrand et à la fibronectine, leur permettant ainsi de jouer leur rôle au cours de l'hémostase primaire (Hynes, Cell 2002).

➤ Signalisation bidirectionnelle

Les intégrines n'ont **pas d'activité enzymatique**. C'est leur fixation à des molécules intracellulaires adaptatrices qui met en route la signalisation cellulaire.

Les intégrines ne sont pas toujours dans un état actif. Leur activation se fait par :

- Un **changement conformationnel** qui leur permet en se dépliant de passer dans l'état actif.

Les intégrines peuvent être activées soit par la fixation de leur ligand au niveau extracellulaire, soit par la fixation de protéines sur leur partie cytoplasmique qui, en écartant les deux sous-unités, induit le changement conformationnel (Figure 14).

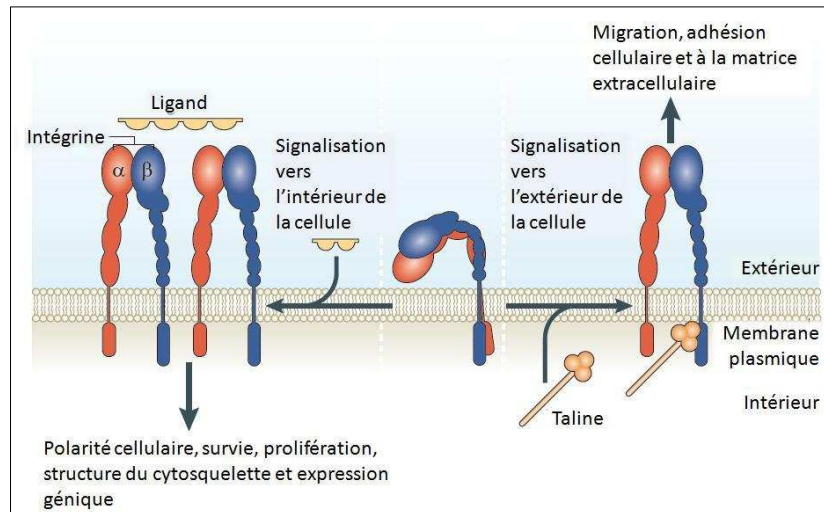


Figure 14 : *Vue schématique de la signalisation bidirectionnelle par l'intermédiaire des intégrines.* Adapté d'après Shattil, Nat Rev Mol Cell Biol 2010.

- Leur activation passe également par **leur regroupement** dans la membrane. Ce regroupement entraîne le recrutement et l'activation de protéines intracellulaires avec une activité kinase comme les **FAKs** (« Focal Adhesion Kinases ») ou les **SFKs** (« Src Family Kinases »). Les intégrines sont ainsi responsables de l'activation en cascade des différentes voies de signalisation NF- κ B (Courter, J Biol Chem 2005 ; Scatena, J Cell Biol 1998), PI3/Akt (Aoudjit, Oncogene 2001), Src (Ricono, Cancer Res 2009) et ras/MAPK (Dolfi, PNAS 1998 ; Miyamoto, J Cell Biol 1996) (Figure 15).

L'activation des intégrines permet de moduler de nombreux aspects du comportement cellulaire dont la prolifération, la survie et l'apoptose, la forme, la polarité, l'expression génique et la différenciation.

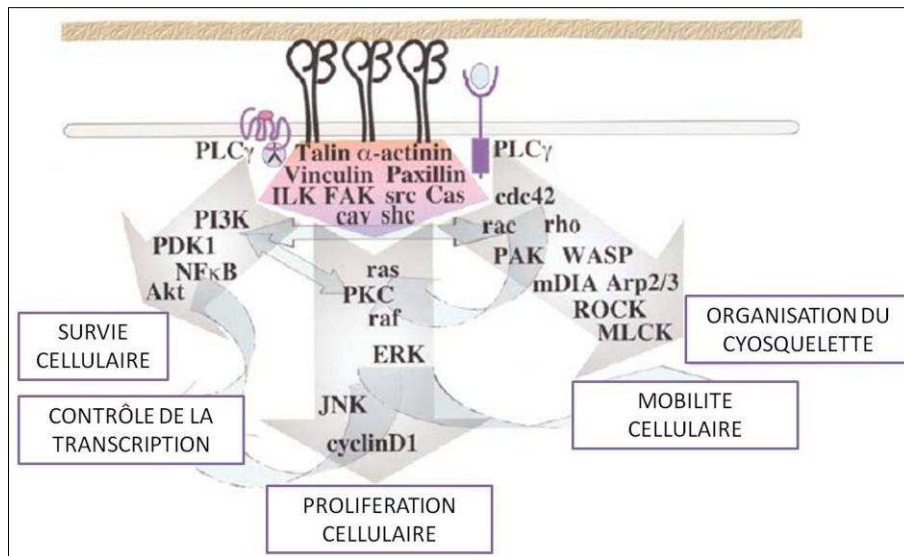


Figure 15 : Principales voies de signalisation des intégrines et acteurs majeurs. Adapté d'après Hynes, Cell 2002.

Les intégrines et leurs ligands jouent des rôles clés dans le développement, la réponse immunitaire, le trafic leucocytaire, l'hémostase et sont au cœur de nombreuses maladies humaines telles que le cancer, l'athérombose, certaines maladies génétiques et auto-immunes (Hynes, Cell 2002).

1.2. Intégrines et cancer

Les intégrines sont généralement profondément impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses, leur survie, la migration et l'invasion tissulaire (Desgrosellier, Nature Rev Cancer 2010 ; Assoian, Trends Cell Biol 2008 ; Streuli, Biochem 2009).

Comme la plupart des cancers solides sont issus de tissus épithéliaux, les intégrines exprimées par les cellules épithéliales ($\alpha6\beta4$, $\alpha6\beta1$, $\alpha v\beta5$, $\alpha2\beta1$ ou $\alpha3\beta1$) sont généralement conservées par les tumeurs, avec des niveaux d'expression qui peuvent être altérés. Les intégrines $\alpha v\beta3$, $\alpha5\beta1$ et $\alpha v\beta6$ sont quant à elles **très faiblement exprimées dans la grande majorité des épithéliums** à l'âge adulte et peuvent être surexprimées dans les tumeurs. L'expression de l'intégrine $\alpha2\beta1$ est diminuée dans les cellules tumorales et pourrait donc être considérée comme un suppresseur de tumeur.

Dans de nombreux types de tumeurs, l'expression de certaines intégrines est associée à la **progression de la maladie** et à la **diminution de la survie** des patients (Tableau 6). Les intégrines $\alpha\nu\beta 3$, $\alpha\nu\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha\nu\beta 6$ sont les intégrines les plus étudiées dans les recherches contre le cancer.

Types de tumeur	Intégrines exprimées	Phénotypes associés
Mélanome	$\alpha\nu\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$	Croissance tumorale explosive et métastases ganglionnaires
Cancer du sein	$\alpha\nu\beta 3$ et $\alpha 6\beta 4$	Augmentation de la taille tumorale et du grade, diminution de la survie ($\alpha 6\beta 4$) et augmentation des métastases osseuses ($\alpha\nu\beta 3$)
Cancer de la prostate	$\alpha\nu\beta 3$	Augmentation des métastases osseuses
Cancer du pancréas	$\alpha\nu\beta 3$	Métastases ganglionnaires
Cancer des ovaires	$\alpha\nu\beta 3$ et $\alpha 4\beta 1$	Augmentation des métastases péritonéales ($\alpha 4\beta 1$) et prolifération tumorale ($\alpha\nu\beta 3$)
Cancer du col de l'utérus	$\alpha\nu\beta 3$ et $\alpha\nu\beta 6$	Diminution de la survie des patientes
Glioblastome	$\alpha\nu\beta 3$ et $\alpha\nu\beta 5$	Invasion tissulaire
Cancer du poumon non à petites cellules	$\alpha 5\beta 1$	Diminution de la survie des patients sans métastases ganglionnaires
Cancer du colon	$\alpha\nu\beta 6$	Diminution de la survie des patients

Tableau 6 : Le rôle des intégrines dans la progression de certains cancers. *Adapté d'après Desgrosellier, Nat Rev Cancer 2010.*

Dans les cancers, les intégrines sont généralement exprimées de manière aberrante plutôt que présentes sous des formes mutées activées. Cette expression aberrante des intégrines participe à la tumorigenèse en activant des voies de signalisation qui conduisent à l'inhibition de l'apoptose, à la prolifération cellulaire, au remodelage de la MEC, à la migration et à l'angiogenèse (Cabodi, Nature Rev Cancer 2010).

En plus des cellules tumorales, les intégrines sont souvent exprimées par les cellules du microenvironnement tumoral, telles que les cellules de l'endothélium vasculaire, les péricytes, les fibroblastes, les cellules dérivées de la moelle osseuse et les plaquettes. Les intégrines jouent un rôle dans la contribution de ces différents types cellulaires à la progression du cancer (Desgrosellier, Nat Med 2009).

Les intégrines sont également nécessaires à la migration cellulaire, l'invasion tissulaire et aux métastases (Brakebusch, Cancer Metastasis Rev 2005 ; Christofori, Nature 2006). Par l'adhésion à la matrice extracellulaire, les intégrines fournissent les points d'ancrage nécessaires à la traction et au déplacement des cellules. Le remodelage de la MEC nécessaire à l'invasion tissulaire est contrôlé par les intégrines qui régulent la localisation et l'activité des protéases.

Les voies de signalisation activées par les intégrines sont aussi impliquées dans la résistance à la chimiothérapie et aux radiations ionisantes *in vitro* (Nam, Int J Radiat Biol 2009), ce qui laisse présager d'une fonction similaire *in vivo*.

Les intégrines et les molécules des voies de signalisation qu'elles déclenchent sont essentielles pour le développement tumoral et sont des cibles pertinentes pour le traitement du cancer.

L'intégrine $\alpha\beta3$ est en tête de liste des intégrines impliquées en oncogénèse, c'est pourquoi nous l'avons choisie comme cible.

2. L'intégrine $\alpha\beta3$

2.1. Généralités

L'intégrine $\alpha\beta3$, également connue sous le nom de **récepteur de la vitronectine**, est constituée d'une sous-unité α (CD51) de 125 kDa et d'une sous-unité $\beta3$ (CD61) de 105 kDa.

L'intégrine $\alpha\beta3$ se fixe à de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire contenant le motif RGD dont la fibronectine, le fibrinogène, le facteur von Willebrand, la vitronectine et

les formes protéolysées du collagène et de la laminine. En comparaison, d'autres intégrines n'ont qu'un seul ligand extracellulaire, comme l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ qui ne se lie qu'à la fibronectine.

L'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ est au centre de nombreuses recherches car elle joue un rôle majeur dans plusieurs processus tels que la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes, l'angiogenèse, la néovascularisation pathologique et le processus métastatique.

La structure cristallographique de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$, présentée dans la figure ci-dessous (Figure 16), a été dévoilée en 2001 (Xiong, Science 2001).

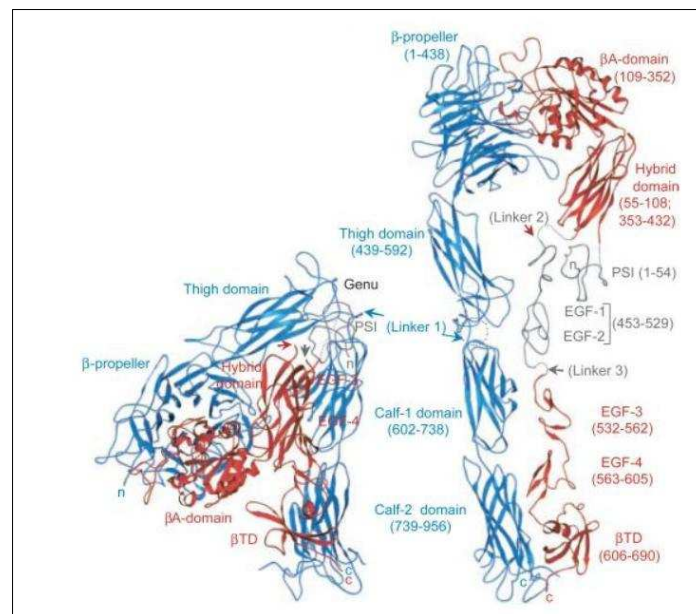


Figure 16 : Structure cristallographique de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$. A gauche, la forme repliée inactive et à droite la forme dépliée activée. Xiong, Science 2001.

2.2. Molécules associées à l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$

L'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ a plusieurs fonctions qui correspondent à son association avec différentes protéines de la MEC (ses ligands) et d'autres protéines membranaires ou intracellulaires.

- Les protéines de la matrice extracellulaire qui peuvent se fixer à l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ sont la vitronectine, la fibronectine, l'ostéopontine, la périostine, le fibrinogène, la

thrombospondine, des formes protéolysées du collagène et de la laminine et le facteur von Willebrand.

Ces différentes protéines de la MEC se fixent à l'intégrine $\alpha\beta3$ par le biais de la séquence RGD qu'elles contiennent.

La cristallographie par rayons X a permis de mettre en évidence les interactions électrostatiques entre le peptide RGD et l'intégrine $\alpha\beta3$ (Figure 17). L'arginine, R, interagit avec deux acides aspartiques de la sous-unité α chargés négativement. L'acide aspartique, D, interagit avec un cation métallique divalent sur le site MIDAS (« Metal ion-dependent adhesion site ») de la sous-unité β et la glycine, G, par son encombrement, permet un contact rapproché entre le peptide et l'intégrine (Xiong, Science 2002).

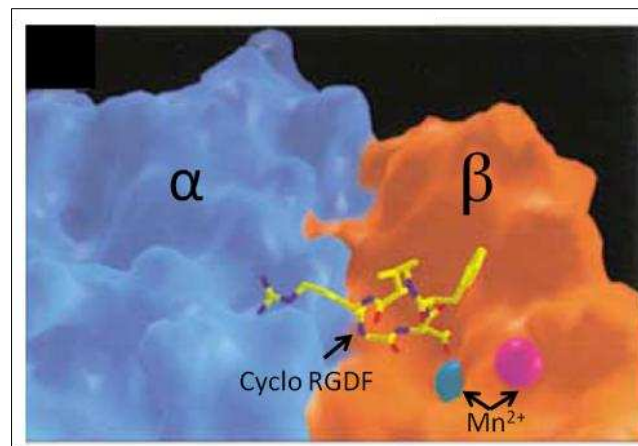


Figure 17 : Représentation de la fixation d'un peptide cyclo-RGDF à l'interface entre les sous-unités α et β d'une intégrine. Adapté d'après Xiong, Science 2002.

- Au niveau membranaire, l'intégrine $\alpha\beta3$ interagit physiquement avec le VEGF-R2, la protéine associée CD47 (une IAP, pour « Integrin associated protein »), la MT1-MMP et la MMP-2 (Wilder, Ann Rheum Dis 2002).

L'intégrine $\alpha\beta3$ contrôle la localisation et le regroupement de ces récepteurs et régule ainsi leur fonction. L'association d' $\alpha\beta3$ avec ces différentes molécules de surface est modulée par la fixation d' $\alpha\beta3$ avec ses divers ligands.

- Au niveau intracellulaire, l'intégrine $\alpha\beta3$ interagit avec de nombreuses molécules de signalisation cellulaire dont la paxilline, la FAK et la caspase 8 (Pfaff, J Cell Science 2001; Stupack, J Cell Biol 2001).

2.3. Localisation

L'intégrine $\alpha\beta3$ présente une distribution tissulaire assez limitée :

- elle est **exprimée faiblement dans la plupart des tissus**,
- les hauts niveaux d'expression sont limités à certaines régions osseuses, l'endomètre au milieu du cycle menstruel, le placenta, les sites inflammatoires **et les tumeurs invasives**.

Les cellules qui surexpriment l'intégrine $\alpha\beta3$ sont (Eliceiri, Mol Med 1998):

- les ostéoclastes et les macrophages activés lors de la résorption osseuse,
- une petite fraction des neutrophiles,
- les **cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse**,
- les cellules musculaires lisses en migration
- et les **cellules de certains types de tumeurs invasives** dont les mélanomes, les gliomes, le cancer du sein, des ovaires et du pancréas (Pinon, Pigment Cell Melanoma Res 2011 ; Reardon, Expert Opin Drug Discov 2011 ; Lambert, ISRN oncol 2012 ; Matsuura, Cancer Sci 2010 ; Hosotani, Pancreas 2002).

Toutes les tumeurs de ces types de cancer n'expriment pas forcément $\alpha\beta3$.

Par exemple, environ 60 % des adénocarcinomes canauxaires du pancréas expriment $\alpha\beta3$, expression d'ailleurs corrélée avec une augmentation des métastases ganglionnaires (Hosotani, Pancreas 2002).

Les mélanomes ont la particularité de former des métastases dès les premiers stades de la maladie. L'expression d' $\alpha\beta3$ par les mélanomes initie leur phase de croissance explosive (Albelda, Cancer Res 1990 ; Hsu, Am J Pathol 1998).

Une recherche effectuée en avril 2012 concernant les 25 cancers les plus courants dans la base de données Pubmed sur internet indique qu'il peut y avoir une surexpression de l'intégrine $\alpha\beta3$ dans 12 de ces types de cancer. Il s'agit des cancers du colon/rectum, de l'estomac, du pancréas, du poumon, du sein, des ovaires, du col de l'utérus, du rein, de la prostate, les mélanomes, les glioblastomes et les myélomes.

2.4. Fonctions biologiques

La localisation de l'intégrine $\alpha\beta3$ et ses interactions avec les protéines de la MEC ainsi qu'avec diverses molécules membranaires et intracellulaires indiquent que l'intégrine $\alpha\beta3$ joue un rôle dans la croissance, la survie, la mobilité et la différenciation d'un nombre limité de types cellulaires.

L'intégrine $\alpha\beta3$ joue un rôle dans la **résorption osseuse médiée par les ostéoclastes** (Ross, J Clin Invest 2006), **l'inflammation** (Ward, Am J Respir Crit Care Med 2012), la **néovascularisation pathologique**, **l'angiogenèse**, la **tumorigenèse**, **l'invasion tissulaire** et la **formation de métastases** (Wilder, Ann Rheum Dis 2002).

L'intégrine $\alpha\beta3$ est au cœur de nombreuses pathologies humaines telles que le cancer, l'ostéoporose et l'arthrite rhumatoïde (Kumar, Curr Drug Targets 2003).

2.4.1. Angiogenèse

Le rôle de l'intégrine $\alpha\beta3$ dans l'angiogenèse n'est pas encore clairement élucidé.

- Rôle pro-angiogénique ?

En partant de l'observation initiale en 1994 de la **surexpression de l'intégrine $\alpha\beta3$ par les cellules endothéliales activées lors de la néoangiogenèse** (Brooks, Science 1994), l'équipe du Dr David Cheresh de l'institut de recherche du Scripps en Californie a testé des inhibiteurs de cette intégrine et de son homologue $\alpha\beta5$. De nombreux travaux, principalement conduit par cette équipe, ont montré que l'anticorps murin monoclonal LM609 dirigé contre $\alpha\beta3$ ainsi que de nombreux peptides contenant la séquence RGD bloquaient l'angiogenèse tumorale et rétinienne dans des modèles animaux (Brooks, Cell 1994 ; Brooks, J Clin Invest 1995 ; Friedlander, Science 1995 ; Friedlander, PNAS 1996 ; Hammes, Nature Med 1996). Ces différents travaux conduisirent à la théorie d'un rôle pro-angiogénique majeur des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$. C'est sur cette base qu'une version humanisée de l'anticorps anti- $\alpha\beta3$, le MEDI-522 ou Vitaxin, est entré en phase clinique (Gutheil, Clin Can Res 2000).

Bien que les études précliniques des inhibiteurs des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ prouvent leur certaine efficacité à réduire la croissance tumorale (Mitjans, Int J Cancer 2000 ; Buerkle, Br J

Cancer 2002 ; MacDonald, Neurosurgery 2001), les premiers résultats cliniques sont peu concluants en ce qui concerne leur effet anti-angiogénique (Tucker, Curr Oncol Rep 2006).

Le **Cilengitide**® (développé par Merck KGaA), un pentapeptide cyclique comprenant la séquence RGD, qui cible les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ et actuellement en phase III (premiers résultats en septembre 2012, fin de l'étude prévue en 2016) pour le traitement des glioblastomes (Reardon, Future Oncol 2011). L'ajout de Cilengitide® au traitement conventionnel (Temozolomide plus radiothérapie) ne rajoute que deux mois de survie globale (sur 14) au groupe de patient ainsi traité (Stupp, J Clin Oncol 2007).

De plus, une étude parue en 2009 dans Nature Medicine démontre qu'une faible dose d'inhibiteurs d' $\alpha\beta3$ (dont le Cilengitide) peut au contraire entraîner la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse induite par le VEGF (figure 19). Le mécanisme semble être lié à une modification de l'interaction entre $\alpha\beta3$ et VEGF-R2 induisant une sensibilité accrue des cellules endothéliales au VEGF (Reynolds, Nat Med 2009).

○ Rôle anti-angiogénique ?

Une série d'articles sur des souris génétiquement modifiées a également remis en doute le caractère pro-angiogénique des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, voire même le fait qu'elles soient indispensables lors de l'angiogenèse.

Le principal opposant, dès 1998, à la théorie « pro-angiogénique » est le Dr Richard Hynes du MIT à Cambridge (Bader, Cell 1998). Il réévalue notamment le rôle des intégrines dans l'angiogenèse dans un article publié dans Nature en 2002 (Hynes, Nat Med 2002).

Les souris KO pour $\beta3$ ou pour $\beta3$ et $\beta5$ sont viables et fertiles. Les souris KO pour $\alpha\beta3$ présentent une angiogenèse excessive, 80% d'entre elles meurent au cours de leur développement. Ces souris présentent un défaut de vascularisation uniquement dans le cerveau. Les souris KO pour $\beta8$ présentant les mêmes défauts, ce phénotype correspondrait donc à l'absence d' $\alpha\beta8$.

Les intégrines $\alpha\beta3$ et/ou $\alpha\beta5$ ne seraient donc pas indispensables pour l'angiogenèse.

Au contraire, les tumeurs greffées sur des souris qui n'expriment plus l'une ou l'autre de ces intégrines présentent une croissance plus rapide et une meilleure angiogenèse. D'après ces études, les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ auraient donc au contraire un rôle anti-angiogénique.

○ Les deux

Malgré tous les travaux qui ont été réalisés depuis l'observation initiale de la surexpression de l'intégrine $\alpha\beta3$ lors de la néoangiogenèse tumorale, le rôle de cette intégrine n'est donc toujours pas clairement établi et les thérapies anti-angiogéniques dirigées contre $\alpha\beta3$ ne sont pas aussi efficaces qu'on pouvait l'espérer.

Selon les études, le caractère pro-angiogénique ou anti-angiogénique de l'intégrine $\alpha\beta3$ donc est mis en avant.

Il apparait finalement que **l'intégrine $\alpha\beta3$ peut jouer un rôle pro- ou anti-angiogénique selon le contexte** (Robinson, Curr Opin Cell Biol 2011). Cela dépend (Figures 18 et 19):

- des interactions avec la matrice extracellulaire,
- de la dose d'inhibiteur de l'intégrine $\alpha\beta3$,
- du type cellulaire qui exprime cette intégrine
- et des autres molécules présentes interagissant avec l'intégrine $\alpha\beta3$.

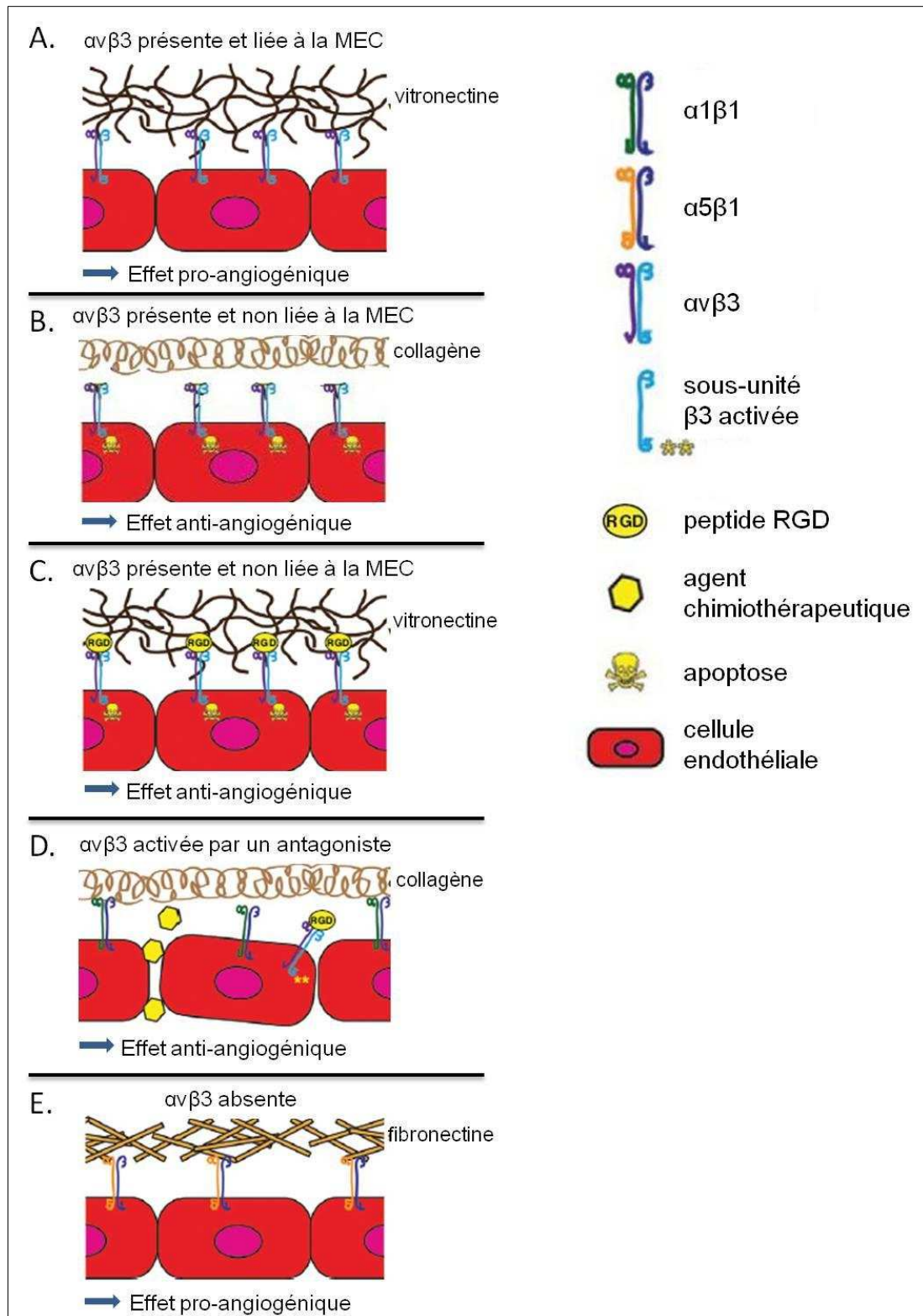


Figure 18: Influence de la matrice et des intégrines exprimées par les cellules endothéliales sur l'angiogenèse et la réponse aux inhibiteurs d' $\alpha v\beta 3$. Adapté d'après Robinson, Curr Opin Cell Biol 2011.

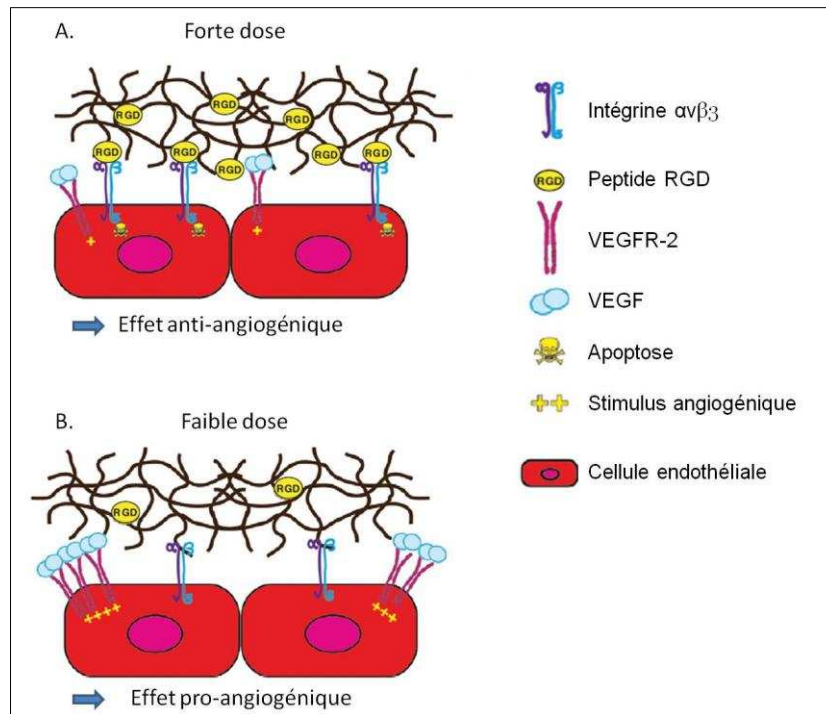


Figure 19 : Relation entre la dose d'antagoniste d' $\alpha\beta_3$ (peptide RGD) et l'effet pro- ou anti-angiogénique associé. Traduit de Robinson, Curr Opin Cell Biol 2011.

Une meilleure compréhension des différents contextes biologiques reste à atteindre pour optimiser l'effet des antagonistes de l'intégrine $\alpha\beta_3$ dans le traitement anti-angiogénique des tumeurs.

Cependant malgré son rôle complexe lors la néo-angiogenèse, il est clair que l'intégrine $\alpha\beta_3$ est un **excellent biomarqueur de la néo-angiogenèse tumorale** (Ruegg, Recent Results Cancer Res 2010).

2.4.2. Survie et prolifération cellulaires

Les antagonistes des intégrines $\alpha\beta_3$ et $\alpha\beta_5$ entraînent la mort des cellules endothéliales. Dans les cellules endothéliales, l'interaction entre $\alpha\beta_3$ et le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) empêche la survenue de la voie intrinsèque de l'apoptose alors qu' $\alpha\beta_5$ et le récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR2) fonctionnent ensemble pour inhiber la voie extrinsèque de l'apoptose (Hood, J Cell Biol 2003).

Les cellules non-adhérentes qui présentent des intégrines non liées vont subir l'anoïkis, mort cellulaire par la voie de la caspase 8 (phénomène à la base de la dépendance à l'ancrage) (Figure 20).

Dans l'endothélium activé et les tumeurs, l'intégrine $\alpha\beta3$ réprime l'activité de p53, ce qui a un effet anti-apoptotique (Sablina, Oncogene 2001). La protéine p53 est un facteur de transcription qui induit l'expression de p27 et p21, éléments clés de l'évolution dans le cycle cellulaire et de l'apoptose.

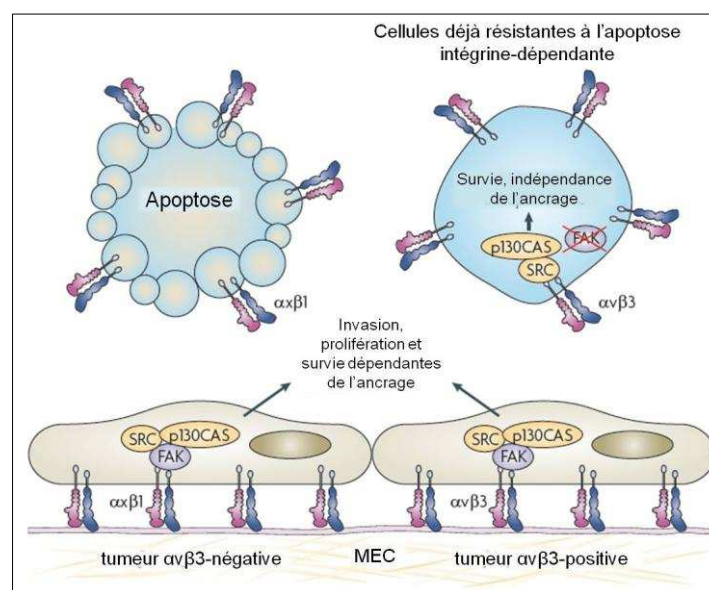


Figure 20 : *Unité oncogénique intégrine $\alpha\beta3$ -SRC permettant l'indépendance de l'ancrage.* Adapté de Desgrosellier, Nature reviews Cancer 2010.

2.4.3. Migration cellulaire et invasion tumorale : formation de métastases

L'intégrine $\alpha\beta3$ est particulièrement surexprimée lors de la migration et de l'invasion tissulaire. Son interaction avec la métalloprotéase matricielle de type 2 (MMP-2) est nécessaire à la maturation et à l'activation de cette dernière (Guo, Nat Rev Mol Cell Biol 2004). La localisation de l'intégrine $\alpha\beta3$ au niveau du front de migration cellulaire permet alors à la MMP-2 de dégrader la matrice adjacente et faciliter ainsi l'invasion tissulaire

(Siletta, PNAS 2001). L'association de l'intégrine $\alpha\beta3$ avec la MMP-2 est RGD-indépendante. L'intégrine $\alpha\beta3$ reste ainsi libre de se fixer aux protéines de la MEC pour poursuivre la migration cellulaire (Chattopadhyay, J Cancer Res Clin Oncol 2001).

L'ostéopontine est exprimée dans le cerveau. L'expression des intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, et $\alpha5\beta1$ par les cellules tumorales astrocytaires permet leur migration dans le cerveau par leur fixation à l'ostéopontine (Ding, Cancer Res 2002). Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ interagissent également avec l'ostéopontine et la sialoprotéine dans les os, permettant ainsi migration et prolifération nécessaires aux métastases osseuses (Nemeth, Clin Exp Metastasis 2003).

3. Les thérapies ciblées anti- $\alpha\beta3$

L'intégrine $\alpha\beta3$ est fortement exprimée par les cellules endothéliales activées et par les cellules tumorales, mais très peu exprimée par les cellules endothéliales au repos et par la plupart des autres tissus de l'organisme. Ces caractéristiques en font une cible idéale à la fois pour les **thérapies anti-angiogéniques** et pour la **thérapie ciblée des tumeurs dont les cellules expriment $\alpha\beta3$** . L'expression d' $\alpha\beta3$ contribue au caractère invasif et au phénotype malin des tumeurs, elle est un facteur de mauvais pronostic.

L'inhibition de l'intégrine $\alpha\beta3$ par des anticorps monoclonaux, des peptides RGD, des peptidomimétiques ou d'autres molécules ciblant $\alpha\beta3$ a un fort potentiel en thérapie anticancéreuse. Les différentes thérapies ciblées anti- $\alpha\beta3$ à l'étude actuellement sont listées ci-dessous.

3.1. Anticorps

Plusieurs anticorps monoclonaux visent l'intégrine $\alpha\beta3$. L'anticorps le plus avancé est **l'etaracizumab ou Abegrin (Vitaxin II, MEDI-522, MedImmune Inc.)** qui succède au Vitaxin I (MEDI-523, MedImmune Inc.) avec une meilleure stabilité et une affinité pour $\alpha\beta3$ 7,2 fois supérieure (Wu, PNAS 1998). Ces deux anticorps sont des versions humanisées de l'anticorps monoclonal murin LM609 anti- $\alpha\beta3$.

Cependant, une étude clinique de phase II a démontré l'inefficacité de l'etaracizumab pour le traitement de mélanomes métastatiques (Hersey, Cancer 2010). Si les études précliniques

basées sur l'anticorps murin LM609 étaient très encourageantes (Brooks, J Clin Invest 1995), la version humanisée de cet anticorps ne rencontre pas le même succès. Les différentes versions de cet anticorps humanisé ont échoué à plusieurs reprises dans différentes études cliniques de phase I (Gutheil, Clin Cancer Res 2000 ; Patel, Cancer 2001 ; Posey, Cancer Biother Radiopharm 2001).

Néanmoins, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour l'etaracizumab lorsqu'il est associé à un radionucléide de thérapie. Dans une étude préclinique sur un modèle hétérotopique de glioblastome humain implanté sur des souris Nude, une injection de 7,4 MBq (200 μ Ci) d' 90 Y-Abegrin permet de réduire le volume tumoral de manière très efficace avec un rapport volume tumoral final sur volume tumoral initial de 0,69 quatorze jours après le traitement (Veeravagu, Clin Cancer Res 2008).

3.2. Peptidomimétiques

Les peptidomimétiques sont des composés contenant des éléments structuraux non-peptidiques et qui sont capables d'imiter les peptides naturels ou de s'opposer à leurs actions biologiques. Ils ont l'avantage d'être moins sensibles aux dégradations des protéases, ce qui augmente leur demi-vie biologique et autorise leur administration par voie orale. Les peptidomimétiques peuvent être isolés à partir de bibliothèques permettant de choisir le composé le plus adapté à la situation.

Le SC-68448 est un antagoniste de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ pour laquelle il présente une grande affinité ($CI_{50}=1nm$) et de l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$ ($CI_{50}>100nm$). Dans un modèle préclinique de souris porteuses de tumeur de Leydig associée à une hypercalcémie, le SC-68448 inhibe la croissance tumorale de manière dose-dépendante jusqu'à 80% et bloque le développement de l'hypercalcémie (Carron, Cancer Res 1998).

3.3. Autres types de molécules

L'utilisation de petits ARNs interférents plus connus en anglais sous le terme de siRNA (« small interfering RNA ») est une autre approche pour inhiber l'expression des intégrines impliquées en cancérogenèse.

Par exemple, l'utilisation de petits ARNs interférant avec l'expression de la sous-unité α v inhibe la prolifération cellulaire, induit l'apoptose dans des cellules humaines de cancer du sein en culture (MDA-MB-435) et augmente de manière très intéressante leur radiosensibilité *in vitro* (Cao, Biochem Biophys Res Commun 2006). Les perspectives d'utilisation de ces siRNA *in vivo* ouvrent la voie à de nouvelles possibilités de thérapies ciblées.

3.4. Peptides RGD

Les peptides synthétiques contenant la séquence RGD sont très étudiés pour leur capacité à inhiber certaines intégrines. Le tripeptide RGD linéaire a une utilisation *in vivo* limitée à cause de sa courte demi-vie biologique. La cyclisation de ce peptide ainsi que des modifications chimiques de ses acides aminés ont permis d'augmenter considérablement la demi-vie biologique de ces peptides et leur affinité pour l'intégrine α v β 3. Un exemple de modification chimique réalisée est l'utilisation d'acides aminés dextrogyres (D) au lieu de lévogyres (L) dans la version c(RGDfV) où f est une D-phénylalanine (tous les acides aminés naturels étant lévogyres et les protéases humaines leur étant donc spécifiques).

L'EMD 121974 ou **Cilengitide®** (Merck-Serono, Darmstadt, Allemagne) est un pentapeptide cyclique contenant la séquence RGD : c(RGDf(NMe)V) (Figure 21). Le Cilengitide® est actuellement en phase III d'étude clinique pour le traitement des glioblastomes et en phases I/II pour plusieurs autres tumeurs (Mas-Moruno, Anticancer Agents Med Chem 2010). Ce médicament est le premier antagoniste d'intégrines à atteindre une phase III. Il cible les intégrines α v β 3 avec une très grande affinité (concentration inhibitrice médiane, CI_{50} = 0,58 nm) ainsi que les intégrines α v β 5 et α v β 1.

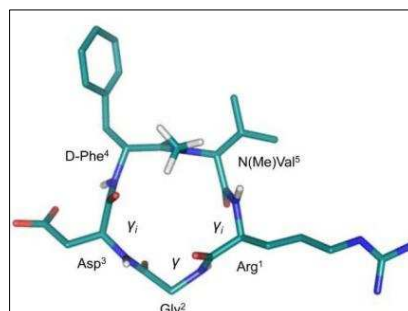


Figure 21 : Structure tridimensionnelle du Cilengitide®. D'après Mas-Moruno, Anticancer Agents Med Chem 2010.

In vitro, le Cilengitide® a prouvé son efficacité en tant qu'inhibiteur de l'angiogenèse en inhibant l'interaction des intégrines avec leurs ligands de la MEC et en induisant l'apoptose dans les cellules endothéliales (Taga, Int J Cancer 2002 ; Paolillo, Mini Rev Med Chem 2009). Au cours d'études précliniques, le Cilengitide® a montré son efficacité à ralentir la croissance de mélanomes humains greffés sur des souris Nude (Figure 22).

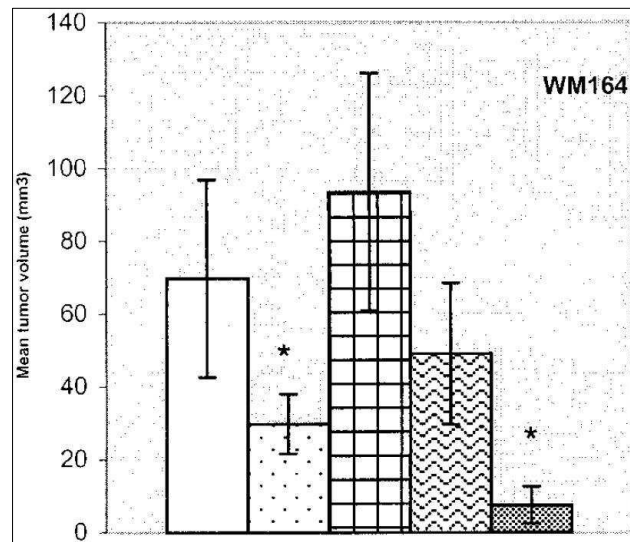


Figure 22 : Volumes tumoraux de mélanomes humains greffés sur des souris Nude 31 jours après le début des traitements. Blanc: Groupe contrôle ; Pointillés : Cilengitide (250 μg /souris, 5 fois/semaine) ; Carrés : c(RADf(NMe)V), contrôle non spécifique (250 μg /souris, 5 fois/semaine), Vagues : MAb LM609, anti- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (250 μg /souris, 3 fois/semaine), Croix : MAb 17E6, anti- αv (250 μg /souris, 3 fois/semaine). Toutes les injections sont faites en intrapéritonéal. WM164 est une lignée de mélanome humain exprimant $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. D'après Mitjans, Int J Cancer 2000.

D'autres études précliniques ont montré la capacité du Cilengitide® à réduire l'angiogenèse, la croissance tumorale (Figure 23) et le potentiel métastatique dans de nombreux modèles tumoraux (Buerkle, Br J Cancer 2002).

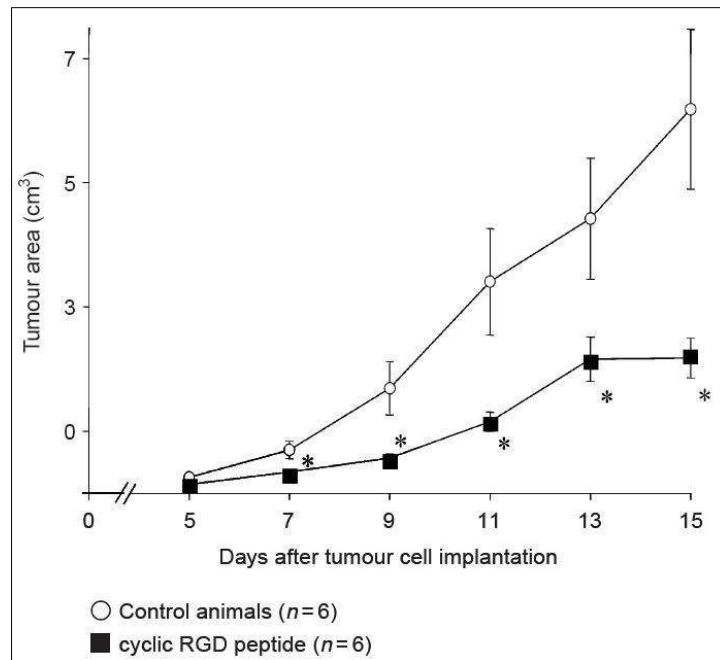


Figure 23 : Evolution des volumes tumoraux moyens de mélanomes de hamsters (A-mel-3) implantés en sous-cutané sur des hamsters et traités avec du Cilengitide® ou le peptide contrôle c(RADf(NMe)V). Les traitements commencent le lendemain de l'implantation. Traitements toutes les 12 heures avec 30 mg.kg⁻¹ en intrapéritonéal. D'après Buerkle, Br J Cancer 2002.

Les capacités du Cilengitide® en tant qu'inhibiteur de l'angiogenèse ont été remises en questions au cours d'une étude en 2009 (Reynolds, Nat Med 2009) où une très faible concentration plasmatique stable de l'ordre de 2 nM d'inhibiteurs d'intégrines augmente l'angiogenèse de tumeurs implantées en sous-cutané sur des souris, ainsi que leurs volumes.

De nombreuses études cliniques de phases I et II ont déjà été réalisées ces dix dernières années pour tester l'efficacité du Cilengitide® (Mas-Moruno, Anticancer Agents Med Chem 2010). Ces études ont eu en général des résultats peu satisfaisants qui vont d'une absence de bénéfice en terme de survie (Friess, BMC Cancer 2006) à une faible augmentation de la durée de survie globale (Nabors, J Clin Oncol 2009 ; Stupp, Clin Oncol 2010). Par contre, toutes démontrent un bon profil toxicologique du Cilengitide® avec une absence de seuil de toxicité ou de dose maximum tolérée.

De nouvelles études sont en cours et il reste à déterminer dans quelles conditions exactes le Cilengitide® est efficace in vivo pour réduire l'angiogenèse et la croissance tumorale.

3.5. Association de thérapies

Avant les années 2000, associer une thérapie anti-angiogénique avec une autre modalité thérapeutique comme la chimiothérapie pouvait paraître paradoxal car la thérapie anti-angiogénique était sensée affamer la tumeur en détruisant ses vaisseaux sanguins alors que la chimiothérapie a besoin de ces vaisseaux pour être délivrée au sein de la tumeur. Ces dernières années, une théorie alternative a fait son apparition. Certains agents anti-angiogéniques peuvent de manière transitoire normaliser la structure et la fonction du réseau sanguin tumoral et permettre ainsi une meilleure distribution des traitements chimiothérapeutiques en leurs seins (Jain, Nat med 2001, Science 2005).

Pour être efficaces au niveau clinique, il apparaît de plus en plus clairement que les thérapies anti- $\alpha v\beta 3$ devront être combinées avec d'autres thérapies, que ce soit des thérapies anti-angiogéniques ou des chimio- ou radiothérapies.

Au niveau préclinique, plusieurs études démontrent le potentiel thérapeutique de ces associations.

Une étude parue en 2010 dans le « Journal of nuclear medicine » (Figure 24) met en évidence l'augmentation de l'efficacité de la radioimmunothérapie lorsqu'elle est précédée par ou couplée avec un traitement anti-angiogénique (Kraeber-Bodéré, JNM 2010).

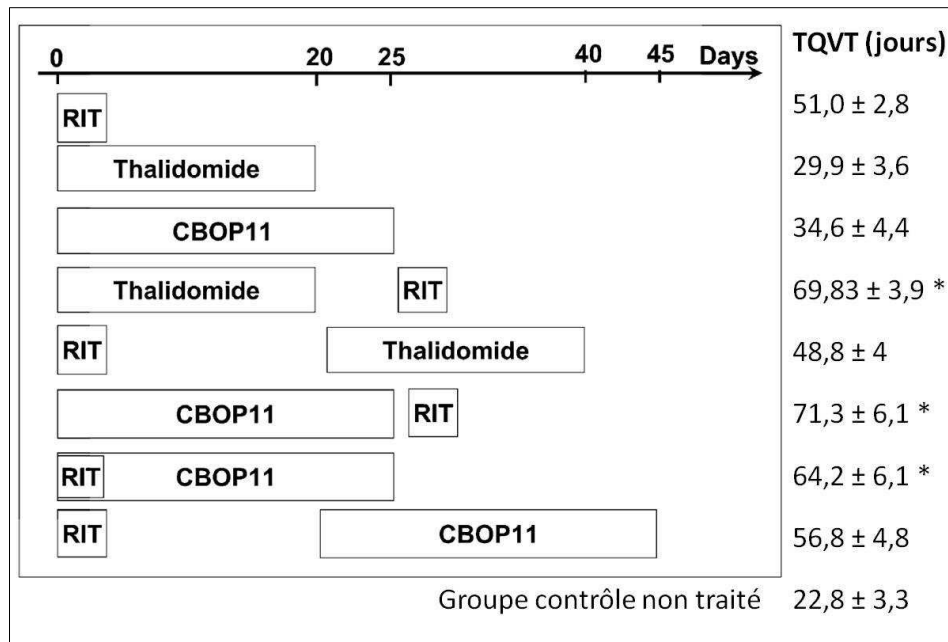


Figure 24 : Temps de quadruplement du volume de tumeurs médullaires de la thyroïde implantées sur des souris Nude soumises à différentes stratégies thérapeutiques permettant de comparer l'efficacité de la RIT seule ou de traitements anti-angiogéniques seuls (thalidomide ou CBOP11) à des combinaisons de ces thérapies. TQVT: temps de quadruplement du volume tumoral ; RIT dirigée contre l'antigène carcino-embryonnaire avec un anticorps F6 marqué à l'¹³¹I ; * : p<0,01 par rapport au groupe RIT seule. Adapté d'après Kraeber-Bodéré, JNM 2010.

Une autre étude montre une amélioration de 53% de l'efficacité d'une RIT utilisant l'anticorps ChL6 (ciblant une glycoprotéine membranaire fortement exprimée par certains types tumoraux) marqué avec un yttrium-90 couplée à un traitement au Cilengitide® comparé à la RIT seule sur un modèle murin de cancer du sein (Burke, Cancer Res 2002).

Un autre exemple est donné par une étude sur plusieurs modèles de xénogreffes sur souris Nude où l'association d'un peptidomimétique à séquence RGD à la radiothérapie externe améliore les effets anti-angiogéniques et tumoricides individuels (Abdollahi, Clin Can Res 2005).

Les thérapies combinées avec un traitement anti- $\alpha v \beta 3$ sont très prometteuses. La grande majorité des études cliniques en cours avec le Cilengitide® sont d'ailleurs axées sur cette approche.

3.6. Molécules ciblant $\alpha\beta3$ utilisées comme vecteurs

La surexpression des intégrines $\alpha\beta3$ au niveau des vaisseaux sanguins de la tumeur et par les cellules de nombreux types tumoraux fait de cette intégrine une cible pertinente pour délivrer spécifiquement les traitements au niveau de la tumeur, que ce soit des molécules de **chimiothérapie**, des **radioisotopes** ou des **inhibiteurs géniques**.

Une étude parue en 2005 utilise une molécule ciblant l'intégrine $\alpha\beta3$ couplée à un agent de chimiothérapie (Chen, J. Med. Chem. 2005). L'agent de chimiothérapie utilisé ici est le paclitaxel (PTX), un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules bloquant la mitose utilisé pour traiter les cancers du poumon, du sein et des ovaires. Cette étude compare l'effet d'un dimère de cyclo-RGD couplé à une molécule de PTX, avec le PTX seul ou le dimère de cyclo-RGD seul sur des cellules MDA-MB-435 (cancer du sein métastatique exprimant $\alpha\beta3$). Les résultats obtenus montrent que le conjugué inhibe la prolifération cellulaire de manière comparable au paclitaxel seul (Figure 25) et présente l'avantage de s'accumuler spécifiquement dans la tumeur (modèle de xénogreffes sur souris Nude). Ces résultats permettent d'envisager de diminuer la dose efficace du paclitaxel et donc de réduire sa toxicité.

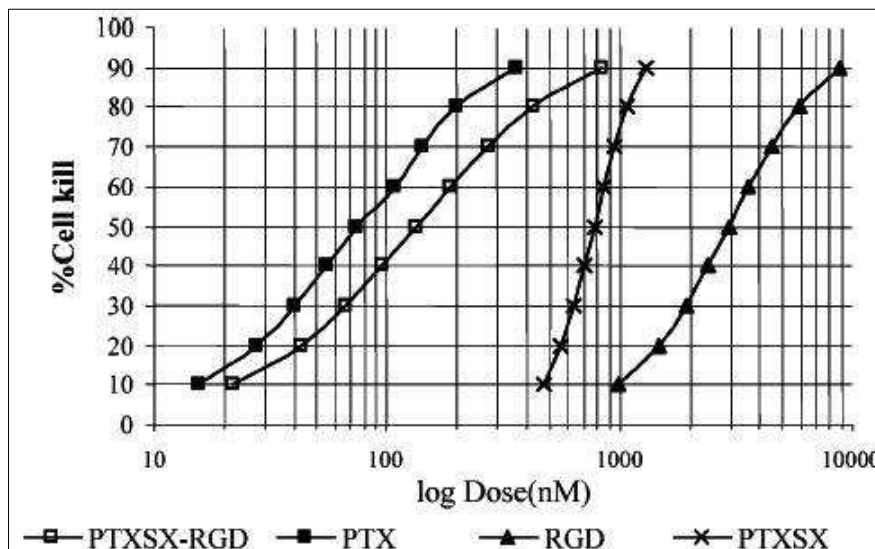


Figure 25 : Effets cytotoxiques *in vitro* des différentes molécules testées dans l'étude de Xiaoyuan Chen, J. Med. Chem. 2005. PTX : Paclitaxel, PTXSX : Paclitaxel modifié en vue du couplage avec le RGD.

De nombreuses études concernent l'association d'un vecteur ciblant $\alpha v\beta 3$ avec un radionucléide de thérapie. L'efficacité de ce type de vectorisation a déjà été évoquée avec l' ^{90}Y -Abegrin (page 65).

On notera également en exemple l'utilisation d'un peptidomimétique inhibiteur de l'intégrine $\alpha v\beta 3$, le TA138 radiomarqué avec de l'yttrium-90. A 15 mCi/m², le ^{90}Y -TA 138 ralentit la croissance tumorale sur un modèle de souris transgéniques présentant des tumeurs mammaires spontanées et une régression tumorale est observée à 90 mCi/m² (Harris, Cancer Biother Radiopharm 2003).

➤ Les peptides RGD couplés à des radionucléides

○ Thérapie anti-tumorale avec des dimères de cyclo-RGD radiomarqués

- Une étude réalisée par l'équipe du Pr. O.C. Boerman (Nimègue, Pays-Bas) a évalué l'effet thérapeutique d'un dimère de cyclo-RGD marqué à l'yttrium-90, ^{90}Y -cRGD₂ (^{90}Y -DOTA-E-[c(RGDfK)]₂), sur un modèle de souris Nude porteuse de xénogreffes NIH:OVCAR-3 (cancer humain ovarien, $\alpha v\beta 3$ +) (Janssen, Cancer Research 2002). La dose maximale tolérée a été évaluée à 37 MBq d' ^{90}Y -cRGD₂ par souris (Figure 26). La captation tumorale du ^{111}In -cRGD₂ est de 7,5 % DI/g à 2h p.i.

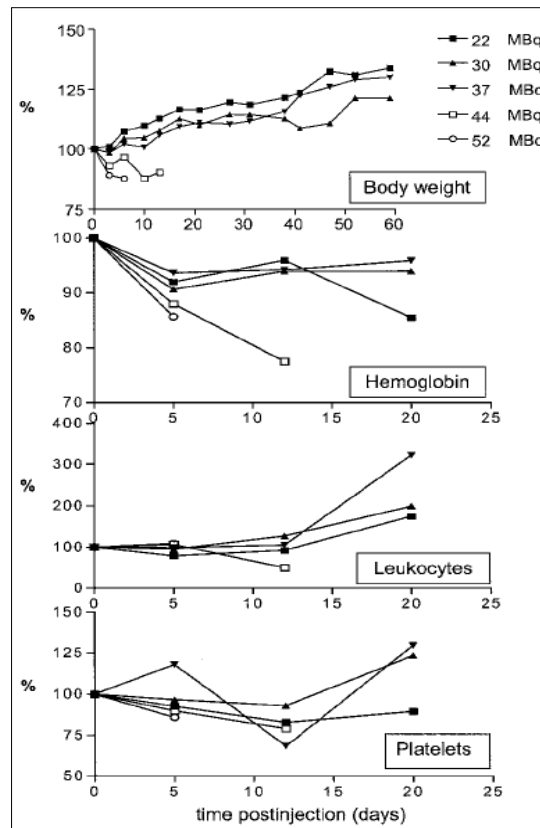


Figure 26 : Evaluation de la dose maximale tolérée pour l'injection i.v. de ^{90}Y -cRGD₂ sur des souris Balb/c Nude grâce au suivi du poids des souris, de leurs taux d'hémoglobine, de leucocytes et de plaquettes. D'après Janssen, Cancer Research 2002.

Dans cette étude, le temps de doublement du volume tumoral augmente significativement dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -cRGD₂ (5,2 j versus 3,9j pour le groupe traité avec du ^{90}Y -cRGK₂, contrôle non spécifique et 3,2 j pour le groupe contrôle PBS) (Figure 27).

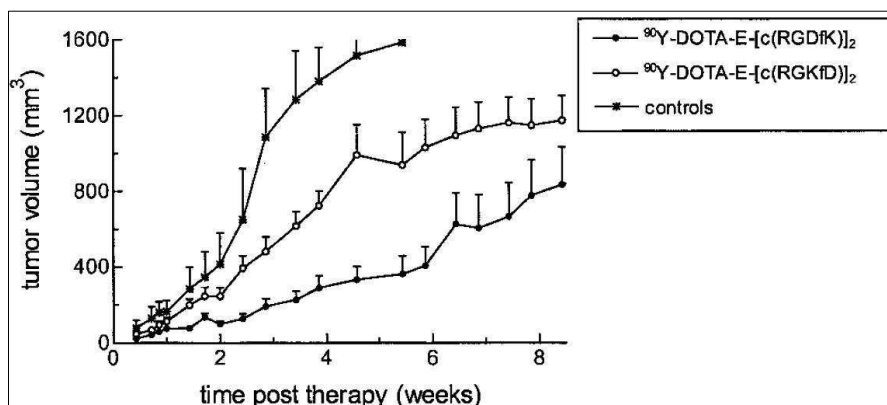


Figure 27 : Courbes de croissance de tumeurs NIH:OVCAR-3 implantées en sous-cutané sur des souris Balb/c Nude dans 3 groupes de souris après injection i.v. de 37 MBq de ^{90}Y -cRGD₂ ou 37 MBq de ^{90}Y -cRGK₂ ou avec du PBS. D'après Janssen, Cancer Research 2002.

- Des recherches menées par la même équipe ont porté sur l'effet du fractionnement d'un traitement avec la même molécule de ^{90}Y -cRGD₂ toujours sur un modèle de souris Nude porteuses de xénogreffes NIH:OVCAR-3 en sous-cutané (Janssen, Cancer Biother Radiopharm 2004). Ils ont constaté une amélioration de la captation tumorale dans le groupe traité avec 5 fois 7,4 MBq de ^{90}Y -cRGD₂ par rapport au groupe traité avec 37 MBq, mais pas de différence au niveau de la croissance tumorale.
- La dernière étude parue sur le potentiel thérapeutique des peptides RGD en RIV est celle d'une équipe chinoise qui a testé l'efficacité de traitements avec un dimère ou un tétramère de RGD radiomarqués à l' ^{90}Y sur des tumeurs U-87 MG : ^{90}Y -(3PRGD2) et ^{90}Y -RGD4 (Liu, Mol Pharm 2011).

Les résultats de la biodistribution du ^{111}In -(3PRGD2) et du ^{111}In -RGD4 indiquent des captations tumorales (respectivement $6,13 \pm 0,82$ % de la DI/g et $6,43 \pm 1,6$ % de la DI/g 4h post-injections).

Dans cette étude, les résultats sur l'efficacité d'un traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -RGD4 à 12 jours post-injection semblent à première vue très spectaculaires avec un volume tumoral dans le groupe traité inférieur de plus de 4 fois à celui du groupe contrôle non traité (avec des moyennes de 415 mm³ dans le groupe traité versus 1790 mm³ dans le groupe contrôle, valeurs observées à partir de la figure 28), mais il apparaît finalement que cette diminution n'est pas due entièrement à la captation tumorale du ^{90}Y -RGD4 puisque le traitement contrôle non spécifique avec 37 MBq de ^{90}Y -RAD4 provoque également une diminution importante du volume tumoral dans ce groupe d'un peu plus de 2 fois par rapport au groupe contrôle (avec un volume final moyen de 870 mm³ dans le groupe traité avec le ^{90}Y -RAD4 versus 1790 mm³ dans le groupe contrôle) (Figure 28).

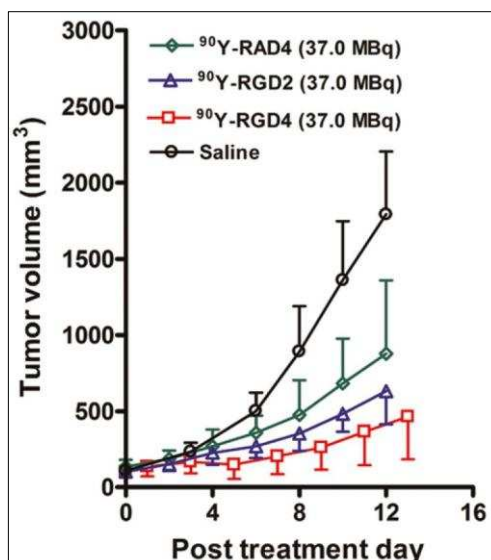


Figure 28 : Courbes de croissance de tumeurs U-87 MG implantées en sous-cutané sur des souris Nude dans 4 groupes de souris après injection i.v. de 37 MBq de ⁹⁰Y-RAD4 (molécule contrôle non spécifique) ou 37 MBq de ⁹⁰Y-RGD4 ou 37 MBq de ⁹⁰Y-RGD2 (⁹⁰Y-(3PRGD2)) ou avec du sérum physiologique. D'après Liu, Mol Pharm 2011.

La toxicité médullaire des traitements est évaluée par le suivi de la numération des globules blancs. Après une période de leucopénie transitoire, les taux de leucocytes remontent à partir du 12^{ème} jour post-traitement pour atteindre une valeur normale 20 jours après le traitement.

- Thérapie anti-tumorale avec des monomères de cyclo-RGD radiomarqués
- Une autre étude, réalisée par l'équipe du Pr. O.C. Boerman, teste l'effet d'une thérapie avec un monomère de cyclo-RGD marqué au lutétium-177 sur un modèle de souris Nude porteuses de tumeurs intra-péritonéales NIH:OVCAR-3 (Dijkgraaf, Int J Cancer 2007). Un traitement avec 37 MBq de ¹⁷⁷Lu-DOTA-E-c(RGDfK) permet de rallonger la durée de survie moyenne avant point limite à 21 semaines contre 5 semaines pour le groupe contrôle (Figure 29). Ces résultats très impressionnants sont en partie dus au mode d'injection intra-péritonéale du traitement qui est associé à une très forte captation des tumeurs également intra-péritonéales (captation tumorale du ¹¹¹In-DOTA-E-c(RGDfK) : 35,2 ± 3,8 % DI/g 2h post injection i.p. vs 0,98 ± 0,26 % DI/g 2h post injection i.v.).

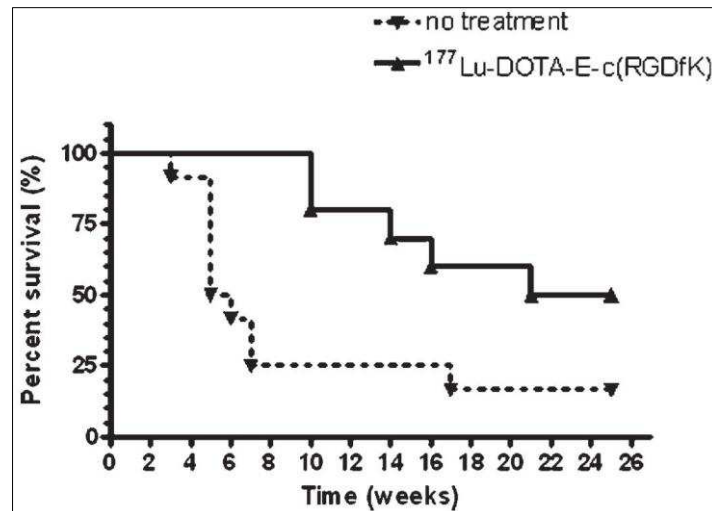


Figure 29 : Courbe de survie après traitement et avant point limite de souris Balb/c Nude implantées avec des tumeurs NIH:OVCAR-3 en intra-péritonéal. Le groupe traité reçoit une injection i.p. de 37 MBq de ¹⁷⁷Lu-DOTA-E-c(RGDfK). D'après Dijkgraaf, Int J Cancer 2007.

- Une étude parue en 2008 (Yoshimoto, Int J Cancer 2008) teste l'effet d'un traitement au ⁹⁰Y-DOTA-c(RGDfK) sur un modèle de souris Nude porteuses de tumeurs SKOV-3 (cancer humain des ovaires, αβ3 +). Les souris traitées 3 fois avec 11,1 MBq de ⁹⁰Y-RGD voient leur volume tumoral augmenter de 7,2 fois contre 13,6 fois pour le groupe contrôle NaCl, 23 jours après le début du traitement (Figure 30).

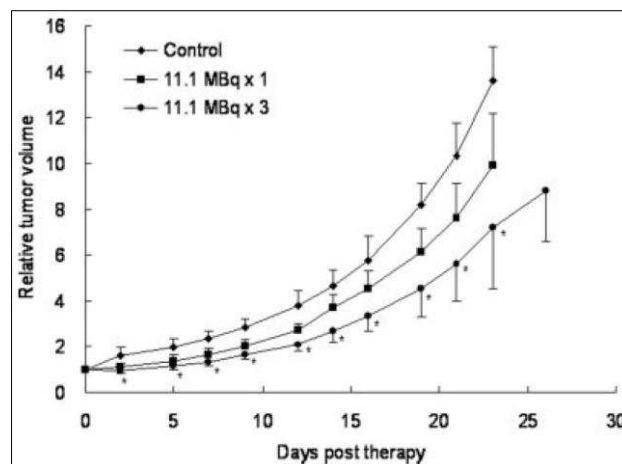


Figure 30 : Courbes de croissance relative au jour du traitement de tumeurs SKOV-3 implantées en sous-cutané sur des souris Nude dans 3 groupes de souris traitées une fois avec 11,1 MBq ou 3 fois avec 11,1 MBq de ⁹⁰Y-DOTA-c(RGDfK) ou avec du sérum physiologique. D'après Yoshimoto, Int J Cancer 2008.

Ces différentes études démontrent toutes le potentiel thérapeutique des peptides RGD sous forme de monomères ou de dimères de cyclo-RGD couplés à des radionucléides de thérapie. Nous allons maintenant nous intéresser à la forme multimérique de cyclo-RGD développée à Grenoble, le RAFT-RGD.

D. Intérêt du RAFT-RGD comme vecteur

La séquence peptidique RGD (arginine - glycine - acide aspartique) qui permet la liaison spécifique avec nombreuses intégrines est étudiée depuis plus de 20 ans.

La **cyclisation de ce motif** et son intégration dans une **séquence pentapeptidique** augmente l'affinité et la **sélectivité pour l'intégrine $\alpha\beta 3$** par rapport aux autres intégrines. Les différents peptides cRGD ont une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) pour l'intégrine $\alpha\beta 3$ de 7 à 40 nM, alors qu'elle est de 600 à 4000 nM pour l'intégrine $\alpha\beta 5$ et de 700 à 5000 nM pour l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (Haubner, J Am Chem Soc 1996).

De nombreuses équipes ont travaillé sur des peptides contenant un ou plusieurs motifs cRGD. Il apparaît que les **peptides dimériques et multimériques de cyclo-RGD présentent une meilleure avidité pour leur récepteur in vitro** (Thumshirn, Chemistry 2003) **et une meilleure captation tumorale in vivo** (Chen, Molecular Imaging 2004) que les peptides contenant un cRGD monomérique. On désigne par le terme « avidité » la force avec laquelle une molécule multivalente se lie à sa cible par l'intermédiaire de plusieurs liaisons entre ses sites de reconnaissance et les molécules cibles. Une liaison multivalente présente une avidité supérieure à la somme des affinités intrinsèques individuelles des sites de fixation car toutes les liaisons doivent être rompues en même temps pour que les deux molécules se séparent.

Le **RAFT-RGD** ($RAFT(c[-RGDfK-])_4$) est constitué de **quatre peptides cyclo-RGD (cRGD) fixés sur un groupe porteur RAFT** (« Regioselectively Addressable Functionalized Template ») (Figure 31). Le RAFT-RGD a un faible poids moléculaire de **5 kDa** environ.

Le RAFT est une molécule originale développée à Grenoble, au sein de l'UMR 5250 CNRS du Pr. Pascal Dumy. La formule chimique et les applications du RAFT ont été protégées par dépôt de brevet. Le RAFT est un châssis moléculaire présentant quatre sites d'ancrage pour

les cyclo-RGD sur sa face supérieure et un site d'ancrage sur la face inférieure pour l'accrochage d'un radionucléide ou d'un fluorophore pour le marquage de la molécule.

Ce système RAFT permet d'obtenir une architecture multivalente de ligands ciblant les intégrines $\alpha\beta3$ avec une séparation spatiale des modules de ciblage et du marqueur évitant leur interférence. Par ailleurs, **le RAFT n'est pas immunogène** (Grigalevicius, Bioconj Chem 2005) et sa métabolisation cellulaire ne génère pas de produits de dégradation toxiques.

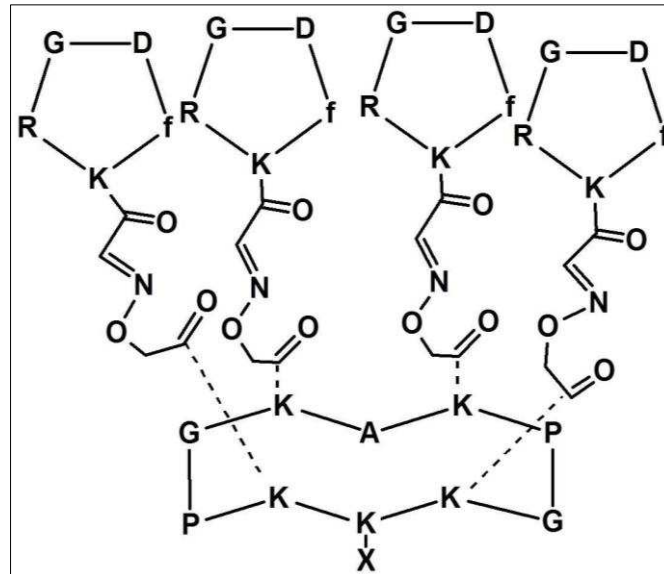


Figure 31: Formule générale du peptide RAFT-RGD

Le RAFT-RGD est comparé à une **molécule non spécifique** : le **RAFT-RAD** qui présente la même structure que le RAFT-RGD sauf au niveau du motif cible RGD où la glycine a été remplacée par une β -alanine (lettre A) c[**RADfK**]. Le remplacement de la glycine par la β -alanine est connu pour abolir entièrement la reconnaissance du peptide pour sa cible $\alpha\beta3$. C'est pourquoi le RAFT-RAD est utilisé comme molécule non spécifique, contrôle négatif (Boturn, JACS 2004).

1. Etudes in vitro

Le RAFT-RGD a une grande avidité pour l'intégrine $\alpha\beta3$ avec une CI_{50} de $0,5 \pm 0,05 \mu\text{M}$ lors de l'inhibition de l'adhésion de cellules CHO-3a (Cancer ovarien de hamster) à la vitronectine (Boturyn, JACS 2004).

Une autre étude effectuée par L. Sancey indique que la constante d'équilibre (K_D) de la liaison du RAFT-RGD avec l'intégrine $\alpha\beta3$ purifiée est de $3,87 \text{ nmol.L}^{-1}$ alors que celle entre l'intégrine $\alpha\beta3$ et le cRGD (cyclo(-RGDfK-)) est de $41,70 \text{ nmol.L}^{-1}$. **L'avidité du RAFT-RGD pour l'intégrine $\alpha\beta3$ est 10 fois supérieure à celle du cRGD** (Sancey, Mol Ther 2009).

Cette même étude met en évidence le **regroupement** des complexes RAFT-RGD/intégrine $\alpha\beta3$ à la surface cellulaire grâce à la fixation simultanée d'une molécule de RAFT-RGD à deux intégrines $\alpha\beta3$ et l'**internalisation des complexes** par endocytose dépendante de la clathrine (Figure 32).

Le cRGD n'entraîne pas l'internalisation de son récepteur l'intégrine $\alpha\beta3$ lorsqu'il s'y fixe. Néanmoins, le cRGD peut également être internalisé dans les cellules mais de manière non spécifique par endocytose de phase fluide ou pinocytose (Castel, Lab Invest 2001 ; Schraa, J Control Release 2002).

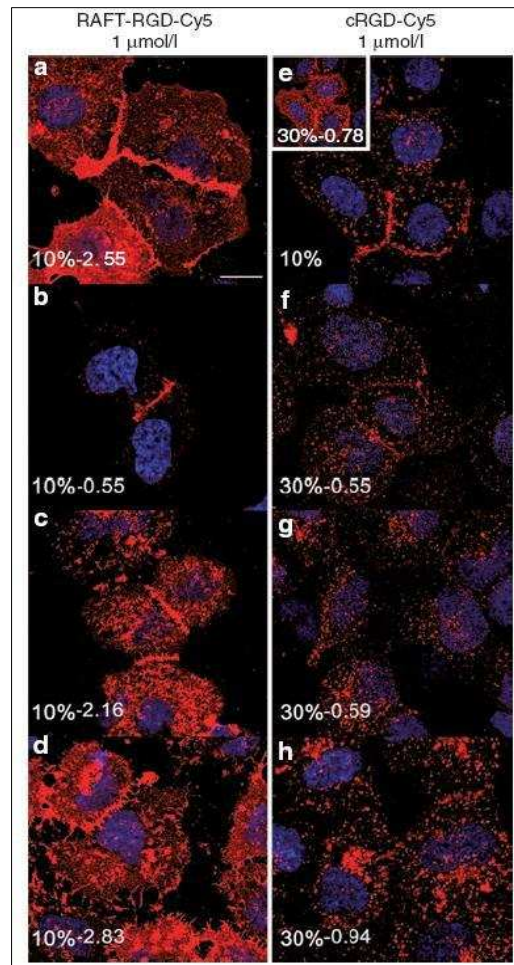


Figure 32 : Imagerie confocale de cellules HEK293(β 3) incubées avec du RAFT-RGD-Cy5 (a-d) ou du cRGD-Cy5 (e-h) pendant 10 minutes. (Cy5 :Cyanine-5, HEK pour « Human Embryonic Kidney »). a, e : contrôle, DMEM seul (DMEM pour « Dulbecco's Modified Eagle Medium »). b, f : DMEM + amantadine 1 mmol.L⁻¹(inhibiteur de l'endocytose dépendante de la clathrine). c, g : DMEM + nystatine 1μmol.L⁻¹ (inhibiteur de l'endocytose dépendante des cavéolines). D, h : DMEM + amiloride 1 mmol.L⁻¹ (inhibiteur de la macropinocytose). D'après Sancey, Mol Ther 2009.

2. Etudes in vivo

2.1. Imagerie

Plusieurs études ont démontré que le **RAFT-RGD** permet la **détection de tumeurs exprimant $\alpha\beta3$ in vivo** sur des modèles précliniques en imagerie nucléaire ou en fluorescence (Jin, Mol Imaging 2006 ; Jin, Mol Cancer 2007 ; Sancey, EJNM 2007 ; Ahmadi, Cancer Biother Radiopharm 2008 ; Foillard, Chembiochem 2009). Ces études ont été menées au sein de deux laboratoires grenoblois, l'équipe INSERM U823 du Pr. Jean-Luc Coll pour l'imagerie en fluorescence et notre équipe U1039 pour l'imagerie nucléaire (Sancey, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier 2006).

- Une étude en fluorescence parue en 2007 (Jin, Mol Cancer 2007) confirme la capacité du RAFT-RGD à se fixer à l'intégrine $\alpha\beta3$ in vivo et donc à cibler spécifiquement des tumeurs $\alpha\beta3$ positives. Cette étude confirme également que le RAFT-RGD a une meilleure captation tumorale que la version monomérique cRGD (Figure 33).

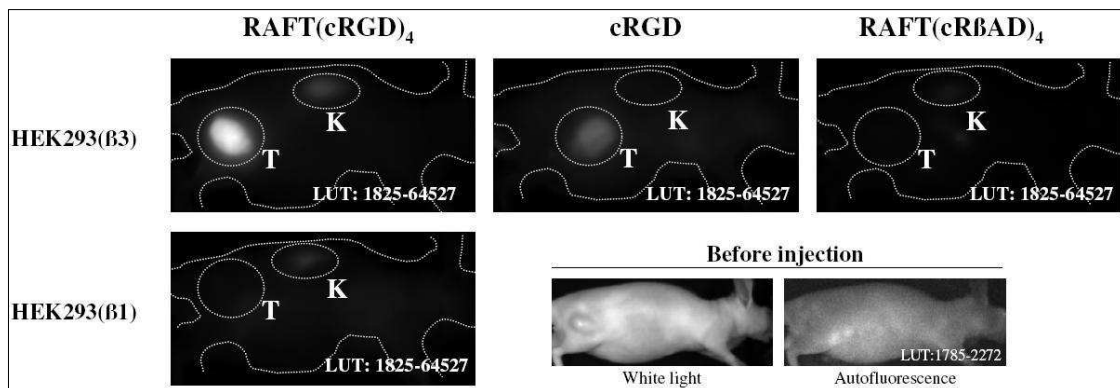


Figure 33 : Images obtenues en fluorescence de souris porteuses de tumeurs sous-cutanées exprimant $\alpha\beta3$ (HEK293 ($\beta3$), cellules embryonnaires de rein exprimant α et transfectées avec un plasmide portant le gène de $\beta3$) ou pas (HEK293 ($\beta1$)) et recevant des injections i.v. de RAFT-RGD, de cRGD ou de RAFT-RAD marqués avec un fluorophore, la cyanine 5. D'après Jin, Mol Cancer 2007.

Le RAFT-RGD permet, 4 heures après l'injection de la molécule marquée avec un fluorophore, d'obtenir un rapport d'intensité de fluorescence de la tumeur par rapport à la peau de 15,9 contre seulement 5,9 pour le monomère (Figure 34).

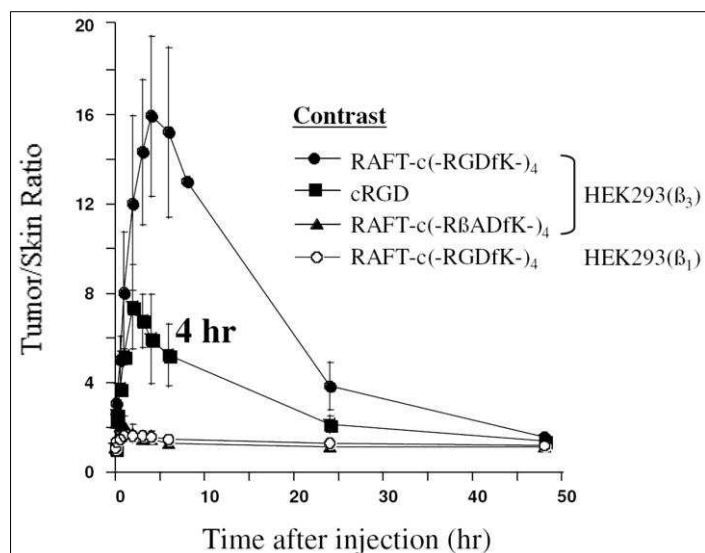


Figure 34 : *Rapports d'intensité de fluorescence au cours du temps entre la tumeur et la peau après injection i.v. de RAFT-RGD, de cRGD ou de RAFT-RAD marqués avec de la cyanine 5. D'après Jin, Mol Cancer 2007.*

– Une étude en imagerie nucléaire parue en 2007 (Sancey, EJNM 2007) présente la comparaison des biodistributions des molécules de RAFT-RGD, de RAFT-RAD et de cRGD radiomarqués au technétium-99m (Figure 35). On constate que le RAFT-RGD s'accumule spécifiquement dans les tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ par rapport au RAFT-RAD et ce de manière plus importante que le cRGD. L'élimination du ^{99m}Tc -cRGD se fait par les voies hépatiques et rénales et celles du ^{99m}Tc -RAFT-RGD ou du ^{99m}Tc -RAFT-RAD passent majoritairement par la voie rénale.

Organ	^{99m}Tc -cRGD (n=6)	^{99m}Tc -RAFT-RGD (n=6)	^{99m}Tc -RAFT-RAD (n=5)	Organ	^{99m}Tc -cRGD (n=6)	^{99m}Tc -RAFT-RGD (n=6)	^{99m}Tc -RAFT-RAD (n=5)
Heart	1.9±0.5	2.0±0.2	1.0±0.2 ^{a,b}	Heart	1.6±0.5	2.6±0.6 ^a	0.5±0.1 ^{a,b}
Lung	3.4±1.1	4.0±0.6	1.8±0.3 ^{a,b}	Lung	3.2±0.9	5.1±2.0	1.1±0.1 ^{a,b}
Liver	20.8±2.1	9.8±1.8 ^a	3.9±0.5 ^{a,b}	Liver	16.9±2.3	14.3±4.2	3.5±0.7 ^{a,b}
Spleen	2.8±0.8	3.7±1.4	1.2±0.3 ^{a,b}	Spleen	2.5±0.9	3.9±1.4	0.7±0.2 ^{a,b}
Kidney	20.0±17.6	44.0±5.9 ^a	45.8±5.1 ^a	Kidney	12.2±3.0	28.6±13.6 ^a	40.9±2.7 ^a
Stomach	3.6±1.6	4.1±0.5	1.7±0.2 ^{a,b}	Stomach	1.7±0.3	3.0±1.3 ^a	1.0±0.4 ^{a,b}
Intestine	3.8±3.5	3.3±0.3	1.4±0.3 ^b	Intestine	14.9±12.1	4.1±1.1	0.9±0.2 ^{a,b}
Bone	1.0±0.1	1.6±0.3 ^a	0.8±0.2 ^{a,b}	Bone	0.7±0.2	1.5±0.6 ^a	0.4±0.1 ^{a,b}
Brain	0.2±0.1	0.2±0.0	0.1±0.1 ^b	Brain	0.1±0.1	0.2±0.1 ^a	0.0±0.0 ^{a,b}
Blood	5.8±1.6	6.1±1.0	3.2±0.6 ^{a,b}	Blood	5.3±1.8	8.2±2.6	2.2±0.2 ^{a,b}
Muscle	0.7±0.3	0.7±0.1	0.4±0.1 ^b	Muscle	0.6±0.2	1.0±0.4	0.2±0.0 ^{a,b}
Tumour	1.6±0.4	2.4±0.5 ^a	1.0±0.1 ^{a,b}	Tumour	1.9±0.4	2.7±0.8 ^a	0.7±0.1 ^{a,b}

Figure 35 : *Biodistribution du cRGD, du RAFT-RGD et du RAFT-RAD radiomarqués au technétium-99m sur des souris Nude porteuses de tumeurs B16F0 à gauche ou TS/A-pc à droite, 60 minutes après injections des radiotraceurs. Résultats exprimés en %DI/g de tissu. D'après Sancey, EJNM 2007.*

Ces différences de captation tumorale entre RAFT-RGD et cRGD ne se retrouvent pas sur les images obtenues par scintigraphie (Figure 36). On constate cependant que les molécules de RAFT-RGD et cRGD permettent la visualisation de tumeurs exprimant $\alpha v\beta 3$.

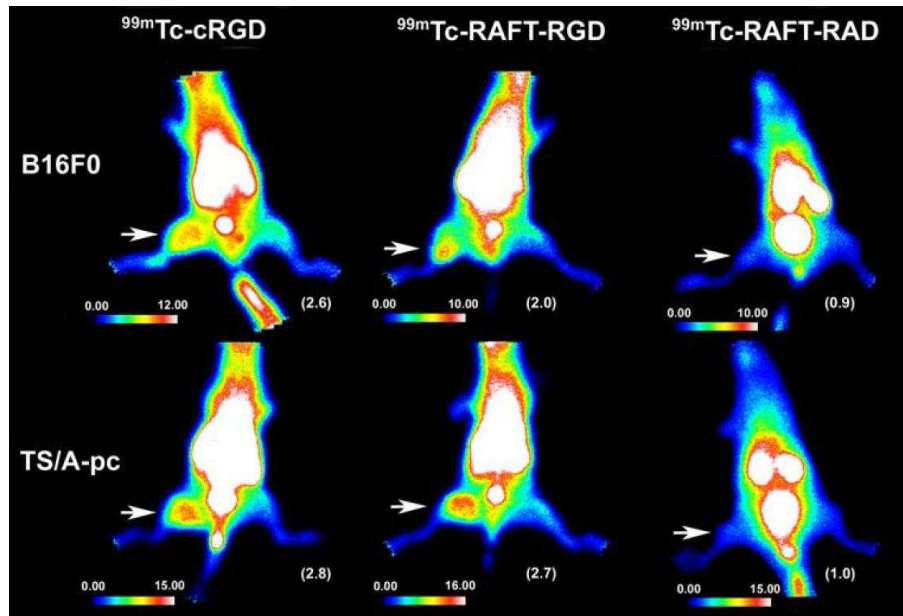


Figure 36 : Imagerie planaire scintigraphique de souris Nude porteuses de tumeurs B16F0 en haut ou TS/A-pc en bas, 50 minutes après injection de cRGD, RAFT-RGD ou de RAFT-RAD radiomarqués au technétium-99m. D'après Sancey, EJNM 2007.

Les études de biodistribution du ^{99m}Tc -RAFT-RGD et du ^{111}In -RAFT-RGD réalisées au laboratoire (Sancey, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier 2006) ont soulevé un problème d'importance : la forte captation rénale et les probables effets secondaires d'une radiothérapie utilisant le RAFT-RGD.

- Pour pallier à ce problème, des études visant à diminuer la captation rénale ont été effectuées au sein de notre laboratoire. **Des études précliniques ont ainsi montré qu'une injection de 100 μL de gélofusine® 4 % pouvait réduire de 50 % la captation rénale du ^{111}In -RAFT-RGD sans en diminuer la captation tumorale (Figures 37 et 38) (Briat, Cancer science 2012).**

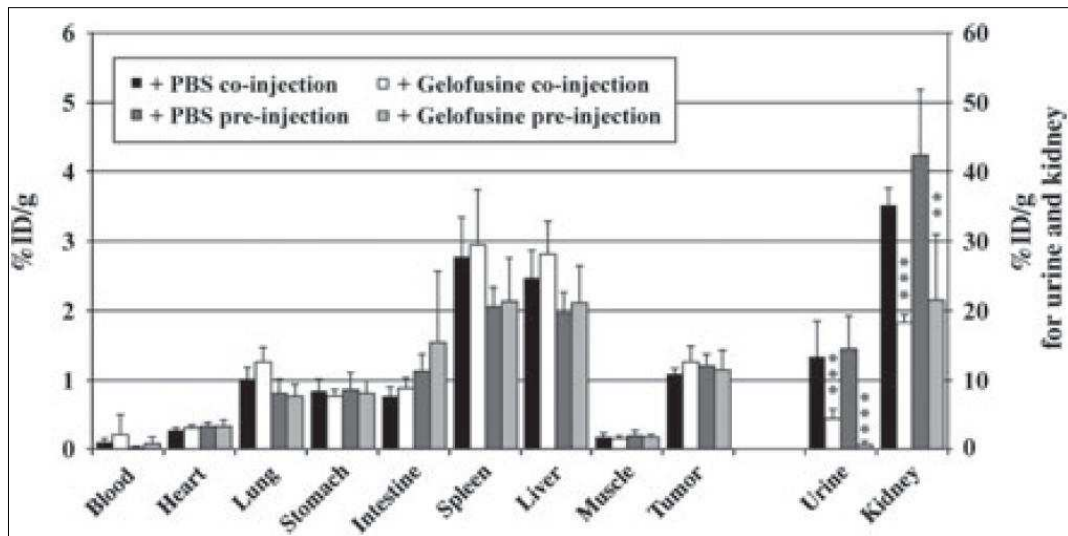


Figure 37 : Effet de la gélofusine® sur la biodistribution 24h p.i. du ^{111}In -RAFT-RGD. ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$ avec un test de Student, PBS vs gélofusine. Briat, Cancer science 2012.

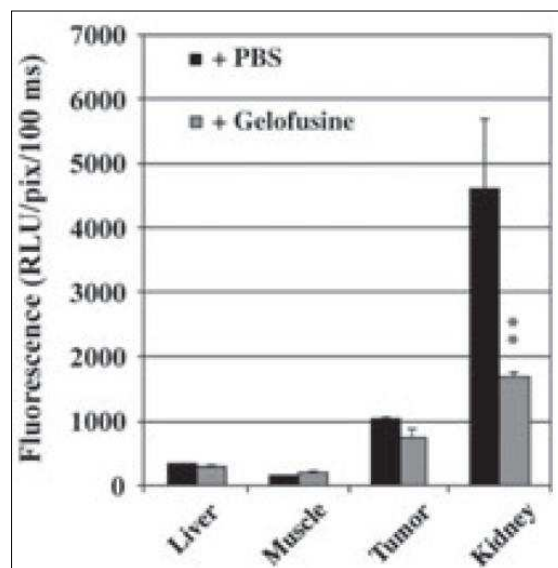


Figure 38 : Effet d'une pré-injection de gélofusine® sur la captation du RAFT-RGD couplé à un fluorophore, le A700, dans quelques organes clés. ** : $p < 0,01$ avec un test de Student, PBS vs gélofusine. Briat, Cancer science 2012.

Ces études montrent qu'il est tout à fait raisonnable d'envisager une radiothérapie interne vectorisée avec du RAFT-RGD radiomarqué avec un émetteur β^- puisque des moyens efficaces existent pour limiter la néphrotoxicité du traitement.

- Enfin, une étude parue en 2011 montre qu'il est possible d'utiliser la TEP pour visualiser et quantifier l'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ in vivo grâce à une molécule de cyclam-RAFT-RGD couplée à du cuivre-64, le ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)₄ (Jin, Nucl Med Biol 2011). L'un des modèles tumoraux utilisés dans cette étude est le glioblastome humain U-87 MG qui exprime l'intégrine $\alpha\beta3$. Cette équipe relève une captation tumorale équivalente à $3,46 \pm 0,45$ % de la DI/g 3h après l'injection de 740 kBq de ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)₄. La captation rénale du ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)₄ est d'environ 20% de la DI/g à 3h post-injection mais leur protocole expérimental ne prévoit pas de technique comme la co-injection de lysine et d'arginine ou l'administration de substituts plasmatiques tels que la gélofusine pour réduire cette captation rénale.

Le **RAFT-RGD** contient **30 acides aminés** et peut donc être qualifié de **dérivé polypeptidique**. Il présente les mêmes avantages que les peptides utilisés en radio-peptide-thérapie, à savoir, une petite taille permettant une distribution tumorale rapide et une internalisation du complexe formé avec son récepteur l'intégrine $\alpha\beta3$ (ce qui permet d'obtenir une rétention intra-tumorale de longue durée) et le même inconvénient : l'accumulation rénale.

2.2. Thérapie

La première étude de thérapie avec le RAFT-RGD comme vecteur est parue en 2011 (Dufort, J Drug Target 2011). Il s'agit d'une étude démontrant le potentiel thérapeutique du RAFT-RGD lorsqu'il est couplé à un peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂ : RAFT-RGD-KLA.

Le RAFT-RGD-KLA permet de délivrer le peptide pro-apoptotique à l'intérieur des cellules et d'inhiber la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose dans ces cellules (Figure 39).

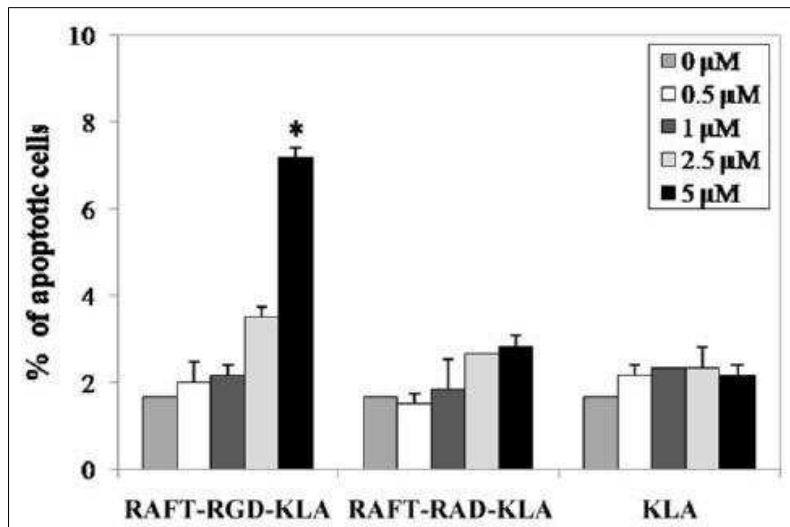


Figure 39 : Etude de cytotoxicité du RAFT-RGD-KLA. Des cellules en culture IGROV-1 sont traitées pendant 48 h avec des concentrations croissantes de RAFT-RGD-KLA, RAFT-RAD-KLA ou KLA. Les cellules sont ensuite fixées et les noyaux marqués avec du Hoechst 33342. Les noyaux apoptotiques sont comptabilisés. * $p < 0,05$. D'après Dufort, *J Drug Target* 2011.

Le potentiel thérapeutique du RAFT-RGD-KLA a été confirmé in vivo par le ralentissement de la croissance tumorale d'environ 5 fois par rapport au groupe contrôle avec un traitement quotidien de RAFT-RGD-KLA injecté en intra-péritonéal (Figure 40).

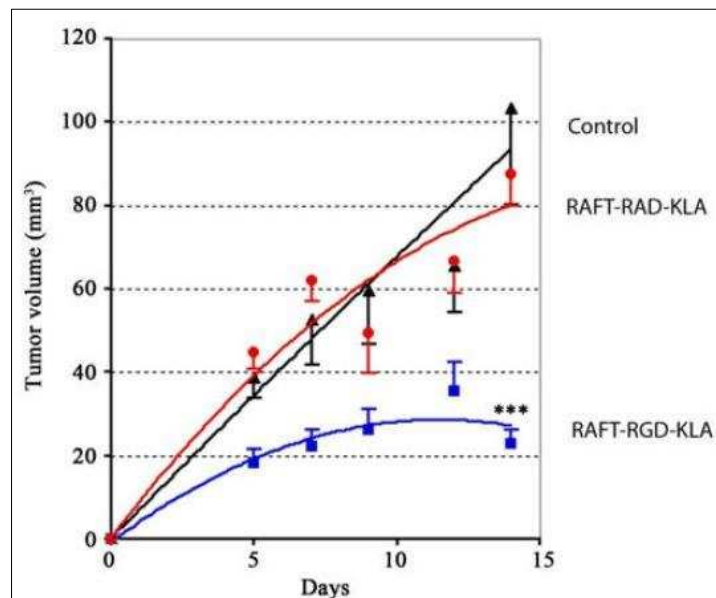


Figure 40 : Inhibition de la croissance tumorale in vivo avec un traitement de RAFT-RGD-KLA. Tumeurs IGROV-1 (carcinome ovarien humain, $\alpha\beta3$ +). Traitement quotidien dès le jour de l'implantation tumorale, injection intra-péritonéale de 200 μL de PBS avec 0,12 μmol de RAFT-RGD-KLA ou RAFT-RAD-KLA. $N = 5-7$ par groupe. *** $p < 0,0001$. D'après Dufort, *J Drug Target* 2011.

E. Conclusion de la partie bibliographique

L'objectif de mon travail de thèse était de **déterminer l'effet d'un nouvel agent de radiothérapie interne vectorisée (RIV)**. La RIV permet d'irradier des cibles tumorales de petite taille disséminées dans l'organisme au moyen de médicaments radioactifs. La RIV est un traitement systémique qui délivre une irradiation continue sur une période prolongée, à bas débit de dose. L'utilisation d'un bas débit de dose permet de profiter de l'effet de proximité (le « bystander effect » qui augmente la cytotoxicité du traitement au niveau tumoral) et de l'effet différentiel tumeurs / tissus sains (un faible débit protège mieux la plupart des tissus sains que les tumeurs car les capacités de réparation de l'ADN des cellules normales sont supérieures à celles des cellules tumorales).

La cible de ce nouvel agent de RIV est l'**intégrine $\alpha\beta3$** qui est en tête de liste des intégrines impliquées en oncogénèse. L'intégrine $\alpha\beta3$ est exprimée faiblement dans la plupart des tissus. Par contre, elle est fortement exprimée par les cellules endothéliales activées lors de l'angiogénèse et par les cellules de certains types de tumeurs invasives dont les mélanomes, les gliomes, le cancer du sein, des ovaires et du pancréas. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les tumeurs invasives ont souvent un fort potentiel angiogénique associé (Frank, Ann Surg 1995). La croissance rapide des tumeurs qui expriment $\alpha\beta3$ au niveau cellulaire est soutenue par une forte angiogénèse. Ces caractéristiques font de l'intégrine $\alpha\beta3$ une excellente cible en thérapie anticancéreuse puisqu'elle permet de viser à la fois les cellules des tumeurs invasives et la néo-angiogénèse tumorale. D'ailleurs, les thérapies ciblées anti- $\alpha\beta3$ représentent un domaine de recherche très actif.

Le vecteur dont nous disposons est le **RAFT-RGD**. Le RAFT-RGD est constitué de quatre peptides cyclo-RGD (ligands sélectifs de l'intégrine $\alpha\beta3$) fixés sur un groupe porteur RAFT (« Regioselectively Addressable Functionalized Template », molécule originale développée à Grenoble). Le RAFT-RGD a un faible poids moléculaire de 5 kDa environ. De nombreuses études montrent que le RAFT-RGD cible sélectivement l'intégrine $\alpha\beta3$ in vitro et in vivo, qu'il pénètre rapidement dans les cellules par endocytose et qu'il permet la détection in vivo par imagerie nucléaire ou par fluorescence de tumeurs exprimant $\alpha\beta3$ sur des modèles précliniques. Le RAFT-RGD présente des capacités supérieures au cRGD (molécule de référence dans les recherches sur les peptides RGD) avec une avidité supérieure pour

l'intégrine $\alpha\beta3$ et une meilleure captation tumorale grâce à son internalisation cellulaire. Ces caractéristiques font du RAFT-RGD un excellent vecteur potentiel pour cibler les tumeurs exprimant $\alpha\beta3$ et pour y délivrer des traitements, que ce soit des molécules de chimiothérapie ou des radionucléides de thérapie. Une récente étude confirme d'ailleurs ce potentiel lorsqu'un peptide pro-apoptotique est fixé sur le RAFT-RGD (Dufort, J Drug Target 2011).

Au cours de ces études, nous avons marqué successivement le RAFT-RGD avec deux radionucléides, tous deux **émetteurs β^-** , l'yttrium-90 et le lutétium-177. Les émetteurs β^- sont les radionucléides les plus employés en RIV, les applications médicales des particules α et des électrons Auger étant limitées par les caractéristiques radiophysiques des radionucléides actuellement disponibles. Les émetteurs β^- ont un TEL faible qui provoque des lésions éparses facilement réparables (surtout par les cellules normales). Ils ont un parcours long, ce qui leur procure un avantage car la zone irradiée est ainsi plus importante que la zone ciblée (grâce au phénomène de « feux croisés ») et un inconvénient à cause de la toxicité médullaire induite.

L'**yttrium-90** est un émetteur β^- pur très énergétique. Avec une énergie maximale de 2,28 MeV, c'est le plus énergétique des principaux émetteurs β^- utilisés en RIV (Tableau 5, page 46). Il émet des électrons avec un parcours moyen de 3,6 mm et un parcours maximal assez long de 11 mm dans l'eau ou les tissus mous. L' ^{90}Y a une demi-vie de 64,1 heures (2,67 jours).

Le **lutétium-177** est un émetteur mixte β^- moyennement énergétique (78,7 % : $E_{\max}=0,497$ MeV) et γ (11% : $E_{\max}=0,208$ MeV et 6,4% : 0,113 MeV). Son rayonnement β^- a un parcours moyen infra millimétrique et un parcours maximal très court de 1,8 mm dans l'eau ou les tissus mous. Le ^{177}Lu a une demi-vie de 161 heures (6,61 jours). L'intérêt du ^{177}Lu réside en outre dans sa double émission β^- et γ qui permet son utilisation en thérapie et en imagerie.

Le but de mon travail de thèse était de déterminer le potentiel thérapeutique du RAFT-RGD lorsqu'il est couplé à un émetteur β^- (yttrium-90 ou lutétium-177) sur des tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$.

Partie 2 : Matériel et Méthode

A. Produits radiomarqués

Les molécules sont synthétisées au sein du Département de Chimie Moléculaire, UMR 5250 CNRS, dirigé par le Pr. Pascal Dumy, dans le laboratoire i2bm (Ingénierie et Interactions BioMoléculaires) du Dr. Didier Boturyn. La formule chimique et les applications du RAFT ont été protégées par dépôt de brevet. Le radiomarquage est effectué au sein de notre laboratoire par les radiochimistes de notre équipe.

1. RAFT(c[-RGDfK-])₄ ou RAFT-RGD et RAFT(c[-RADfK-])₄ ou RAFT-RAD

La formule générale du peptide est représentée ci-dessous (Figure 41). Dans cette formule « X » représente différents acides aminés ou autre groupement que l'on peut attacher sur la chaîne latérale de la lysine (K) afin de réaliser le radiomarquage souhaité :

- la tyrosine (Y) permet le marquage à l'iode-125 (Ardisson, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier 2006),
- l'histidine (H) permet le marquage au technétium-99m (Ahmadi, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier 2008),
- le groupement **DOTA** ([1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid]) (Figure 41) permet le marquage à l'indium-111, à l'yttrium-90 ou au lutétium-177. Le schéma d'une coordination possible est présenté dans la figure 43.

La masse molaire du **DOTA-RAFT-RGD** est de **4265 g.mol⁻¹**.

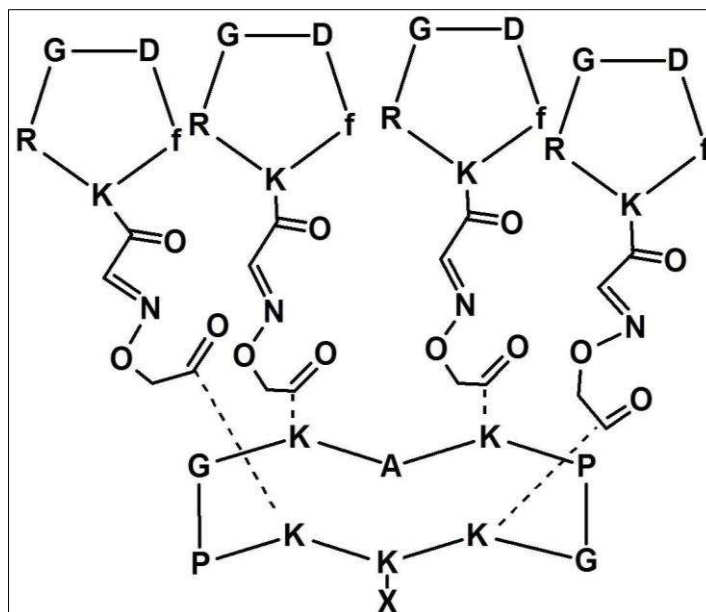


Figure 41 : Formule générale du RAFT-RGD

Le peptide RAFT-RGD est comparé à une molécule non spécifique : le RAFT(c[-RADfK-])₄ ou RAFT-RAD qui présente la même structure que le RAFT-RGD sauf au niveau du motif cible RGD où la glycine a été remplacée par une β-alanine (lettre A) c[RADfK] (Figure 42, B). Le remplacement de la glycine par la β-alanine est connu pour abolir entièrement la reconnaissance du peptide pour sa cible αvβ3. C'est pourquoi le RAFT-RAD est utilisé comme molécule non spécifique, contrôle négatif (Boturyn, JACS 2004).

La masse molaire du DOTA-RAFT-RAD est de 4321 g.mol⁻¹.

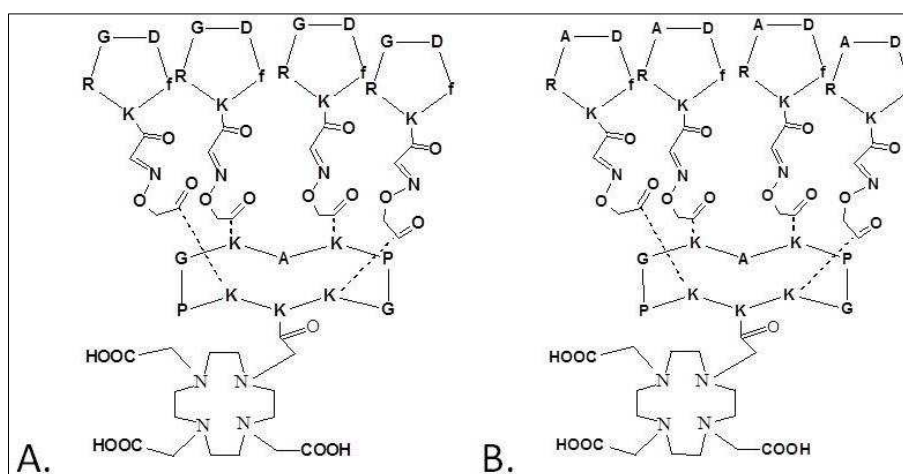


Figure 42 : Structure du DOTA-RAFT-RGD (A) et du DOTA-RAFT-RAD (B).

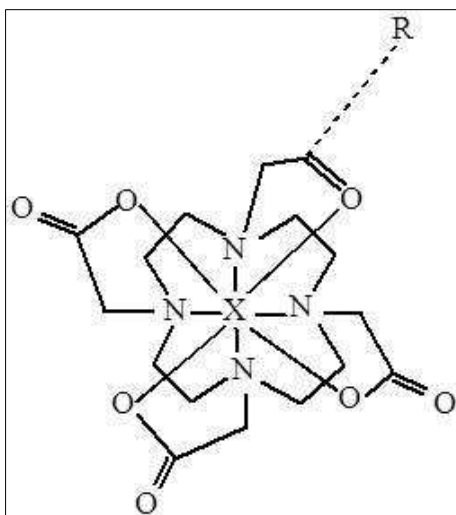


Figure 43 : Structure d'une coordination possible du DOTA-⁹⁰Y et DOTA-¹⁷⁷Lu. X = Y-90 ou Lu-177 et R= RAFT-RGD ou RAFT-RAD.

2. Radiomarquages

2.1. Radiomarquage à l'yttrium-90

L'yttrium-90 (⁹⁰Y), acheté chez Perkin Elmer, est fourni sous forme de chlorure d'⁹⁰Y (⁹⁰YCl₃).

Pour le radiomarquage, 10 mg de gentisate de sodium (un antioxydant pour éviter la radiolyse) sont solubilisés dans 150 µL de tampon acétate ammonium (0,5 M). Puis 100 µg de DOTA-RAFT-RGD ou DOTA-RAFT-RAD (10 µg.µL⁻¹) et 185 MBq (5mCi) de ⁹⁰YCl₃ (3,7 MBq.µL⁻¹) sont ajoutés. L'ensemble est incubé à 90°C pendant 7 min dans un bloc chauffant et ensuite refroidi à température ambiante. Afin de chélater l'⁹⁰Y libre, 240 µL d'une solution de DTPA 2 mM (20 fois supérieure à la quantité molaire du DOTA-RAFT-RGD) sont ajoutés au flacon de marquage puis incubés à température ambiante pendant 15 minutes.

Pour mesurer la **pureté radiochimique par radio-HPLC**, 5 µL de la solution de marquage sont prélevés. La **stabilité temporelle du marquage** à température ambiante est également suivie. Pour chacune de ces analyses la solution est diluée dans du NaCl 0,9% pour obtenir la concentration radioactive souhaitée.

2.2. Radiomarquage au lutétium-177

Le lutétium-177 (^{177}Lu), également acheté chez Perkin Elmer, est sous forme de chlorure de ^{177}Lu ($^{177}\text{LuCl}_3$).

Le marquage est identique à celui de l'yttrium-90 : 10mg de gentisate de sodium, 150 μL de tampon acétate ammonium (0.5 M), 100 μg de DOTA-RAFT-RGD ou DOTA-RAFT-RAD (10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) et 185 MBq (5 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$ (3,7 MBq $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) sont incubés à 90°C pendant 7min. Après refroidissement du flacon, 240 μL d'une solution de DTPA 2mM sont ajoutés et incubés à température ambiante pendant 15 minutes afin de complexer le ^{177}Lu libre.

Comme précédemment la pureté radiochimique et la stabilité du marquage au cours du temps sont mesurées et suivies par une radio-HPLC.

Pour des raisons de commodité, les termes ^{90}Y -RAFT-RGD, ^{90}Y -RAFT-RAD ou ^{111}Lu -RAFT-RGD et ^{111}Lu -RAFT-RAD feront référence aux molécules de DOTA-RAFT-RGD ou DOTA-RAFT-RAD radiomarquées avec du ^{90}Y ou du ^{111}Lu .

B. Etudes cellulaires

1. Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires humaines et murines sont utilisées. Ces lignées ont été choisies en fonction de leur expression ou leur absence d'expression de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ ainsi que pour leur capacité à induire des tumeurs solides lorsqu'elles sont implantées chez des souris Nude.

1.1. U-87 MG, glioblastome humain, $\alpha\text{v}\beta 3+$

Cette lignée humaine a été établie à partir d'un sujet féminin de 44 ans et de type caucasien (LGC Standards, Molsheim, France en partenariat avec ATCC, Réf ATCC : HTB-14).

Ce type de tumeur, également connu sous le nom d'astrocytome de grade IV, est la **tumeur primitive du cerveau la plus fréquente chez l'Homme** (70% des tumeurs primitives malignes du cerveau et 20% des tumeurs intra-crâniennes) **et la plus agressive** (la survie médiane à partir du diagnostic est de 3 mois sans traitement et de 14 mois avec un traitement standard) (Wen, N Engl J Med, 2008). Les glioblastomes sont des tumeurs intrinsèquement radorésistantes qui ont un grand nombre de cellules hypoxiques.

En culture, ces cellules sont adhérentes et de morphologie épithéliale (Figure 44). Elles se développent en monocouches et multicouches (formation de grappes).

Ces cellules sont cultivées dans du MEM (Minimal Essential Medium Eagle) contenant des sels de Earle et de la glutamine stable, supplémenté avec 10% de Sérum de veau foetal (MEM et SVF, PAA Laboratories, Les Mureaux, France). Le milieu de culture est renouvelé trois fois par semaine. Les cellules arrivant à confluence sont réensemencées dans de nouveaux flacons de culture une à deux fois par semaine. Le temps de doublement indiqué par le fournisseur pour cette lignée est d'approximativement 50h.

Ces cellules sont reconnues pour fortement exprimer en surface l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Xiong, J Nucl Med, 2006 ; Zhang, J Nucl Med 2006).

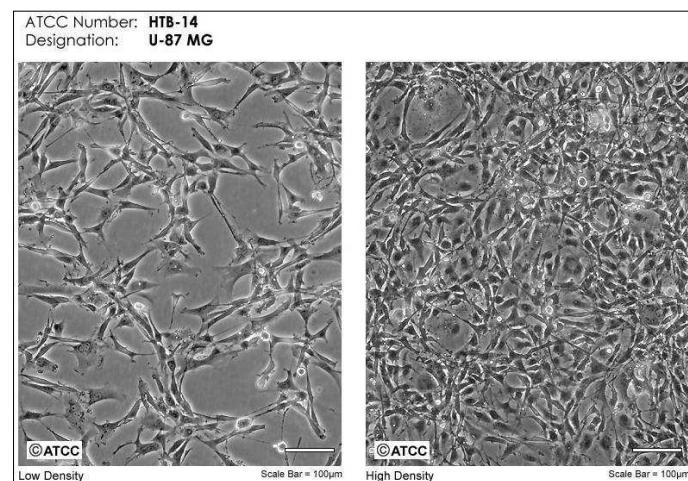


Figure 44 : Photographie au microscope des cellules U-87 MG.

1.2. MCF-7, Adénocarcinome mammaire humain, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -

Cette lignée humaine a été établie à partir d'un sujet féminin de 69 ans de type caucasien (LGC Standards, Molsheim, France en partenariat avec ATCC, Réf ATCC : HTB-22). MCF-7 est l'acronyme de « Michigan Cancer Fondation », l'institut de Détroit où cette lignée a été établie en 1973. Cet adénocarcinome est une tumeur maligne qui se développe aux dépens de l'épithélium glandulaire mammaire.

En culture, ces cellules sont adhérentes et de morphologie épithéliale (Figure 45). Elles se développent en monocouches mais ont gardé la capacité à former des dômes.

Ces cellules sont cultivées dans du MEM (Minimal Essential Medium Eagle) contenant des sels de Earle et de la glutamine stable, supplémenté avec 10% de Sérum de veau fœtal (PAA Laboratories, Les Mureaux, France, Références E15-888 et A15-101) et $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'insuline (Actrapid, Novo Nordisk Pharmaceutique SAS, Paris). Le milieu de culture est renouvelé trois fois par semaine. Les cellules arrivant à confluence sont réensemencées dans de nouveaux flacons de culture une à deux fois par semaine. Le temps de doublement indiqué par le fournisseur pour cette lignée est d'approximativement 30h.

Ces cellules n'expriment pas l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (Xiong, J Nucl Med, 2006 ; Beauvais, JCB 2004).

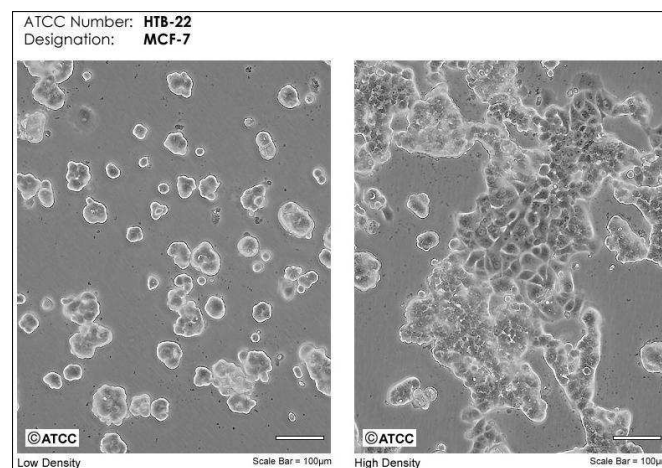


Figure 45 : Photographie au microscope des cellules MCF-7.

1.3. TS/A-pc, carcinome mammaire murin, $\alpha\beta3$?

La lignée TS/A-pc (pc pour « parental cells ») est une lignée murine de carcinome mammaire qui a été établie à partir de souris de type Balb/c. Elle nous a été généreusement fournie par le Dr. Lucie Sancey (équipe du Pr. Jean-Luc Coll, Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Grenoble).

En culture, ces cellules sont adhérentes, de morphologie épithéliale et se développent en monocouches. Ces cellules sont cultivées dans du RPMI 1640 contenant de la glutamine stable (PAA Laboratories, Les Mureaux, France) supplémenté avec 10 % de SVF. Le temps de doublement de cette lignée est d'approximativement 36 heures.

Lucie Sancey a montré dans ses travaux de thèse que ces cellules exprimaient $\alpha\beta3$ (Sancey, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier 2006).

2. Méthodes de culture cellulaire

A réception, les cellules sont immédiatement mises en culture.

– La décongélation

La décongélation s'effectue par un chauffage très rapide (2 min) dans un bain-marie à 37°C. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube de centrifugation et diluées progressivement avec du milieu préchauffé. Elles sont ensuite sédimentées par centrifugation 5 minutes à 1500 rpm et remises en suspension dans du milieu complet pré-incubé au moins 15 minutes. Cette pré-incubation permet d'équilibrer le pH et évite ainsi la mise en contact des cellules fragilisées par la décongélation avec du milieu trop basique.

– Congélation

Un lot de réserve puis un lot de travail sont établis et conservés dans l'azote liquide à -196°C. La congélation se fait dans des cryotubes en présence d'un agent cryoprotecteur, le Diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10% dans du milieu de culture complet (contenant du sérum de veau foetal et les additifs spécifiques à chaque lignée) avec une descente progressive de température d'environ 1°C par minute. Ce refroidissement progressif est obtenu en plaçant les cryotubes dans une boîte contenant du propane-2-ol à -80°C (Mr Frosty, Cryo 1°C Freezing container, NalgeneTM). Le lendemain, les cryotubes sont transférés dans l'azote liquide.

A chaque nouvelle expérimentation, un cryotube du lot de travail est décongelé et les cellules remises en culture afin de toujours travailler avec des cellules à faible passage, limitant ainsi leur dérive génétique.

– Passage des cellules

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont détachées et réensemencées en plus faible quantité dans de nouveaux flacons. Après aspiration du milieu de culture, les cellules sont rincées avec de la trypsine 0,05%, EDTA 0,02% en PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), puis recouvertes d'un petit volume de trypsine-EDTA et placées 5 minutes à l'incubateur (la trypsine est une enzyme digestive intestinale qui coupe les polypeptides aux endroits occupés par la lysine et l'arginine). L'ajout du double en volume de milieu complet arrête l'action de la trypsine-EDTA. Les cellules sont ensuite sédimentées par centrifugation 5 minutes à 200g puis remises en suspension dans du milieu complet et réparties dans de nouveaux flacons. Les cellules sont conservées dans un incubateur à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 .

– Viabilité des cellules

La viabilité des cellules est mesurée grâce à l'incorporation de bleu trypan dans les cellules mortes de l'échantillon servant au comptage.

La viabilité est calculée grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = (1 - (\text{nombre de cellules bleues} / \text{nombre de cellules totales})) \times 100$$

Le suivi régulier de la viabilité cellulaire permet de contrôler l'état général des cellules. Ce dernier est considéré comme bon avec un pourcentage de viabilité cellulaire supérieur à 90-95%.

– Le temps de doublement

Le temps de doublement ou temps d'une génération (TG) est également régulièrement calculé. Sa constance est également un bon reflet de l'état des cellules. Le temps de doublement ou temps d'une génération est l'intervalle de temps nécessaire pour que la quantité de cellules double pendant la phase de croissance logarithmique.

Le temps de doublement peut être calculé grâce à la formule suivante :

$$TG = (\log 2 \times T) / (\log Y - \log X)$$

T est le temps (heure ou jours) en culture au moment du comptage, Y est le nombre de cellules finales et X le nombre de cellulesensemencées.

– Vérification de l'absence de mycoplasmes

Le milieu des cellules est également régulièrement contrôlé pour la présence de mycoplasmes (avant et après chaque décongélation). Ce test est effectué avec le Plasmotest, Mycoplasma Detection Kit (InvivoGen, Cayla, Toulouse, France). La présence de mycoplasmes invisibles au microscope à faible grossissement peut altérer le comportement cellulaire et modifier les résultats des expérimentations. Ce test est un test colorimétrique utilisant des cellules HEK-Blue-2 et basé sur l'activation du récepteur 2 de type Toll (Toll-like receptor 2) par les mycoplasmes.

3. Western blot

L'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ par les différentes lignées a été vérifiée par western blot.

A confluence, les cellules sont lysées avec une solution tampon de lyse (RIPA lysis buffer, Sigma-Aldrich, Lyon). Les concentrations protéiques des extraits cellulaires sont quantifiées grâce au réactif de Bradford (Sigma-Aldrich, Lyon), après réalisation d'une gamme étalon d'échantillons contenant des concentrations connues d'albumine bovine (BSA). La mesure de l'absorbance à 595 nm des échantillons de la gamme étalon permet de déterminer la fonction reliant la valeur de l'absorbance à celle de la concentration protéique et ainsi de calculer la concentration protéique des échantillons à tester en fonction de leur propre mesure d'absorbance.

Les échantillons sont ensuite mélangés avec le même volume d'une solution tampon Laemmli sans β -mercaptoéthanol (Tris-HCl 0,125 M à pH 6,8 contenant 4% de SDS, 20% de glycérol et 0,05% de bleu de bromophénol). Le gel utilisé est un gel de polyacrylamide contenant 7,5% de Tris-Glycine pour une échelle de séparation de 50 à 200 kDa (PAGEr® Gold Precast Gels, Lonza, Rockland, ME, USA). En plus des échantillons, un marqueur de poids moléculaire est également déposé dans un puits du gel (ProSieve Color Protein Markers, Lonza, Rockland, ME, USA). L'électrophorèse s'effectue avec le « Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell » (Bio-Rad) à 125V et 120 mA (Générateur Bio-Rad, modèle 200/2.0 power supply) pendant 45

minutes environ dans un tampon de migration (Tris Base 25 mM, Glycine 192 mM et 0,1% de SDS).

Le transfert sur membrane s'effectue avec l'ensemble « Mini trans-blot electrophoretic transfert cell » (Bio-Rad) à 4°C dans un tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM et 20% de méthanol), à 50 V et 180 mA pendant une heure et demi. Une fois terminé, la qualité du transfert est vérifiée en plongeant la membrane dans une solution de rouge Ponceau (Sigma-Aldrich, Lyon).

S'en suivent des étapes de décoloration avec du tampon PBS-EDTA-Triton et de saturation avec une solution de blocage pendant une nuit dans du tampon PBS-EDTA-Triton contenant du lait écrémé en poudre. La membrane est ensuite mise en contact avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage pendant 4 heures (Tableau 7). Après quelques étapes de lavages au PBS-EDTA-Triton, la membrane est mise en contact avec les anticorps secondaires couplés avec la peroxydase du Raifort (horseradish peroxidase, HRP) dilués dans la solution de blocage (PBS-EDTA-Triton et lait écrémé) pendant une heure. La membrane est de nouveau lavée dans plusieurs bains de PBS-EDTA-Triton avant de passer à l'étape de détection.

La détection s'effectue avec le système de détection ECL (Amersham™, ECL™ West blotting detection reagents, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) sur un film Amersham™ Hybond™-ECL exposé de 10 à 60 secondes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Les films sont ensuite développés en utilisant les révélateurs et fixateurs Kodak GBX.

Antigène détecté	Anticorps primaire	Anticorps secondaire (provenance)
alpha v (CD 51) humaine et murine, 125 kDa	IgG1 de souris (BD 611012) dilué au 1/500 ^{ème}	Anti-IgG1 de souris (chèvre) couplé HRP (BD 554002) dilué au 1/1000 ^{ème}
béta 3 (CD 61) humaine et murine, 105 kDa	IgG de lapin (Millipore 04-1060) dilué au 1/2000 ^{ème}	Anti-IgG de lapin (chèvre) couplé HRP (Millipore 12-348) dilué au 1/3000 ^{ème}
actine humaine et murine, 42 kDa	IgG1 de souris (BD 612656) dilué au 1/5000 ^{ème}	Anti-IgG1 de souris (chèvre) couplé HRP (BD 554002) dilué au 1/1000 ^{ème}

Tableau 7 : Les différents anticorps utilisés pour le western blot.

4. Cytométrie en flux

L'expression de l'intégrine $\alpha\beta_3$ par les différentes lignées a été quantifiée par cytométrie en flux.

Cette expérience a été réalisée grâce à l'aide de Pierre Champelovier à l'institut de Biologie et Pathologie du CHU de Grenoble (équipe du Dr. Jean Boutonnat) avec un FACS Canto II (Becton Dickinson).

Les cellules sont décollées avec du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} contenant 0,02% d'EDTA. On récolte les cellules par ajout de PBS-BSA 1%. Les cellules sont réparties dans deux tubes à raison de 200 000 cellules par tube. Après 5 minutes de centrifugation à 200g, les cellules sont resuspendues avec un anticorps anti- $\alpha\beta_3$ (ou avec l'anticorps de contrôle isotypique) couplé à un fluorochrome dilué dans du PBS (Tableau 8). Après un temps de fixation dont les conditions varient selon l'anticorps utilisé, on retire l'excès d'anticorps par ajout de PBS-BSA 1% suivi de 5 minutes de centrifugation à 200g et aspiration du surnageant. Un rinçage est effectué avec du PBS-BSA 1%, suivi d'une nouvelle centrifugation et de l'élimination du surnageant. Les cellules sont finalement suspendues dans 200 μL de PBS-BSA 1%. Les échantillons sont ensuite analysés par le cytomètre.

Antigène détecté	Anticorps utilisé	Contrôles isotypiques	Conditions spécifiques
$\alpha\beta_3$ (CD51/CD61) humaine (U-87 MG et MCF-7)	IgG1 de souris couplée à la Phycoérythrine, PE (BD Pharmingen 550037)	IgG1 non spécifique de souris couplée à la PE (BD Pharmingen 555749)	Pour 200 000 cellules : 2 μL d'anticorps dans du PBS, volume final 10 μL . 15 minutes à température ambiante. Echantillon à analyser dans les 30 minutes.
β_3 (CD61) murine (TS/A-pc)	IgG2b de rat couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine, FITC (Emfret Analytics MO31-1)	IgG polyclonales de rat non spécifiques couplées au FITC (Emfret Analytics P190-1)	Pour 200 000 cellules : 4 μL d'anticorps dans du PBS, volume final 20 μL . 30 minutes à 4°C dans l'obscurité.

Tableau 8 : Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.

Lors de l'acquisition, les cellules sont sélectionnées en fonction de leur taille et de leur granulosité. Pour l'analyse, on élimine les débris cellulaires. La mesure de la fluorescence du contrôle isotypique permet de définir la valeur nulle. Les deux fluorochromes utilisés ici sont excités par des longueurs d'ondes différentes (Tableau 9) et émettent également des photons de longueurs d'onde spécifiques. La valeur de l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'expression de l'antigène présent à la surface des cellules.

Fluorochrome	Excitation (nm)	Emission (nm)
Phycoérythrine (PE)	565	578
Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)	490	543

Tableau 9 : Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des deux fluorochromes utilisés.

5. Cinétique de captation cellulaire

Cette étude vise à évaluer la captation in vitro du ^{90}Y -RAFT-RGD et du ^{90}Y -RAFT-RAD par différentes lignées cellulaires. Les cellules U-87 MG, TS/A-pc et MCF-7 sontensemencées en plaques de culture 6 puits la veille de l'expérience, à raison d'un million de cellules par puits dans 8 mL de milieu complet. Le jour de l'expérience, le milieu est remplacé par du milieu sans SVF pour limiter les interactions aspécifiques avec les protéines du sérum. Le radioligand est rajouté dans ce milieu à raison de 370 kBq (10 μCi) dans 100 μL de PBS par puits à $t=0$. Après 5, 15, 30, 60 ou 120 minutes d'incubation, le milieu est aspiré et placé dans un tube.

Les cellules U-87 MG forment des grappes qui se détachent très facilement au cours des différents lavages. De plus, l'ajout de molécules présentant des peptides RGD favorise le détachement des cellules par leur fixation sur l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (Chen, J Med Chem 2005). Il était donc indispensable de récupérer ces cellules en suspension, d'autant plus qu'il était probable que les cellules détachées aient fixé le ^{90}Y -RAFT-RGD. Un protocole spécifique a

été mis en place pour récupérer les cellules détachées et ainsi mesurer la captation du ^{90}Y -RAFT-RGD et du ^{90}Y -RAFT-RAD pour l'ensemble des cellules en culture.

Après la récolte du milieu, 2 lavages successifs avec du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} sont réalisés. A chaque aspiration, le PBS est récupéré dans le même tube que le milieu. Les cellules en suspension dans le tube sont ensuite récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 200g, suivie d'un lavage au PBS et d'une nouvelle centrifugation. Les cellules sont alors reprises dans 50 μL d'une solution tampon de lyse (RIPA lysis buffer, Sigma-Aldrich, Lyon) et placées à 4°C pendant 5 minutes.

Sur les cellules adhérentes de la plaque 6 puits, suite aux lavages avec du PBS, 1 mL de la solution tampon de lyse est déposé. Après 5 minutes à 4°C, les cellules lysées sont décollées avec un grattoir et la suspension cellulaire est placée dans un tube sur glace.

Les suspensions issues des cellules adhérentes et détachées sont réunies.

Trois puits sont ainsi traités pour chaque temps d'incubation.

Pour chaque puits, 0,5 mL de suspension cellulaire est prélevé puis mesuré au compteur gamma (Cobra II, Packard) afin de déterminer la quantité de radioactivité captée. En parallèle, une gamme étalon est également analysée au compteur gamma pour pouvoir convertir les valeurs obtenues par le passeur qui sont exprimées en coups par minute (cpm) en becquerels. Bien qu'il soit impossible de mesurer directement les rayonnements β avec le compteur gamma, on peut quantifier l'activité β émise par l'yttrium-90 par détection du rayonnement de freinage, également appelé Bremsstrahlung, produit lors de l'interaction des rayonnements β avec l'environnement (Yoshimoto, Int J Cancer 2008 ; Shen, J Nucl Med 1994).

On réalise en parallèle un dosage des protéines de la suspension cellulaire issue de chaque puits selon le protocole précédemment décrit dans la section « Western Blot ».

La captation cellulaire des deux molécules testées, ^{90}Y -RAFT-RGD et ^{90}Y -RAFT-RAD, est exprimée en femtomoles captées par milligramme de protéine par nanomole injectée. Pour chaque temps, les résultats sont indiqués en moyennant les résultats obtenus pour les trois puits et en calculant l'écart-type.

Ce protocole a nécessité plusieurs expériences de mise au point. La cinétique de captation cellulaire du ^{90}Y -RAFT-RAD a été obtenue au cours de l'une de ces expériences dans des conditions légèrement différentes. Cette étude s'est déroulée sur 60 minutes comprenant 8 temps d'incubation différents (au lieu des 120 minutes et 5 temps différents pour le ^{90}Y -

RAFT-RGD) et pour seulement deux lignées cellulaires, la lignée positive pour l'expression d' $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, U-87 MG et la lignée négative pour cette intégrine, MCF-7.

C. Expérimentation animale

L'ensemble des protocoles est en accord avec les lois d'éthiques et a été soumis et validé par le comité d'éthique local Com-ETH (Avis favorable 75_LER-U1039-DMB-01).

1. Les souris

Trois différentes souches de souris Nude ont été utilisées. Les souris Nude ont une aplasie du thymus et sont donc déficientes en lymphocytes T. Cette caractéristique facilite le développement de tumeurs sur ces modèles, les lymphocytes T jouant un rôle primordial dans les rejets de greffe. Immunodéprimées, ces souris sont plus fragiles et nécessitent une attention particulière. Dans une pièce de l'animalerie qui leur est dédiée, les souris Nude sont conservées dans des cages avec filtre dans des armoires ventilées autonomes, en surpression, à 25°C et 30 à 50% d'hygrométrie. La nourriture et l'eau de boisson sont stérilisées et fournies ad libitum. Les cages et les litières sont changées deux fois par semaine. Les souris sont placées sous une hotte à flux laminaire lors de leur manipulation. A leur arrivée, les souris sont placées une semaine en stabulation avant toute expérimentation.

Les souches de souris Nude utilisées varient selon le type de tumeur qui leur a été implanté mais toutes sont des femelles âgées de 5 à 6 semaines à la livraison. La veille de l'implantation tumorale, les souris sont individuellement identifiées par un tatouage. Les souris sont également pesées tous les 7 jours.

Des Swiss Nude (Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) ont servi de modèle pour l'implantation des tumeurs U-87 MG.

Pour les tumeurs MCF-7, la souche NMRI Nude (Janvier, Saint Berthevin, France) a été utilisée.

Dans ces deux cas, les cellules implantées provenant d'une espèce différente de celle du receveur, il s'agit de xénogreffes.

Pour les tumeurs TS/A-pc, des souris BALB/c Nude (Janvier, Saint Berthevin, France) ont été privilégiées, les cellules TS/A-pc ayant été isolées à partir d'un carcinome mammaire de souris BALB/c. Il s'agit dans ce dernier cas de greffes syngéniques.

2. Induction tumorale

La veille de l'implantation tumorale, le milieu de culture cellulaire est renouvelé pour optimiser l'état des cellules. Les cellules sont récoltées comme indiqué précédemment et suspendues dans du milieu de culture pur (non supplémenté). Les cellules sont implantées en sous-cutané sur la patte arrière gauche avec une seringue présentant une aiguille 23G (assez large pour ne pas détruire les cellules lors de leur passage dans l'aiguille).

Cinq millions de cellules U-87 MG dans 100 μ L de MEM sont implantées sur les Swiss Nude.

Les TS/A-pc sont implantées à raison d'un million de cellules dans 100 μ L de RPMI 1640 sur les Balb/c Nude.

Les MCF-7 sont implantées à raison de 10 millions de cellules par souris dans 200 μ L de matrigel (Matrigel haute concentration, BD Biosciences) sur les NMRI Nude.

L'implantation en matrigel, nécessite de travailler à 4°C. La veille de l'implantation, le matrigel doit être placé dans de la glace, à 4°C pour qu'il devienne liquide et le matériel servant à l'implantation doit être placé au congélateur.

L'eau de boisson des souris NMRI Nude est supplémentée avec des œstrogènes (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Sigma Aldrich) afin de favoriser la croissance tumorale. Les œstrogènes stimulent la prolifération des cellules MCF-7 (Oh, Cell Death and Differ. 2011 ; Babic, Methods 2010) d'une part parce que ces cellules d'adénocarcinome mammaire expriment de nombreux récepteurs à l'œstrogène et d'autre part parce que les oestrogènes diminuent l'immunosurveillance en bloquant la mort cellulaire induite par les lymphocytes NK (Jiang, Oncogene 2007 ; Gauchez, Anticancer Research 1996). Les œstrogènes augmentent l'expression de PI-9 (Serpin9/proteinase inhibitor 9), inhibiteur de la granzyme B contenue dans les granules libérées par les NK pour lyser les cellules.

3. Suivi de la croissance tumorale

3.1. Mesures

Les souris sont ensuite observées quotidiennement. Dès que les tumeurs sont visibles, le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse à lecture digitale (précision 10^{-2} mm, Servilab). Trois mesures sont relevées quotidiennement : Longueur, largeur et épaisseur.

La formule du volume d'un ellipsoïde nous permet d'obtenir le volume tumoral (Tomayko, Cancer Chemother Pharmacol 1989):

$$V(\text{tumeur}) = (\text{Longueur} \times \text{largeur} \times \text{épaisseur}) \times \pi/6$$

Plusieurs paramètres peuvent être calculés à partir du suivi du volume tumoral.

- La taille relative (TR)

La taille relative de la tumeur par rapport au jour du traitement est un calcul simple qui donne une bonne indication de la croissance tumorale.

$$\text{Taille relative (TR)} = \text{Volume tumoral au jour J} / \text{Volume tumoral le jour du traitement}$$

- Le temps de doublement du volume tumoral (TD)

C'est un très bon indicateur de la croissance tumorale et de l'efficacité du traitement. Il permet également de traiter les données de tous les groupes quel que soit le temps de survie des souris après le traitement. En effet, l'interprétation des résultats sur la base du suivi des volumes tumoraux moyens dans les différents groupes est limitée par la perte précoce des souris dans certains groupes.

Le temps de doublement tumoral est donné par la formule suivante (Sarma, Current radiopharmaceuticals 2011) :

Temps de doublement du volume tumoral : $TD = \ln 2 / \text{Taux de croissance spécifique}$

Taux de croissance spécifique : $TCS = \ln (V_2 / V_1) / (t_2 - t_1)$

Ou directement : $TD = \ln 2 / (\ln (V_2 / V_1) / (t_2 - t_1))$

V_1 et V_2 représentent les volumes de la tumeur aux temps t_1 et t_2 . t_1 est le jour du traitement et t_2 le jour du sacrifice de la souris.

3.2. Point limite

Un volume tumoral de **1500 mm³** a été défini comme point limite pour ces études, conformément aux recommandations du comité d'éthique (Com-ETH). Les souris sont alors euthanasiées par dislocation cervicale sous anesthésie. Les souris présentant des signes de faiblesse et/ou souffrance importantes sont également euthanasiées même si le volume tumoral limite n'est pas atteint.

4. Analyses sanguines

4.1. Analyses hématologiques

A partir de prélèvements sanguins effectués au bout de la queue des souris, le nombre de leucocytes, d'érythrocytes et de thrombocytes par millilitre de sang est mesuré plusieurs fois au cours de l'étude pour obtenir un suivi. Les mesures sont effectuées la veille de l'implantation tumorale, la veille du traitement et à la fin du protocole expérimental. Ces mesures sont réalisées avec des tests unitaires (Leuko-TIC®, Ery-TIC® et Thrombo-TIC®, Bioanalytic GmbH, Umkirch, Allemagne).

4.2. Dosage de la créatinine sérique

La créatinine est un dérivé d'acide aminé de 113 Da générée par le métabolisme musculaire. La créatinine est un produit de dégradation de la créatine, une molécule de première importance pour la production d'énergie dans les muscles. Environ 2 % de la créatine du corps sont convertis chaque jour en créatinine. La créatinine est transportée par le sang vers les reins. La créatinine est filtrée au niveau glomérulaire mais n'est pas réabsorbée au niveau tubulaire. Pour un sujet donné, le taux plasmatique et la quantité de créatinine éliminée quotidiennement dans les urines constituent des paramètres biologiques remarquablement

fixes. Pour ces raisons, la valeur de la clairance de la créatinine est un très bon indicateur de l'insuffisance rénale. La clairance de la créatinine est indépendante de la diurèse, elle mesure directement la filtration glomérulaire (Bodei, Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008). **L'augmentation du taux de créatinine sérique est le reflet d'une insuffisance rénale.**

En fin de protocole, le sang des souris est prélevé en intracardiaque sous anesthésie à la kétamine/xylazine (100 mg.kg⁻¹ de kétamine et 10 mg.kg⁻¹ de xylazine, en injection intrapéritonéale). Les prélèvements sont laissés une heure à température ambiante, puis conservés à 4°C jusqu'au lendemain. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4000 tr.min⁻¹ pendant 20 minutes à 4°C. Le sérum ainsi séparé du reste du sang est doucement prélevé par pipetage et conservé à -20°C jusqu'au moment du dosage.

Le dosage de la créatinine sérique est effectué avec un kit de dosage (BioVision, Milpitas, USA). Ce kit contient plusieurs enzymes et réactifs qui agissent en cascade pour transformer la créatinine initiale et aboutir à une coloration rouge ($\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$) et une fluorescence (Ex/Em = 538/587 nm) proportionnelles à la quantité de créatinine présente. Les mesures de l'absorbance à 570 nm reliées aux mesures de la gamme étalon permettent d'obtenir la valeur de la concentration en créatinine des échantillons.

5. Traitements des souris

Avant les injections, les souris sont placées une dizaine de minutes près d'une source de chaleur (lampe à infrarouge) pour dilater leurs veines. Les souris placées dans un tube de contention reçoivent ensuite le traitement par injection dans l'une des veines caudales avec une seringue à insuline (volume mort quasi inexistant).

5.1. Gélofusine® 4%

Toutes les souris reçoivent une injection intraveineuse de 100 µL de gélofusine® 4% (BBraun Medical, Boulogne Billancourt, France) au moins cinq minutes avant l'injection de leur traitement (RAFT-RGD radiomarqué, RAFT-RAD radiomarqué, RAFT-RGD non radiomarqué ou sérum physiologique) pour diminuer la captation rénale du peptide (Briat, Cancer Sci 2012).

5.2. Tumeurs exprimant $\alpha v\beta 3$ au niveau cellulaire : U-87 MG

- **Série 1 : 3,7 MBq (100 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD**

Cette étude a été réalisée sur 11 Swiss Nude (6 pour le groupe traité et 5 pour le groupe contrôle). Le traitement a eu lieu 14 jours après l'implantation tumorale. Les souris des groupes traités ont reçu une injection intraveineuse de 3,7 MBq (100 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD (environ 3 μ g de RAFT-RGD) dilués dans du sérum physiologique pour atteindre un volume injectable d'environ 100 μ L par souris. Les souris des groupes contrôles ont reçu une injection de la même quantité de RAFT-RGD non radiomarké (« froid ») dans le même volume de sérum physiologique. Le volume tumoral moyen le jour du traitement était de $103 \pm 46 \text{ mm}^3$.

- **Effet dose du RAFT-RGD non radiomarké**

Au cours de cette expérience, nous avons voulu vérifier si le RAFT-RGD non radiomarké avait un potentiel thérapeutique sur notre modèle de tumeurs U-87 MG. Nous avons réalisé une étude de l'effet-dose du RAFT-RGD froid. Quatre groupes de 4 ou 5 souris Swiss Nude ont été traités 15 jours après l'implantation tumorale avec des quantités croissantes de RAFT-RGD non radiomarké dilué dans du sérum physiologique. Les tumeurs avaient un volume moyen de $60 \pm 27 \text{ mm}^3$. Dans le premier groupe (N=5), les souris ont reçu une injection de 3 μ g de RAFT-RGD. Les souris du deuxième groupe (N=5) ont reçu 30 μ g de RAFT-RGD. Les souris du troisième groupe (N=4) ont reçu 100 μ g de RAFT-RGD et les souris du quatrième groupe (N=4) ont reçu 300 μ g de RAFT-RGD.

- **Série 2 : 3,7 MBq (100 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD, 3,7 MBq (100 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RAD, 37 MBq (1 mCi) de ^{90}Y -RAFT-RGD**

Au cours de cette série, 4 groupes de 5 ou 6 souris Swiss Nude ont été constitués. Le traitement a eu lieu 24 jours après l'implantation tumorale. Les tumeurs avaient un volume moyen de $230 \pm 150 \text{ mm}^3$. Le premier groupe (N=6) a été traité avec 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-

RGD, le deuxième (N=6) avec 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD. Le troisième groupe (N=5) a reçu une injection de 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD. Le groupe contrôle (N=6) a été divisé en 2 sous-groupes : 3 souris ont reçu une injection de 100 μL de sérum physiologique et 3 souris ont reçu une injection de 100 μL de RAFT-RGD froid.

- **Série 3 : 37 MBq (1 mCi) de ^{90}Y -RAFT-RGD, 37 MBq (1 mCi) de ^{90}Y -RAFT-RAD**

La série 3 nous a permis de traiter 7 souris Swiss Nude avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et 7 souris avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD. Le groupe contrôle était constitué de 6 souris. Nous souhaitons ici étudier l'effet du ^{90}Y -RAFT-RGD sur des tumeurs d'un volume plus important que précédemment. Contrairement aux séries précédentes où les traitements avaient lieu le même jour, trois jours de traitement ont permis de traiter toutes les souris une fois, lorsque leur volume tumoral était supérieur à 400 mm^3 . Les souris ont été traitées lorsque les tumeurs avaient un volume moyen de $798 \pm 243 \text{ mm}^3$.

- **Série 4 : Deux fois 18,5 MBq (500 μCi) à 3 jours d'intervalle de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{90}Y -RAFT-RAD**

Pour la quatrième série de souris traitées au ^{90}Y -RAFT-RGD, nous avons voulu voir si un traitement répété augmentait l'efficacité thérapeutique du ^{90}Y -RAFT-RGD. Les souris Swiss Nude ont été traitées une première fois 21 jours après l'implantation tumorale. Le volume tumoral moyen était alors de $548 \pm 239 \text{ mm}^3$. Le deuxième traitement a eu lieu 3 jours après. Le groupe traité avec 2 x 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD était composé de 7 souris. Le groupe traité avec 2 x 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD était composé de 6 souris. Le groupe contrôle comprenait 7 souris.

- **Série 5 : 37 MBq (1 mCi) de ^{177}Lu -RAFT-RGD, 37 MBq (1 mCi) de ^{177}Lu -RAFT-RAD**

Pour cette cinquième série, nous avons évalué l'effet d'un traitement au 14^{ème} jour post-implantation tumorale avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD sur 7 souris Swiss Nude. Sept

Matériel et Méthodes

souris ont reçu 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RAD et 7 autres souris ont reçu seulement une injection de sérum physiologique. Les tumeurs avaient un volume moyen de $169 \pm 75 \text{ mm}^3$ le jour du traitement.

Le tableau ci-dessous (Tableau 10) présente un récapitulatif des séries de traitement des souris porteuses de tumeurs U-87 MG ($\alpha\text{v}\beta 3+$).

Série	Nombre de souris contrôles	Nombre de souris traitées	Activité et molécule injectées aux souris traitées	Jour du traitement, en jours post-implantation	Volume tumoral le jour du traitement (mm ³)
1	5		RAFT-RGD froid	14	103 ± 46
		6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
RAFT-RGD froid		5	3 µg/souris	15	60 ± 27
		5	30 µg/souris		
		4	100 µg/souris		
		4	300 µg/souris		
2	3		RAFT-RGD froid	24	230 ± 150
	3		Sérum physiologique		
		6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
		6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD		
		5	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
3	6		Sérum physiologique	22 ou 26 ou 32	798 ± 243
		7	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
		7	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD		
4	7		Sérum physiologique	21 et 24	548 ± 239
		7	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
		6	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD		
5	7		Sérum physiologique	14	169 ± 75
		7	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD		
		7	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RAD		

Tableau 10 : Récapitulatif des séries de traitement sur des tumeurs U-87 MG.

5.3. Tumeurs n'exprimant pas $\alpha v\beta 3$ au niveau cellulaire

5.3.1. TS/A-pc

- **Série 1 : 3,7 MBq (100 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD**

Pour cette première série, 6 souris BALB/c Nude ont été traitées avec 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD. Le groupe contrôle, composé de 6 souris, a été traité avec la même quantité de RAFT-RGD froid (3 μ g). Le traitement a lieu 7 jours après l'implantation tumorale. Les tumeurs avaient un volume moyen de $343 \pm 200 \text{ mm}^3$.

- **Série 2 : 3,7 MBq (100 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD, 7,4 MBq (200 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD, 2 x 3,7 MBq (2 x 100 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD**

Pour cette deuxième série, nous avons évalué l'effet dose d'un traitement au ^{90}Y -RAFT-RGD sur des tumeurs TS/A-pc. Quatre groupes de 6 souris BALB/c Nude ont été constitués. Les souris ont été traitées 7 jours après l'implantation tumorale. Les tumeurs mesuraient alors $377 \pm 149 \text{ mm}^3$. Six souris ont reçu 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD. Six souris ont reçu 7,4 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD. Six souris ont reçu une première injection de 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD, puis une deuxième trois jours après. Enfin, six souris n'ont reçu qu'une injection de 3 μ g de RAFT-RGD froid.

- **Série 3 : 29,6 MBq (800 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RGD, 29,6 MBq (800 μ Ci) de ^{90}Y -RAFT-RAD**

Huit jours après l'implantation tumorale, les tumeurs avaient un volume de $540 \pm 193 \text{ mm}^3$. Au cours de cette troisième série, sept souris BALB/c Nude ont reçu une injection intraveineuse de 29,6 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD, sept souris ont reçu une injection de 29,6 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD et 6 souris ont reçu une injection de 100 μ L de sérum physiologique.

Le tableau ci-dessous (Tableau 11) présente un récapitulatif des séries de traitement des souris porteuses de tumeurs TS/A-pc ($\alpha\beta3^-$).

Série	Nombre de souris contrôles	Nombre de souris traitées	Activité et molécule injectées aux souris traitées	Jour du traitement, en jours post-implantation	Volume tumoral le jour du traitement (mm ³)
1	6		RAFT-RGD froid	7	343 ± 200
		6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
2	6		RAFT-RGD froid	7	377 ± 149
		6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
		6	7,4 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
		6	2 x 3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	7 et 10	
3	6		Sérum physiologique	8	540 ± 193
		7	29,6 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		
		7	29,6 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD		

Tableau 11 : Récapitulatif des séries de traitement sur des tumeurs TS/A-pc.

5.3.2.MCF-7

- **Série 1**

Pour cette série de mise au point du modèle, des souris SCID de chez Charles River (L'Arbresle, France) ont été utilisées. Les cellules MCF-7 sont reconnues capables d'induire des tumeurs sur ces modèles de souris immunodéficientes (Babic, Methods 2010). Une injection de 10^7 cellules dans 100 μ L de MEM en sous-cutané dans la patte arrière gauche a permis l'obtention de tumeurs de 88 ± 61 mm³ au bout de 43 jours.

- **Série 2**

Pour cette seconde série, des souris NMRI Nude de chez Janvier (Saint Berthevin, France) ont été utilisées d'après des travaux rapportés (non publiés) d'une autre équipe grenobloise travaillant sur ce modèle (Julien Vollaire, Plateforme OPTIMAL, Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Grenoble). Dix millions de cellules ont été implantées par souris dans 200 μL de matrigel (Matrigel haute concentration, BD Biosciences). Au bout de 42 jours, les tumeurs mesuraient $78 \pm 30 \text{ mm}^3$.

6. Biodistribution

Pour cette expérience, 20 souris Swiss Nude ont été utilisées.

Des tumeurs U-87 MG ont été implantées en sous-cutané dans les mêmes conditions que pour les études sur l'effet du traitement.

L'étude de biodistribution a eu lieu 14 jours après l'implantation tumorale. Les tumeurs avaient atteint un volume de $146 \pm 94 \text{ mm}^3$.

Chaque souris a reçu une pré-injection intraveineuse de 100 μL de Gélofusine® 4% dans la veine caudale, suivie, cinq minutes après, d'une injection d'environ 370 kBq de ^{90}Y -RAFT-RGD. La radioactivité contenue dans les seringues est mesurée dans un activimètre (Medisystem) avant et après injection pour connaître la valeur exacte de la dose injectée.

A 1 heure, 4 heures, 24 heures et 48 heures post-injection, 5 souris sont euthanasiées avec une injection intrapéritonéale létale de pentobarbital sodique. Différents organes d'intérêt et liquides physiologiques sont prélevés et pesés individuellement, puis leur radioactivité est mesurée dans le compteur gamma (Cobra II, Packard) afin de quantifier la biodistribution du radioligand.

Le compteur gamma donne des valeurs de radioactivité en coups par minute (CPM). Une gamme étalon est réalisée pour connaître la valeur en CPM de la dose injectée. Pour chaque organe, le pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu est calculé, après correction de la décroissance.

7. Imagerie corps entier

Les animaux utilisés pour cette étude sont ceux de la cinquième série de traitement des tumeurs U-87 MG. Il s'agit donc de souris Swiss Nude xéno greffées avec un glioblastome humain U-87 MG en sous-cutané.

L'étude a été réalisée 14 jours après l'implantation tumorale.

Des images corps entier ont été obtenues suite à l'injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD (N=2) ou de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RAD (N=2). Ces injections ont fait suite à l'injection intraveineuse de 100 μL de Gélofusine® 4%.

Une heure, 4 heures, 24 heures, 48 heures et 6 jours après l'injection du radioligand, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (4% pour l'induction et 1,5% pour le maintien de l'anesthésie, CSP, Coumon, France) puis placées dans le lit de la caméra.

Une tomographie par émission monophotonique couplée à un tomodensitomètre X (TEMP-TDM) petit animal quadruple tête a été réalisée (Bioscan NanoSPECT/CT®, MEDISO medical imaging system, Budapest, Hongrie). Les quatre têtes étaient équipées de collimateurs multipinholes (APT 1 : 9 pinholes par tête, diamètre d'un pinhole 1,4 mm). Les images X et TEMP ont été acquises de manière séquentielle à l'aide du logiciel Nucline (MEDISO). Pour la TEMP, trois fenêtres d'énergie ont été utilisées pour la réalisation des images, la première à $208 \text{ keV} \pm 20 \%$, la deuxième à $113 \text{ keV} \pm 20 \%$ et la troisième à $57 \text{ keV} \pm 20 \%$.

Pour les images de corps entiers :

- Les paramètres d'acquisition de l'imagerie X étaient de 180 projections, 500 ms par projection et 45 kV. La durée de l'acquisition était de 3 minutes 45 secondes et l'intensité du courant était de 16,7 mAs.
- A 1 h, 4 h et 24 h post-injection, les paramètres d'acquisition de la TEMP étaient de 24 projections et 60 secondes par projection (durée de la TEMP : 24 min). A 48 h post-injection, les paramètres d'acquisition de la TEMP étaient de 24 projections et 100 secondes par projection (durée de la TEMP : 50 min).

Pour les images de l'abdomen des souris :

- Les paramètres d'acquisition de l'imagerie X étaient les mêmes que pour le corps entier. La durée d'acquisition était de 2 minutes et 30 secondes.
- A 1 h, 4 h et 24 h post-injection, les paramètres d'acquisition de la TEMP étaient de 24 projections et 60 secondes par projection (durée de la TEMP : 12 min). A 48 h post-injection, les paramètres d'acquisition de la TEMP étaient de 24 projections et

100 secondes par projection (durée de la TEMP : 20 min). Pour la TEMP réalisée 6 jours après l'injection, les paramètres d'acquisition étaient de 24 projections et 150 secondes par projection.

La reconstruction tridimensionnelle des images et la fusion des images X et TEMP sont réalisées avec le logiciel InVivoScope 1.44 (Bioscan). Avant fusion avec l'imagerie X, la résolution des voxels est de $0,45 \text{ mm}^3$.

Pour l'analyse quantitative des images, des zones d'intérêt sont déterminées dans la tumeur, le rein et le muscle. Tous les voxels dont l'intensité est supérieure ou égale au tiers de l'intensité maximale mesurée dans chacun de ces trois compartiments sont inclus dans les différents volumes de la tumeur, du rein ou du muscle pour y mesurer l'activité captée et calculer la biodistribution des radiotraceurs dans ces trois compartiments.

8. Autoradiographie

8.1. Tumeurs U-87 MG

Deux souris Swiss Nude portant des tumeurs U-87 MG, ont reçu une injection dans la veine caudale de $100 \mu\text{L}$ de Gélofusine® 4%. Cinq minutes après, une des souris a reçu une injection intraveineuse de $5,55 \text{ MBq}$ ($150 \mu\text{Ci}$) de ^{90}Y -RAFT-RGD et l'autre une injection de $5,55 \text{ MBq}$ de ^{90}Y -RAFT-RAD.

Quatre heures après les injections, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale après anesthésie à la kétamine/xylazine (100 mg.kg^{-1} de kétamine et 10 mg.kg^{-1} de xylazine, en injection intra-péritonéale). Les tumeurs ont été prélevées et la radioactivité contenue quantifiée. Les tumeurs ont ensuite été incluses dans du Tissue-Tek (Microm, France), puis immédiatement congelées par immersion dans un béccher contenant du 2 méthylbutane placé à -80°C .

Des coupes de tumeurs de $20 \mu\text{m}$ d'épaisseur ont été obtenues avec un cryo-microtome (HM 505E, Microm, France), puis ensuite déposées sur des lames pour l'analyse autoradiographique.

Ces lames ont ensuite été placées au contact d'un film autoradiographique permettant de détecter la quantité de radioactivité contenue dans chaque coupe (Fujifilm Phosphorimager Plate) pendant 4 heures. Le film est révélé dans un phosphorimager (Fujifilm BAS 5000). Les

images autoradiographiques obtenues sont quantifiées à l'aide du logiciel associé au phosphorimager utilisé (Image-Gauge, Fuji). Des zones d'intérêt sont tracées manuellement et l'activité en radiotracteur, exprimée en intensité d'excitation des cellules du film par unité de surface ("Phospho-Stimulated Luminescence" ou PSL/mm²), est déterminée.

Pour chaque coupe de 20 µm, une coupe adjacente de 8 µm est réalisée pour une analyse en immunohistochimie.

8.2. Tumeurs TS/A-pc

Deux souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs TS/A-pc ont été utilisées pour cette étude. Le protocole suivi est le même que pour les tumeurs U-87 MG.

9. Immunohistochimie

Le marquage immunologique cible l'intégrine $\alpha\beta 3$ avec un anticorps anti- $\alpha\beta 3$ biotinylé (Millipore MAB1976B).

Après dépôt sur lame, les coupes congelées de 8 µm d'épaisseur sont fixées dans un bain d'acétone/méthanol (1:1) pendant 5 minutes. Les peroxydases endogènes sont bloquées par un bain d'eau oxygénée à 0,45% dans de l'eau distillée pendant 15 minutes. Après 3 bains d'eau distillée, les coupes sont encerclées par un film hydrophobe (Dako Pen). Les sites non spécifiques sont ensuite saturés par une mise en contact pendant une heure avec une solution de blocage contenant du PBS/0,5% de gélatine issue de peau de poisson (Skin fish gelatin, SFG) et 100µl.mL⁻¹ de sérum de souris. L'anticorps biotinylé dilué dans du PBS au 1/100ème est ensuite mis en contact avec les coupes pendant 3 heures. Après 3 bains de 5 minutes dans du PBS contenant 0,5 % de SFG, on applique une solution ABC (Vector) pendant 30 minutes. Cette solution contient les peroxydases biotinylées et les molécules d'avidine qui permettent la complexation des anticorps avec les peroxydases. Après 4 lavages de 5 minutes au PBS, on dépose la solution de DAB pendant quelques minutes sur les lames (le temps que la coloration devienne visible à l'œil nu). Après un rinçage de 5 minutes au PBS, une contre-coloration à l'hématoxyline est réalisée pendant 2 minutes. Un dernier rinçage à l'eau courante est réalisé pendant 5 minutes avant la déshydratation des lames par leur passage successif dans 3 bains d'éthanol 100% et 2 bains de xylène 100% et le montage des coupes entre lames et lamelles.

D. Analyses statistiques

Les variables quantitatives ont été décrites à l'aide de la moyenne et de l'écart-type. La taille des échantillons ($n \leq 7$) ne garantissant pas une distribution normale, des tests non paramétriques ont été utilisés. Les comparaisons des moyennes en inter-groupes ont été effectuées à l'aide des tests de Mann-Whitney pour les variables à 2 groupes et de Kruskal-Wallis pour les variables à 3 groupes ou plus. Des tests post-hoc de Student-Newman-Keuls ont été effectués pour comparer les groupes deux à deux lorsque la significativité était prouvée par le test de Kruskal-Wallis. Le seuil de significativité était fixé conventionnellement à 5% ($p < 0.05$).

Partie 3 : Résultats

A. Caractérisation et validation des produits et modèles utilisés

1. Qualité des radiomarquages du RAFT-RGD et du RAFT-RAD

1.1. Radiomarquage à l'yttrium-90

Les radio-chromatogrammes obtenus par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC pour « Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography ») montrent une **excellente pureté radiochimique** pour les deux peptides marqués à l'yttrium-90 avec des pics majoritaires supérieurs à 91% pour le ^{90}Y -DOTA-RAFT-RGD et à 94% pour le ^{90}Y -DOTA-RAFT-RAD. Le profil présente également des pics minoritaires correspondant à de l' ^{90}Y -90 libre résiduel, et de l' ^{90}Y -90 chélaté DTPA (Figure 46). Le marquage est stable à température ambiante dans le milieu de marquage, avec une pureté radiochimique supérieure à 80% 10 jours après le marquage (Tableau 12).

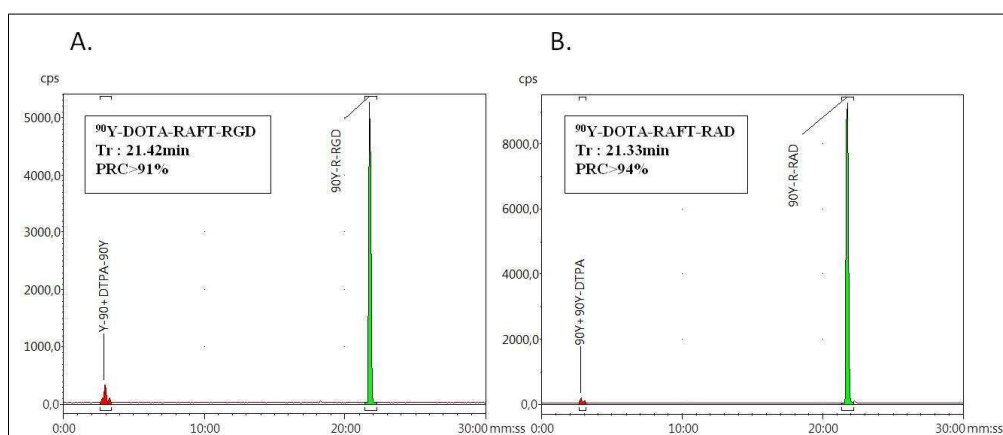


Figure 46 : Analyse par RP-HPLC du ^{90}Y -DOTA-RAFT-RGD (A) et du ^{90}Y -DOTA-RAFT-RAD (B).

	T0	T24h	T48h	T72h	T6j	T10j
⁹⁰ Y-DOTA-RAFT-RGD	>91%	>90%	>88%	>88%	>87%	>80%
⁹⁰ Y-DOTA-RAFT-RAD	>94%	>88%	>80%	>80%	>80%	>80%

Tableau 12 : Analyse par RP-HPLC pour l'étude de stabilité dans le milieu de marquage à température ambiante du ⁹⁰Y-DOTA-RAFT-RGD et du ⁹⁰Y-DOTA-RAFT-RAD à différents temps après le marquage.

1.2. Radiomarquage au lutétium-177

La pureté radiochimique mesurée immédiatement après le marquage du DOTA-RAFT-RGD et du DOTA-RAFT-RAD au Lutétium-177 est supérieure à 97% (Figure 47). L'étude de stabilité, jusqu'à 21 jours après le marquage, dans le milieu de marquage à température ambiante montre également une bonne pureté radiochimique. La pureté radiochimique 21 jours après le marquage est supérieure à 75% pour le ¹⁷⁷Lu-DOTA-RAFT-RGD et à 87% pour le ¹⁷⁷Lu-DOTA-RAFT-RAD (Tableau 13).

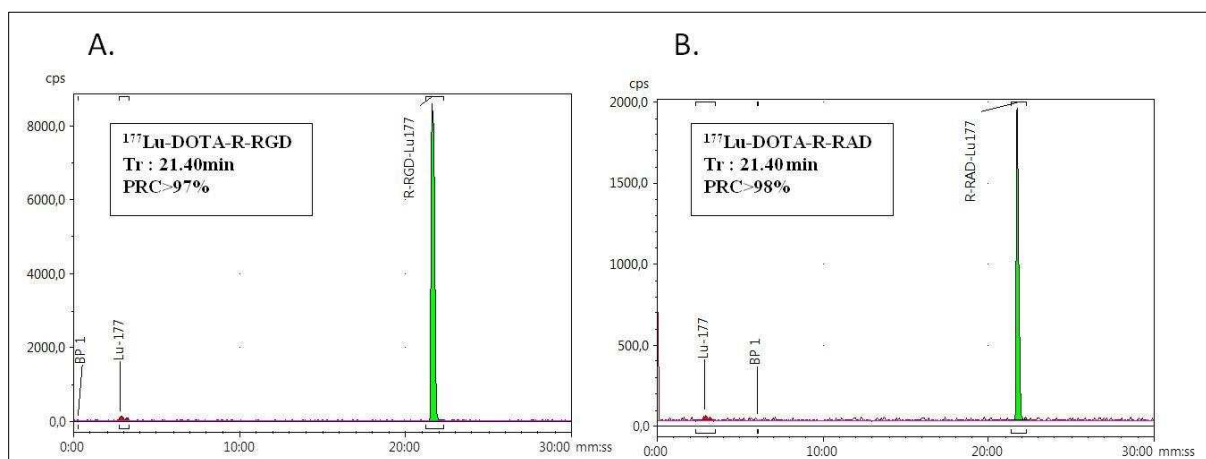


Figure 47 : Analyse par RP-HPLC du ¹⁷⁷Lu-DOTA-RAFT-RGD (A) et du ¹⁷⁷Lu-DOTA-RAFT-RAD (B).

	T0	T24h	T48h	T72h	T6j	T7j	T9j	T14j	T21j
¹⁷⁷ Lu-DOTA-RAFT-RGD	>97%	>95%	>93%	>93%	>89%	>87%	>87%	>75%	>75%
¹⁷⁷ Lu-DOTA-RAFT-RAD	>98%	>95%	>94%	>94%	>92%	>92%	>89%	>87%	>87%

Tableau 13 : Analyse par RP-HPLC pour l'étude de stabilité dans le milieu de marquage à température ambiante du ¹⁷⁷Lu-DOTA-RAFT-RGD et du ¹⁷⁷Lu-DOTA-RAFT-RAD à différents temps après le marquage.

2. Modèles cellulaires

2.1. Culture cellulaire

➤ Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été testée à chaque passage. Quelle que soit la lignée analysée, la viabilité cellulaire est toujours supérieure à 95 %.

➤ Temps de doublement

- U-87 MG

Le temps de doublement de cette lignée a été calculé à chaque passage. Il est en moyenne de 52 ± 12 heures. Cette valeur correspond à la valeur de 50 heures indiquée par le fournisseur ATCC.

- MCF-7

Le temps de doublement moyen calculé de cette lignée est de 62 ± 20 heures. Le fournisseur indiquait un temps de doublement moyen de 30 heures. Les cellules poussent donc deux fois

Résultats

moins vite que ce qui était attendu. Une explication possible est l'utilisation d'insuline humaine (Actrapid®) pour supplémenter le milieu à la place de l'insuline bovine recommandée par le fournisseur (mais qui n'est plus disponible à la vente).

- TS/A-pc

Le temps de doublement moyen calculé de cette lignée est de 36 ± 12 heures. Ces cellules poussent très vite en culture.

➤ Tests de la présence de mycoplasmes

Les milieux de culture des cellules des différentes lignées ont été testés pour la présence de mycoplasmes, avant et après chaque décongélation. Les résultats ont toujours été négatifs pour les différentes lignées. Les contrôles positifs fournis dans le kit étaient bien positifs. Les cellules ne sont donc pas contaminées par des mycoplasmes.

2.2. Western blot

L'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été étudiée par western blot sur les trois modèles cellulaires utilisés. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 48 et résumés dans le tableau 14.

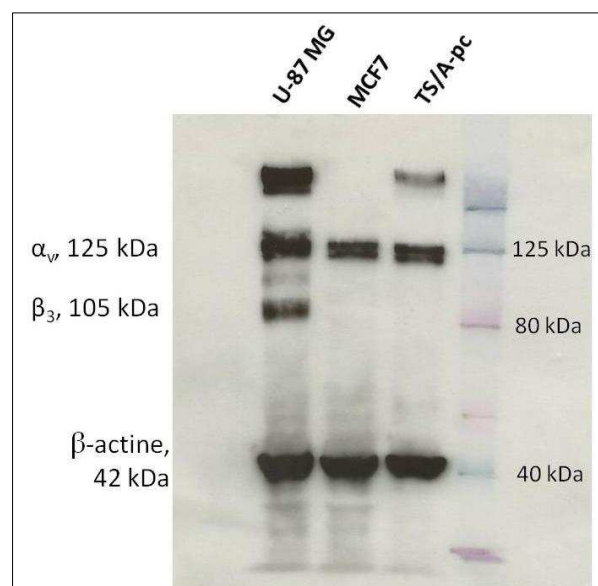


Figure 48 : Western Blot des sous-unités α_v et β_3 .

Résultats

On voit très bien les bandes correspondant à la sous-unité αv pour les trois lignées cellulaires au niveau du marqueur de 125 kDa de l'échelle de poids moléculaire.

La sous-unité $\beta 3$ est représentée par une bande à 105 kDa, uniquement pour les U-87 MG. Les cellules U-87 MG expriment donc bien l'intégrine $\alpha v\beta 3$.

Les MCF-7 expriment αv seulement et pas $\beta 3$. Les cellules MCF-7 n'expriment donc pas l'intégrine $\alpha v\beta 3$, conformément à ce qui est indiqué dans la littérature.

Les résultats obtenus pour les cellules TS/A-pc sont plus surprenants. Les cellules TS/A-pc n'expriment pas l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Ces résultats sont en contradiction avec ce qui était attendu : lors de sa thèse soutenue en 2006 au laboratoire, Lucie Sancey avait caractérisé cette lignée cellulaire comme exprimant $\alpha v\beta 3$.

L'expérience de western blot a été renouvelée deux fois. Les trois expériences ont confirmé ces résultats.

	αv	$\beta 3$	$\alpha v\beta 3$
U-87 MG	+	+	+
MCF-7	+	-	-
TS/A-pc	+	-	-

Tableau 14 : Résultats du western blot des sous-unités αv et $\beta 3$.

2.3. Cytométrie en flux

L'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ a été étudiée par cytométrie en flux sur les trois modèles cellulaires utilisés. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (figures 49, 50, 51 et tableaux 15, 16, 17).

- U-87 MG

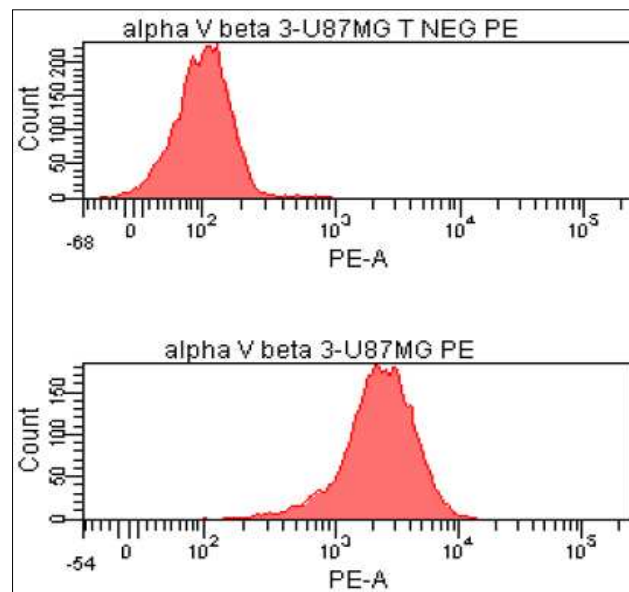


Figure 49 : Résultats de la cytométrie en flux pour les cellules U-87 MG.

	Nombre d'évènements	PE-A mean (Unité arbitraire de fluorescence spécifique de l'appareil utilisé)
Témoin négatif U-87 MG	6793	110
U-87 MG	6777	2628

Tableau 15 : Résultats de la cytométrie en flux pour les cellules U-87 MG.

Les résultats obtenus en cytométrie en flux indiquent que les cellules U-87 MG expriment bien l'intégrine $\alpha\beta3$.

Résultats

- MCF-7

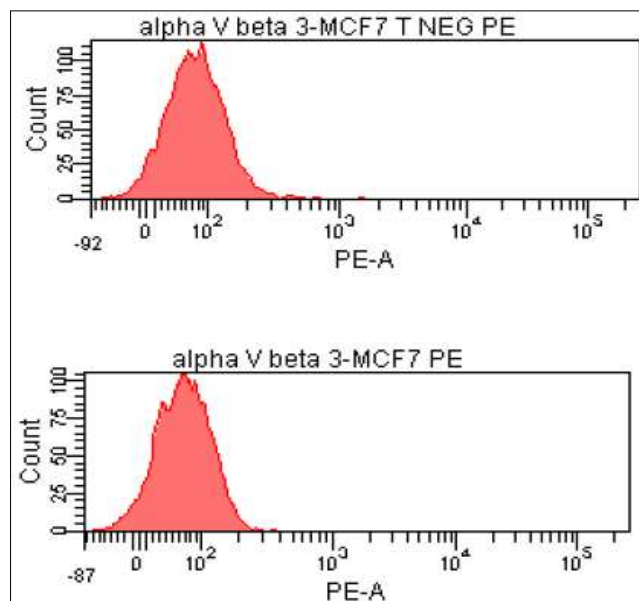


Figure 50 : Résultats de la cytométrie en flux pour les cellules MCF-7.

	Nombre d'évènements	PE-A mean (Unité arbitraire de fluorescence spécifique de l'appareil utilisé)
Témoin négatif MCF-7	3621	90
MCF-7	3320	75

Tableau 16 : Résultats de la cytométrie en flux pour les cellules MCF-7.

Les résultats obtenus en cytométrie en flux indiquent que les cellules MCF-7 n'expriment pas l'intégrine $\alpha v \beta 3$.

Résultats

- TS/A-pc

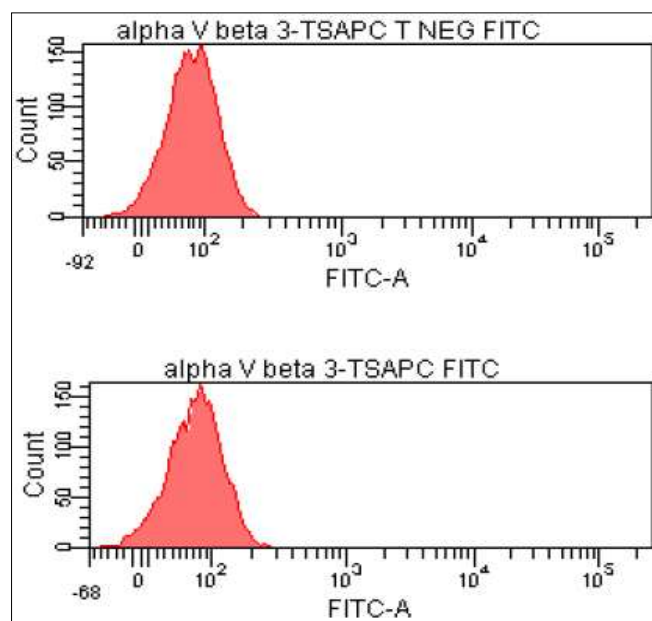


Figure 51 : Résultats de la cytométrie en flux pour les cellules TS/A-pc.

	Nombre d'évènements	FITC-A mean (Unité arbitraire de fluorescence spécifique de l'appareil utilisé)
Témoin négatif TS/A-pc	4315	78
TS/A-pc	4510	74

Tableau 17 : Résultats de la cytométrie en flux pour les cellules TS/A-pc.

Les résultats obtenus en cytométrie en flux indiquent que les cellules TS/A-pc n'expriment pas l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Ce qui confirme les résultats obtenus en western blot.

2.4. Résumé : Caractéristiques des modèles cellulaires utilisés

Les résultats obtenus en cytométrie en flux confirment ceux du western blot et sont synthétisés dans le tableau 18.

	Western blot		Cytométrie en flux
	αv	$\beta 3$	$\alpha v\beta 3$
U-87 MG	+	+	+
MCF-7	+	-	-
TS/A-pc	+	-	-

Tableau 18 : Expression d' $\alpha v\beta 3$ par les différentes lignées cellulaires utilisées.

Les cellules de glioblastome humain U-87 MG expriment très nettement l'intégrine $\alpha v\beta 3$, conformément à ce qui est décrit dans la littérature.

Les cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 n'expriment pas l'intégrine $\alpha v\beta 3$, conformément à ce qui est décrit dans la littérature et peuvent donc servir de contrôle négatif pour l'expression d' $\alpha v\beta 3$.

Les cellules de carcinome mammaire murin TS/A-pc n'expriment plus l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Cette lignée nous a été aimablement fournie par le Dr. Lucie Sancey (équipe du Pr. Jean-Luc Coll, Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Grenoble). A l'époque de sa thèse au sein de notre laboratoire, Lucie Sancey avait mis en évidence l'expression d' $\alpha v\beta 3$ par ces cellules. Toutes les précautions ont donc été prises pour confirmer ce résultat contradictoire, mais il est clair que ces cellules n'expriment plus l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Ces cellules nous ont été données alors qu'elles étaient déjà au 33^{ème} passage (P33). C'est un niveau de passage déjà très avancé. Il est donc tout à fait possible que ces cellules aient subi une dérive génétique et aient perdu l'expression de $\beta 3$.

Le lot de réserve réalisé à réception de ces cellules est à P33 et le lot de travail est à P34. Les expériences de western blot, de cytométrie en flux et les implantations tumorales ont toujours été réalisées à partir de cellules décongelées à partir du lot de travail et donc à faible

« nouveau » passage, limitant ainsi au maximum le risque d'une nouvelle dérive génétique. Cette lignée peut donc servir de contrôle négatif pour l'expression d' $\alpha\beta3$.

2.5. Cinétique de captation

Les lignées cellulaires U-87 MG, MCF-7 et TS/A-pc ont été étudiées pour la captation du ^{90}Y -RAFT-RGD et/ou du ^{90}Y -RAFT-RAD. Les résultats obtenus pour le ^{90}Y -RAFT-RGD sont rapportés dans la figure 52 et le tableau 19.

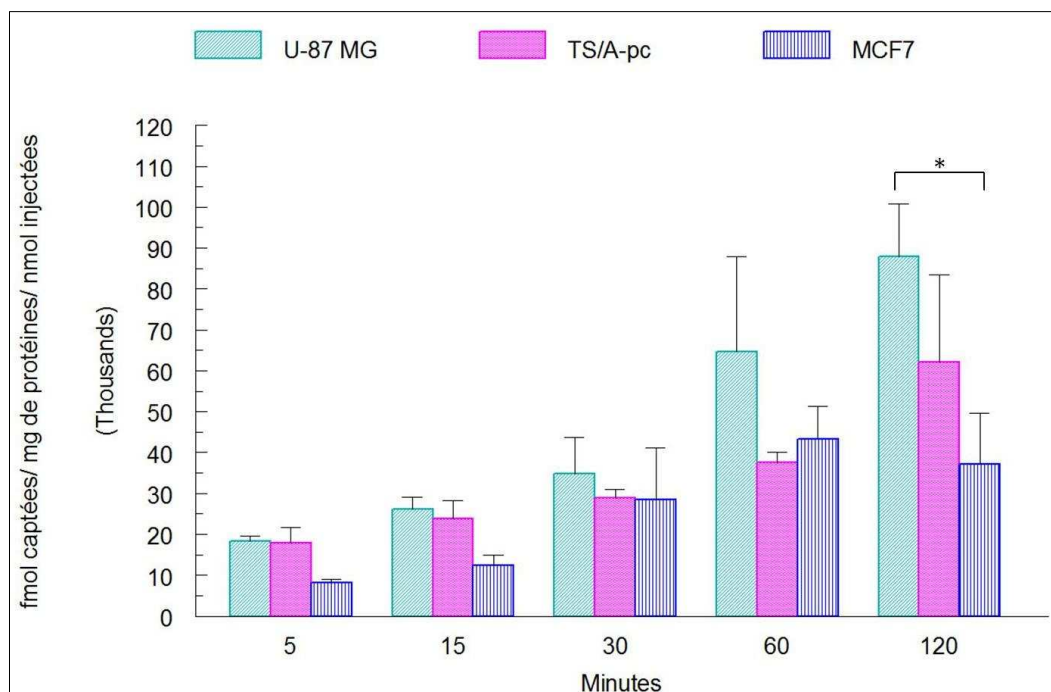


Figure 52 : Cinétique de captation du ^{90}Y -RAFT-RGD sur les lignées cellulaires U-87 MG, TS/A-pc et MCF-7 à 5, 15, 30 minutes, 1 heure et 2 heures (n=3 par temps). * : p<0,05 entre U-87 MG et MCF-7 à 2 heures avec un t-test.

Toutes les lignées présentent une captation du ^{90}Y -RAFT-RGD qui augmente au cours du temps. Les cellules U-87 MG, $\alpha\beta3+$, captent plus le ^{90}Y -RAFT-RGD que les deux autres lignées $\alpha\beta3-$. Cette différence est significative à 2 heures entre les cellules U-87 MG et MCF-7. A 2 heures, les cellules U-87 MG ont capté 2,4 fois plus de ^{90}Y -RAFT-RGD que les cellules MCF-7. Un plateau de captation autour de 36 000 fmol captées/ mg de protéines/ nmol injectée est atteint pour les cellules MCF-7 au bout d'une heure.

Temps (minutes)	U-87 MG	TS/A-pc	MCF-7
5	18384,65 ± 1221,82	17809,68 ± 3967,12	8113,35 ± 852,16
15	26063,26 ± 3063,72	23894,77 ± 4313,03	12418,54 ± 2445,75
30	34726,44 ± 8982,43	28920,01 ± 2028,46	28396,00 ± 12828,66
60	64717,53 ± 23198,60	37614,40 ± 2530,57	43336,34 ± 7925,89
120	87935,38 ± 12878,34	62148,42 ± 21278,43	37247,27 ± 12391,97

Tableau 19 : Cinétique de captation du ⁹⁰Y-RAFT-RGD sur les lignées cellulaires U-87 MG, TS/A-pc et MCF-7 à 5, 15, 30 minutes, 1 heure et 2 heures (n=3 par temps). Les résultats sont exprimés en femtomoles de ⁹⁰Y-RAFT-RGD captées par milligrammes de protéines par nanomoles de ⁹⁰Y-RAFT-RGD injectées.

Les résultats obtenus pour le ⁹⁰Y-RAFT-RAD sont rapportés dans la figure 53 (avec la même échelle que pour le ⁹⁰Y-RAFT-RGD) et le tableau 20.

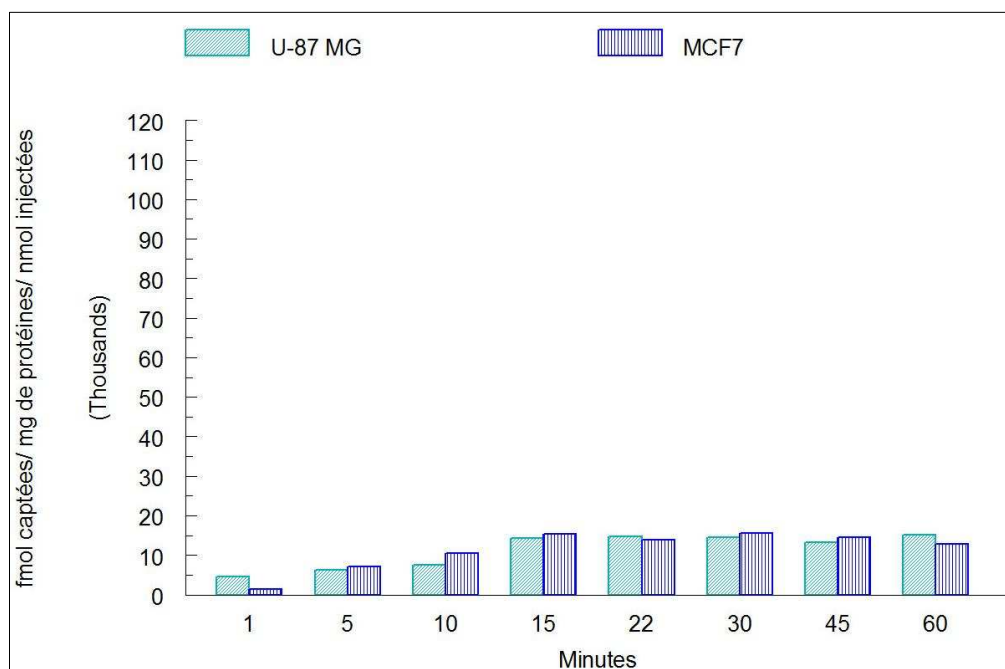


Figure 53 : Cinétique de captation du ⁹⁰Y-RAFT-RAD sur les lignées cellulaires U-87 MG et MCF-7 à 1, 5, 10, 15, 22, 30, 45 et 60 minutes (n=1 par temps).

Le ^{90}Y -RAFT-RAD, molécule de contrôle non spécifique de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, est peu capté par les deux lignées testées U-87 MG et MCF-7. La captation varie peu au cours du temps. Un plateau de captation semble atteint pour les deux lignées à partir de 15 minutes autour de 14000 fmol captées/ mg de protéines/ nmol injectée.

Temps (minutes)	U-87 MG	MCF-7
1	4525,47	1481,55
5	6316,63	7183,53
10	7603,52	10451,75
15	14309,23	15284,98
22	14749,32	13904,58
30	14463,08	15645,20
45	13209,77	14524,72
60	15186,71	12864,07

Tableau 20 : Cinétique de captation du ^{90}Y -RAFT-RAD sur les lignées cellulaires U-87 MG et MCF-7 à 1, 5, 10, 15, 22, 30, 45 et 60 minutes (n=1 par temps). Les résultats sont exprimés en femtomoles de ^{90}Y -RAFT-RAD captées par milligrammes de protéines par nanomoles de ^{90}Y -RAFT-RAD injectées.

3. Modèles animaux

3.1. Induction tumorale

D'une manière générale, les tumeurs poussent de manière hétérogène entre les souris d'une même série. Pour la lignée U-87 MG, les différences sont également présentes entre les différentes séries. Ces disparités sont représentées dans la figure 54 pour les tumeurs U-87 MG et pour l'ensemble des lignées dans la figure 55.

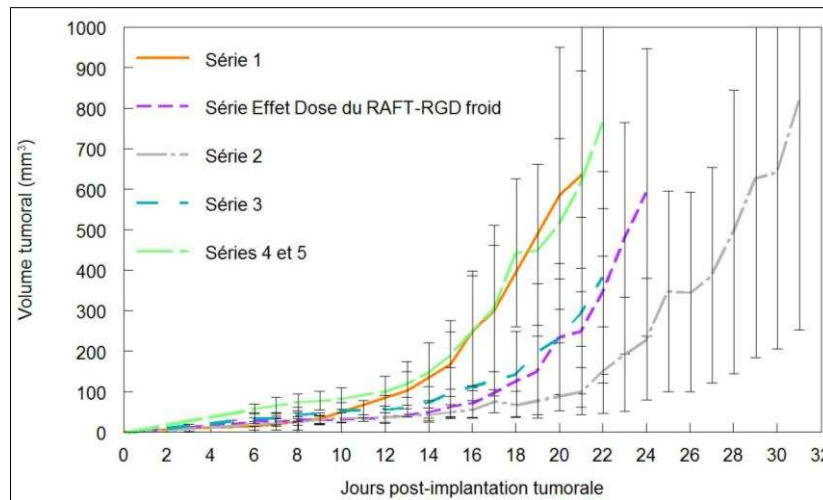


Figure 54 : Evolution du volume moyen (\pm écart-type) des tumeurs U-87 MG des souris non traitées au cours des différentes séries.

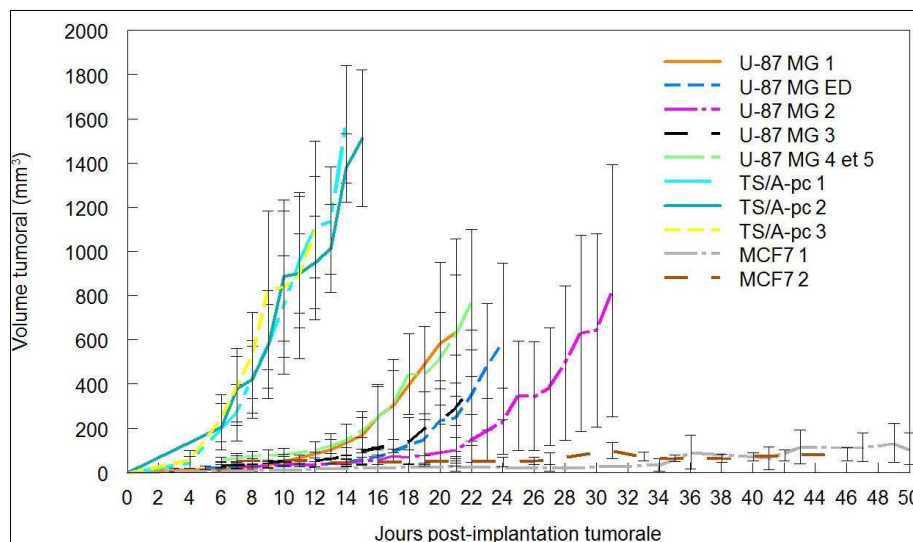


Figure 55 : Evolution du volume moyen (\pm écart-type) des tumeurs U-87 MG, TS/A-pc et MCF-7 des souris non traitées au cours des différentes séries.

Les séries TS/A-pc sont les plus reproductibles. Les tumeurs poussent très rapidement et de manière plus homogène que les tumeurs U-87 MG. L'implantation tumorale se fait dans ce cas par l'implantation d'un seul million de cellules TS/A-pc dans 100 μ L de milieu contre 5 millions de cellules pour les tumeurs U-87 MG. Les cellules étant plus diluées, il est normal que la marge d'erreur au moment de l'implantation soit plus faible pour les TS/A-pc.

Les tumeurs MCF-7 poussent beaucoup plus lentement que ce qui était attendu. Elles n'atteignent jamais un volume suffisant pour le traitement et ne peuvent donc pas servir de contrôle négatif pour l'expression d' $\alpha\nu\beta 3$.

3.2. Autoradiographies

L'autoradiographie de coupes de tumeurs U-87 MG après une injection de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{90}Y -RAFT-RAD constitue la figure 56. On constate un signal correspondant au ^{90}Y -RAFT-RGD capté par la tumeur dans les coupes de la tumeur de la souris ayant reçu une injection de ^{90}Y -RAFT-RGD ($518,1 \pm 47,3$ PSL/mm²) alors que le signal est beaucoup plus faible dans la tumeur au contact du ^{90}Y -RAFT-RAD ($19,1 \pm 1,5$ PSL/mm²). La captation de l' ^{90}Y -RAFT-RGD n'est pas uniforme dans la coupe. La zone d'où le signal est émis entoure une zone nécrotique, non irriguée.

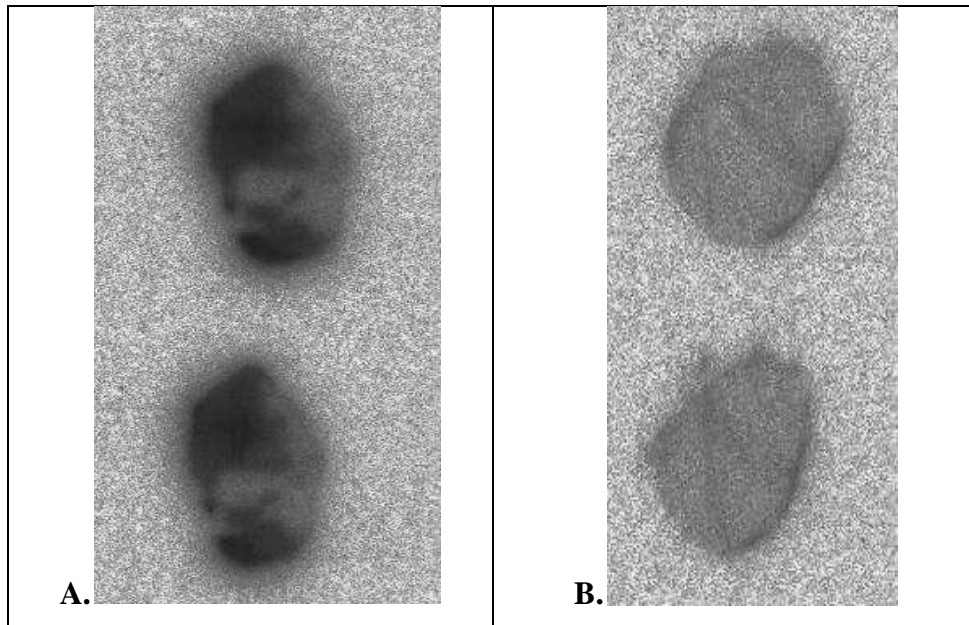


Figure 56 : Autoradiographies de coupes de tumeurs U-87 MG après injections de ^{90}Y -RAFT-RGD en A. ou de ^{90}Y -RAFT-RAD en B. Injections de 5,55 MBq. 4 heures d'exposition. Quantification du signal : A. $518,1 \pm 47,3$ PSL/mm², B. $19,1 \pm 1,5$ PSL/mm².

L'autoradiographie de coupes de tumeurs TS/A-pc ($\alpha\nu\beta 3$ -) après une injection de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{90}Y -RAFT-RAD constitue la figure 57. On constate que le signal émis est

Résultats

beaucoup plus faible que pour les tumeurs U-87 MG ($\alpha v\beta 3+$). Le ^{90}Y -RAFT-RGD est plus capté par les tumeurs TS/A-pc que le ^{90}Y -RAFT-RAD ($99,5 \pm 10,1$ PSL/mm² vs $24,3 \pm 4,3$ PSL/mm²). Il y a une absence de signal correspondant au ^{90}Y -RAFT-RGD au centre des coupes. Cette zone correspond au cœur nécrotique de la tumeur, non irrigué.

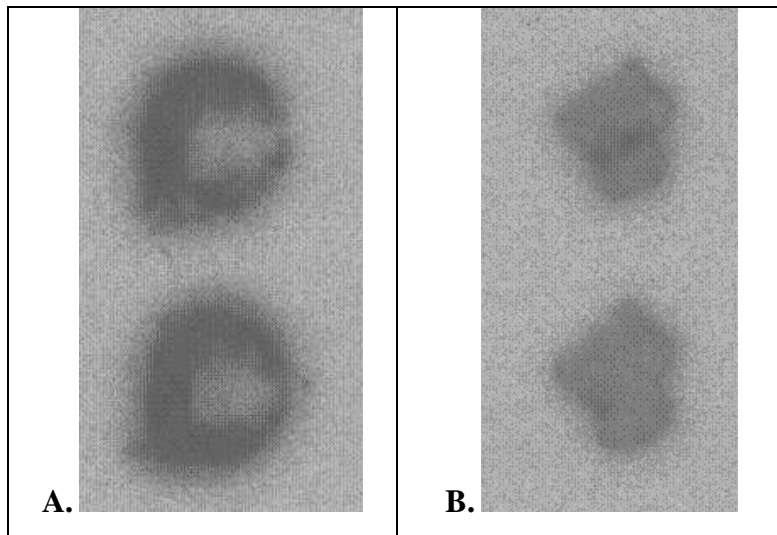


Figure 57 : Autoradiographies de coupes de tumeurs TS/A-pc après injections de ^{90}Y -RAFT-RGD en A. ou de ^{90}Y -RAFT-RAD en B. Injections de 5,55 MBq. 4 heures d'exposition. Quantification du signal : A. $99,5 \pm 10,1$ PSL/mm², B. $24,3 \pm 4,3$ PSL/mm².

3.3. Analyses immunohistochimiques

L'analyse immunohistochimique de coupes de tumeurs U-87 MG (Figure 58) révèle une expression uniforme de l'intégrine $\alpha\beta3$ par les cellules tumorales, ainsi qu'une expression au niveau des cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins. On note également une surexpression de l'intégrine $\alpha\beta3$ à la périphérie de la tumeur.

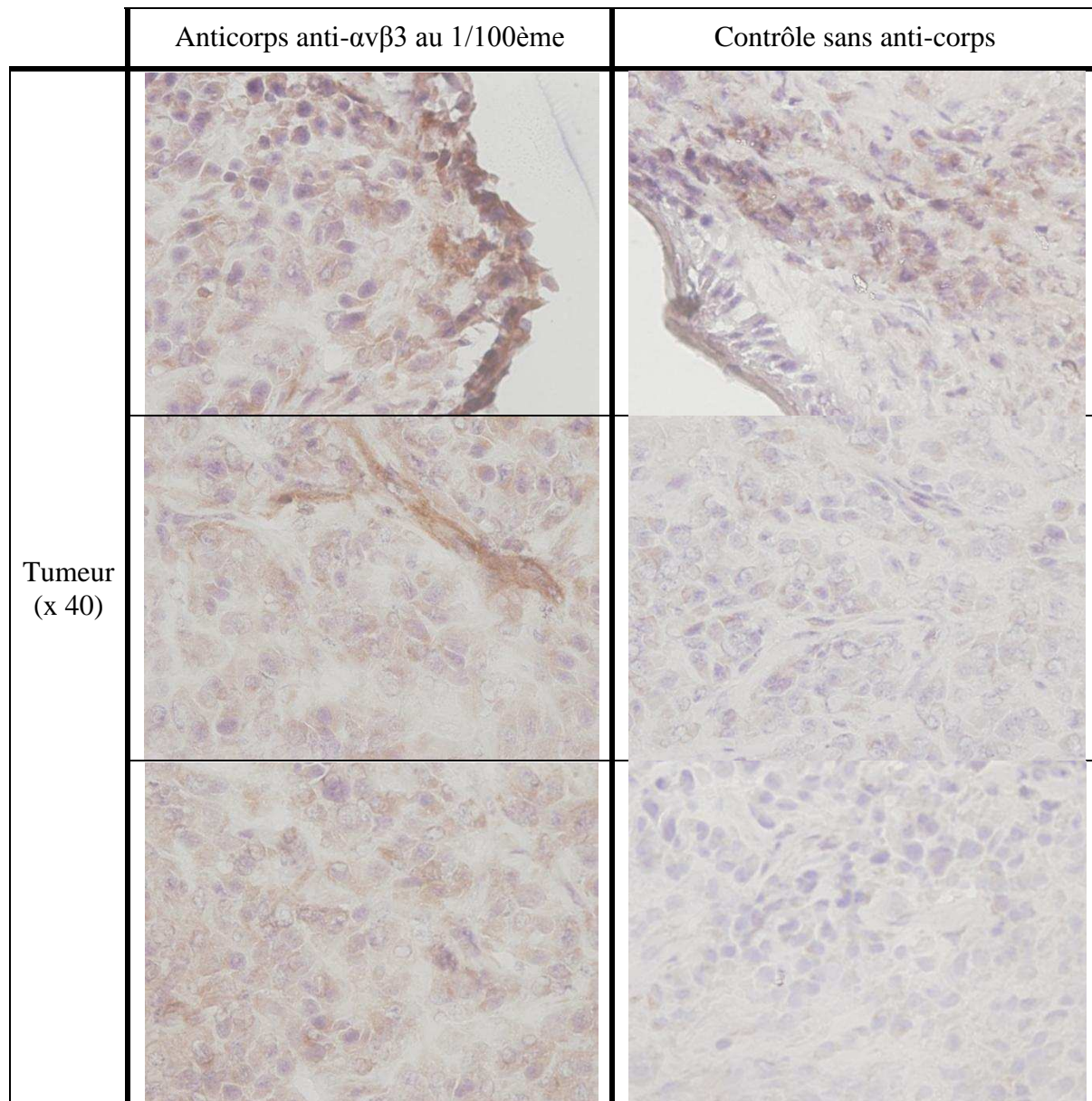


Figure 58 : Analyse immunohistochimique de l'intégrine $\alpha\beta3$ des tumeurs U-87 MG.

Résultats

L'analyse immunohistochimique de coupes de tumeurs TS/A-pc (Figure 59) révèle une absence d'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ par les cellules tumorales.

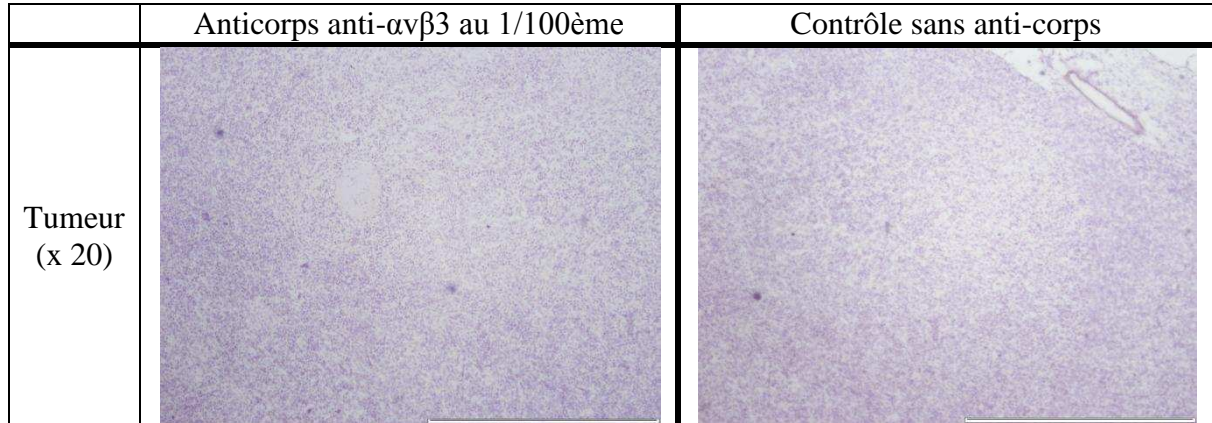


Figure 59 : *Analyse immunohistochimique de l'intégrine $\alpha\beta3$ des tumeurs TS/A-pc.*

3.4. Effet dose du RAFT-RGD non radiomarqué

L'évolution des volumes moyens des tumeurs des groupes traités avec des doses croissantes de RAFT-RGD « froid » est représentée ci-dessous (Figure 60).

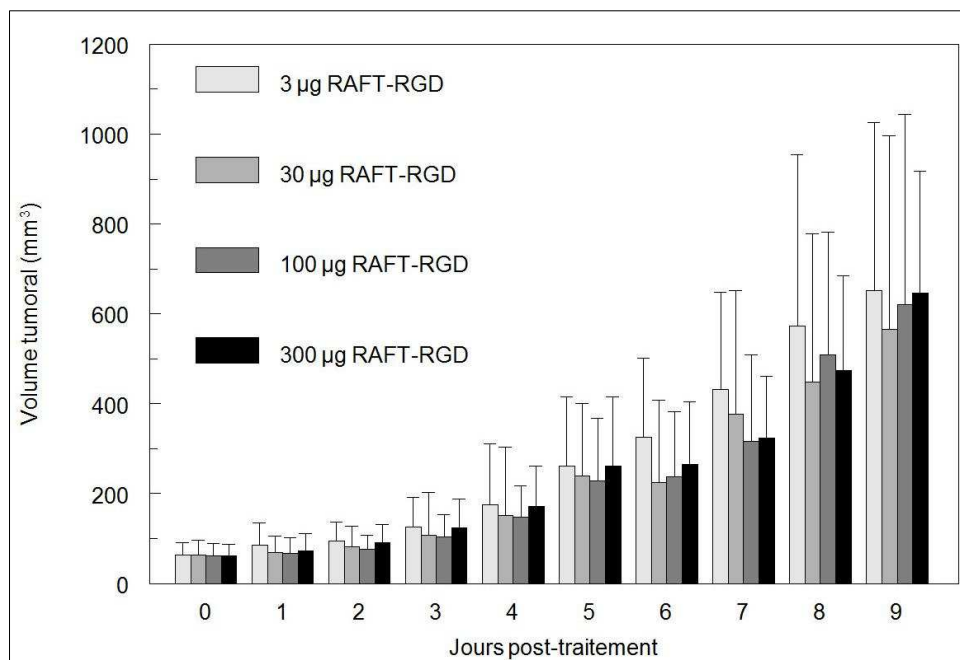


Figure 60 : Evolution post-traitement du volume tumoral de souris Swiss Nude greffées avec des glioblastomes U-87MG traitées avec une dose croissante de RAFT-RGD non radiomarqué : 3 µg de RAFT-RGD (n=5), 30 µg de RAFT-RGD (n=5), 100 µg de RAFT-RGD (n=4), 300 µg de RAFT-RGD (n=4).

Il n'y a pas de différences significatives entre les groupes traités avec 3 µg de RAFT-RGD, 30 µg de RAFT-RGD, 100 µg de RAFT-RGD ou 300 µg de RAFT-RGD que ce soit au niveau de l'évolution des volumes moyens des tumeurs ou au niveau de l'évolution de la taille relative moyenne par rapport au jour du traitement (Figure 61).

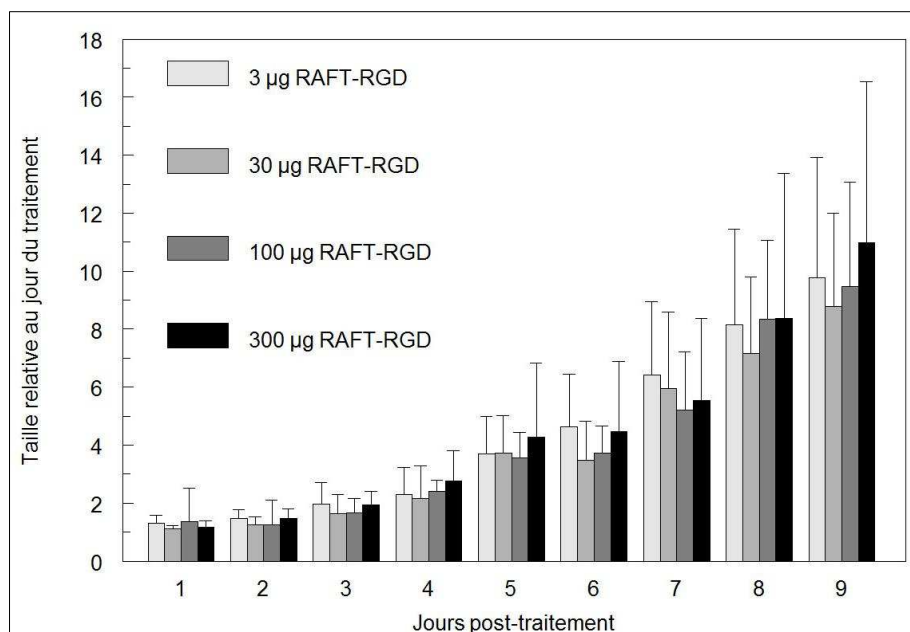


Figure 61 : Evolution des moyennes des tailles relatives des tumeurs U-87 MG traitées avec des doses croissantes de RAFT-RGD « froid » par rapport au jour du traitement.

Il n'y a pas non plus de différences significatives entre les temps de doublement du volume tumoral des différents groupes (TDVT en jours: $2,78 \pm 0,31$, $2,98 \pm 0,55$, $2,70 \pm 0,3$, $2,79 \pm 0,51$, $p=0,89$).

Une dose de 3 µg de RAFT-RGD correspond à la quantité minimale de RAFT-RGD injecté aux souris lorsqu'il est radiomarqué avec de ^{90}Y ou du ^{177}Lu dans les expériences de traitement. Ces résultats nous indiquent donc que les effets thérapeutiques potentiellement observables du RAFT-RGD radiomarqué avec un émetteur β^- sur la croissance tumorale ne seront pas dus à un effet thérapeutique de la molécule de RAFT-RGD elle-même, dans nos conditions expérimentales.

3.5. Biodistribution

Des études de biodistribution du RAFT-RGD ont été effectuées précédemment dans le laboratoire par L. Sancey. Nous disposons ainsi des valeurs de biodistribution du RAFT-RAD marqué au technétium-99m et à l'iode-125 ainsi celles du RAFT-RGD marqué au technétium-99m et à l'iode-125 (via une histidine à la place du DOTA) et du RAFT-RGD marqué à l'indium-111 (via un groupement DOTA, comme pour l'yttrium-90 ou le lutétium-111). La

Résultats

seule différence avec la molécule testée ici en biodistribution étant donc pour ce dernier cas la présence d'un yttrium-90 à la place d'un atome d'indium-111. Bien que nous disposions d'un important panel de biodistributions de RAFT-RGD marqués avec plusieurs radionucléides, il était nécessaire d'étudier également la biodistribution du ^{90}Y -RAFT-RGD, la simple présence d'un radionucléide plutôt qu'un autre pouvant induire des changements dans la biodistribution.

Les résultats de la biodistribution du ^{90}Y -RAFT-RGD sur des souris Swiss Nude portant des tumeurs U-87 MG sont présentés dans la figure 62 et le tableau 21 en pourcentage de la dose injectée (DI) par gramme de tissu.

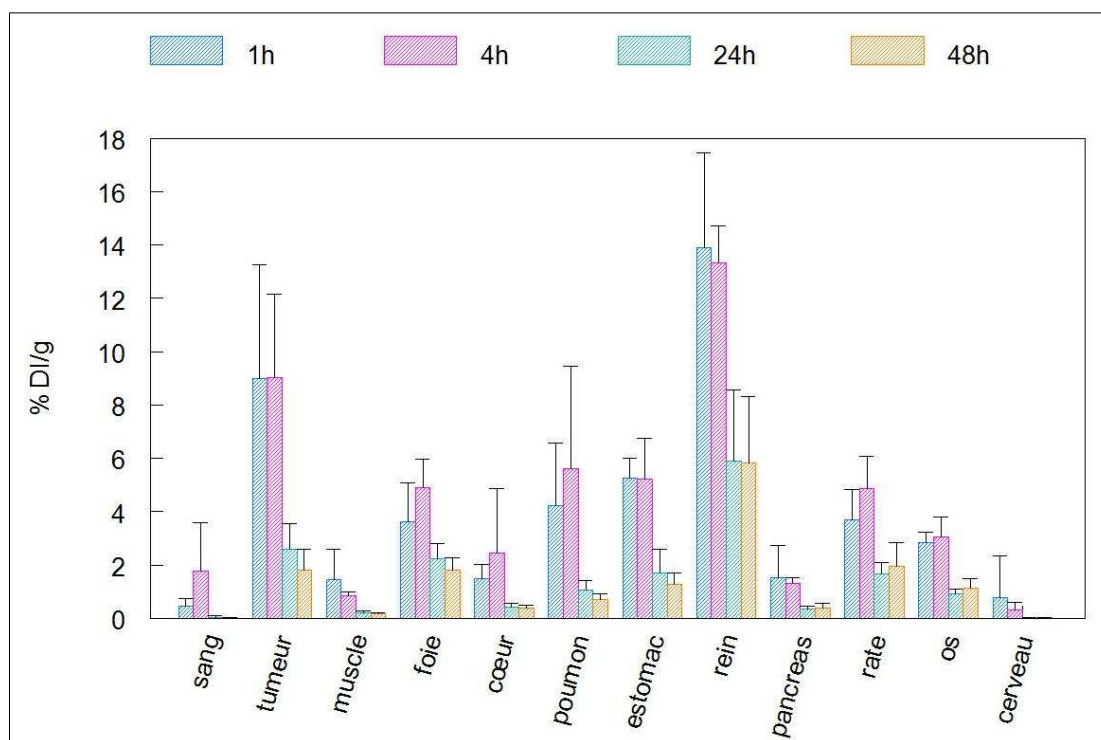


Figure 62 : Biodistribution du ^{90}Y -RAFT-RGD à 1h, 4h, 24h et 48h (n=5 par temps) sur des souris Swiss Nude greffées avec le glioblastome U-87 MG. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

	1h		4h		24h		48h	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
sang	0,45	0,27	1,78	1,79	0,04	0,06	0,03	0,02
tumeur	9,00	4,26	9,04	3,12	2,59	0,94	1,81	0,77
muscle	1,46	1,12	0,85	0,14	0,19	0,08	0,17	0,06
foie	3,63	1,44	4,92	1,04	2,25	0,57	1,80	0,48
cœur	1,49	0,56	2,46	2,40	0,43	0,14	0,37	0,12
poumon	4,23	2,33	5,60	3,86	1,05	0,35	0,71	0,21
estomac	5,25	0,74	5,23	1,51	1,70	0,90	1,29	0,41
rein	13,90	3,55	13,33	1,40	5,90	2,66	5,84	2,46
pancreas	1,53	1,20	1,30	0,23	0,35	0,12	0,38	0,19
rate	3,71	1,12	4,86	1,22	1,66	0,44	1,95	0,89
os	2,86	0,38	3,05	0,77	0,91	0,19	1,14	0,34
cerveau	0,77	1,58	0,30	0,32	0,02	0,01	0,03	0,02
urine	164,30	246,91	46,81	64,03	3,20	1,57	3,56	1,86

Tableau 21 : Biodistribution du ⁹⁰Y-RAFT-RGD à 1h, 4h, 24h et 48h (n=5 par temps) sur des souris Swiss Nude greffées avec le glioblastome U-87 MG. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

Il est important de rappeler que toutes les souris ont reçu une pré-injection de 100 µL de gélofusine® 4% cinq minutes avant l'injection des 370 kBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD pour diminuer la captation rénale du peptide. La captation rénale est de 14% de la DI/g à 1h et 13,3% de la DI/g à 4h, puis se stabilise autour de 5,8% de la DI/g à 24 et 48h.

La captation tumorale du ⁹⁰Y-RAFT-RGD est de 9% de la dose injectée par gramme 1h et 4h post-injection. Cette valeur descend à 2,6% à 24h et 1,8% à 48h. Après les reins, la tumeur capte plus le ⁹⁰Y-RAFT-RGD que tous les organes à tous les temps, à la seule exception de la rate qui la dépasse de très peu à 48h (1,95 ± 0,89 % DI/g pour la rate versus 1,81 ± 0,77 % DI/g pour la tumeur).

Le ⁹⁰Y-RAFT-RGD est éliminé par la voie rénale principalement et un peu par la voie hépatique. Il est très rapidement éliminé dans les urines des souris. Le ⁹⁰Y-RAFT-RGD est très rapidement éliminé du sang et peu capté par le muscle controlatéral. Les rapports « tumeur / muscle controlatéral » et « tumeur / sang » sont rapportés dans le tableau 22. Ces rapports, toujours largement en faveur de la tumeur, indiquent une bonne capacité de ciblage du ⁹⁰Y-RAFT-RGD sur la tumeur et une faible activité non spécifique dans les tissus et le sang.

	1h	4h	24h	48h
tumeur/sang	22,28 ± 7,75	25,91 ± 37,12	26,68 ± 15,47	71,1 ± 34,82
tumeur/muscle	8,33 ± 4,11	11,09 ± 5,63	15,47 ± 6,66	11,53 ± 5,61
rein/tumeur	1,66 ± 0,43	1,58 ± 0,39	2,55 ± 1,82	3,73 ± 2,54

Tableau 22 : Rapport des pourcentages de dose injectée par gramme de tissu entre la tumeur et le sang, la tumeur et le muscle et le rein et la tumeur.

3.6. Imagerie corps entier au ^{177}Lu -RAFT-RGD

Les résultats obtenus montrent une accumulation rénale du ^{177}Lu -RAFT-RGD et du ^{177}Lu -RAFT-RAD ainsi qu'une élimination rapide par la vessie dès la première heure post-injection (Figure 63).

Il est très intéressant de noter l'accumulation tumorale du ^{177}Lu -RAFT-RGD dès la première heure post-injection et l'absence d'accumulation tumorale du peptide contrôle ^{177}Lu -RAFT-RAD.

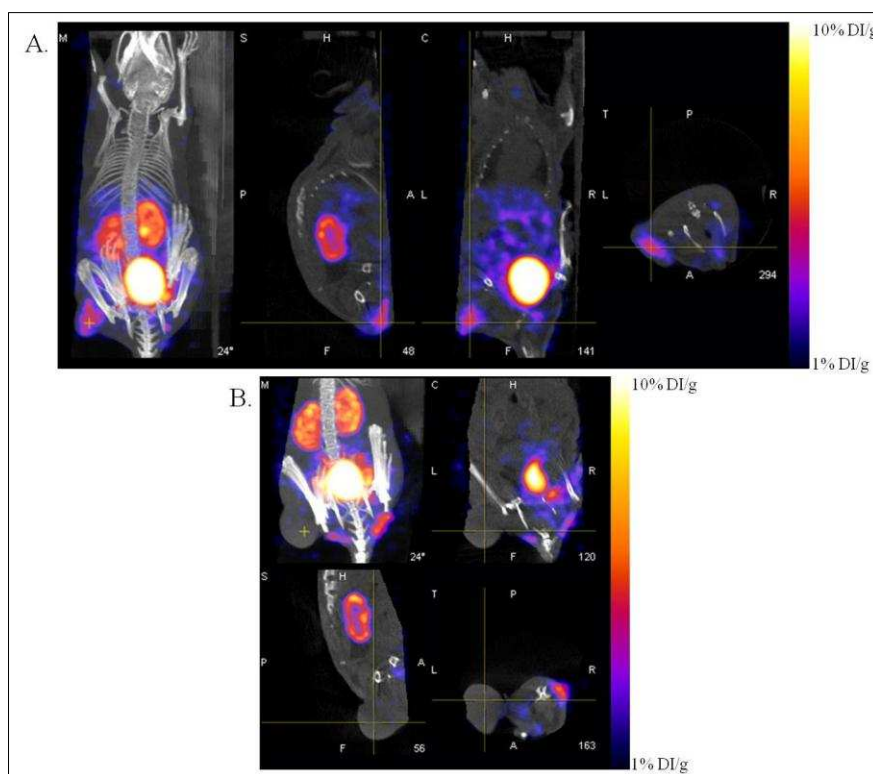


Figure 63 : Imagerie SPECT/CT à 1 heure post-injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD (A) ou ^{177}Lu -RAFT-RAD (B) sur des souris SWISS Nude porteuses de tumeurs U-87 MG.

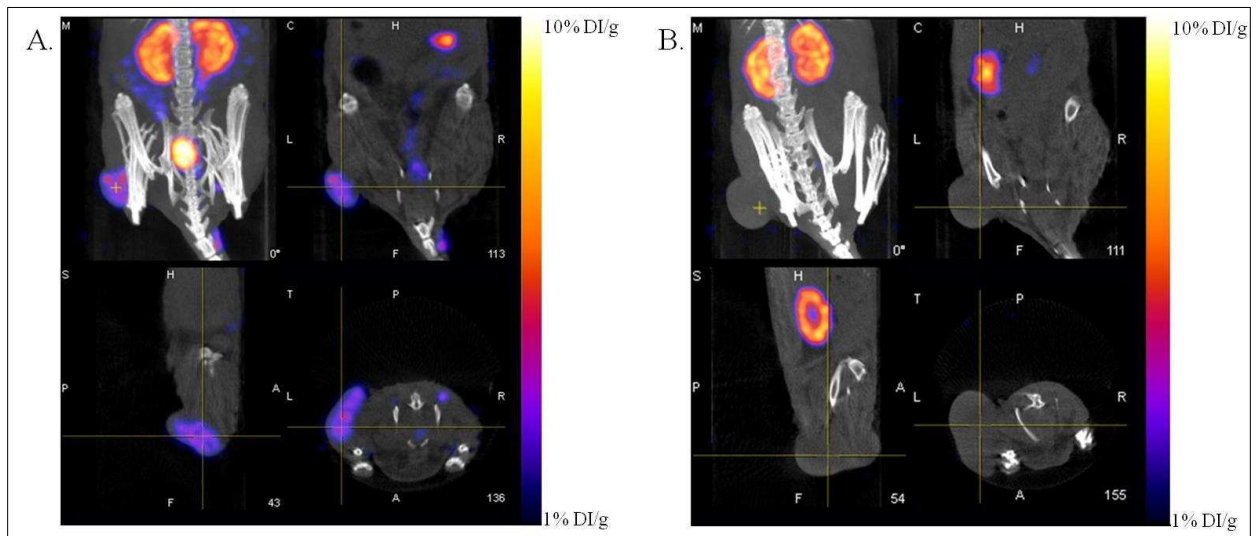


Figure 64 : Imagerie SPECT/CT à 4 heures post-injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD (A) ou ^{177}Lu -RAFT-RAD (B).

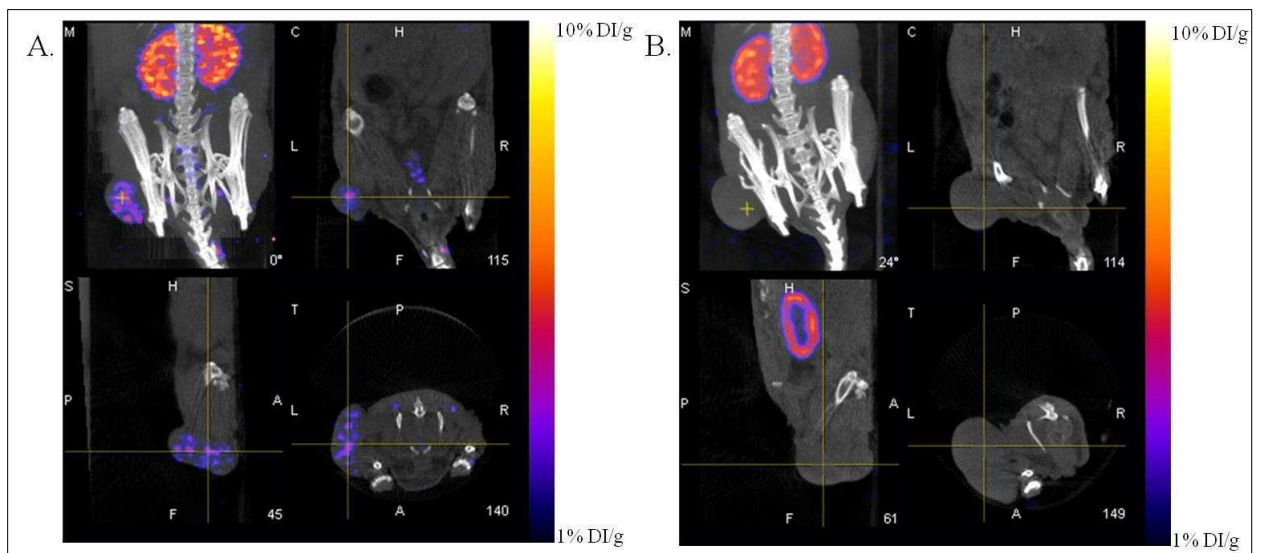


Figure 65 : Imagerie SPECT/CT à 24 heures post-injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD (A) ou ^{177}Lu -RAFT-RAD (B).

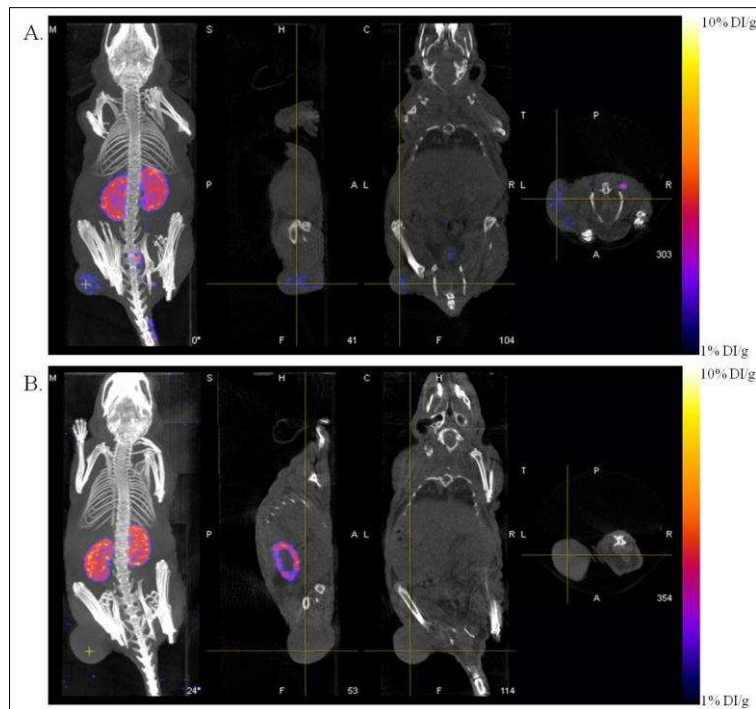


Figure 66 : Imagerie SPECT/CT à 48 heures post-injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD (A) ou ^{177}Lu -RAFT-RAD (B).

Le ^{177}Lu -RAFT-RGD est encore présent dans la tumeur 6 jours après l'injection (Figure 67).

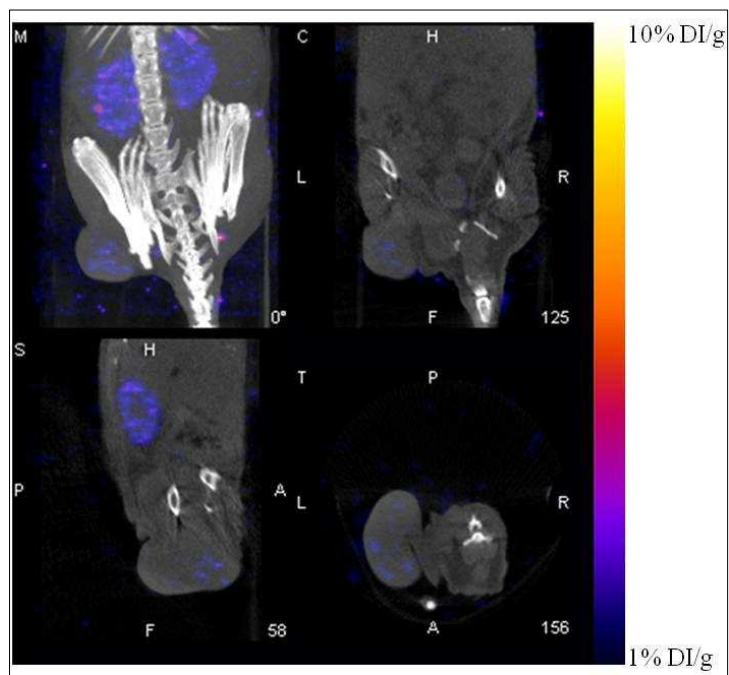


Figure 67 : Imagerie SPECT/CT 6 jours post-injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD.

Résultats

La quantification de l'activité observée sur les images permet de calculer la biodistribution des radiotraceurs dans les organes d'intérêt.

La biodistribution calculée sur l'imagerie du ^{177}Lu -RAFT-RGD est présentée dans la figure 68 et le tableau 23. On constate une captation précoce du radiotraceur dès 1h post-injection avec $3,35 \pm 0,46$ % de la dose injectée par gramme. Cette captation augmente un peu jusqu'à 4 heures post-injection pour atteindre $3,84 \pm 0,94$ % de la DI/g et diminue ensuite doucement avec toujours $1,56 \pm 0,01$ % DI/g à 48h post-injection. La captation rénale atteint rapidement un plateau à 6 % de la DI/g de 1h à 4h post-injection et diminue ensuite doucement avec toujours $3,51 \pm 0,60$ % de la DI/g à 48h. La captation musculaire est faible, puisqu'elle n'excède pas 1% de la DI/g, valeur atteinte une heure après l'injection et qui diminue ensuite jusqu'à $0,15 \pm 0,05$ % de la DI/g à 48h.

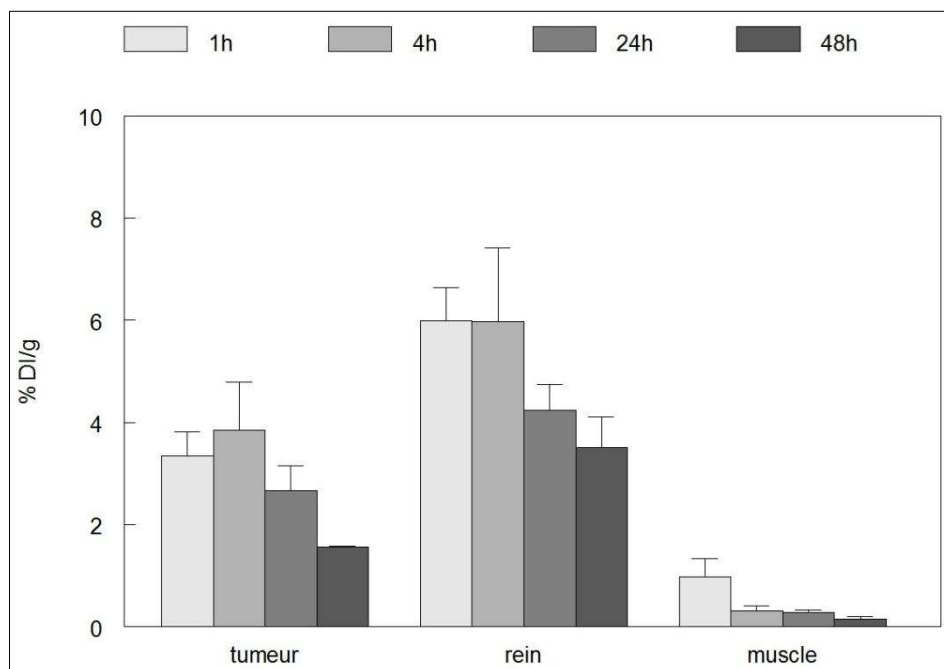


Figure 68 : Biodistribution par quantification d'images SPECT/CT du ^{177}Lu -RAFT-RGD à 1h, 4h, 24h et 48h (n=2 par temps) sur des souris Swiss Nude greffées avec le glioblastome U-87 MG. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

% DI/g	1h		4h		24h		48h	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
tumeur	3,35	0,46	3,84	0,94	2,66	0,50	1,56	0,01
rein	6,00	0,65	5,98	1,43	4,24	0,51	3,51	0,60
muscle	0,99	0,35	0,32	0,09	0,29	0,04	0,15	0,05

Tableau 23 : Biodistribution par quantification d'images SPECT/CT du ¹⁷⁷Lu-RAFT-RGD à 1h, 4h, 24h et 48h (n=2 par temps) sur des souris Swiss Nude greffées avec le glioblastome U-87 MG. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

La biodistribution calculée sur l'imagerie du ¹⁷⁷Lu-RAFT-RAD est présentée dans la figure 69 et le tableau 24. La captation tumorale est très faible et similaire à celle du muscle à tous les temps de la biodistribution. Ces valeurs n'excèdent pas 0,5% de la DI/g, valeurs atteintes une heure après l'injection et qui diminuent ensuite. La captation rénale atteint rapidement un plateau à 5 % de la DI/g de 1h à 4h post-injection et diminue ensuite doucement avec toujours $2,86 \pm 0,77$ % de la DI/g à 48h.

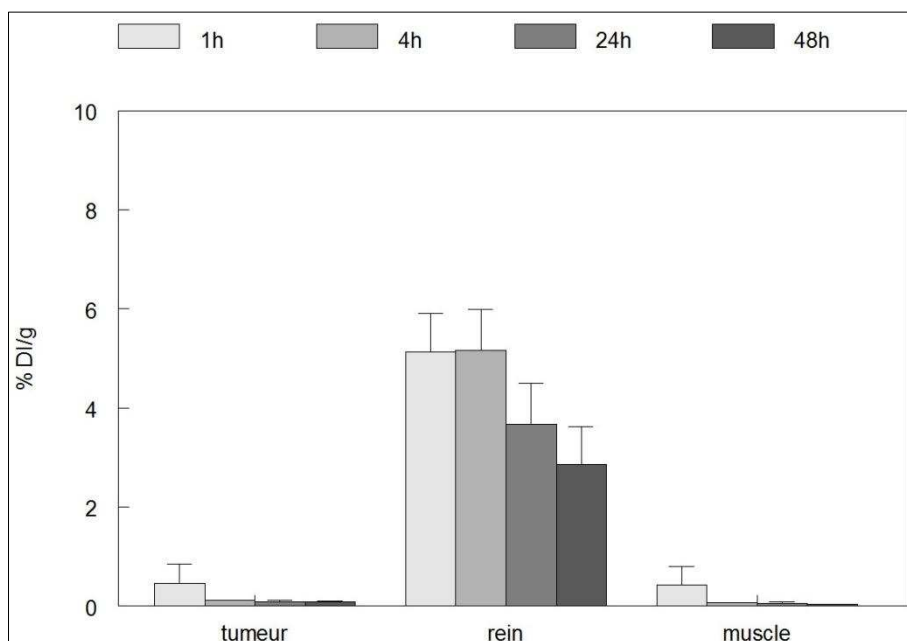


Figure 69 : Biodistribution par quantification d'images SPECT/CT du ¹⁷⁷Lu-RAFT-RAD à 1h, 4h, 24h et 48h (n=2 par temps) sur des souris Swiss Nude greffées avec le glioblastome U-87 MG. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

% DI/g	1h		4h		24h		48h	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
tumeur	0,47	0,39	0,12	0,002	0,09	0,02	0,08	0,02
rein	5,14	0,77	5,16	0,83	3,67	0,82	2,86	0,77
muscle	0,43	0,37	0,06	0,01	0,06	0,03	0,04	0,002

Tableau 24 : Biodistribution par quantification d'images SPECT/CT du ¹⁷⁷Lu-RAFT-RAD à 1h, 4h, 24h et 48h (n=2 par temps) sur des souris Swiss Nude greffées avec le glioblastome U-87 MG. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu.

Les résultats obtenus en biodistribution permettent de comparer l'activité retenue dans la tumeur par rapport aux organes sains (tableau 25).

	1h	4h	24h	48h
tumeur/muscle	3,72 ± 1,80	12,13 ± 0,42	9,19 ± 0,54	11,36 ± 4,25
rein/tumeur	1,79 ± 0,06	1,56 ± 0,01	1,60 ± 0,11	2,25 ± 0,40

Tableau 25 : Rapport des captations dans la tumeur par rapport au muscle et dans le rein par rapport à la tumeur du ¹⁷⁷Lu-RAFT-RGD à 1h, 4h, 24h et 48h post-injection. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne (n=2) ± écart-type.

Le ¹⁷⁷Lu-RAFT-RGD s'accumule sélectivement dans la tumeur, ce qui permet d'obtenir un bon rapport T/NT (« tumeur/non tumeur »), ici tumeur/muscle, d'environ 10 à partir d'une heure post-injection. Le rapport de l'activité captée par le rein sur celle de la tumeur est toujours en faveur du rein, avec une valeur de rapport inférieure à 2 jusqu'à 24h après l'injection.

B. Effets des traitements au RAFT-RGD radiomarqué à l' ^{90}Y ou au ^{177}Lu sur les différents modèles animaux

1. Tumeurs exprimant $\alpha v\beta 3$ au niveau cellulaire : U-87 MG

1.1. Traitements au ^{90}Y -RAFT-RGD

- Série 1 : 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD

L'évolution des volumes moyens des tumeurs des groupes traité et contrôle est représentée ci-dessous (Figure 70).

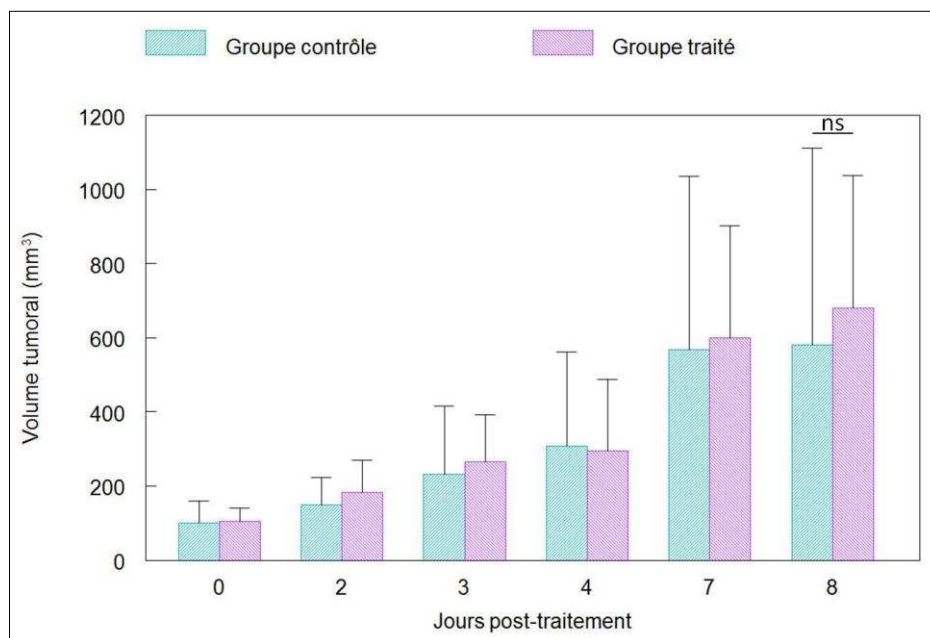


Figure 70 : Evolution post-traitement du volume tumoral de souris Swiss Nude greffées avec des glioblastomes U-87MG traitées avec 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD (n=6) versus souris contrôles (n=5).

Résultats

L'évolution de la taille relative des tumeurs par rapport au jour du traitement des différents groupes est représentée dans la figure 71.

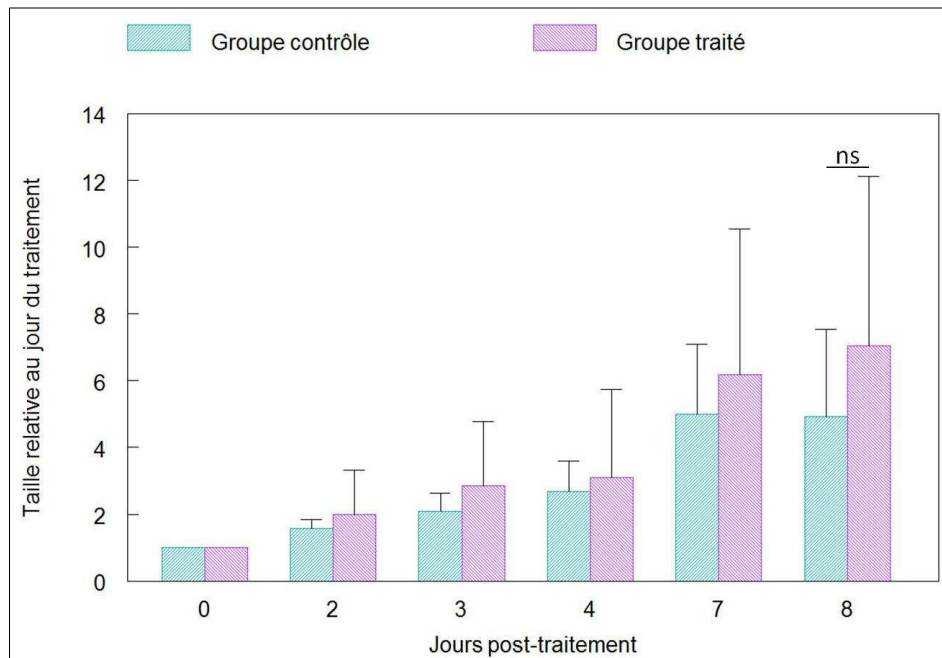


Figure 71 : Evolution des moyennes des tailles relatives des tumeurs par rapport au jour du traitement.

Il n'y a pas de différences significatives entre le groupe traité avec 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et le groupe contrôle ayant reçu une injection de la même quantité de RAFT-RGD non-radiomarqué que ce soit au niveau de l'évolution des volumes moyens des tumeurs ou au niveau de l'évolution de la taille relative moyenne par rapport au jour du traitement (Figure 71).

Les tumeurs avaient un volume de $103 \pm 46 \text{ mm}^3$ le jour du traitement. Les souris ont toutes été sacrifiées 8 jours après le traitement. Les tumeurs du groupe traité avaient alors un volume moyen de $680 \pm 357 \text{ mm}^3$ et étaient $7,1 \pm 5,1$ fois plus grosses que le jour du traitement. Les tumeurs du groupe contrôle mesuraient $581 \pm 530 \text{ mm}^3$ et étaient $4,9 \pm 2,6$ fois plus grosses que le jour du traitement. Les résultats de cette première série sont contre-intuitifs puisque les tumeurs sont plus grosses dans le groupe traité que dans le groupe contrôle, même si ces différences ne sont pas significatives.

Les temps moyens de doublement du volume tumoral sont présentés dans le tableau 26. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes.

	Groupe contrôle	Groupe traité	Analyse statistique
Temps de doublement en jours	4,65 ± 2,75	3,95 ± 2,21	Mann-Whitney, non significatif, p=0,47

Tableau 26 : Temps de doublement du volume tumoral.

Ces premiers résultats négatifs nous ont conduits à recommencer l'expérience sur des tumeurs de volumes supérieurs. Nous avons également rajouté un groupe pour tester une activité 10 fois supérieure, 37 MBq au lieu de 3,7 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD.

- **Série 2 : 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD, 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD, 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD**

L'évolution des volumes moyens des tumeurs pour chaque groupe est représentée ci-dessous (Figure 72).

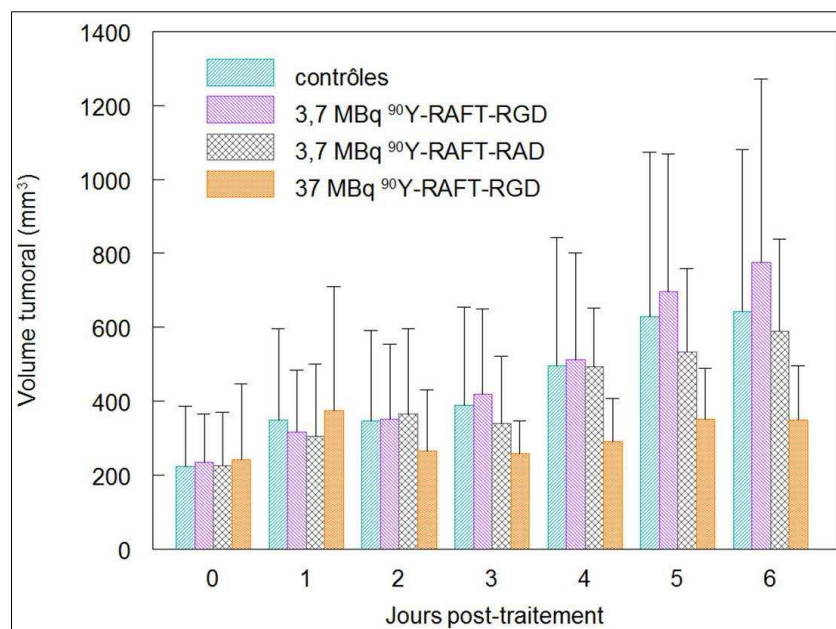


Figure 72 : Evolution post-traitement du volume tumoral de souris Swiss Nude greffées avec des glioblastomes U-87MG traitées avec 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD (n=6) ou 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD (n=6) ou 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD (n=5) versus souris contrôles (n=6).

L'évolution de la taille relative des tumeurs par rapport au jour du traitement des différents groupes est représentée dans la figure 73.

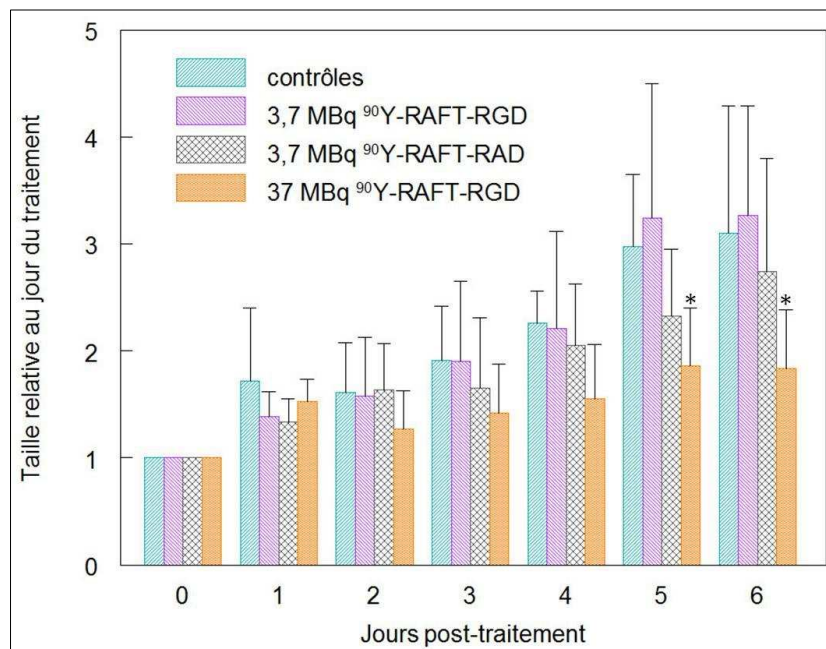


Figure 73 : Evolution de la taille relative des tumeurs par rapport au jour du traitement. *: $p < 0,05$ vs groupes contrôle ou 3,7 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD avec un test de Kruskal-Wallis et test post hoc de Student-Newman-Keuls à J5 et Mann-Whitney à J6.

Aucune souris n'a atteint le point limite conduisant au sacrifice durant les 5 premiers jours après les traitements. On dispose donc ici de moyennes pour les 6 premiers jours post-traitement. Il n'y a pas de différences significatives entre les différents groupes au niveau de l'évolution des volumes moyens des tumeurs.

Par contre, l'analyse statistique des tailles relatives au jour du traitement moyennes révèle des différences significatives à partir du 5^{ème} jour post-traitement (Figure 73). Les tumeurs ont moins grossi dans le groupe traité avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD que dans le groupe contrôle ou le groupe traité avec 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD.

Six jours après les traitements, la taille moyenne des tumeurs du groupe traité avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD est de 1,8 fois celle du jour du traitement, alors que dans le même temps les tumeurs du groupe contrôle ont augmenté leurs volumes de 3,1 fois et 3,3 fois dans le groupe traité avec 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD ($p=0,011$ et $p=0,014$ respectivement avec un test de Mann-Whitney) (Tableau 27).

	Groupe contrôle	Groupe 3,7 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD	Groupe 3,7 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RAD	Groupe 37 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD
J5	2,98 ± 0,67	3,24 ± 1,26	2,33 ± 0,62	1,86 ± 0,54
J6	3,10 ± 1,19	3,27 ± 1,02	2,74 ± 1,06	1,84 ± 0,55

Tableau 27 : Moyenne des tailles relatives au jour du traitement au 5^{ème} et 6^{ème} jour post-traitement.

Le temps de doublement du volume tumoral du groupe traité avec 37 MBq est supérieur à ceux des autres groupes (Tableau 28). L'analyse statistique de la différence entre les groupes contrôle et traité avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD indique qu'on se trouve à la limite de la significativité avec un p égal à 0,0502.

	Temps de doublement (jours)	Analyses statistiques
Groupe 37 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD	4,81 ± 1,44	Kruskal-Wallis : non significatif, p=0,32
Groupe 3,7 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD	3,81 ± 1,08	Mann-Whitney : limite significativité 37 MBq RGD/Ctrl p=0,0502
Groupe 3,7 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RAD	4,31 ± 1,04	
Groupe contrôle	3,63 ± 0,52	

Tableau 28 : Temps de doublement du volume tumoral.

Il est très intéressant de noter que l'efficacité du traitement avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD est corrélée ($r^2=0,98$) à la taille des tumeurs le jour du traitement. Cette relation directe est mise en évidence dans les figures ci-dessous (Figures 73 et 74).

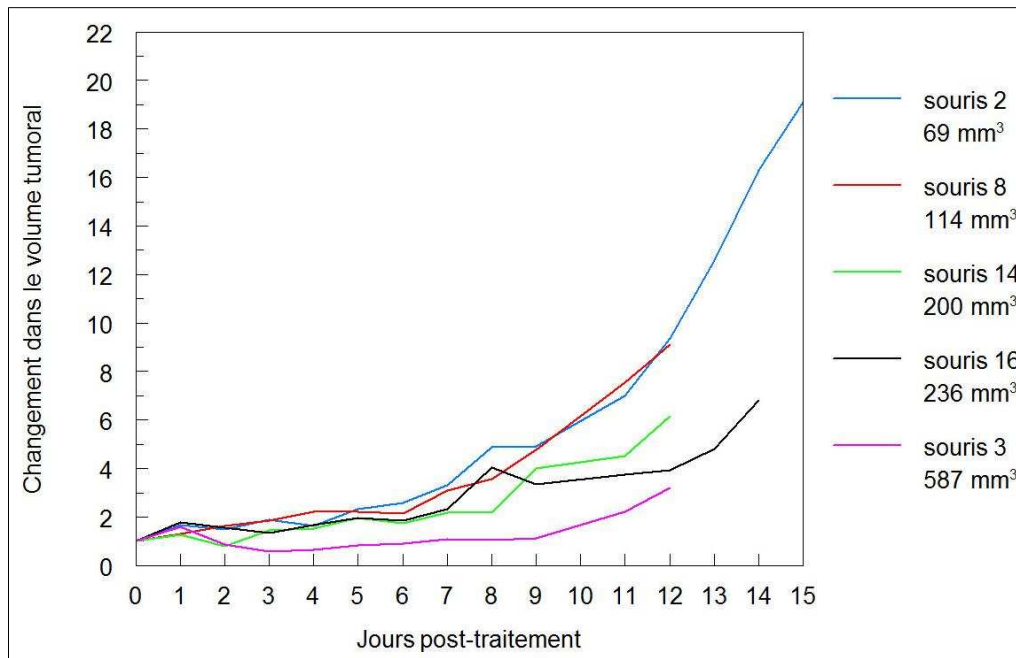


Figure 73 : Evolutions individuelles des tailles relatives des tumeurs par rapport au jour du traitement dans le groupe traité avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD. Le volume tumoral le jour du traitement est indiqué pour chaque souris du groupe.

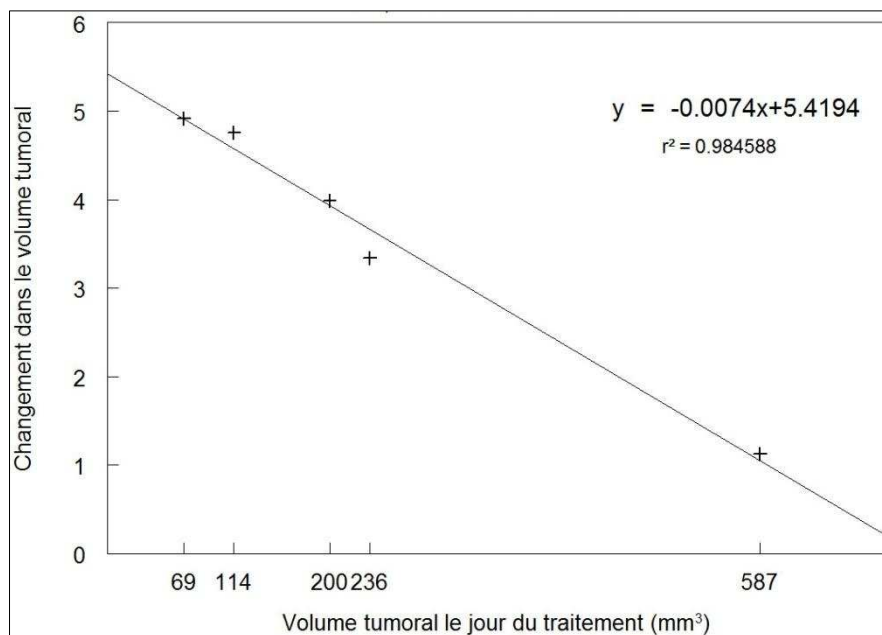


Figure 74 : Corrélation entre le volume tumoral le jour du traitement et son changement au 9^{ème} jour après un traitement avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD.

Résultats

La même corrélation ne peut pas être mise en évidence dans les autres groupes. La figure 75 représente la corrélation entre le volume tumoral le jour du traitement dans le groupe contrôle et son évolution au 7^{ème} jour après le traitement. Avec un r^2 égal à 0,28, cette relation n'est pas significative.

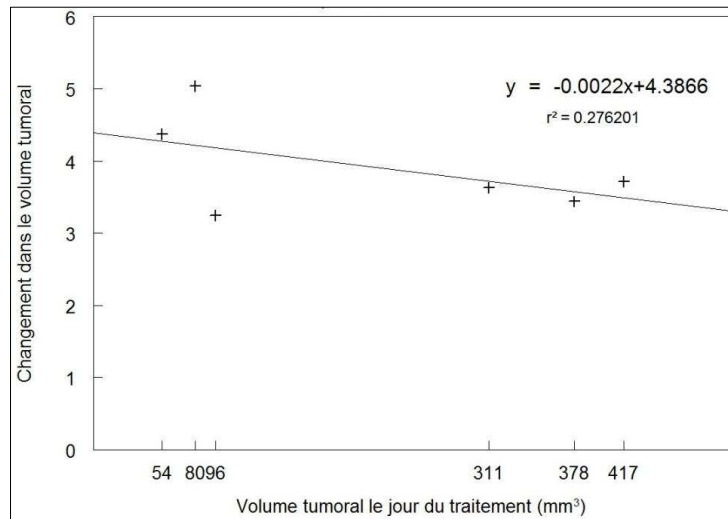


Figure 75 : Corrélation entre le volume tumoral le jour du traitement et son changement au 7^{ème} jour après les traitements dans le groupe contrôle.

Les souris sont sacrifiées lorsqu'elles atteignent le point limite. Les courbes de survie des différents groupes sont représentées dans la figure 76.

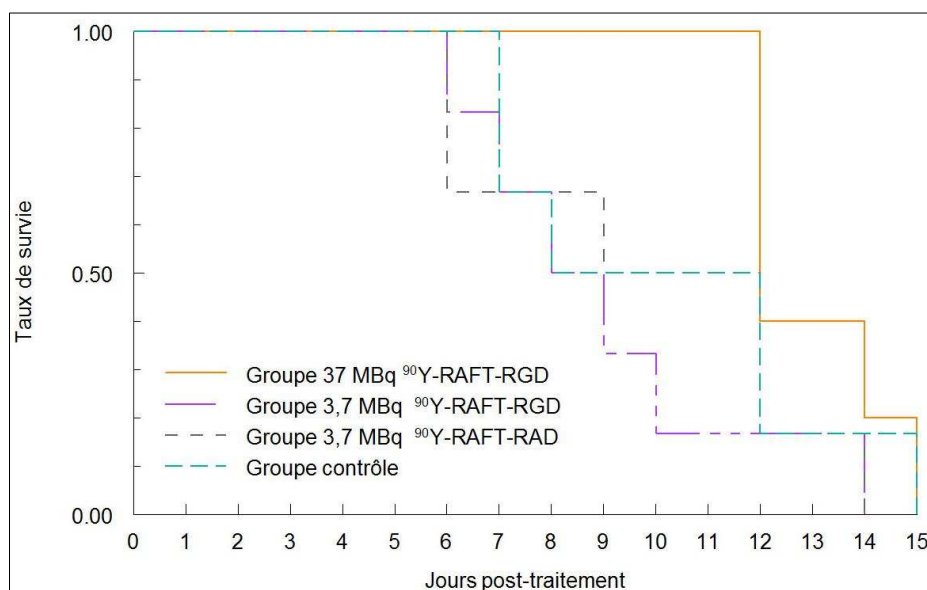


Figure 76 : Courbe de survie avant point limite.

Résultats

Les temps de survie moyens des différents groupes sont indiqués dans le tableau 29. Les souris du groupe traité avec 37 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD survivent plus longtemps que les souris du groupe contrôle (13 ± 1,41 jours vs 10,17 ± 3,31 jours). Cette différence est significative avec un test de Mann-Whitney.

	Survie moyenne (jours)	Analyses statistiques
Groupe 37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	13 ± 1,41	Kruskal-Wallis : non significatif, p=0,19
Groupe 3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	9 ± 2,83	
Groupe 3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD	9,83 ± 3,37	Mann-Whitney : p=0,09 : 37 MBq RGD/Ctrl p=0,06 : 37 MBq RGD/RAD p=0,02 : 3,7 MBq /37 MBq RGD
Groupe contrôle	10,17 ± 3,31	

Tableau 29 : Survie moyenne avant point limite en jours post-traitement (± écart-type).

Les résultats obtenus avec cette série de traitements nous apprennent qu'une injection de 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD par souris est efficace car elle ralentit la croissance tumorale par rapport aux autres groupes et que l'efficacité du traitement est corrélée à la taille de la tumeur le jour du traitement. Par contre, à ce stade nous n'avons pas de groupe contrôle non spécifique traité avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD. Pour les séries suivantes, nous décidons donc de traiter les souris avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD avec des groupes contrôles non traités et traités avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD et d'effectuer les traitements sur des tumeurs avec des volumes supérieurs à ceux des séries précédentes.

- **Série 3 : 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD, 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD**

Les tumeurs ont un volume supérieur le jour du traitement que lors des précédentes séries (798 ± 243 mm³ vs 230 ± 150 mm³ pour la série 2 ou 103 ± 46 mm³ pour la série 1). Les tumeurs atteignent donc plus rapidement le volume limite de 1500 mm³, surtout dans les groupes contrôles. La première souris qui atteint le volume limite fait partie du groupe contrôle traité au sérum physiologique et est euthanasiée le lendemain du traitement. On ne dispose donc pas de moyennes post-traitement pour les volumes tumoraux de cette série.

Résultats

L'évolution individuelle des volumes des tumeurs des différents groupes est représentée dans la figure 77.

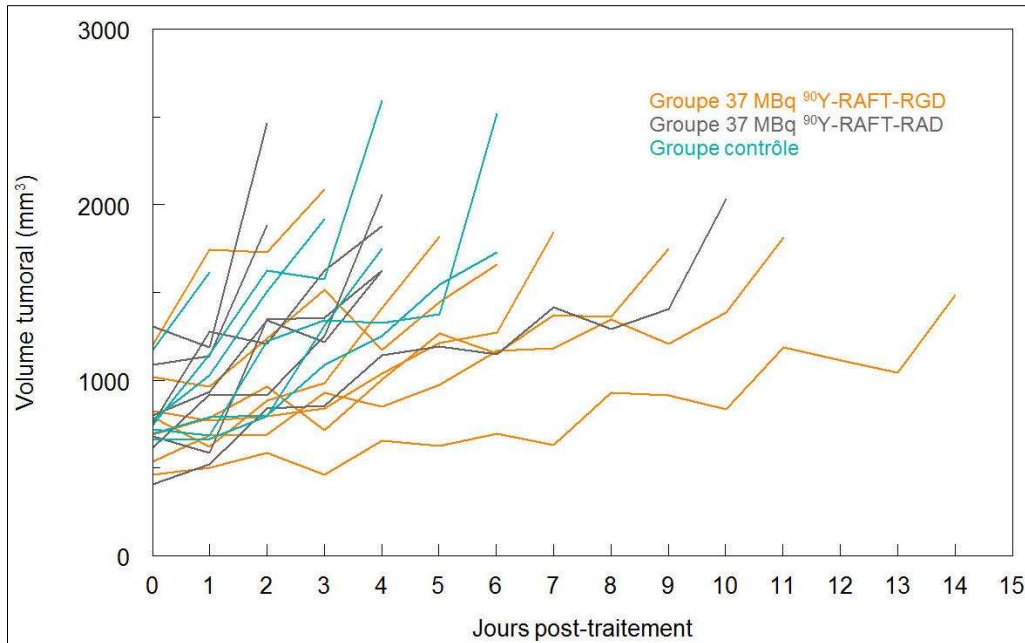


Figure 77 : Evolutions individuelles post-traitement du volume tumoral de souris Swiss Nude greffées avec des glioblastomes U-87MG traitées avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD (n=7) ou 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD (n=7) versus souris contrôles (n=6).

Ne disposant pas de valeurs moyennes, nous ne pouvons pas faire d'analyses statistiques des données obtenues sous cette forme. Cependant, on constate un ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq d' ^{90}Y -RAFT-RGD par rapport aux deux autres groupes bien visible sur la figure 78.

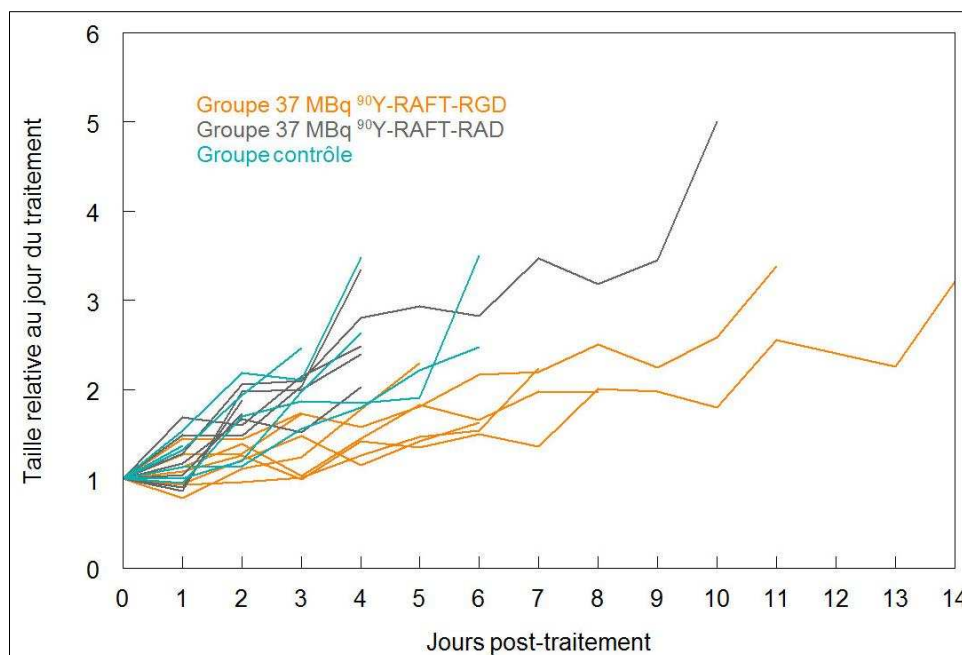


Figure 78 : Evolutions individuelles des tailles relatives des tumeurs par rapport au jour du traitement.

Le ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD est confirmé par le **temps de doublement du volume tumoral** qui est **2,4 fois supérieur à celui du groupe contrôle** et 2 fois supérieur au groupe traité avec 37 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RAD (Tableau 30).

	Temps de doublement (jours)	Analyses statistiques
Groupe 37 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD	6,26 ± 1,84	Kruskal-Wallis : p=0,0055 Post-hoc, Student-Newman-Keuls : p=0,0041 RGD/Ctrl p=0,0077 RGD/RAD p=0,7558 RAD/Ctrl
Groupe 37 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RAD	3,07 ± 0,81	
Groupe contrôle	2,61 ± 1,17	

Tableau 30 : Temps de doublement du volume tumoral.

Les courbes de survie avant point limite des différents groupes sont représentées dans la figure 79.

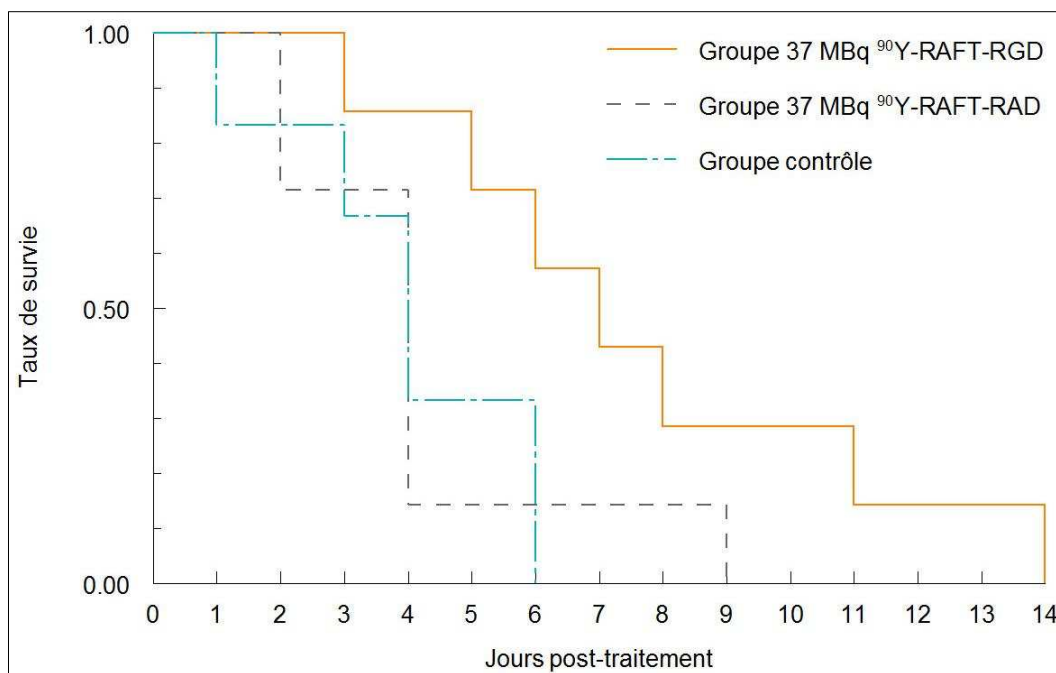


Figure 79 : Courbes de survie avant point limite.

On constate que ce ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD se traduit par une augmentation de la survie moyenne dans ce groupe par rapport aux groupes contrôles traités avec du sérum physiologique ou avec le peptide radiomarqué contrôle non spécifique (Tableau 31). La **survie moyenne double** presque (x1,93) par rapport au groupe contrôle traité au sérum physiologique et est 1,8 fois supérieure à celle du groupe traité avec 37 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RAD.

	Survie moyenne (jours)	Analyses statistiques
Groupe 37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	7,71 ± 3,73	Kruskal-Wallis : p=0,0653 Mann-Whitney : p=0,0269 RGD/Ctrl p=0,0238 RGD/RAD p=0,4432 RAD/Ctrl
Groupe 37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD	4,29 ± 2,69	
Groupe contrôle	4 ± 1,90	

Tableau 31 : Survie moyenne avant point limite en jours post-traitement (± écart-type).

Cette série de traitements confirme ainsi ce que la série 2 laissait présager, à savoir qu'un traitement avec 37 MBq d' ^{90}Y -RAFT-RGD ralentit la croissance tumorale, alors que le traitement avec la même activité de la molécule contrôle non spécifique n'est pas efficace.

Nous avons ensuite voulu examiner l'effet du fractionnement de ce traitement sur le même modèle de souris porteuses de tumeurs U-87 MG, $\alpha\text{v}\beta 3$ +.

- **Série 4 : Etude de fractionnement de l'activité injectée. Deux fois 18,5 MBq à 3 jours d'intervalle de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{90}Y -RAFT-RAD.**

Pour les mêmes raisons que précédemment, nous ne disposons pas de valeurs moyennes post-traitement des volumes tumoraux. L'évolution individuelle des volumes des tumeurs des différents groupes est donc représentée dans la figure 80.

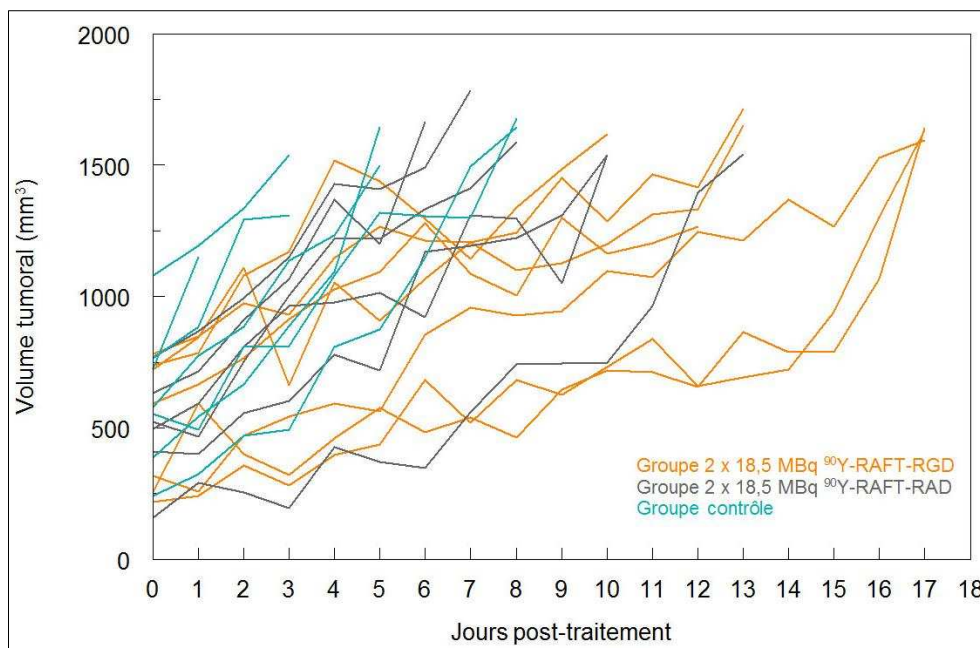


Figure 80 : Evolutions individuelles post-traitement du volume tumoral de souris Swiss Nude greffées avec des glioblastomes U-87MG traitées avec 2 x 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD (n=7) ou 2 x 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD (n=6) à 3 jours d'intervalle versus souris contrôles (n=7).

Résultats

La représentation des données obtenues sous forme d'évolution individuelle des tailles relatives des tumeurs par rapport au jour du traitement (Figure 81) permet de visualiser un ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 2 fois 18,5 MBq d' ^{90}Y -RAFT-RGD.

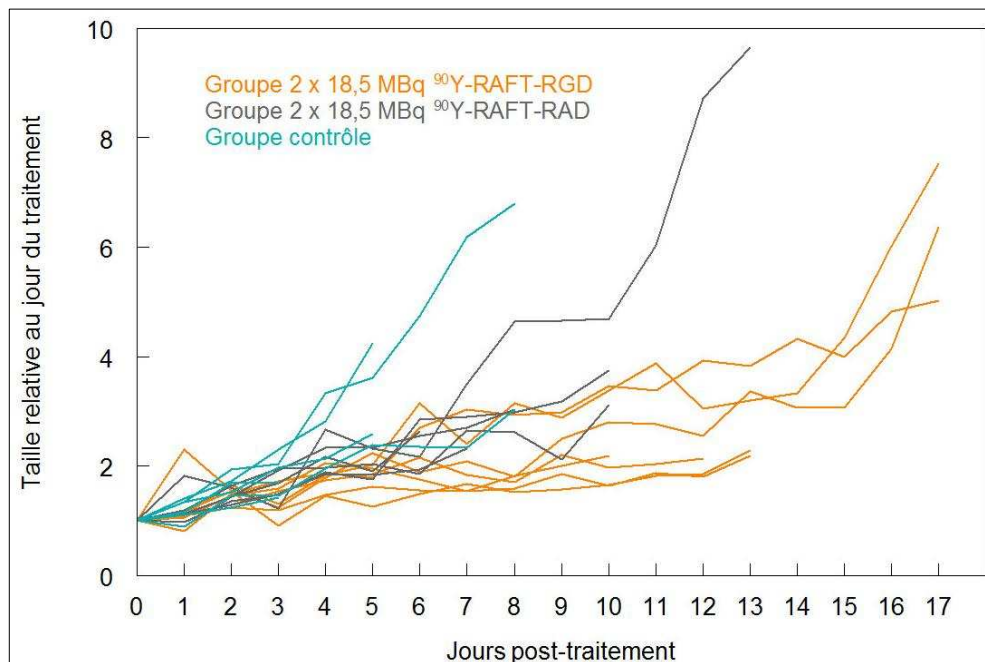


Figure 81 : Evolutions individuelles des tailles relatives des tumeurs par rapport au jour du traitement.

Le ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité se traduit par une augmentation du temps de doublement du volume tumoral par rapport aux deux autres groupes (Tableau 31). Les **tumeurs du groupe traité** avec deux doses de 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD mettent **2,4 fois plus longtemps à doubler de volume** que les tumeurs des souris du groupe contrôle (comme le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD) et 1,7 fois plus longtemps que celles du groupe traité avec le peptide contrôle radiomarqué non spécifique.

	Temps de doublement (jours)	Analyses statistiques
Groupe 2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	8,81 ± 2,35	Kruskal-Wallis : p=0.0012
Groupe 2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD	5,07 ± 0,83	Post-hoc, Student-Newman-Keuls :
Groupe contrôle	3,60 ± 1,50	p=0.0003 RGD/Ctrl p=0.0249 RGD/RAD p=0.2188 RAD/Ctrl

Tableau 31 : Temps de doublement du volume tumoral.

Les courbes de survie avant point limite des différents groupes sont représentées ci-dessous (Figure 82).

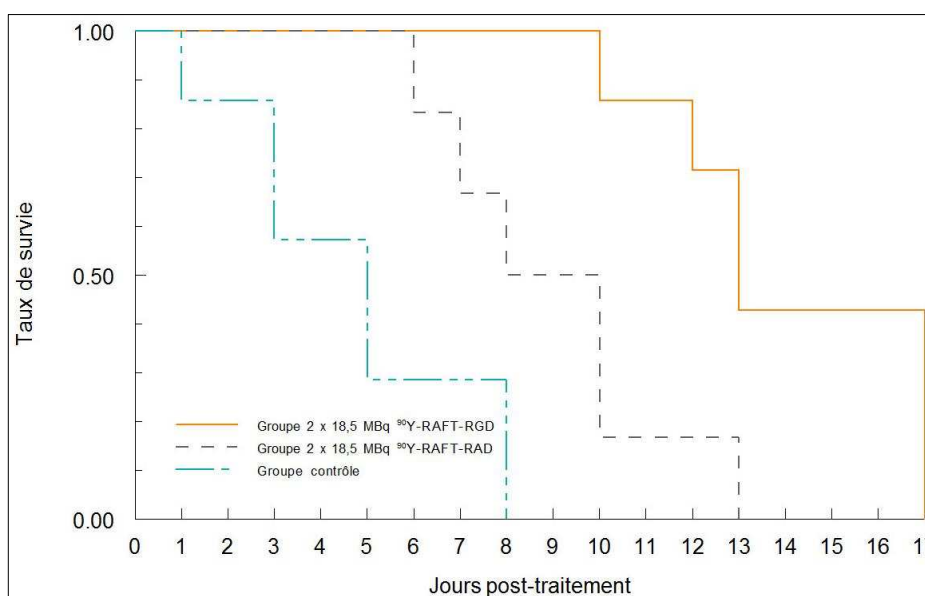


Figure 82 : Courbe de survie avant point limite.

Le ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 2 fois 18,5 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD entraîne un rallongement de la survie moyenne des souris de ce groupe (Tableau 32) qui triple par rapport au groupe contrôle. La survie moyenne du groupe traité avec la molécule contrôle non spécifique, ⁹⁰Y-RAFT-RAD, est inférieure à celle du groupe traité avec le ⁹⁰Y-RAFT-RGD, même si cette différence n'est pas significative (p=0,06).

	Survie moyenne (jours)	Analyses statistiques
Groupe 2 x 18,5 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD	14,14 ± 2,85	Kruskal-Wallis : p=0.001
Groupe 2 x 18,5 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RAD	9 ± 2,53	Post-hoc, Student-Newman-Keuls : p=0.0002 RGD/Ctrl p=0.0640 RGD/RAD p=0.0878 RAD/Ctrl
Groupe contrôle	4,71 ± 2,63	

Tableau 32 : Survie moyenne avant point limite en jours post-traitement (\pm écart-type).

Un traitement composé de 2 injections de 18,5 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD ralentit la croissance tumorale de 2,4 fois, tout comme le traitement composé d'une dose de 37 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD.

1.2. Traitement au ^{177}Lu -RAFT-RGD

- **Série 5 : 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD, 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RAD**

Le volume moyen des tumeurs le jour du traitement est de $169 \pm 75 \text{ mm}^3$. Les tumeurs mettent au moins 8 jours après le traitement pour atteindre le volume limite. On dispose donc des valeurs moyennes post-traitement des volumes tumoraux des différents groupes sur 8 jours. Ces valeurs sont représentées dans la figure 83. On constate un ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD par rapport aux deux autres groupes. Cette différence est significative à partir de J7 avec le groupe traité avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RAD.

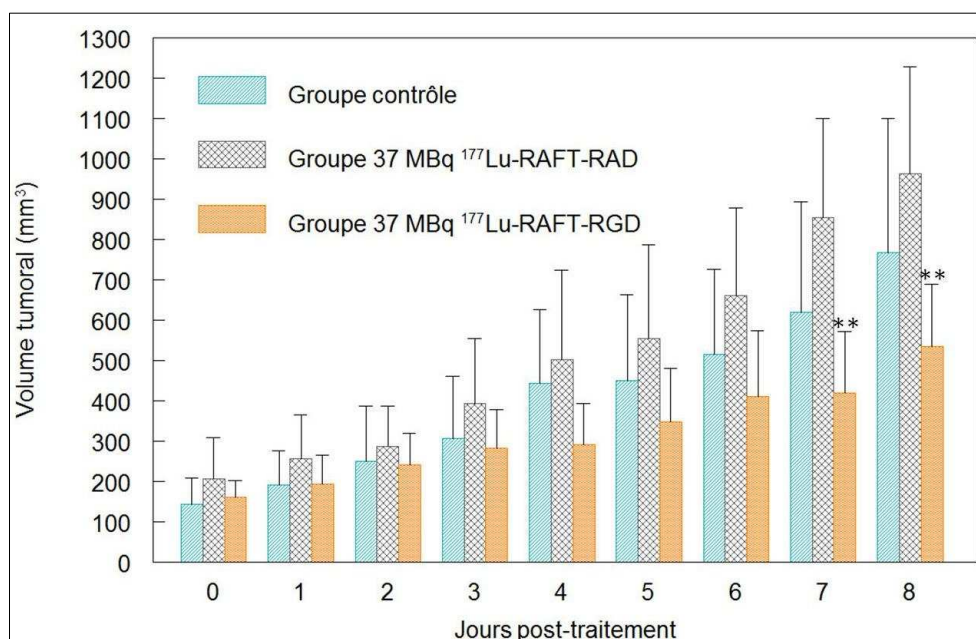


Figure 83 : Evolution post-traitement du volume tumoral de souris Swiss Nude greffées avec des glioblastomes U-87MG traitées avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD (n=7) ou 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RAD (n=7) versus souris contrôles (n=7). **: $p < 0,01$ vs groupe 30 MBq ^{90}Y -RAFT-RAD avec un test de Kruskal-Wallis et test post hoc de Student-Newman-Keuls.

L'évolution de la taille relative des tumeurs par rapport au jour du traitement des différents groupes est représentée dans la figure 84. On constate toujours le ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD et cette

différence est significative à partir du 4^{ème} jour après le traitement avec les groupes contrôles traités au sérum physiologique ou avec le peptide contrôle radiomarqué non spécifique (sauf à J5).

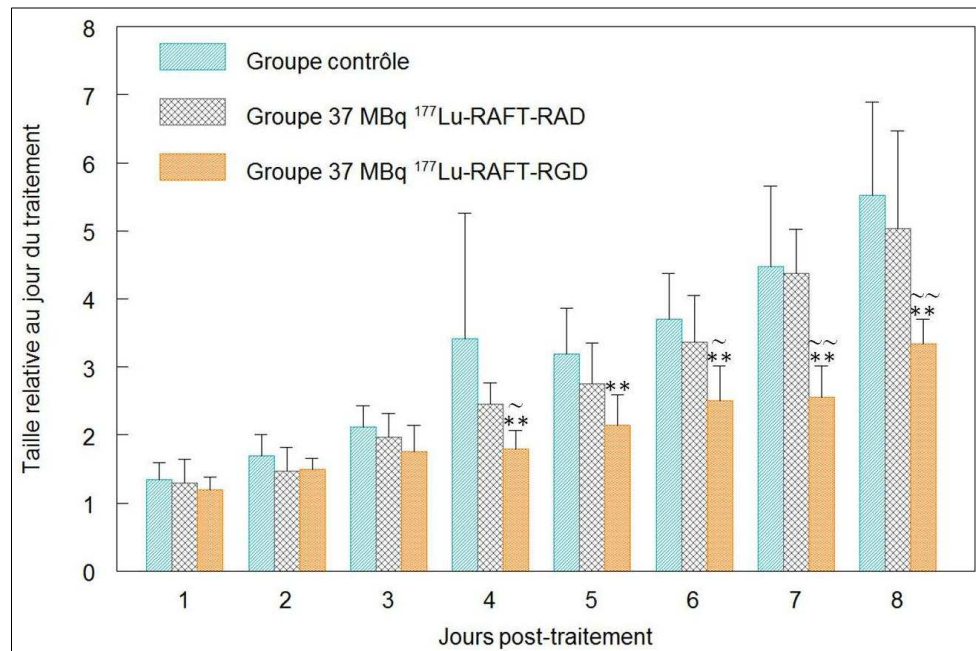


Figure 84 : Evolution de la taille relative des tumeurs par rapport au jour du traitement.
 ** : $p < 0,01$ vs groupe contrôle avec un test de Kruskal-Wallis et test post hoc de Student-Newman-Keuls. ~ : $p < 0,05$ vs groupe 37 MBq ¹⁷⁷Lu -RAFT-RAD. ~ : $p < 0,01$ vs groupe 37 MBq ¹⁷⁷Lu -RAFT-RAD.

Le ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité se traduit par une augmentation du temps de doublement du volume tumoral par rapport aux deux autres groupes (Tableau 33). Les tumeurs du groupe traité avec 37 MBq de ¹⁷⁷Lu-RAFT-RGD mettent 1,4 fois plus longtemps à doubler de volume que les tumeurs des souris du groupe contrôle et 1,3 fois plus longtemps que celles du groupe traité avec le peptide contrôle radiomarqué non spécifique.

	Temps de doublement (jours)	Analyses statistiques
Groupe 37 MBq de ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD	4,85 ± 0,74	Kruskal-Wallis : p=0.0045
Groupe 37 MBq de ¹⁷⁷ Lu -RAFT-RAD	3,67 ± 0,81	Post-hoc, Student-Newman-Keuls : p=0.0017 RGD/Ctrl p=0.0159 RGD/RAD p=0.4640 RAD/Ctrl
Groupe contrôle	3,37 ± 0,35	

Tableau 33 : Temps de doublement du volume tumoral.

Les courbes de survie avant point limite des différents groupes sont représentées ci-dessous (Figure 85).

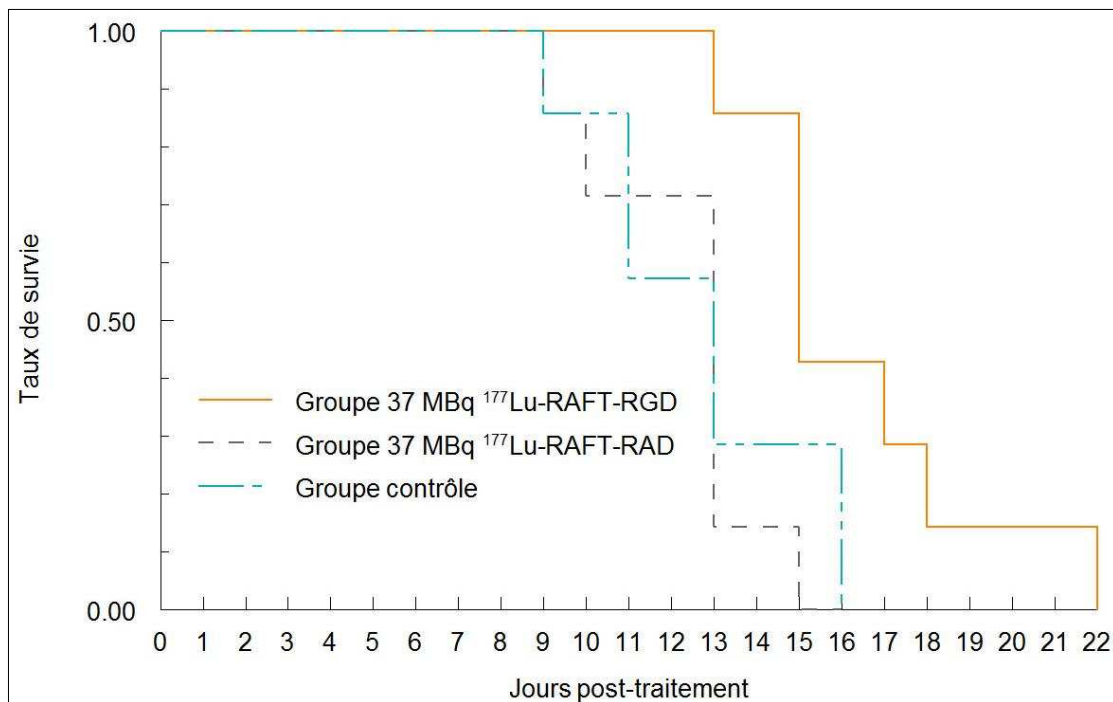


Figure 85 : Courbes de survie avant point limite.

Le ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq de ¹⁷⁷Lu-RAFT-RGD entraîne un rallongement de la survie moyenne des souris de ce groupe (Tableau 34). La durée moyenne de survie est multipliée par 1,3 par rapport au groupe contrôle traité avec du sérum physiologique et par 1,4 par rapport au groupe traité avec 37 MBq de ¹⁷⁷Lu-RAFT-RAD.

	Survie moyenne (jours)	Analyses statistiques
Groupe 37 MBq de ¹⁷⁷Lu-RAFT-RGD	15,43 ± 2,94	Kruskal-Wallis : p=0.0237
Groupe 37 MBq de ¹⁷⁷Lu -RAFT-RAD	11,29 ± 2,06	Post-hoc, Student-Newman-Keuls :
Groupe contrôle	11,71 ± 2,63	p=0.0348 RGD/Ctrl p=0.0133 RGD/RAD p=0.7143 RAD/Ctrl

Tableau 34 : Survie moyenne avant point limite en jours post-traitement (\pm écart-type).

Les résultats obtenus avec cette série de traitements indiquent qu'une injection de 37 MBq de ¹⁷⁷Lu-RAFT-RGD par souris permet de ralentir la croissance tumorale par rapport aux autres groupes.

1.3. Synthèse des résultats obtenus sur les tumeurs U-87 MG

Le tableau 35 présente une synthèse des résultats obtenus en termes de temps de doublement du volume tumoral et de temps de survie avant point limite pour les différentes séries.

Série	Nbre de souris	Activité et molécule injectées aux souris traitées	Volume tumoral le jour du traitement ³ (mm ³)	Temps de doublement du volume tumoral (jours)	Temps de survie avant point limite (jours)
1	5	contrôles	103 ± 46	4,65 ± 2,75	
	6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		3,95 ± 2,21	
2	6	contrôles	230 ± 150	3,63 ± 0,52	10,17 ± 3,31
	6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		3,81 ± 1,08	9 ± 2,83
	6	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD		4,31 ± 1,04	9,83 ± 3,37
	5	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		4,81 ± 1,44†	13 ± 1,41°
3	6	contrôles	798 ± 243	2,61 ± 1,17	4 ± 1,90
	7	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		6,26 ± 1,84*†	7,71 ± 3,73*†
	7	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD		3,07 ± 0,81	4,29 ± 2,69
4	7	contrôles	548 ± 239	3,60 ± 1,50	4,71 ± 2,63
	7	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD		8,81 ± 2,35*†	14,14 ± 2,85*
	6	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD		5,07 ± 0,83	9 ± 2,53
5	7	contrôles	169 ± 75	3,37 ± 0,35	11,71 ± 2,63
	7	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD		4,85 ± 0,74*†	15,43 ± 2,94*†
	7	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RAD		3,67 ± 0,81	11,29 ± 2,06

Tableau 35 : Synthèse des résultats obtenus pour les différentes séries. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± écarts-types. * : $p < 0,05$ vs Ctrl, † : $p < 0,05$ vs RAFT-RAD, ‡ : $p = 0,05$ vs Ctrl, ° : $p < 0,05$ vs 3,7 MBq ⁹⁰Y-RAFT-RGD.

2. Tumeurs n'exprimant pas $\alpha\beta3$ au niveau cellulaire : TS/A-pc

- Série 1 : 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD

L'évolution des volumes moyens des tumeurs des groupes traité et contrôle au cours du protocole est indiquée dans la figure 86. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes traité et contrôle. Les souris sont euthanasiées sept jours après le traitement.

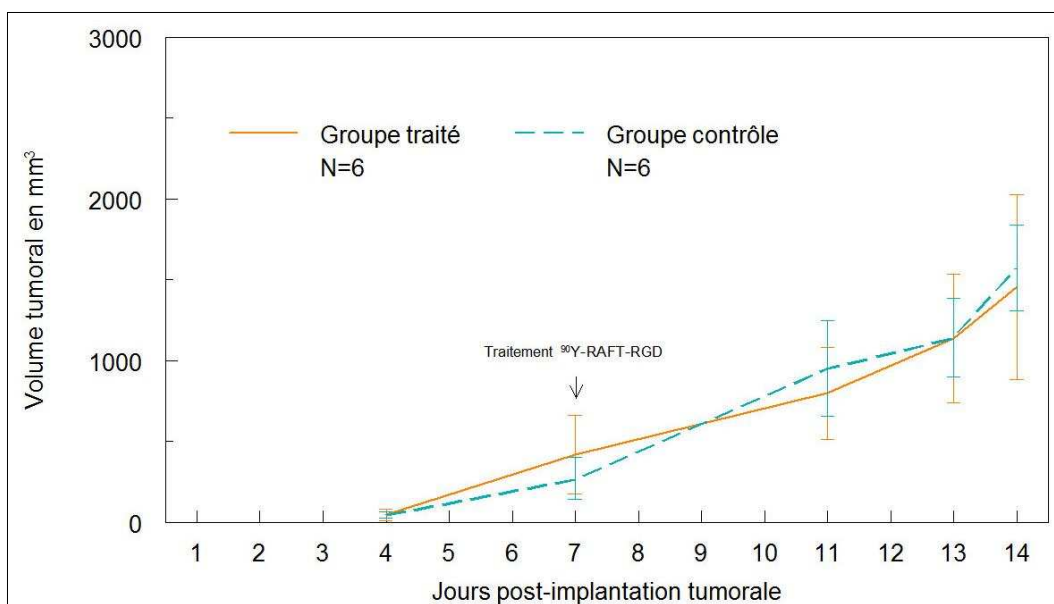


Figure 86 : Evolution moyenne des volumes tumoraux de souris BALB/c Nude greffées avec des carcinomes mammaires murins TS/A-pc traitées avec 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD (n=6) versus souris contrôles (n=6).

Les temps de doublement du volume tumoral sont de $3,38 \pm 1,19$ jours pour le groupe traité avec 3,7 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et de $2,81 \pm 0,90$ jours pour le groupe contrôle. La différence n'est pas significative avec un test de Mann-Whitney ($p = 0,18$).

• **Série 2 : 3,7 MBq, 7,4 MBq et 2 fois 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD**

L'évolution des volumes moyens des tumeurs des différents groupes traités et contrôle au cours du protocole est indiquée dans la figure 87. Il n'y a aucune différence significative entre les groupes. Les souris sont euthanasiées huit jours après le traitement.

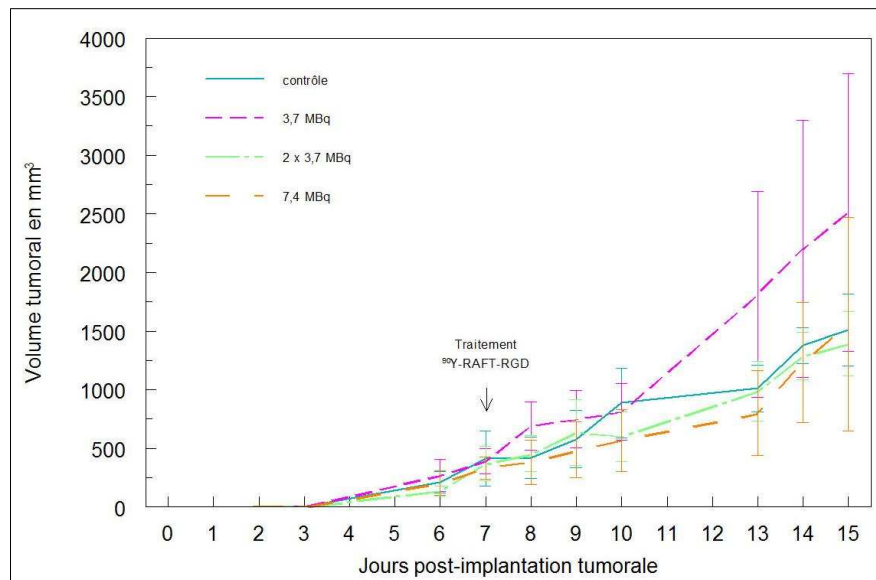


Figure 87 : Evolution moyenne des volumes tumoraux de souris BALB/c Nude greffées avec des carcinomes mammaires murins TS/A-pc traitées avec 3,7 MBq, 7,4 MBq et 2 fois 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD (n=6 par groupe) versus souris contrôles (n=6).

Les temps de doublement du volume tumoral sont indiqués dans le tableau 36 pour les différents groupes. Il n'y a aucune différence significative entre les groupes.

	Temps de doublement (jours)	Analyses statistiques
Groupe 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD	3,25 ± 0,69	
Groupe 7,4 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD	4,69 ± 2,79	Kruskal-Wallis : p = 0,35 NS
Groupe 2 x 3,7 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD	4,29 ± 1,14	
Groupe contrôle	4,77 ± 2,81	

Tableau 36 : Temps de doublement du volume tumoral.

Ces deux premières séries ont été effectuées en même temps que les premières séries U-87 MG, ce qui explique l'utilisation de faibles activités pour les traitements. Les résultats obtenus indiquent qu'une faible activité de ^{90}Y -RAFT-RGD ne permet pas de diminuer la croissance de tumeurs TS/A-pc, $\alpha\text{v}\beta 3$ -.

- **Série 3 : 30 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD, 30 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD**

L'évolution des volumes moyens des tumeurs des différents groupes est représentée ci-dessous (Figure 88). Il n'y a aucune différence significative entre les groupes.

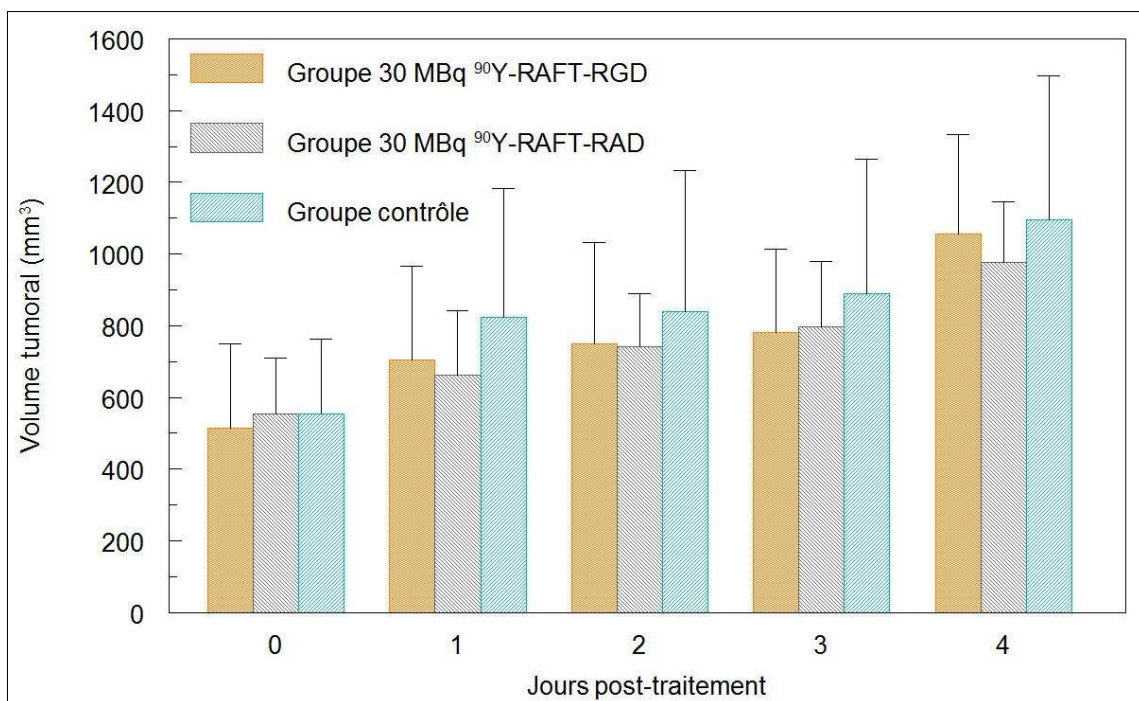


Figure 88 : Evolution post-traitement du volume tumoral de souris BALB/c Nude greffées avec des carcinomes mammaires murins TS/A-pc traitées avec 30 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD (n=7) ou 30 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD (n=7) versus souris contrôles (n=6).

L'évolution de la taille relative des tumeurs par rapport au jour du traitement pour les différents groupes est présentée dans la figure 89. Il n'y a aucune différence significative entre les groupes.

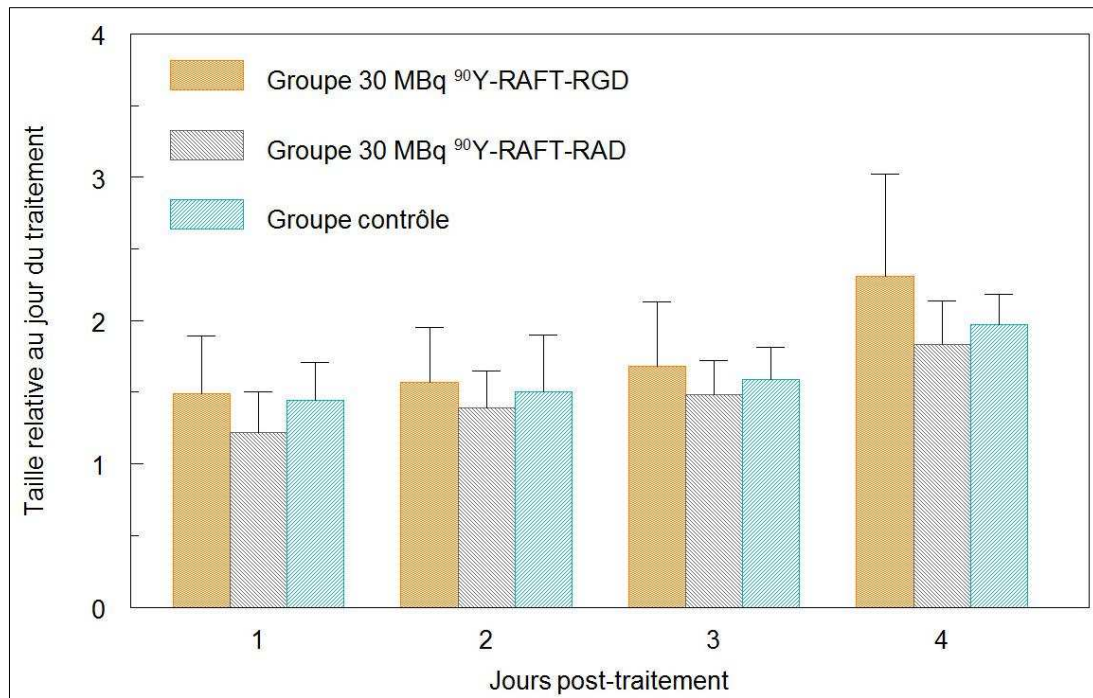


Figure 89 : Evolution de la taille relative des tumeurs par rapport au jour du traitement.

Le temps de doublement du volume des tumeurs (Tableau 37) est similaire dans les différents groupes.

	Temps de doublement (jours)	Analyses statistiques
Groupe 30 MBq de ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	0,84 ± 0,21	Kruskal-Wallis : non significatif, p=0,66
Groupe 30 MBq de ⁹⁰ Y-RAFT-RAD	0,80 ± 0,15	
Groupe contrôle	0,73 ± 0,28	Mann-Whitney 2 par 2 : non significatif

Tableau 37 : Temps de doublement moyen (en jours ± écart-type) du volume tumoral.

Les courbes de survie avant point limite des souris des différents groupes sont présentées dans la figure 90.

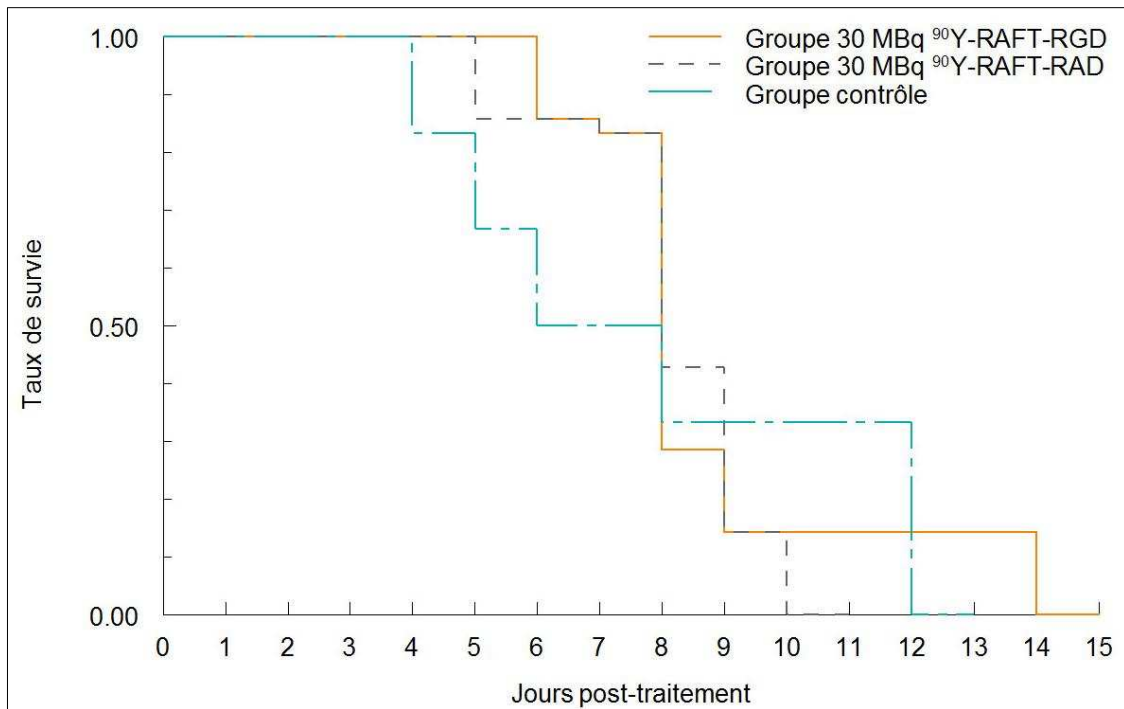


Figure 90 : Courbes de survie avant point limite.

Il n'y a pas de différence significative entre les groupes de survie moyenne avant point limite après traitement (Tableau 38).

	Survie moyenne (jours)	Analyses statistiques
Groupe 30 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD	8,6 ± 2,6	Kruskal-Wallis : non significatif, p=0,70
Groupe 30 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD	8 ± 1,6	
Groupe contrôle	7,3 ± 2,9	Mann-Whitney 2 par 2 : non significatif

Tableau 38 : Survie moyenne avant point limite en jours post-traitement (± écart-type).

Les résultats obtenus au cours de cette série de traitements nous indiquent que même une forte activité de ⁹⁰Y-RAFT-RGD (30 MBq) ne permet pas de ralentir la croissance de tumeurs TS/A-pc, qui n'expriment pas la cible, l'intégrine αvβ3.

C. Toxicité des traitements

1. Analyses hématologiques

La toxicité au niveau des cellules sanguines est indiquée par le **pourcentage de leur concentration par rapport à la valeur basale mesurée la veille de l'implantation tumorale**. Des valeurs comprises entre 70% et 130% de la valeur basale sont considérées comme normales (Kraeber-Bodéré, JNM 2010). Il n'existe pas de valeurs de références pour l'étude cytologique quantitative du sang de souris Nude à cause d'un très grand nombre de facteurs de variation parmi lesquels on peut citer le sexe des souris, leur âge, le site de ponction, la lignée, leur statut médical et la méthode d'étude de ces paramètres sanguins (manuelle ou automatisée).

1.1. Séries U-87 MG

➤ Erythrocytes

Dans le sang des groupes contrôles, la concentration moyenne en érythrocytes la veille de l'implantation est de $10,3 \times 10^6$ cellules par mm^3 (de $9,51 \times 10^6$ à $12,6 \times 10^6$ érythrocytes/ mm^3). L'évolution du taux d'érythrocytes au cours des traitements des différentes séries est indiquée dans le tableau 39.

Ces valeurs restent relativement normales. Aucune d'entre elles n'excède les 130% et seule une valeur est inférieure à 70% de la valeur basale (série 3, groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD). On constate cependant une **légère érythropénie dans les groupes traités** par rapport aux groupes contrôles.

Séries	Traitements	J-1 Traitement	Fin de protocole			Groupe Contrôle
			Groupes traités			
2	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD/RAD, 37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	111 ± 13	3,7 MBq RGD	3,7 MBq RAD	37 MBq RGD	99 ± 4
			88 ± 7	71 ± 27	77 ± 4	
3	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD/RAD	124 ± 10	RGD	RAD		84 ± 12
			69 ± 9	73 ± 12		
4	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD/RAD	109 ± 14	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y- RGD	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y- RAD		104 ± 15
			83 ± 8	87 ± 4		
5	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RAFT-RGD/RAD	103 ± 7	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RGD	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RAD		97 ± 6
			81 ± 4	78 ± 13		

Tableau 39 : Suivi du nombre d'érythrocytes en pourcentage par rapport à la veille de l'implantation tumorale au cours des séries U-87 MG. J-1 implantation : 100%.

➤ Leucocytes

Dans le sang des groupes contrôles, la concentration moyenne en leucocytes la veille de l'implantation est de 15000 cellules par mm³ (de 10100 à 19800 leucocytes/mm³). L'évolution du taux de leucocytes au cours des traitements des différentes séries est indiquée dans le tableau 40.

Les **groupes contrôles des quatre séries développent une hyperleucocytose très marquée** entre le début et la fin du protocole, cette augmentation est déjà visible la veille des traitements. Ces protocoles sont très longs, ils durent en moyenne **29 ± 4 jours** pour les groupes contrôles des séries 2, 3, 4 et 5 à partir de l'induction tumorale.

Il est intéressant de noter que la valeur de la concentration de leucocytes en pourcentage de la valeur basale du groupe contrôle en fin de protocole est similaire à celles des groupes traités dans la série 2 où les activités injectées sont faibles. En revanche, lorsque les activités injectées augmentent (série 3, 4 et 5), on constate une **forte leucopénie en fin de protocole dans les groupes traités par rapport aux groupes contrôles**.

La série pour laquelle les taux de leucocytes diminuent le plus est la série traitée avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD (série 3). Cette diminution est beaucoup moins importante pour la

Résultats

série 4, traitée avec 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et la série 5, traitée avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD.

D'ailleurs, la seule série pour laquelle les groupes traités ne voient pas leurs taux de leucocytes diminuer en dessous de la valeur la veille du traitement est la série 5 traitée au ^{177}Lu -RAFT-RGD. Le groupe contrôle de cette série présente une hyperleucocytose moins marquée que les autres séries, ce qui rend difficile l'interprétation de cette différence. Cependant si on compare les valeurs des groupes traités avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD de cette série 5 avec celles des groupes traités avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD de la série 3, on constate que la leucopénie est bien moins marquée dans les groupes traités avec du ^{177}Lu -RAFT-RGD/RAD que dans ceux traités avec la même activité de ^{90}Y -RAFT-RGD.

En ce qui concerne les traitements non spécifiques effectués au RAFT-RAD radiomarqué, on constate que les taux de leucocytes des souris sont similaires à ceux des souris traitées avec la même activité de RAFT-RGD radiomarqué.

Séries	Traitements	J-1 Traitement	Fin de protocole			
			Groupes traités			Groupe Contrôle
2	3,7 MBq ^{90}Y -RAFT-RGD/RAD, 37 MBq ^{90}Y -RAFT-RGD	175 ± 27	3,7 MBq RGD	3,7 MBq RAD	37 MBq RGD	266 ± 90
			296 ± 231	209 ± 56	121 ± 56	
3	37 MBq ^{90}Y -RAFT-RGD/RAD	177 ± 47	37 MBq ^{90}Y - RGD	37 MBq ^{90}Y - RAD		482 ± 183
			34 ± 7	31 ± 10		
4	2 x 18,5 MBq ^{90}Y -RAFT-RGD/RAD	161 ± 30	2 x 18,5 MBq ^{90}Y - RGD	2 x 18,5 MBq ^{90}Y - RAD		370 ± 44
			113 ± 36	128 ± 18		
5	37 MBq ^{177}Lu -RAFT-RGD/RAD	127 ± 19	RGD	RAD		195 ± 28
			141 ± 21	152 ± 57		

Tableau 40 : Suivi du nombre de leucocytes en pourcentage par rapport à la veille de l'implantation tumorale au cours des séries U-87 MG. J-1 implantation : 100%.

➤ Thrombocytes

Dans le sang des groupes contrôles, la concentration moyenne en thrombocytes la veille de l'implantation est de 9800 cellules par mm³ (de 7000 à 14300 thrombocytes/mm³). L'évolution du taux de thrombocytes au cours des traitements des différentes séries est indiquée dans le tableau 41.

L'évolution des thrombocytes est similaire à celle des leucocytes. Les valeurs en pourcentages de la concentration par rapport à la valeur basale augmentent de manière très importante au cours des séries. Cette **hyperplaquettose** commence avant le traitement pour toutes les séries et continue d'augmenter **dans les groupes contrôles**.

Les **traitements provoquent une importante thrombopénie** par rapport aux groupes contrôles. La diminution la plus marquée est celle du groupe traité avec 37 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD de la série 2 qui finit avec une concentration de thrombocytes égale à 98% de la concentration basale alors que le groupe contrôle finit lui à 343%.

Comme pour les leucocytes, les valeurs sont similaires entre les groupes traités avec le RAFT-RGD ou la molécule contrôle non spécifique.

Les valeurs du groupe traité au RAFT-RGD marqué au Lu-177 sont semblables à celles des autres groupes avec une franche diminution par rapport au groupe contrôle non traité et des valeurs qui descendent au niveau de celles de la veille du traitement.

Séries	Traitements	J-1 Traitement	Fin de protocole			Groupe Contrôle
			Groupes traités			
2	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD/RAD, 37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	140 ± 33	3,7 MBq RGD	3,7 MBq RAD	37 MBq RGD	343 ± 135
			426 ± 339	272 ± 160	98 ± 38	
3	37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD/RAD	194 ± 56	RGD	RAD		877 ± 591
			194 ± 147	264 ± 48		
4	2 x 18,5 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD/RAD	179 ± 34	RGD	RAD		366 ± 72
			218 ± 38	201 ± 12		
5	37 MBq ¹⁷⁷ Lu-RAFT- RGD/RAD	123 ± 25	RGD	RAD		278 ± 89
			130 ± 14	121 ± 33		

Tableau 41 : Suivi du nombre de thrombocytes en pourcentage par rapport à la veille de l'implantation tumorale au cours des séries U-87 MG. J-1 implantation : 100%.

Les résultats des analyses hématologiques des séries U-87 MG indiquent :

- une légère érythropénie dans les groupes traités,
- une hyperleucocytose très marquée dans les groupes non traités entre le début et la fin du protocole, une leucopénie dans les groupes traités avec des fortes activités par rapport aux groupes contrôles, une diminution de cet effet leucopéniant lors de de l'injection du traitement en 2 fois ou de l'utilisation de lutétium-177 à la place d'yttrium-90,
- une évolution du nombre de thrombocytes similaire à celle des leucocytes, à savoir une hyperplaquettose très importante dans les groupes non traités et une thrombopénie dans les groupes traités avec des fortes activités par rapport aux groupes contrôles,
- que la pancytopenie observée dans les groupes traités ne dépend pas du type de molécule radiomarquée, les résultats obtenus étant similaires entre les groupes traités avec du RAFT-RGD ou du RAFT-RAD radiomarqués.

1.2. Séries TS/A-pc

Les profils d'analyses sanguines obtenus pour les séries de souris avec des tumeurs TS/A-pc sont différents des précédents.

Les valeurs en pourcentage de la concentration basale pour les trois types de cellules quantifiées restent dans la norme pour les groupes contrôles en fin de protocole (entre 70% et 130%). Ces protocoles durent deux fois moins longtemps que les protocoles U-87 MG, avec une moyenne de **14,8 ± 0,7 jours** pour les groupes contrôles des séries 1, 2 et 3 à partir de l'induction tumorale.

➤ Erythrocytes

Dans le sang des groupes contrôles, la concentration moyenne en érythrocytes la veille de l'implantation est de $10,3 \times 10^6$ cellules par mm^3 (de $7,62 \times 10^6$ à $13,2 \times 10^6$ érythrocytes/ mm^3). Le suivi du taux d'érythrocytes est présenté dans le tableau 42. Toutes les valeurs mesurées sont normales. On ne constate pas d'érythropénie dans les groupes traités.

Séries	Traitements	J-1 Traitement	Fin de protocole			Groupe Contrôle
			Groupes traités			
1	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD	78 ± 16	83 ± 14			89 ± 1
2	3,7 MBq, 7,4 MBq et 2 x 3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD	86 ± 12	3,7 MBq	7,4 MBq	2 x 3,7 MBq	87 ± 11
			83 ± 7	108 ± 29	74 ± 11	
3	29,6 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD/RAD	94 ± 6	RGD		RAD	92 ± 8
			88 ± 13		72 ± 34	

Tableau 42 : Suivi du nombre d'érythrocytes en pourcentage par rapport à la veille de l'implantation tumorale au cours des séries TS/A-pc. J-1 implantation : 100%.

➤ Leucocytes

Dans le sang des groupes contrôles, la concentration moyenne en leucocytes la veille de l'implantation est de 17600 cellules par mm³ (de 12100 à 25700 leucocytes/mm³). Le suivi du taux de leucocytes est présenté dans le tableau 43.

Il n'y a pas d'hyperleucocytose dans les groupes contrôles. Les groupes traités de la série 2 avec des activités injectées qui vont de 3,7 MBq à 7,4 MBq présentent une leucopénie. La diminution du nombre de leucocytes est encore plus marquée pour les groupes de la série 3 traités avec 29,6 MBq d'⁹⁰Y-RAFT-RGD/RAD.

Il n'y a pas de différence entre les groupes traités avec le RAFT-RGD radiomarqué et la molécule contrôle non spécifique radiomarquée.

Séries	Traitements	J-1 Traitement	Fin de protocole			Groupe Contrôle
			Groupes traités			
1	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD	95 ± 10	111 ± 57			106 ± 18
2	3,7 MBq, 7,4 MBq et 2 x 3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD	98 ± 7	3,7 MBq	7,4 MBq	2 x 3,7 MBq	103 ± 4
			60 ± 7	44 ± 27	66 ± 25	
3	29,6 MBq ⁹⁰ Y-RAFT- RGD/RAD	102 ± 5	RGD		RAD	92 ± 8
			37 ± 4		32 ± 8	

Tableau 43 : Suivi du nombre de leucocytes en pourcentage par rapport à la veille de l'implantation tumorale au cours des séries TS/A-pc. J-1 implantation : 100%.

➤ Thrombocytes

Dans le sang des groupes contrôles, la concentration moyenne en thrombocytes la veille de l'implantation est de 11900 cellules par mm³ (de 9000 à 16500 thrombocytes/mm³). Le suivi du taux de thrombocytes est présenté dans le tableau 44. Les groupes traités des séries 2 et 3 présentent une thrombopénie.

Séries	Traitements	J-1 Traitement	Fin de protocole			Groupe Contrôle
			Groupes traités			
1	3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	98 ± 25	82 ± 33			120 ± 15
2	3,7 MBq, 7,4 MBq et 2 x 3,7 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	98 ± 8	3,7 MBq	7,4 MBq	2 x 3,7 MBq	97 ± 18
			42 ± 3	50 ± 5	67 ± 25	
3	29,6 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD/RAD	89 ± 24	RGD		RAD	111 ± 16
			63 ± 14		71 ± 22	

Tableau 44 : Suivi du nombre de thrombocytes en pourcentage par rapport à la veille de l'implantation tumorale au cours des séries TS/A-pc. J-1 implantation : 100%.

2. Dosage de la créatinine sérique

Les résultats du dosage de la créatinine sérique de la série 3 U-87 MG sont présentés ci-dessous (Tableau 45). Les souris traitées ont reçu une injection de 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD ou de ⁹⁰Y-RAFT-RAD.

	Groupe contrôle	Groupe 37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RGD	Groupe 37 MBq ⁹⁰ Y-RAFT-RAD
Nombre d'échantillons	6	7	5
Créatinine sérique (µmol.L ⁻¹)	52,8 ± 13,6	86,6 ± 23 *	81,4 ± 18,3 *

Tableau 45 : Résultats du dosage de la créatinine sérique en fin de protocole pour la série 3 U-87 MG. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± écart-type.

Résultats

Les souris des groupes traités présentent une augmentation significative de leurs taux de créatinine sérique (* : $p=0,0061$ entre les groupes contrôle et ^{90}Y -RAFT-RGD et $p=0,0254$ entre les groupes contrôle et ^{90}Y -RAFT-RAD avec un test de Kruskal-Wallis et un test post-hoc de Student-Newman-Keuls). La faible différence entre les groupes traités avec la molécule de RAFT-RGD radiomarquée et la molécule contrôle non spécifique RAFT-RAD est quant à elle non significative. Ces résultats indiquent une diminution de la fonction rénale chez les souris traitées avec 37 MBq de RAFT-RGD ou RAFT-RAD marquée avec de l'yttrium-90.

Les résultats du dosage de la créatinine sérique des séries 4 et 5 U-87 MG sont présentés ci-dessous (Tableau 46). Les souris traitées au cours de la 4^{ème} série U-87 MG ont reçu un traitement fractionné de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{90}Y -RAFT-RAD (deux fois 18,5 MBq à trois jours d'intervalle). Les souris de la 5^{ème} série U-87 MG ont reçu une injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD ou de ^{177}Lu -RAFT-RAD. Ces deux séries sont présentées ensemble car elles ont été réalisées en parallèle et partagent le même groupe contrôle.

	Groupe contrôle	Groupe 2 x 18,5 MBq ^{90}Y -RAFT- RGD	Groupe 2 x 18,5 MBq ^{90}Y -RAFT- RAD	Groupe 37 MBq ^{177}Lu -RAFT- RGD	Groupe 37 MBq ^{177}Lu -RAFT- RAD
Nombre d'échantillons	6	6	5	7	4
Créatinine sérique ($\mu\text{mol/L}$)	60 \pm 18,1	79,4 \pm 15,2 *	81,3 \pm 11,5 *	67,8 \pm 12	74,2 \pm 9,9

Tableau 46 : Résultats du dosage de la créatinine sérique en fin de protocole pour les séries 4 et 5 U-87 MG.

Les valeurs des taux de créatinine sérique sont supérieures dans les groupes traités par rapport au groupe contrôle. Ces différences sont significatives entre les groupes contrôle et traités avec du ^{90}Y -RAFT-RGD ou du ^{90}Y -RAFT-RAD (* : $p<0,05$ avec un test de Mann-Whitney).

Résultats

En revanche, il n'y pas de différence significative entre les groupes contrôle et ceux traités avec du ^{177}Lu -RAFT-RGD ou ^{177}Lu -RAFT-RAD.

Ces résultats confirment les résultats obtenus pour la 3^{ème} série U-87 MG : il y a une **dégradation de l'activité rénale dans les groupes traités avec les molécules de RAFT-RGD ou de RAFT-RAD marqués à l'yttrium-90** et cette dégradation a également lieu avec une administration fractionnée (2 fois 18,5 MBq).

Pour une même activité injectée (37 MBq), **un traitement au RAFT-RGD ou RAFT-RAD marqué avec du lutétium-177 ne présente pas de néphrotoxicité aigüe.**

D. Discussion générale

La radiothérapie interne vectorisée (RIV) est une modalité thérapeutique des cancers développée en médecine nucléaire. La RIV est un traitement systémique qui permet de cibler des lésions tumorales de petite taille et de leur délivrer une irradiation continue sur une période prolongée, à bas débit de dose.

L'intégrine $\alpha\beta3$ est l'une des intégrines les plus impliquées en oncogénèse. Elle est exprimée faiblement dans la plupart des tissus. En revanche, elle est fortement exprimée par les cellules endothéliales activées lors de l'angiogénèse et par les cellules de certaines tumeurs invasives dont les mélanomes, les gliomes, le cancer du sein, des ovaires et du pancréas. Ces caractéristiques font de l'intégrine $\alpha\beta3$ une excellente cible en thérapie anticancéreuse puisqu'elle permet d'atteindre à la fois les cellules des tumeurs invasives et la néo-angiogénèse tumorale. Les thérapies ciblées anti- $\alpha\beta3$ représentent un domaine de recherche très actif.

Nous disposons d'un vecteur original développé à Grenoble, ciblant l'intégrine $\alpha\beta3$, le **RAFT-RGD**. Ce vecteur est constitué de quatre peptides cyclo-RGD (spécifiques de l'intégrine $\alpha\beta3$) fixés sur un groupe porteur RAFT (« Regioselectively Addressable Functionalized Template »). Le RAFT-RGD a un faible poids moléculaire d'environ 5 kDa. De nombreuses études précliniques montrent que le RAFT-RGD cible sélectivement l'intégrine $\alpha\beta3$ *in vitro* et *in vivo*, qu'il pénètre rapidement dans les cellules par endocytose et permet la détection *in vivo* par imagerie nucléaire ou par fluorescence de tumeurs exprimant $\alpha\beta3$. Le RAFT-RGD présente des capacités supérieures au cRGD (molécule de référence dans les recherches sur les peptides RGD) avec une avidité supérieure pour l'intégrine $\alpha\beta3$ et une meilleure captation tumorale grâce à son internalisation cellulaire (Sancey, Mol Ther 2009). Ces caractéristiques font du RAFT-RGD un excellent vecteur potentiel pour cibler les tumeurs exprimant $\alpha\beta3$ et y délivrer des traitements, que ce soient des molécules de chimiothérapie ou des radionucléides de thérapie. Une récente étude confirme d'ailleurs ce potentiel lorsqu'un peptide pro-apoptotique est fixé sur le RAFT-RGD (Dufort, J Drug Target 2011).

L'objectif de ce travail de thèse est de **tester le potentiel thérapeutique du RAFT-RGD couplé à un émetteur β^-** sur des tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\nu\beta3$.

Nous avons radiomarqué successivement le RAFT-RGD avec deux radionucléides, tous deux émetteurs β^- , l'yttrium-90 et le lutétium-177.

L'**yttrium-90** (Y-90) est un émetteur β^- pur très énergétique qui émet des électrons avec un parcours moyen de 3,6 mm et un parcours maximal assez long de 11 mm dans l'eau ou les tissus mous. L'Y-90 a une demi-vie de 64,1 heures (2,67 jours).

Le **lutétium-177** (Lu-177) est un émetteur mixte β^-/γ (le β^- est moyennement énergétique). Son rayonnement β^- a un parcours moyen infra millimétrique et maximal très court de 1,8 mm dans l'eau ou les tissus mous. Le Lu-177 a une demi-vie de 161 heures (6,61 jours). L'intérêt du Lu-177 réside en outre dans sa double émission β^- et γ qui permet son utilisation en thérapie et de faire de l'imagerie.

1. Choix des lignées cellulaires

Pour ces études, nous avons besoin d'au moins une lignée de cellules tumorales exprimant l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ et d'une lignée ne l'exprimant pas.

Après consultation des données de la presse scientifique, nous avons initialement choisi la lignée **U-87 MG** (glioblastome humain) comme lignée exprimant l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ et les cellules **MCF-7** (adénocarcinome mammaire humain) comme lignée négative pour l'expression de l'intégrine $\alpha\nu\beta3$. Nous avons également choisi comme deuxième lignée positive pour l'expression de l'intégrine $\alpha\nu\beta3$, les cellules **TS/A-pc** (carcinome mammaire murin, utilisé comme modèle $\alpha\nu\beta3$ positif par L. Sancey au cours de sa thèse au sein du laboratoire).

Les lignées U-87 MG et MCF-7 proviennent d'une banque de cellules. La lignée TS/A-pc n'étant pas disponible à la vente, elle nous a été fournie par une autre équipe.

2. Caractérisation des modèles cellulaires utilisés

Les lignées cellulaires retenues ont ensuite été caractérisées afin de vérifier leur statut pour l'expression de l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ grâce aux techniques de western blot et de cytométrie en flux.

Il est apparu que les lignées tumorales **U-87 MG et MCF-7** sont bien respectivement **très positive et négative pour l'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$** , conformément à ce qui est décrit dans la littérature.

En revanche, la lignée **TS/A-pc** est apparue comme n'exprimant que la sous-unité $\alpha\upsilon$ et donc **n'exprimant pas l'intégrine $\alpha\beta3$** . Ces cellules TS/A-pc nous ont été données alors qu'elles étaient déjà au 33^{ème} passage en culture, ce qui est très élevé. Il est donc tout à fait possible que ces cellules aient subi une dérive génétique et aient perdu l'expression de $\beta3$. Les cellules cancéreuses sont d'ailleurs plus susceptibles de conserver de nouvelles mutations que les cellules normales qui présentent encore toutes les défenses cellulaires. Cette lignée pouvait donc servir de **contrôle négatif pour l'expression d' $\alpha\beta3$** . Nous avons pris la précaution de réaliser les expériences à faible «nouveau passage» pour éviter une nouvelle dérive génétique.

Les analyses immunohistochimiques de coupes de tumeurs U-87 MG et TS/A-pc confirment également l'expression d' $\alpha\beta3$ par les cellules U-87 MG et son absence pour les cellules TS/A-pc.

3. Fixation du RAFT-RGD et du RAFT-RAD à l'intégrine $\alpha\beta3$

La très bonne avidité du RAFT-RGD pour l'intégrine $\alpha\beta3$ a été rapportée dans plusieurs études (Boturny, JACS 2004 et Sancey, Mol Ther 2009). Les études de captation effectuées par L. Sancey au cours de sa thèse avaient montré que le RAFT-RGD était capté par les cellules $\alpha\beta3+$ et que le RAFT-RAD était peu capté par l'ensemble des cellules $\alpha\beta3$ positives ou négatives. La forte captation du RAFT-RGD par des cellules $\alpha\beta3+$ a été également mise en évidence en fluorescence (Sancey, Mol Ther 2009).

La fixation des molécules de ^{90}Y -RAFT-RGD et de ^{90}Y -RAFT-RAD sur nos modèles a été vérifiée in vitro par une étude de cinétique de captation et ex vivo grâce à l'autoradiographie de coupes de tumeurs.

La cinétique de captation du RAFT-RGD a été étudiée sur les trois modèles cellulaires dont nous disposons. La cinétique de captation de la molécule contrôle non spécifique, le RAFT-RAD, a été étudiée sur seulement deux modèles cellulaires, un positif pour l'expression d' $\alpha\beta3$ (U-87 MG) et un négatif (MCF-7).

Toutes les lignées présentent une captation du ^{90}Y -RAFT-RGD qui augmente au cours du temps. Les cellules U-87 MG, $\alpha\text{v}\beta\text{3}^+$, présentent une captation supérieure aux deux autres lignées $\alpha\text{v}\beta\text{3}^-$, cependant cette différence n'est significative qu'avec les cellules MCF-7 après 2 heures d'incubation (les cellules U-87 MG ont alors capté 2,4 fois plus de ^{90}Y -RAFT-RGD que les cellules MCF-7).

La captation du RAFT-RGD par les deux lignées n'exprimant pas l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ peut s'expliquer par la fixation du RAFT-RGD sur d'autres intégrines : $\alpha\text{v}\beta\text{5}$, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ (Haubner, J Am Chem Soc 1996 ; Mas-Moruno, Anticancer Agents Med Chem 2010). Le ^{90}Y -RAFT-RAD, molécule de contrôle non spécifique de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, est peu capté au cours du temps par les deux lignées testées U-87 MG et MCF-7.

L'analyse des autoradiographies de coupes de tumeurs U-87 MG et TS/A-pc réalisées après injection de ^{90}Y -RAFT-RGD ou ^{90}Y -RAFT-RAD met en évidence une forte captation tumorale du ^{90}Y -RAFT-RGD par les cellules U-87 MG in vivo, supérieure à celle des cellules TS/A-pc. L'autoradiographie des coupes de tumeurs des deux lignées permet d'observer une captation tumorale supérieure du ^{90}Y -RAFT-RGD par rapport au ^{90}Y -RAFT-RAD et cette différence est nettement plus marquée dans le cas de tumeur exprimant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$.

Les informations recueillies lors de la caractérisation de l'expression de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ par les lignées cellulaires étudiées et des études de la fixation du ^{90}Y -RAFT-RGD sur les cellules de ces différentes lignées nous ont permis de valider les cellules **U-87 MG comme modèle cellulaire exprimant la cible $\alpha\text{v}\beta\text{3}$** et de valider les cellules **TS/A-pc et MCF-7 comme modèles cellulaires contrôles n'exprimant pas la cible $\alpha\text{v}\beta\text{3}$** .

4. Modèles tumoraux in vivo

In vivo, malgré plusieurs tentatives d'implantations sur différents modèles de souris Nude ainsi qu'une supplémentation en œstrogènes de l'eau de boisson des souris, la croissance des tumeurs MCF-7 a été beaucoup plus lente que ce qui était attendu. Les tumeurs n'atteignent pas un volume suffisant pour le traitement dans un délai raisonnable. **Ce modèle animal contrôle négatif pour l'expression d' $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ a donc dû être abandonné au profit du modèle TS/A-pc.** Les modèles U-87 MG et TS/A-pc quant à eux ont pu être obtenus avec des croissances tumorales suffisamment rapides pour notre étude, les volumes tumoraux

compatibles avec nos conditions de traitement étant obtenus en 1 à 3 semaines après l'implantation tumorale.

5. Effet dose du RAFT-RGD « froid » ou non radiomarqué

Comme indiqué dans le chapitre concernant les thérapies ciblées anti- $\alpha v\beta 3$ et les peptides RGD, le Cilengitide qui est le peptide RGD le plus avancé actuellement en recherche clinique a démontré dans plusieurs études précliniques sa capacité à réduire la croissance tumorale in vivo (Mitjans, Int J Cancer 2000 ; Buerkle, Br J Cancer 2002). Il était donc important de tester l'effet thérapeutique du RAFT-RGD non radiomarqué sur la croissance tumorale afin de ne pas introduire de biais dans nos études.

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet dose du RAFT-RGD « froid » indiquent une **absence d'efficacité thérapeutique du RAFT-RGD seul** lorsqu'il est injecté en quantité correspondant à nos conditions expérimentales de traitement. Cette absence d'effet sur la croissance tumorale est toujours observée même avec une quantité injectée augmentée jusqu'à trente fois par rapport à nos conditions expérimentales. Ces résultats indiquent donc que les effets thérapeutiques du RAFT-RGD radiomarqué avec un émetteur β^- sur la croissance tumorale ne sont pas dus à un effet de la molécule de RAFT-RGD elle-même, dans nos conditions expérimentales, mais bien de son association avec un émetteur β^- .

Ces résultats ne sont pas en contradiction avec ceux obtenus dans les études précliniques du Cilengitide® car les quantités injectées dans les études démontrant son efficacité thérapeutique sont nettement plus importantes que dans nos conditions expérimentales. Il s'agit par exemple d'injections intrapéritonéales toutes les 12 heures pendant les 15 jours suivant l'implantation tumorale de 750 μg de Cilengitide pour une souris de 25 grammes ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Buerkle, Br J Cancer 2002) alors que nous avons injecté au maximum 300 μg de RAFT-RGD par souris, une seule fois.

D'autre part, il a été démontré dans une autre étude préclinique qu'une très faible concentration plasmatique stable de l'ordre de 2 nM de Cilengitide augmentait au contraire la croissance tumorale (Reynolds, Nat Med 2009). Il est important de préciser qu'au cours de l'étude de l'effet dose du RAFT-RGD « froid », l'échelle de concentration plasmatique du RAFT-RGD juste après l'injection est située entre 390 nM et 39 μM (le DOTA-RAFT-RGD a

une masse molaire de 4265 g.mol⁻¹ et le volume sanguin total d'une souris de 25 grammes est d'environ 1,8 mL).

Si l'on se base sur les études concernant le Cilengitide, les quantités de RAFT-RGD injectées au cours de nos travaux sont donc inférieures aux quantités potentiellement thérapeutiques et supérieures aux quantités augmentant la croissance tumorale.

6. Biodistribution du ⁹⁰Y-RAFT-RGD

Des études de biodistribution du RAFT-RGD (sans pré-injection de gélofusine® 4%) ont été effectuées précédemment dans le laboratoire par L. Sancey. Nous disposons ainsi des valeurs de biodistribution du RAFT-RGD marqué au technétium-99m, à l'iode-125 et à l'indium-111 ainsi que celles du RAFT-RAD marqué au technétium-99m et à l'iode-125.

La seule différence entre les molécules de ¹¹¹In-RAFT-RGD et de ⁹⁰Y-RAFT-RGD est la présence d'un yttrium-90 à la place d'un atome d'indium-111 (puisque le marquage à l'indium-111 se fait via un groupement DOTA, comme pour l'yttrium-90 ou le lutétium-111). Il est important de rappeler que la pré-injection de gélofusine® 4% dans notre étude n'est pas sensée modifier la captation tumorale, mais juste diminuer de moitié la captation rénale (Briat, Cancer science 2012).

Bien que nous disposions d'un important panel de biodistributions de RAFT-RGD marqués avec plusieurs radionucléides, il était nécessaire d'étudier également la biodistribution du ⁹⁰Y-RAFT-RGD, d'une part car la simple présence d'un radionucléide plutôt qu'un autre peut induire des changements dans la biodistribution et d'autre part car nous n'utilisons pas les mêmes modèles tumoraux.

Nous avons donc réalisé une étude de biodistribution du ⁹⁰Y-RAFT-RGD sur des souris Swiss Nude portant des tumeurs U-87 MG exprimant fortement l'intégrine $\alpha v \beta 3$.

L'étude de biodistribution du ⁹⁰Y-RAFT-RGD confirme qu'il **atteint bien sa cible in vivo**, avec une **importante captation tumorale de 9% de la DI/g à 1h et 4h post-injection**, laquelle décroît à 2,6% de la DI/g à 24h et à 1,8% de la DI/g à 48h.

En comparaison, les études de biodistribution du ¹¹¹In-RAFT-RGD indiquaient une captation tumorale de 1,8% de la DI/g à 1h qui descendait à 0,6% de la DI/g à partir de 4h et jusqu'à 48h après l'injection. On observe donc une différence de captation tumorale d'un facteur 5 à 1h post-injection en faveur du ⁹⁰Y-RAFT-RGD par rapport au ¹¹¹In-RAFT-RGD. Cette

différence de captation peut être due en partie à l'utilisation d'yttrium-90 à la place d'indium-111, mais il paraît plus probable qu'elle soit principalement causée par les différences intrinsèques entre les modèles tumoraux utilisés : le mélanome murin B16F0 pour la biodistribution du ^{111}In -RAFT-RGD versus le glioblastome humain U-87 MG pour le ^{90}Y -RAFT-RGD et à leurs différents niveaux d'expression de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$.

La captation rénale du ^{90}Y -RAFT-RGD est de 14% de la DI/g à 1h et 13,3% de la DI/g à 4h, puis se stabilise autour de 5,8% de la DI/g à 24 et 48h. La captation rénale du ^{111}In -RAFT-RGD était de 28,1% à 1h, 44,8% à 4h, 58,9% à 24h et 35,8% de la DI/g à 48h. Dans notre étude avec le ^{90}Y -RAFT-RGD, la captation rénale est donc bien diminuée de moitié à 1h par rapport à celle du ^{111}In -RAFT-RGD et cette captation rénale continue de descendre pour finir par être plus de 6 fois inférieure à celle observée à 48h pour le ^{111}In -RAFT-RGD. La captation rénale du ^{90}Y -RAFT-RGD est inférieure aux captations rénales du RAFT-RGD marqués avec d'autres radionucléides injectés sans gélofusine® 4%, il semblerait donc que l'effet de la gélofusine® 4% soit bien celui escompté.

Les rapports d'activité entre le rein et la tumeur sont inférieurs à 2 à 1h et 4h post-injection laissant espérer une faible néphrotoxicité du ^{90}Y -RAFT-RGD. La captation tumorale diminue cependant plus vite que la captation rénale puisque ces rapports augmentent légèrement à 24h et 48h post-injection.

Comme pour le ^{111}In -RAFT-RGD, la clairance sanguine du ^{90}Y -RAFT-RGD est rapide et son élimination se fait principalement par la voie rénale et en moindre mesure par la voie hépatique.

Le rapport d'activité du ^{90}Y -RAFT-RGD entre la tumeur et le muscle controlatéral est supérieur à 8 à 1h post-injection et supérieur à 11 de 4h à 48h post-injection. Ces rapports toujours largement en faveur d'une captation tumorale, sont le reflet d'une bonne capacité de ciblage tumoral du ^{90}Y -RAFT-RGD.

Une autre équipe a évalué l'effet thérapeutique d'un dimère de cyclo-RGD marqué à l'yttrium-90, le ^{90}Y -cRGD₂, sur un modèle de souris Nude porteuse de xénogreffes NIH:OVCA-3 (cancer humain ovarien, $\alpha\text{v}\beta 3+$) (Janssen, Cancer Research 2002). La captation tumorale du ^{111}In -cRGD₂ était de 7,5 % de la DI/g à 2h post-injection, ce qui est du même ordre de grandeur que ce que nous obtenons avec le ^{90}Y -RAFT-RGD. Dans cette étude, le temps de doublement du volume tumoral augmente significativement dans le groupe traité

avec 37 MBq de ^{90}Y -cRGD₂ (le temps de doublement est multiplié par 1,6 dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle) (Figure 27, page 73).

Une autre équipe a publié les résultats de leurs études sur l'effet d'un traitement au ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK) sur un modèle de souris Nude porteuses de tumeurs SKOV-3 (cancer humain des ovaires, $\alpha\beta3+$) (Yoshimoto, Int J Cancer 2008). Les résultats de biodistribution obtenus par cette équipe indiquaient une captation tumorale du ^{90}Y -cRGD de 2,5% de la DI/g à son maximum à 1h post-injection (soit 3,6 fois inférieure à celle du ^{90}Y -RAFT-RGD). Le traitement avec 3 fois 11,1 MBq de ^{90}Y -RGD était efficace puisqu'un ralentissement de la croissance tumorale était observé (environ trois semaines après le début du traitement, le volume tumoral moyen du groupe traité était multiplié par 7,2 alors que celui du groupe contrôle était multiplié par 13,6) (Figure 30, page 76).

Les résultats obtenus par ces deux équipes en matière de biodistribution de leurs molécules et d'efficacité de leurs traitements nous confirment que les résultats de biodistribution du ^{90}Y -RAFT-RGD sont très encourageants pour la poursuite des études sur l'effet du traitement au ^{90}Y -RAFT-RGD.

7. Imagerie au ^{177}Lu -RAFT-RGD

Hormis le faible parcours de son rayonnement β^- , l'avantage de l'utilisation du lutétium-177 par rapport à l'yttrium-90 réside dans sa double émission β^- et γ qui permet son utilisation en imagerie et en thérapie. Nous avons donc profité de l'émission γ du Lu-177 pour obtenir des images corps entier de souris porteuses de tumeurs U-87 MG après injection de 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD ou ^{177}Lu -RAFT-RAD par tomographie par émission monophotonique couplée à un tomodensitomètre X (TEMP-TDM) (Bioscan NanoSPECT/CT®).

Les images obtenues mettent clairement en évidence une captation précoce des radiopharmaceutiques dans les organes d'élimination (reins et vessie) ainsi que dans la tumeur pour le ^{177}Lu -RAFT-RGD. Le ^{177}Lu -RAFT-RGD s'accumule dans la tumeur dès la première heure post-injection contrairement au peptide contrôle, le ^{177}Lu -RAFT-RAD, qui lui n'est jamais capté de façon significative par la tumeur.

L'absence de captation non spécifique du ^{177}Lu -RAFT-RGD par les autres tissus est bien reflétée par une absence de signal.

Ces images nous informent également que le ^{177}Lu -RAFT-RGD est encore présent en très petite quantité dans la tumeur 6 jours après l'injection (Figure 67, page 141), ce qui est le

signe d'une longue rétention tumorale du ^{177}Lu -RAFT-RGD qui laisse espérer un bon potentiel thérapeutique.

La quantification de l'activité observée sur les images permet de calculer la biodistribution des radiopharmaceutiques dans les organes d'intérêt et de comparer l'activité retenue dans la tumeur par rapport aux organes sains (Tableau 25, page 144).

Le rapport d'activité du ^{177}Lu -RAFT-RGD entre la tumeur et le muscle controlatéral est supérieur à 12 à 4h post-injection et d'environ 10 jusqu'à 48h post-injection. Ce rapport reflète la bonne capacité de ciblage tumoral du ^{177}Lu -RAFT-RGD.

L'activité captée par le rein est inférieure à deux fois celle de la tumeur jusqu'à 24h après l'injection, ce qui laisse espérer une faible néphrotoxicité du traitement au ^{177}Lu -RAFT-RGD.

8. Efficacité du traitement au ^{90}Y -RAFT-RGD

Les tumeurs poussent de manière hétérogène sur les souris d'une même série, ce qui nous amène à travailler avec des groupes de souris aux volumes tumoraux très variables : les moyennes des volumes présentent de grands écart-types. Cela diminue la puissance statistique lors de la comparaison de ces moyennes après traitement, réduisant ainsi la probabilité de mettre en évidence une différence entre les groupes même si elle existe vraiment. Cela explique pourquoi certaines différences ne sont pas statistiquement significatives alors que la différence entre les groupes semble nette. La prise en compte de plusieurs paramètres (calculés à partir du suivi du volume tumoral) pour mesurer les différences de croissance tumorale entre les groupes (évolution des volumes moyens des tumeurs, évolution de la taille des tumeurs par rapport au jour du traitement, temps de doublement tumoral, temps de survie moyen avant point limite après traitement) permet de diminuer ce manque de puissance statistique. Dans les publications scientifiques concernant l'effet thérapeutique de nouveaux traitements anti-cancer, c'est le plus souvent le temps de doublement du volume tumoral qui est pris en compte pour mesurer l'effet d'un traitement.

L'activité injectée (de 3,7 à 7,4 MBq) lors des premières séries de traitement (séries 1 et 2 U-87 MG et série 1 et 2 TS/A-pc) avait été déterminée par extrapolation de l'activité habituellement injectée avec ce type de vecteur en expérimentation humaine (Kaltsas, Endocr Relat Cancer 2005). D'après les résultats obtenus lors de ces séries de traitement, il s'est

avéré que l' **^{90}Y -RAFT-RGD ne présente aucune efficacité thérapeutique lorsqu'il est injecté avec une activité de 3,7 MBq.**

Plusieurs auteurs précédemment cités et qui ont conduit des expérimentations similaires avec d'autres vecteurs incluant un ou plusieurs motifs cRGD ont obtenu des différences significatives entre les groupes traités et les groupes contrôles (Janssen, Cancer Research 2002 ; Yoshimoto, Int J Cancer 2008). Ces auteurs avaient testé des activités beaucoup plus importantes (37 MBq, activité décrite comme l'activité maximale tolérée pour M.L. Janssen et de 11,1 à 33,3 MBq pour M. Yoshimoto).

C'est pour cette raison que nous avons décidé de tester l'effet d'une injection de 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD dans la série 2 U-87 MG. Ce choix s'est avéré judicieux puisque nous avons pu mettre en évidence un ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD par rapport aux autres groupes. L'effectif dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD n'était certainement pas assez important (n=5) puisque certains paramètres calculés ne sont pas significativement différents entre les groupes ou à la limite de la significativité, avec par exemple un $p=0,0502$ avec un test de Mann-Whitney obtenu lors de la comparaison des temps de doublements du volume tumoral entre le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et le groupe contrôle. Néanmoins, plusieurs différences significatives calculées sur d'autres paramètres nous permettent d'affirmer que l'on constate bien **un ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD** (comparaison de l'évolution relative de la taille des tumeurs par rapport au jour du traitement et comparaison des temps de survie avant point limite).

De plus, cette série de traitement nous apprend que **l'efficacité du traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD est corrélée à la taille des tumeurs le jour du traitement**. Cela semble logique puisque le rayonnement β^- de l'yttrium-90 a un parcours moyen de 3,6 mm dans les tissus mous et un parcours maximal de 11 mm : plus les tumeurs sont grosses et plus le rayonnement émis par le ^{90}Y -RAFT-RGD capté par les cellules tumorales a des chances de provoquer des lésions à l'intérieur de la tumeur et non autour.

Cette série 2 U-87 MG a été décisive pour la suite des séries de traitement puisque nous avons décidé de traiter de plus grosses tumeurs (jusque là les tumeurs avaient un volume moyen d'environ 170 mm³ le jour du traitement) avec une plus grande activité injectée (37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD au lieu de 3,7).

Ainsi, au cours de la série 3 U-87 MG, des tumeurs plus volumineuses que précédemment, (environ 800 mm³), ont été traitées avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD ou avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD, le contrôle non spécifique de la cible.

Les volumes tumoraux étant supérieurs par rapport aux séries précédentes, la limite de 1500 mm³ fixée en accord avec le comité d'éthique est plus rapidement atteinte (par exemple, le lendemain du traitement pour une des souris du groupe contrôle), ce qui nous empêche de disposer de valeurs moyennes pour effectuer les comparaisons entre les groupes.

Néanmoins, la comparaison des temps de doublement des volumes tumoraux des différents groupes et des temps de survie moyens nous confirme les résultats de la série 2 U-87 MG, à savoir que **l'injection de 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD permet de ralentir de manière significative la croissance de tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$** . En effet, **le temps de doublement du volume tumoral dans le groupe traité est multiplié par 2,4 par rapport au groupe contrôle non traité** (différence significative, p=0,0041) et le temps de survie moyen avant point limite est presque multiplié par 2.

Par ailleurs, il n'y a pas de différences significatives entre les groupes contrôles non traité et non spécifique (traité avec 37 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RAD), ce qui nous permet d'affirmer que **le potentiel thérapeutique du ⁹⁰Y-RAFT-RGD observé dans ces conditions dépend de la présence de la séquence RGD ciblant l'intégrine $\alpha\beta3$** .

Nous avons ensuite eu l'occasion de tester l'efficacité du traitement au ⁹⁰Y-RAFT-RGD sur des tumeurs n'exprimant pas la cible au niveau cellulaire. La série 3 TS/A-pc ($\alpha\beta3^-$) s'est déroulée à peu près dans les mêmes conditions que la série 3 U-87 MG ($\alpha\beta3^+$). A la seule différence que l'activité disponible à la fin du radiomarquage était légèrement inférieure à ce qui était obtenu habituellement ; plutôt que de diminuer le nombre de souris par groupe et de risquer de perdre de la puissance statistique, nous avons préféré traiter le même nombre de souris que dans la série 3 U-87 MG (7 dans le groupe traité au ⁹⁰Y-RAFT-RGD, 7 dans le groupe traité au ⁹⁰Y-RAFT-RAD et 6 dans le groupe contrôle non traité) avec une activité de ⁹⁰Y-RAFT-RGD légèrement inférieure, 30 MBq au lieu de 37 MBq en moyenne par souris (800 μ Ci au lieu de 1000 μ Ci).

Les résultats obtenus au cours de cette série 3 TS/A-pc montrent qu'il n'y a aucune différence entre les différents groupes pour aucun des paramètres calculés. L'injection de 30 MBq de ⁹⁰Y-RAFT-RGD ne permet pas de ralentir de manière significative la croissance de tumeurs n'exprimant pas l'intégrine $\alpha\beta3$. **L'efficacité thérapeutique du ⁹⁰Y-RAFT-RGD est donc**

dépendante de la présence au niveau cellulaire de la cible du RAFT-RGD, l'intégrine $\alpha\beta3$.

Une fois le potentiel thérapeutique du ^{90}Y -RAFT-RGD sur des tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ mis en évidence, nous avons souhaité tester l'effet d'un fractionnement de ce traitement. La série 4 U-87 MG nous a ainsi permis de tester l'effet de deux injections de 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD à trois jours d'intervalle. **Le temps de doublement du volume tumoral dans le groupe traité est multiplié par 2,4 (comme pour le traitement non fractionné) par rapport au groupe contrôle non traité** (différence significative, $p=0,0003$) et le temps de survie moyen avant point limite est multiplié par 3 (contre 2 pour le traitement non fractionné). **Les résultats obtenus au cours de cette série 4 U-87 MG ne permettent pas de mettre en évidence une augmentation du potentiel thérapeutique du ^{90}Y -RAFT-RGD grâce au fractionnement du traitement dans nos conditions expérimentales.**

Si le temps de survie moyen avant point limite permet de juger de l'efficacité du traitement, il dépend également de la taille des tumeurs au début du traitement, or pour cette série 4, les tumeurs étaient légèrement moins volumineuses que pour la série 3 ($548 \pm 239 \text{ mm}^3$ pour la série 4 contre $798 \pm 243 \text{ mm}^3$ pour la série 3), il est donc normal que les tumeurs mettent plus de temps à atteindre le volume limite dans la série 4 que dans la série 3.

Il est très difficile de traiter toutes les séries lorsque les tumeurs ont le même volume car les tumeurs ne poussent pas de la même manière entre les séries malgré certaines précautions (comme un niveau de passage des cellules en culture identique le jour de l'implantation tumorale ou le fait d'utiliser des souris du même âge pour chaque série) et de plus, pour des raisons logistiques, l'yttrium-90 doit être commandé la semaine précédent le traitement ce qui induit une certaine marge d'erreur sur l'approximation du volume tumoral le jour du traitement.

Il convient de remarquer que nous obtenons une différence non significative (limite avec un $p=0,064$) entre les groupes traités avec 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD lors de la comparaison des temps de survie moyens entre ces groupes. Cette absence de significativité ne remet cependant pas en cause la nécessité de la présence de la séquence RGD pour l'efficacité du traitement avec le ^{90}Y -RAFT-RGD. En effet, d'une part, c'est l'unique fois où une absence de différence significative entre les groupes traités avec du ^{90}Y -RAFT-RGD ou du ^{90}Y -RAFT-RAD est observée (dans les conditions où l'efficacité du traitement est démontrée). D'autre part, l'absence de

significativité n'est pas nette puisque le p calculé est proche de la limite, on peut donc penser qu'il s'agit d'un manque de puissance statistique. On peut également mettre en avant le fait qu'il n'y a pas non plus de différence significative entre le groupe traité avec 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD et le groupe contrôle non traité (avec un $p=0,088$). Et pour finir, cette absence de différence est observée sur le temps de survie moyen, paramètre moins puissant que le temps de doublement du volume tumoral où la différence entre ces groupes est nette avec un $p=0,025$. Par contre, on ne peut pas mettre en cause une différence de volumes tumoraux entre ces groupes le jour du traitement puisqu'ils étaient de $518 \pm 247 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité au ^{90}Y -RAFT-RGD et de $498 \pm 207 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité au ^{90}Y -RAFT-RAD.

9. Efficacité du traitement au ^{177}Lu -RAFT-RGD

Pour la suite de ces études, nous avons remplacé l'yttrium-90 par du lutétium-177 dont l'utilisation présente des avantages pour lesquels il est de plus en plus utilisé (De Jong, J Nucl Med 2004 ; Kam, EJNM 2012):

- le faible parcours de son rayonnement β^- (parcours moyen inframillimétrique) limite la toxicité pour les tissus sains autour de la lésion tumorale (en cas de rétention spécifique et ciblée de son vecteur), mais également la toxicité liée à la captation non spécifique du vecteur dans les organes sains ou à l'activité circulante associée.
- ses émissions γ permettent de réaliser une imagerie concomitante du traitement, d'en connaître la biodistribution et de réaliser des études dosimétriques spécifiques.

Au cours de la série 5 U-87 MG, nous avons testé l'effet d'un traitement avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD ou 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RAD sur des souris portant des tumeurs exprimant la cible $\alpha v \beta 3$. Ce traitement est efficace puisque **le temps de doublement du volume tumoral dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD est multiplié par 1,44 par rapport au groupe contrôle non traité** (différence significative, $p=0,0017$). D'autre part il n'y a pas de différence significative entre les groupes contrôles non spécifique (traité avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RAD) et non traité. Ce qui prouve une fois de plus que l'efficacité thérapeutique du RAFT-RGD marqué avec un émetteur β^- est dépendante de la présence de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ au niveau cellulaire.

Le jour du traitement, les tumeurs avaient un volume d'environ 170 mm^3 ($169 \pm 75 \text{ mm}^3$), ce qui est plus petit que pour les séries 3 et 4 U-87 MG traitées au ^{90}Y -RAFT-RGD où le volume moyen était d'environ 670 mm^3 ($798 \pm 243 \text{ mm}^3$ pour la série 3 et $548 \pm 239 \text{ mm}^3$ pour la série 4). Pour des raisons logistiques nous ne disposions pas d'assez de lutétium-177 pour tester l'efficacité de ce traitement sur des groupes de tumeurs de différentes tailles (petites et grandes). Nous avons volontairement choisi de traiter de petites tumeurs avec le ^{177}Lu -RAFT-RGD car il est reconnu que la RIV au lutétium-177 est plus efficace sur de petites tumeurs vu le faible parcours de son rayonnement β^- . D'après une étude qui présente un modèle mathématique permettant d'évaluer la curabilité de tumeurs de différentes tailles avec différents radionucléides, il apparaît que le lutétium-177 a une action optimale sur les tumeurs de 2 mm de diamètre alors que l'yttrium-90 a une action optimale sur des tumeurs de 34 mm de diamètre (*O'Donoghue, J Nucl Med 1995*).

10. Comparaison des traitements au ^{90}Y -RAFT-RGD et au ^{177}Lu -RAFT-RGD

En comparaison, le traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD sur des tumeurs d'un volume similaire ($145 \pm 93 \text{ mm}^3$) était moins efficace (série 2 U-87 MG) que le traitement avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD, puisque le temps de doublement du volume tumoral dans le groupe traité était égal à 1,2 fois celui du groupe contrôle et la différence entre ces deux groupes n'était pas statistiquement significative ($p=0,07$ avec un test de Mann-Whitney, valeurs obtenues en ne prenant en compte que les 4 plus petites tumeurs de chaque groupe).

Sur des petites tumeurs, un traitement au ^{177}Lu -RAFT-RGD est donc plus efficace qu'un traitement au ^{90}Y -RAFT-RGD.

De plus, si l'activité injectée dans les deux cas est de 37 MBq, il aurait en fait fallu injecter une plus forte activité de ^{177}Lu -RAFT-RGD pour obtenir la même dose absorbée par la tumeur. En effet, le Lu-177 est moins énergétique que l'Y-90 et cette différence n'est pas suffisamment compensée par leur différence de demi-vie car la période biologique est également à considérer. A cause de sa plus longue demi-vie, le Lu-177 met plus de temps à délivrer la même dose que l'Y-90. Par exemple, dans une étude préclinique sur l'effet d'analogues de la somatostatine radiomarqués avec du Lu-177 ou de l'Y-90 sur un modèle de tumeurs pancréatiques de rat (*De Jong, J Nucl Med 2005*), le protocole prévoit des injections de 2 fois 111 MBq de ^{90}Y -DOTATATE ou 2 fois 278 MBq de ^{177}Lu -DOTATATE (activités injectées déterminées après études dosimétriques) pour obtenir une même dose absorbée par

la tumeur de 60 Gy, soit une activité de ^{177}Lu -DOTATATE 2,5 fois supérieure à celle du ^{90}Y -DOTATATE.

Nos travaux nous apprennent donc qu'un traitement avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD permet de ralentir la croissance tumorale de petites tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ et que ce traitement est plus efficace qu'une injection de 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD sur les petites tumeurs.

La comparaison des caractéristiques physiques de l'yttrium-90 et du lutétium-177 montre qu'ils ont chacun des avantages pour le traitement tumoral. La demi-vie plus courte de l'Y-90 par rapport à celle du Lu-177 permet de délivrer le traitement avec un débit de dose plus important donc plus destructeur. Les particules émises par l'yttrium-90 sont plus énergétiques que celles émises par le lutétium-177. Ainsi, pour une même activité délivrée au sein de la tumeur, chaque molécule peptidique radiomarquée avec de l'Y-90 émet un rayonnement ionisant β^- plus énergétique que la même molécule radiomarquée avec du Lu-177. Le parcours des particules émises par l'Y-90 est également plus long que celui des particules émises par le Lu-177 (parcours maximal de 11 mm vs 1,8 mm) et permet de bénéficier d'un effet de « feux croisés » très important, ce qui est avantageux pour le traitement des grosses tumeurs et des tumeurs avec une distribution hétérogène des récepteurs ciblés mais qui entraîne une exposition plus importante des tissus non spécifiques.

D'un autre côté, les particules émises par le lutétium-177 sont moins énergétiques et ont un parcours beaucoup plus court, ce qui permet une plus grande absorption de l'énergie émise dans les petites tumeurs. Les émissions γ du Lu-177 permettent la réalisation d'images scintigraphiques pour des études dosimétriques qui peuvent ainsi être réalisées avant ou pendant le traitement. La demi-vie plus longue du Lu-177 facilite son utilisation par rapport à l'Y-90 en matière de durée du transport et de délai d'utilisation. Le Lu-177 présente des caractéristiques avantageuses pour le traitement des petites tumeurs et des micrométastases.

L'absence d'émission γ de l'Y-90 peut être compensée par des méthodes indirectes pour la réalisation d'études dosimétriques comme le remplacement de l'Y-90 par de l'indium-111 ou de l'yttrium-86, émetteurs γ (Pauwels, J Nucl Med 2005). L'utilisation de l'yttrium-86 permet de garder une structure chimique totalement identique mais est limitée par la courte demi-vie de l'Y-86 (14,3 h). L'indium-111 avec sa demi-vie de 67 heures est plus adapté pour l'imagerie mais les molécules radiomarquées à l'In-111 ou à l'Y-90 ne sont pas strictement

identiques d'un point de vue chimique et leurs comportements biologiques différent légèrement.

Pour pallier l'absence d'émission γ de l' ^{90}Y -90, il est également possible d'imager l'isotope :

- en TEMP, par détection du rayonnement de freinage, aussi appelé Bremsstrahlung (produit lors de l'interaction des rayonnements β avec l'environnement) (Shen, J Nucl Med 1994 ; Kaltsas, Endocr Relat Cancer 2005)
- en TEP, par détection d'un positon émis au cours d'une transition accessoire très minoritaire (probabilité de $3,2 \cdot 10^{-5}$) de la désintégration de l' ^{90}Y -90 (Selwyn, Appl Radiat Isot 2007).

11. Toxicité des traitements

Les principales limites de la radio-peptide-thérapie se situent au niveau de la **toxicité médullaire** qui est une des conséquences du long parcours des rayonnements β^- dans les tissus et de la **toxicité rénale**, plus spécifique des peptides qui s'accumulent dans le rein comme le RAFT-RGD. L'état des fonctions hématologique et rénale était donc à évaluer pour juger de l'éventuelle dangerosité pour les tissus sains d'un traitement au RAFT-RDG radiomarqué avec un émetteur β^- .

La toxicité médullaire a été évaluée grâce au suivi des taux d'érythrocytes, de leucocytes et de thrombocytes au cours des différentes séries de traitement. Les séries U-87 MG et TS/A-pc diffèrent par leurs durées entre l'implantation tumorale et le sacrifice des souris. **Les séries U-87 MG durent 2 fois plus longtemps que les séries TS/A-pc** dans lesquelles les tumeurs poussent plus vite (29 ± 4 jours en moyenne pour les séries 2, 3, 4 et 5 U-87 MG versus $14,8 \pm 0,7$ jours pour les séries 1, 2 et 3 TS/A-pc).

D'après les résultats des analyses hématologiques, on constate que les **traitements avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{90}Y -RAFT-RAD présentent une toxicité médullaire précoce** reflétée par une importante leucopénie et une thrombopénie plus modérée. **Le fractionnement du traitement ou l'utilisation de lutétium-177 à la place d'yttrium-90 réduisent cette toxicité médullaire.**

La toxicité médullaire causée par le ^{90}Y -RAFT-RGD est identique à celle causée par le ^{90}Y -RAFT-RAD. Cette toxicité est donc causée par l'accumulation non spécifique et l'activité

sanguine circulante des molécules de RAFT-RGD ou RAFT-RAD radiomarqués avec de l' ^{90}Y et non pas par l'accumulation tumorale du ^{90}Y -RAFT-RGD.

Cette toxicité médullaire est principalement observée au niveau des leucocytes et des thrombocytes, ce qui est cohérent avec les effets attendus d'une irradiation au niveau de la moelle hématopoïétique. En effet, une irradiation à ce niveau se traduit par une pancytopénie : une thrombopénie et une neutropénie apparaissant dans les jours suivant l'irradiation et une anémie dans les semaines suivantes. L'absence d'anémie observée dans nos modèles est donc probablement due au délai insuffisant par rapport à son apparition.

Il est intéressant de noter que les souris non traitées des séries U-87 MG développent une hyperleucocytose très marquée au cours des différents protocoles, ainsi qu'une hyperplaquettose importante. Ces deux phénomènes sont certainement dus à la présence et la croissance des xénogreffes tumorales. Les souris Nude n'ont pas de thymus, donc pas de lymphocytes T, mais elles conservent tous les autres types des globules blancs, ce qui explique cette réaction immunitaire face à la présence et la croissance des xénogreffes. L'hyperplaquettose est quant à elle un phénomène accompagnant fréquemment diverses formes de cancer, l'une de ses causes possibles est la présence d'un phénomène inflammatoire péri-tumoral.

Les souris contrôles des séries TS/A-pc ne présentent pas d'hyperleucocytose ni d'hyperplaquettose. Il s'agit dans ce cas de tumeurs syngéniques, il est donc normal que la greffe de cellules tumorales n'entraîne pas de réaction immunitaire, ces cellules n'étant pas reconnues comme corps étranger par le système immunitaire des souris Balb/c Nude. La réaction inflammatoire péri-tumorale est également diminuée par l'absence de réaction immunitaire, ce qui explique probablement l'absence d'hyperplaquettose.

La toxicité rénale des traitements au ^{90}Y -RAFT-RGD/ ^{90}Y -RAFT-RAD ou au ^{177}Lu -RAFT-RGD/ ^{177}Lu -RAFT-RAD est évaluée grâce à la comparaison des taux de créatinine sérique entre les groupes traités et les groupes contrôles, l'augmentation du taux de créatinine sérique étant le reflet d'une insuffisance rénale.

Discussion

Les souris des groupes traités avec 37 MBq ou 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et 37 MBq ou 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD présentent une augmentation significative de leurs taux de créatinine sérique par rapport aux groupes contrôles.

En revanche, il n'y a pas de différences significatives entre les taux de créatinine sérique des groupes traités avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD ou ^{177}Lu -RAFT-RAD par rapport au groupe contrôle.

Ces résultats indiquent qu'il y a une **dégradation de l'activité rénale dans les groupes traités avec 37 MBq de RAFT-RGD ou de RAFT-RAD marqués à l'yttrium-90** et cette dégradation a **également lieu avec une administration fractionnée** (2 fois 18,5 MBq).

Pour une même activité injectée (37 MBq), **un traitement au RAFT-RGD ou RAFT-RAD marqué avec du lutétium-177 ne présente pas de toxicité rénale précoce.**

Cette différence de toxicité rénale entre ^{90}Y -RAFT-RGD et ^{177}Lu -RAFT-RGD peut être expliquée de deux manières.

D'une part, comme expliqué précédemment, 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD sont moins énergétiques que 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD et causent donc moins de dégâts.

D'autre part, cette différence peut être une des conséquences du faible parcours des particules émises par le Lu-177. En effet, la distribution des radiopeptides dans les reins ne se fait pas de façon uniforme, les peptides s'accumulent au niveau des cellules épithéliales du tube contourné proximal du cortex rénal. Le lutétium-177 piégé dans ces cellules lors de la captation rénale du ^{177}Lu -RAFT-RGD délivre son activité très localement et touche donc principalement les cellules du tube contourné proximal reconnues comme relativement radiorésistantes alors que l'yttrium-90 va pouvoir toucher à distance de son lieu de rétention les glomérules plus radiosensibles (De Jong, J Nucl Med 2004).

L'utilisation de gélofusine® 4% en pré-injection avant le traitement permet bien de diminuer de moitié la captation rénale, mais cela ne semble pas encore suffisant pour empêcher la toxicité rénale chez la souris d'un traitement avec 37 MBq ou 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD.

On peut cependant envisager que la différence de taille entre un rein humain et un rein de souris permettrait de diminuer cette toxicité rénale chez l'homme grâce à une diminution de la dose rénale absorbée et à l'éloignement physique des cellules du tube contourné proximal et des glomérules.

La toxicité rénale est le facteur limitant la dose de radiopeptides délivrable à la tumeur. Une dosimétrie rénale précise avant le traitement est nécessaire pour limiter au maximum cette néphrotoxicité. Les premières estimations de dosimétrie obtenues avec les valeurs obtenues de biodistribution du ^{90}Y -RAFT-RGD grâce au logiciel OLINDA (en annexe, page 220) indiquent une dose rénale absorbée correspondante pour un adulte mâle de 70 kg de **0,0263 mGy/MBq**.

En comparaison, la dose de Zévalin® (^{90}Y - ibritumomab tiuxetan) absorbée par les reins d'après l'étude qui a conduit à son acceptation par la FDA était de 0,22 mGy/MBq (Wiseman, J Nucl Med 2003). Des études dosimétriques plus poussées méritent d'être réalisées pour l'utilisation du ^{90}Y -RAFT-RGD ou du ^{177}Lu -RAFT-RAD. Mais il semblerait donc d'après les premières estimations que la toxicité rénale du ^{90}Y -RAFT-RGD extrapolée à l'homme ne soit pas limitante pour son utilisation en RIV.

D'après ces mêmes estimations, la dose absorbée par la moelle hématopoïétique extrapolée à l'homme d'après les valeurs obtenues de la biodistribution du ^{90}Y -RAFT-RGD serait de **0,00138 mGy/MBq à 0,00452 mGy/MBq** selon la méthode d'estimation utilisée (à partir des activités mesurées dans l'os ou à partir de l'activité sanguine). Dans les deux cas, ces valeurs sont largement inférieures à la valeur obtenue pour le Zévalin® qui est de 0,59 mGy/MBq (Wiseman, J Nucl Med 2003).

12. Comparaison de l'efficacité et de la toxicité des traitements au RAFT-RGD radiomarqué avec de l'Y-90 ou du Lu-177 avec celles d'autres peptides RGD couplés à des radionucléides de thérapie

La première étude parue sur le potentiel thérapeutique d'un peptide RGD couplé à un radionucléide de thérapie est l'étude de M. Janssen de l'équipe du Pr. O.C. Boerman (Janssen, Cancer Research 2002). Elle porte sur l'effet thérapeutique d'un dimère de cyclo-RGD marqué à l'yttrium-90, le ^{90}Y -cRGD₂, sur un modèle de souris Nude porteuse de xénogreffes NIH:OVCAR-3 (cancer humain ovarien, $\alpha\beta3+$). Comme mentionné précédemment, la captation tumorale du ^{111}In -cRGD₂ est du même ordre de grandeur que ce que nous obtenons avec le ^{90}Y -RAFT-RGD (7,5 % de la DI/g à 2h post-injection alors que le ^{90}Y -RAFT-RGD présente une captation tumorale de 9% de la DI/g à 1h et 4h post-injection).

Dans cette étude, le temps de doublement du volume tumoral augmente significativement de 1,6 fois dans le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -cRGD₂ par rapport au groupe contrôle. Le

temps de doublement du volume tumoral augmenté de 2,4 fois par rapport au groupe contrôle lors d'un traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD (soit 1,5 fois plus que le ^{90}Y -cRGD₂) et de 1,6 fois lors d'un traitement avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD laisse envisager que le ^{90}Y -RAFT-RGD présente un potentiel thérapeutique supérieur au ^{90}Y -cRGD₂. Cependant, les modèles tumoraux n'étant pas les mêmes et les tumeurs traitées dans les deux études n'ayant pas le même volume (de 27 à 150 mm³ dans l'étude de M. Janssen contre 800 mm³ en moyenne dans la nôtre), on ne peut pas mettre en évidence une différence d'efficacité entre les deux traitements.

Le traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -cRGD₂ ne présente pas de toxicité médullaire ou rénale dans les trois semaines qui suivent le traitement puisque cette étude ne révèle pas d'augmentation significative du niveau de créatinine sérique des souris traitées, ni de diminution significative du nombre de leurs cellules sanguines (Figure 26, page 73). Un traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -cRGD₂ apparaît donc moins toxique chez la souris qu'un traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD. La captation rénale du ^{111}In -cRGD₂, de 4,5% de la DI/g à 2h post-injection, est d'ailleurs bien inférieure aux valeurs mesurées pour le ^{90}Y -RAFT-RGD qui sont de 14% de la DI/g à 1h et 13,3% de la DI/g à 4h post-injection.

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'une autre étude menée par la même équipe et portant sur l'effet du fractionnement (5 fois 7,4 MBq) d'un traitement au ^{90}Y -cRGD₂ sur le modèle tumoral NIH:OVCAR-3 n'a pas mis en évidence de différence au niveau de la croissance tumorale entre le groupe recevant le traitement fractionné et le groupe traité avec 37 MBq en une fois (Janssen, Cancer Biother Radiopharm 2004). Comme nous avons pu le constater avec nos propres résultats sur l'efficacité d'un traitement fractionné, il est difficile de déterminer la modalité d'administration la plus efficace dès les études préliminaires de ce type de traitement.

La même équipe a également réalisé une étude sur l'effet thérapeutique d'un monomère de cyclo-RGD marqué au lutétium-177, ^{177}Lu -DOTA-E-c(RGDfK), sur un modèle de souris Nude porteuses de tumeurs intra-péritonéales NIH:OVCAR-3 (Dijkgraaf, Int J Cancer 2007). Un traitement avec 37 MBq de ^{177}Lu -DOTA-E-c(RGDfK) permet de rallonger la durée de survie moyenne avant point limite à 21 semaines contre 5 semaines pour le groupe contrôle, ralentissant ainsi la croissance tumorale de 4,2 fois (Figure 29, page 76). Ces résultats très impressionnants sont en partie dus au mode d'injection intra-péritonéale du traitement qui est associé à une très forte captation des tumeurs également intra-péritonéales (captation tumorale

du ^{111}In -DOTA-E-c(RGDfK) : $35,2 \pm 3,8$ % de la DI/g 2h post injection i.p. vs $0,98 \pm 0,26$ % DI/g 2h post injection i.v.).

La différence de modes d'injection entre ces travaux et les nôtres nous empêche de comparer l'efficacité des deux traitements. La toxicité du traitement n'a pas été évaluée dans cette étude.

L'équipe japonaise du Pr K. Kawai a également étudié le potentiel thérapeutique d'un peptide RGD couplé à un radionucléide de thérapie (Yoshimoto, Int J Cancer 2008). Cette étude teste l'effet d'un traitement au ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK) sur un modèle de souris Nude porteuses de tumeurs SKOV-3 (cancer humain des ovaires, $\alpha\beta3$ +). Les souris traitées 3 fois avec 11,1 MBq de ^{90}Y -RGD présentent une croissance tumorale ralentie d'un facteur 1,9 par rapport au groupe contrôle (Figure 30, page 76). C'est légèrement inférieur au ralentissement d'un facteur 2,4 que nous observons dans nos travaux pour une activité totale injectée similaire (37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD versus 33,3 MBq de ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)). Cependant, comme pour les études précédemment citées, **l'utilisation de modèles tumoraux différents empêche toute réelle conclusion sur les différences d'efficacité entre ces traitements et les nôtres.**

La dernière étude parue sur le potentiel thérapeutique des peptides RGD en RIV est celle d'une équipe chinoise qui a testé l'efficacité de traitements avec un dimère ou un tétramère de RGD radiomarqués à l' ^{90}Y -90 sur des tumeurs **U-87 MG** (^{90}Y -(3PRGD2) et ^{90}Y -RGD4) (Liu, Mol Pharm 2011). Les résultats de la biodistribution du ^{111}In -(3PRGD2) et du ^{111}In -RGD4 indiquent des captations tumorales (respectivement $6,13 \pm 0,82$ % de la DI/g et $6,43 \pm 1,6$ % de la DI/g 4h post-injections) légèrement inférieures à celle du ^{90}Y -RAFT-RGD avec le même modèle tumoral ($9,04 \pm 3,12$ % de la DI/g à 4h post-injection).

Dans cette étude, les résultats sur l'efficacité d'un traitement avec 37 MBq de ^{90}Y -RGD4 à 12 jours post-injection semblent à première vue très spectaculaires avec un volume tumoral dans le groupe traité inférieur de plus de 4 fois à celui du groupe contrôle non traité (avec des moyennes de 415 mm³ dans le groupe traité versus 1790 mm³ dans le groupe contrôle, valeurs observées à partir des figures), mais il apparaît finalement que cette diminution n'est pas due entièrement à la captation tumorale du ^{90}Y -RGD4 puisque le traitement contrôle non spécifique avec 37 MBq de ^{90}Y -RAD4 provoque également une diminution importante du volume tumoral dans ce groupe d'un peu plus de 2 fois par rapport au groupe contrôle (avec une moyenne de 870 mm³ dans le groupe traité avec le ^{90}Y -RAD4 versus 1790 mm³ dans le groupe contrôle) (Figure 28, page 75).

Discussion

L'efficacité thérapeutique de la molécule contrôle non spécifique (que nous n'observons d'ailleurs pas lors de nos contrôles avec le ^{90}Y -RAFT-RAD) peut s'expliquer ici par le volume tumoral faible d'environ 100 mm^3 au moment du traitement qui permet, grâce aux phénomènes de « feux croisés », une exposition aux rayonnements β^- provenant des tissus sains ayant capté le ^{90}Y -RAD4 non spécifiquement.

La toxicité médullaire des traitements est évaluée par le suivi de la numération des globules blancs. Après une période de leucopénie transitoire, les taux de leucocytes remontent à partir du 12^{ème} jour post-traitement pour atteindre une valeur normale 20 jours après le traitement. Ces indications nous permettent d'envisager que la toxicité médullaire observée dans le cadre de nos traitements au ^{90}Y -RAFT-RGD/ ^{177}Lu -RAFT-RGD pourrait n'être que transitoire puisque la survie moyenne des souris après traitement (tous traitements confondus) n'excède pas 15 jours dans nos conditions expérimentales. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que les groupes traités avec $2 \times 18,5 \text{ MBq}$ de ^{90}Y -RAFT-RGD ou 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD sont à la fois ceux qui présentent la baisse la moins importante de leurs taux de leucocytes et de plaquettes (par rapport au groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD) et ceux qui présentent la survie moyenne avant point limite la plus longue (14,1j et 15,4j versus 7,7j pour le groupe traité avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD).

Une autre équipe japonaise a récemment publié une étude sur l'utilisation en TEP d'une molécule de cyclam-**RAFT-RGD** couplée à du cuivre-64 (Cu-64) pour la visualisation et la quantification de l'expression de l'intégrine $\alpha\beta_3$ (Jin, Nucl Med Biol 2011). L'utilisation du Cu-64 laisse présager une utilisation future de cette molécule avec du cuivre-67 (émetteur mixte β^- et γ), radionucléide de thérapie ($T_{1/2}=61,9\text{h}$, $E_{\text{max}} \beta^-=0,39 \text{ MeV}$). L'un des modèles tumoraux utilisés dans cette étude est le glioblastome humain **U-87 MG**, il est donc intéressant de comparer les résultats de la biodistribution du ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-) $_4$ avec celle du ^{90}Y -RAFT-RGD. Cette équipe relève une captation tumorale équivalente à $3,46 \pm 0,45 \%$ de la DI/g 3h après l'injection de 740 kBq de ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-) $_4$. Ces résultats sont donc moins favorables que les nôtres puisque nous obtenons une captation tumorale équivalente à $9,04 \pm 3,12 \%$ de la DI/g à 4h post-injection de 370 kBq de ^{90}Y -RAFT-RGD. D'autre part, la captation rénale du ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-) $_4$ d'environ 20% de la DI/g à 3h post-injection, est supérieure à celle du ^{90}Y -RAFT-RGD (13,3 % de la DI/g à 4h post-injection) mais leur protocole expérimental ne prévoit pas de technique comme

la co-injection de lysine et d'arginine ou l'administration de substituts plasmatiques tels que la gélofusine pour réduire cette captation rénale.

Cette étude reflète bien l'intérêt de la communauté scientifique à développer des molécules ciblant l'intégrine $\alpha\beta3$ couplées à des radionucléides de thérapie utilisables en RIV.

13. Comparaison de l'efficacité des traitements au RAFT-RGD radiomarcqué avec de l'Y-90 ou du Lu-177 avec celles d'autres peptides utilisés en RIV

De nombreux autres analogues de peptides font l'objet d'études pour leur utilisation en RIV. Il s'agit des peptides analogues de la somatostatine, de la bombésine, du peptide intestinal vasoactif, de la gastrine, de la neurotensine et de l'exendine (Fani, Theranostics 2012).

Le peptide qui a été le plus étudié à ce jour est la somatostatine (SST) qui a une demi-vie plasmatique de 2 à 3 minutes. L'analogue de la SST, le $^{111}\text{In-DTPA}^0\text{-octreotide}$ ($^{111}\text{In-OctreoScan}$, $^{111}\text{In-pentetreotide}$) est le seul radiopeptide à avoir été approuvé par la FDA à ce jour (demi-vie biologique de 1,5 à 2h). Il est indiqué pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines (NETs), des cancers du sein et des cancers du poumon à petites cellules. Parmi les tumeurs neuroendocrines, les tumeurs gastroentéropancréatiques (GEP) sont celles qui ont la plus forte expression des récepteurs de la SST.

Les essais cliniques de radio-peptide-thérapie pour le traitement des tumeurs GEP avec des analogues de la somatostatine marqués soit à l'yttrium-90 ($^{90}\text{Y-DOTATOC}$, OctreoTher, $^{90}\text{Y-DOTA}^0\text{Tyr}^3\text{-ocreotide}$), soit au lutétium-177 ($^{177}\text{Lu-DOTATATE}$) attestent de l'efficacité des traitements avec jusqu'à 30% de réponses complètes et partielles chez les patients et de 23 à 81% de stabilisations de longues durées dans certaines études (Kaltsas, Endocr Relat Cancer 2005).

Il est intéressant de connaître les résultats précliniques obtenus avec les molécules de $^{90}\text{Y-DOTATOC}$ et $^{177}\text{Lu-DOTATATE}$. Une étude sur un modèle syngénique de rat porteur à la fois d'une petite ($0,5\text{ cm}^2$) et d'une grosse ($7-9\text{ cm}^2$) tumeur pancréatique CA20948 exprimant les récepteurs de la somatostatine (SSTR +) teste l'efficacité de ces deux molécules individuellement et de leur combinaison (De Jong, J Nucl Med 2005). Les rats sont sacrifiés lorsque leurs tumeurs atteignent une surface totale de 15 cm^2 ou au maximum 150 jours après le traitement. Les rats traités avec 370 MBq de $^{90}\text{Y-DOTATOC}$ ou 555 MBq de $^{177}\text{Lu-DOTATATE}$ (activités calculées après études dosimétriques pour une même dose absorbée

par la tumeur de 60 Gy) survivent plus longtemps que les rats contrôles non traités ou traités avec 370 MBq de ^{90}Y -DOTA, molécule contrôle non spécifique (75, 75, 34 et 42 jours de durée de survie moyenne respectivement). Les rats traités avec une combinaison de 185 MBq de ^{90}Y -DOTATOC et 278 MBq de ^{177}Lu -DOTATATE survivent encore plus longtemps, 130 jours en moyenne. Les rats recevant le traitement combiné survivent 3,8 fois plus longtemps que les rats contrôles et les rats recevant le **traitement au ^{90}Y -DOTATOC survivent 2,2 fois plus longtemps que les rats contrôles**. En comparaison le traitement avec 37,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD permettait de rallonger la durée de survie moyenne des souris traitées de **2 fois** par rapport aux souris contrôles.

Au cours de cette même étude, l'équipe a testé l'efficacité d'un traitement fractionné en 2 injections à 2 semaines d'intervalle. Les rats traités avec 2 fois 111 MBq de ^{90}Y -DOTATOC ou 2 fois 278 MBq de ^{177}Lu -DOTATATE ou 2 fois 56 MBq de ^{90}Y -DOTATOC et 2 fois 140 MBq de ^{177}Lu -DOTATATE survivent plus longtemps que les rats contrôles non traités (88, 96, 125 et 18 jours de durée de survie moyenne respectivement). Les rats recevant le traitement combiné fractionné survivent 6,9 fois plus longtemps que les rats contrôles et les rats recevant le traitement fractionné de ^{90}Y -DOTATOC survivent 4,9 fois plus longtemps que les rats contrôles. En comparaison le traitement avec 2 fois 18,5 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD permettait de rallonger la durée de survie moyenne des souris traitées de 3 fois par rapport aux souris contrôles.

Il est donc intéressant de constater que même si nos modèles sont très éloignés, les résultats que nous obtenons en termes de rallongement de la durée de survie moyenne avec les traitements au ^{90}Y -RAFT-RGD ne sont pas très différents de ceux obtenus en préclinique avec le ^{90}Y -DOTATOC.

14. Comparaison de l'efficacité et de la toxicité des traitements au RAFT-RGD radiomarké avec de l'Y-90 ou du Lu-177 avec celles d'un anticorps anti-intégrine $\alpha\beta 3$ utilisé en RIT au niveau préclinique

Plusieurs anticorps monoclonaux visent l'intégrine $\alpha\beta 3$. L'anticorps le plus avancé est l'**etaracizumab ou Abegrin (Vitaxin II, MEDI-522, MedImmune Inc.)**, version humanisée de l'anticorps monoclonal murin LM609 anti- $\alpha\beta 3$. Dans une étude préclinique sur un modèle de glioblastome humain U-87 MG implanté sur des souris Nude, une injection de 7,4

Discussion

MBq (200 μ Ci) d' ^{90}Y -Abegrin permet de réduire le volume tumoral de manière très efficace avec un rapport volume tumoral final sur volume tumoral initial de 0,69 quatorze jours après le traitement (Veeravagu, Clin Cancer Res 2008). L' ^{90}Y -Abegrin présente donc un très bon potentiel pour le traitement de tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$.

Les traitements au ^{90}Y -RAFT-RGD sont moins efficaces puisque nous ne constatons pas de réduction du volume tumoral, mais seulement un ralentissement de la croissance tumorale.

L'utilisation de l' ^{90}Y -Abegrin présente cependant l'inconvénient majeur de s'accumuler rapidement dans le foie et la rate de manière très importante (respectivement $24,81 \pm 1,31$ % de la DI/g et $14,06 \pm 1,79$ % de la DI/g, 4 h après l'injection) et prolongée, avec des activités mesurées 7 jours après injection qui restent très élevées ($7,99 \pm 1,26$ % de la DI/g dans le foie et $6,30$ % de la DI/g dans la rate, 168 h après l'injection). Les toxicités hépatique et splénique ne sont pas évaluées dans cette étude, mais ces fortes accumulations peuvent être gênantes pour un passage en clinique.

E. Conclusions et perspectives

Le but de ce travail de thèse était de tester le potentiel thérapeutique du RAFT-RGD lorsqu'il est couplé à un émetteur β^- sur des tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$.

Le ^{90}Y -RAFT-RGD est efficace pour traiter des tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ lorsqu'il est injecté avec une activité de 37 MBq par souris. Le ^{90}Y -RAFT-RGD permet alors de ralentir significativement la croissance tumorale de 2,4 fois.

Les traitements avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RAD (molécule de contrôle non spécifique de l'intégrine $\alpha\beta3$) ne sont pas efficaces. Le potentiel thérapeutique du ^{90}Y -RAFT-RGD dépend donc de la présence de la séquence RGD ciblant l'intégrine $\alpha\beta3$.

Le ^{90}Y -RAFT-RGD n'est pas efficace pour traiter des tumeurs n'exprimant pas l'intégrine $\alpha\beta3$. L'efficacité thérapeutique du ^{90}Y -RAFT-RGD est donc dépendante de la présence au niveau cellulaire de la cible du RAFT-RGD, l'intégrine $\alpha\beta3$.

Les études de toxicité du ^{90}Y -RAFT-RGD indiquent une toxicité aux niveaux médullaire et rénal chez la souris lorsqu'il est injecté avec une activité de 37 MBq.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation du potentiel thérapeutique du ^{90}Y -RAFT-RGD en fractionnant le traitement dans nos conditions expérimentales.

La toxicité rénale est toujours présente avec un traitement fractionné, par contre la toxicité médullaire est diminuée. Le fractionnement présente donc au moins un avantage par rapport au traitement unique.

D'autres études méritent d'être menées pour tester d'autres conditions de fractionnement du traitement pour essayer d'améliorer l'efficacité thérapeutique du ^{90}Y -RAFT-RGD et de diminuer encore plus sa toxicité.

Nous avons également testé l'efficacité thérapeutique du ^{177}Lu -RAFT-RGD. Un traitement avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD permet de ralentir significativement la croissance tumorale de petites tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ de 1,4 fois et ce traitement est plus efficace qu'une injection de 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD sur les petites tumeurs.

L'utilisation de lutétium-177 à la place d'yttrium-90 réduit considérablement la toxicité médullaire chez la souris. De plus, il apparaît qu'un traitement avec 37 MBq de ^{177}Lu -RAFT-RGD ne provoque pas d'insuffisance rénale précoce chez la souris selon nos méthodes de mesures.

Les traitements avec 37 MBq de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{177}Lu -RAFT-RGD sont donc efficaces pour ralentir la croissance tumorale de tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. L'efficacité du ^{90}Y -RAFT-RGD augmente avec le volume des tumeurs, alors qu'au contraire le ^{177}Lu -RAFT-RGD est efficace sur les petites tumeurs.

Le ^{177}Lu -RAFT-RGD est moins toxique que le ^{90}Y -RAFT-RGD chez la souris. Cependant, d'après les premières estimations, les toxicités rénales et médullaires du ^{90}Y -RAFT-RGD extrapolées à l'homme ne seraient pas limitantes pour son utilisation en RIV.

Le RAFT-RGD présente un bon potentiel pour le traitement de tumeurs exprimant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ lorsqu'il est radiomarké avec des émetteurs β^- . Le choix du meilleur radionucléide à utiliser, yttrium-90 ou lutétium-177, devra être basé sur le volume tumoral à traiter.

Il sera d'ailleurs intéressant de tester l'efficacité d'un traitement comprenant à la fois du ^{90}Y -RAFT-RGD et du ^{177}Lu -RAFT-RGD pour mesurer leur effet combiné sur des tumeurs de différents volumes.

Il sera également intéressant de tester l'association du RAFT-RGD radiomarké avec un radionucléide de thérapie, avec un traitement anti-angiogénique.

La perspective la plus intéressante pour le RAFT-RGD reste bien entendu son passage en clinique. A cette fin, des études dosimétriques complètes méritent d'être réalisées afin d'évaluer précisément les doses de ^{90}Y -RAFT-RGD ou de ^{177}Lu -RAFT-RAD qui seraient absorbées par les reins, la moelle osseuse et la tumeur chez l'homme.

Références bibliographiques

Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, Gröne HJ, Hallahan DE, Reisfeld RA, Debus J, Niethammer AG, Huber PE. Inhibition of $\alpha(v)\beta_3$ integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clinical cancer research* **2005**; 11(17): 6270-6279.

Ahmadi M, Sancey L, Briat A, Riou L, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C, Vuillez JP. Chemical and biological evaluations of an (111)in-labeled RGD-peptide targeting integrin $\alpha(V)\beta_3$ in a preclinical tumor model. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals* **2008**; 23(6): 691-700.

Ahmadi M. Nouveaux radiotraceurs peptidiques pour l'imagerie nucléaire, Radiomarquage, évaluation physico-chimiques et pharmacologiques. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble I, 11 février **2008**.

Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the β_3 subunit with tumor progression. *Cancer research* **1990**; 50(20): 6757-6764.

Ansquer C, Bodet-Milin C, Rousseau C, Masliah C, Buecher B, Kraeber-Bodéré F. Principes, indications et résultats de la radiothérapie vectorisée en pathologie tumorale digestive. *Hépto-Gastro* **2007**; 14(3): 211-216.

Aouba A., Eb M., Rey G., Pavillon G., Jouglu E. Données sur la mortalité en France et évolutions depuis 2000. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 7 juin **2011** / n°22.

Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. **2001**; 20(36): 4995-5004.

Ardisson V. Evaluation de nouveaux radiopharmaceutiques. Synthèse, évaluation, et biodistribution de nouveaux radioligands peptidiques de VCAM-1 et $\alpha_v\beta_3$. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble I, 6 juillet **2006**.

Assoian RK, Klein EA. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends in cell biology* **2008**; 18(7): 347-352.

Averbeck D. Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes. *Cancer Radiothérapie* **2000**; 4(5): 335-354.

Babic A, Loftin IR, Stanislaw S, Wang M, Miller R, Warren SM, Zhang W, Lau A, Miller M, Wu P, Padilla M, Grogan TM, Pestic-Dragovich L, McElhinny AS. The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E, dual hapten, dual color in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization assays. *Methods* **2010**; 52(4): 287-300.

Bader BL, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO. "Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all α_v integrins". *Cell* **1998**; 95(4): 507-519.

- Bao S**, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **2006**; 444(7120): 756-760.
- Barbet J**, Chatal JF, Kraeber-Bodéré F. Radiolabeled antibodies for cancer treatment. *Médecine sciences (Paris)* **2009**; 25(12): 1039-1045.
- Barczyk M**, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell and tissue research* **2010**; 339(1): 269-280.
- Beauvais D.M.**, Burbach B.J., Rapraeger A.C. The syndecan-1 ectodomain regulates $\alpha_v\beta_3$ integrin activity in human mammary carcinoma cells. *The journal of cell biology* **2004**; 167: 171-181.
- Bodei L**, Cremonesi M, Ferrari M, Pacifici M, Grana CM, Bartolomei M, Baio SM, Sansovini M, Paganelli G. Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with ^{90}Y -DOTATOC and ^{177}Lu -DOTATATE: the role of associated risk factors. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2008**; 35(10): 1847-1856.
- Boman BM**, Wicha MS. Cancer stem cells: a step toward the cure. *Journal of clinical oncology* **2008**; 26(17): 2795-2799.
- Boturyn D**, Coll JL, Garanger E, Favrot MC, Dumy P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *Journal of the American Chemical Society* **2004**; 126(18): 5730-5739.
- Boyd M**, Ross SC, Dorrens J, Fullerton NE, Tan KW, Zalutsky MR, Mairs RJ. Radiation-induced biologic bystander effect elicited in vitro by targeted radiopharmaceuticals labeled with alpha-, beta-, and auger electron-emitting radionuclides. *Journal of nuclear medicine* **2006**; 47(6): 1007-1015.
- Brakebusch C**, Fässler R. beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer metastasis reviews* **2005**; 24(3): 403-411.
- Briat A**, Wenk CH, Ahmadi M, Claron M, Boturyn D, Josserand V, Dumy P, Fagret D, Coll JL, Ghezzi C, Sancey L, Vuillez JP. Reduction of renal uptake of ^{111}In -DOTA-labeled and A700-labeled RAFT-RGD during integrin $\alpha_v\beta_3$ targeting using single positron emission computed tomography and optical imaging. *Cancer science* **2012**; Mar 26. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02286.x. [Epub ahead of print] PMID:22448775
- Brookes A**. The essence of SNPs. *Gene* **1999**; 234:177-186.
- Brooks PC**, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **1994**; 264: 569-571.
- Brooks PC**, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **1994**; 79: 1157-1164.
- Brooks PC**, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. Anti integrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *The journal of clinical investigation* **1995**; 96 (4): 1815-1822.

- Buerkle** MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M. "Inhibition of the α v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumors in vivo". *British journal of cancer* **2002**; 86(5): 788-795.
- Burkart** W, Jung T, Frasc G. Damage pattern as a function of radiation quality and others factors. *Comptes rendus de l'Académie des sciences série III* **1999**; 322: 89-101.
- Burke** PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR, Matzku S, DeNardo GL. Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer research* **2002**; 62(15): 4263-4272.
- Cabodi** S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P. Integrin signaling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nature reviews. Cancer.* **2010**; 10 (12): 858-870.
- Campbell** NA, Reece JB. *Biologie.* **2004**, 2^{ème} édition, Editions De Boeck.
- Campbell** NA, Reece JB. *Biology.* **2008**, 8^{ème} édition, Editions Pearson Education.
- Cao** Q, Cai W, Li T, Yang Y, Chen K, Xing L, Chen X. Combination of integrin siRNA and irradiation for breast cancer therapy. *Biochemical and biophysical research communications* **2006**; 351(3): 726-732.
- Carron** CP, Meyer DM, Pegg JA, Engleman VW, Nickols MA, Settle SL, Westlin WF, Ruminski PG, Nickols GA. A peptidomimetic antagonist of the integrin alpha(v)beta3 inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy. *Cancer Research* **1998**; 58(9): 1930-1935.
- Castel** S, Pagan R, Mitjans F, Piulats J, Goodman S, Jonczyk A, Huber F, Vilaró S, Reina M. RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of alpha(v)-integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Laboratory investigation* **2001**; 81(12): 1615-1626.
- Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDc), INSERM, site internet: <http://www.cepidc.vesinet.inserm.fr/>
- Chattopadhyay** N, Mitra A, Frei E, Chatterjee A. Human cervical tumor cell (SiHa) surface alphavbeta3 integrin receptor has associated matrix metalloproteinase (MMP-2) activity. *Journal of cancer research and clinical oncology* **2001**; 127(11): 653-658.
- Chavaudra** N, Bourhis J, Foray N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiotherapy and oncology* **2004**; 73(3): 373-382.
- Chen** X, Plasencia C, Hou Y, Neamati N. "Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-Paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery". *Journal of medicinal chemistry* **2005**; 48: 1098-1106.
- Chen** X, Tohme M, Park R, Hou Y, Bading JR, Conti PS. MicroPET imaging of α v β 3 integrin expression with ¹⁸F-labeled dimeric RGD peptide. *Molecular imaging* **2004**; 3: 96-104.
- Christofori** G. New signals from the invasive front. *Nature* **2006**; 441(7092): 444-450.
- Cosset** JM, Haie-Meder C. Curiethérapie du cancer prostatique: haut débit ou bas débit de dose ? *Cancer/Radiothérapie* **2005**; 9(8): 610-619.

Courter DL, Lomas L, Scatena M, Giachelli CM. Src kinase activity is required for integrin alphaVbeta3-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *The journal of biological chemistry* **2005**; 280(13): 12145-12151.

Couturier O, Supiot S, Degraef-Mouglin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Cherel M. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2005**; 32(5): 601-614.

Cremonesi M, Ferrari M, Bodei L, Tosi G, Paganelli G. Dosimetry in Peptide radionuclide receptor therapy: a review. *Journal of nuclear medicine* **2006**; 47(9): 1467-1475.

De Boer J. Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutation Research* **2002**; 509: 201-210.

De Jong M, Valkema R, Van Gameren A, Van Boven H, Bex A, Van De Weyer EP, Burggraaf JD, Körner M, Reubi JC, Krenning EP. Inhomogeneous localization of radioactivity in the human kidney after injection of [(111)In-DTPA]octreotide. *Journal of nuclear medicine* **2004**; 45(7): 1168-1171.

De Jong M, Barone R, Krenning E, Bernard B, Melis M, Visser T, Gekle M, Willnow TE, Walrand S, Jamar F, Pauwels S. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide. *Journal of nuclear medicine* **2005**; 46(10): 1696-1700.

De Jong M, Breeman WA, Valkema R, Bernard BF, Krenning EP. Combination radionuclide therapy using ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-labeled somatostatin analogs. *Journal of nuclear medicine* **2005**; 46 Suppl 1: 13S-7S.

Delannes M, Thomas L. Brachytherapy for soft tissue sarcomas. Technique and therapeutic indications. *Cancer Radiothérapie* **2006**; 10(1-2): 63-67.

Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, Formenti SC. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **2004**; 58(3): 862-870.

Desgrosellier JS, Barnes LA, Shields DJ, Huang M, Lau SK, Prévost N, Tarin D, Shattil SJ, Cheresch DA. An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nature Medicine* **2009**; 15(10): 1163-1169.

Desgrosellier JS, Cheresch DA. « Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities ». *Nature reviews. Cancer* **2010**; 10(1): 9-22.

Devizzi L, Guidetti A, Tarella C, Magni M, Matteucci P, Seregini E, Chiesa C, Bombardieri E, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Gianni AM. High-dose yttrium-90-ibritumomab tiuxetan with tandem stem-cell reinfusion: an outpatient preparative regimen for autologous hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical oncology* **2008**; 26(32): 5175-5182.

Dijkgraaf I, Kruijtzter JA, Frielink C, Corstens FH, Oyen WJ, Liskamp RM, Boerman OC. Alpha v beta 3 integrin-targeting of intraperitoneally growing tumors with a radiolabeled RGD peptide. *International journal of cancer* **2007**; 120(3): 605-610.

- Ding Q**, Stewart J Jr, Prince CW, Chang PL, Trikha M, Han X, Grammer JR, Gladson CL. Promotion of malignant astrocytoma cell migration by osteopontin expressed in the normal brain: differences in integrin signaling during cell adhesion to osteopontin versus vitronectin. *Cancer research* **2002**; 62(18): 5336-5343.
- Dolfi F**, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M, Vuori K. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**; 95(26): 15394-15399.
- Dufort S**, Sancey L, Hurbin A, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Coll JL. Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors in vivo. *Journal of drug targeting* **2011**; 19(7): 582-588.
- Eliceiri BP**, Cheresh DA. The role of alpha v intégrines during angiogenesis. *Molecular medicine* **1998**; 4(12): 741-750.
- Fani M**, Maecke HR, Okarvi SM. Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* **2012**; 2(5): 481-501.
- Ferlay J**, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC (International Agency for Research on Cancer) CancerBase N° 10. **GLOBOCAN 2008** v1.2, consulté sur <http://globocan.iarc.fr>, le 05/04/2012.
- Foillard S**, Sancey L, Coll JL, Boturyn D, Dumy P. Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Organic and biomolecular chemistry* **2009**; 7(2): 221-224.
- Formenti SC**, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *The Lancet oncology* **2009**; 10(7): 718-726.
- Frank RE**, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Annals of surgery* **1995**; 222(6): 695-699.
- Freeman S**, Harrington M, Sharp JC. *Biological Science*. **2005**, 2^{ème} édition, Editions Pearson.
- Friedlander M**, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* **1995**; 270 (5241): 1500-1502.
- Friedlander M**, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresh DA. Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**; 93(18): 9764-9769.
- Friess H**, Langrehr JM, Oettle H, Raedle J, Niedergethmann M, Dittrich C, Hossfeld DK, Stöger H, Neyns B, Herzog P, Piedbois P, Dobrowolski F, Scheithauer W, Hawkins R, Katz F, Balcke P, Vermorken J, van Belle S, Davidson N, Esteve AA, Castellano D, Kleeff J, Tempia-Caliera AA, Kovar A, Nippgen J. A randomized multi-center phase II trial of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) and gemcitabine compared with gemcitabine alone in advanced unresectable pancreatic cancer. *BMC Cancer* **2006**; 6: 285.

Gambini DJ, Granier R. Manuel pratique de radioprotection. 3^{ème} édition, **2007**. Editions TEC ET DOC / EM INTER / LAVOISIER.

Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* **2003**; 300(5622): 1155-1159.

Gauche AS, Riondel J, Fernandes-Carlos T, Jacrot M, Guiraud P, Coudray C, Calop J, Favier A. Effect of Oestrone on the Natural Killer (NK) Cell Activity, Antioxidant Status and Tumour Growth in Athymic Mice Xenografted with Human Tumours. *Anticancer Research* **1996**; 16: 853-860.

Gravina GL, Festuccia C, Marampon F, Popov VM, Pestell RG, Zani BM, Tombolini V. Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. *Molecular cancer* **2010**; 9: 305-321.

Grigalevicius S, Chierici S, Renaudet O, Lo-Man R, Deriaud E, Leclerc C, Dumy P. Chemoselective assembly and immunological evaluation of multiepitopic glycoconjugates bearing clustered Tn antigen as synthetic anticancer vaccines. *Bioconjugate Chemistry* **2005**; 16, 1149-1159.

Guo W, Giancotti FG. Integrin signaling during tumour progression. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2004**; 5(10): 816-826.

Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, Cheresch DA. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha v \beta 3$. *Clinical cancer research: an official journal of the american association for cancer research* **2000**; 6 (8): 3056-3061.

Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Medicine* **1996**; 2: 529-533.

Harris TD, Kalogeropoulos S, Nguyen T, Liu S, Bartis J, Ellars C, Edwards S, Onthank D, Silva P, Yalamanchili P, Robinson S, Lazewatsky J, Barrett J, Bozarth J. Design, synthesis, and evaluation of radiolabeled integrin $\alpha v \beta 3$ receptor antagonists for tumor imaging and radiotherapy. *Cancer Biotherapy and radiopharmaceuticals* **2003**; 18(4): 627-641.

Haubner R, Gratias R, Diefenbach B, Goodman SL, Jonczyk A, Kessler H. Structural and functional aspect of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists. *Journal of the American chemical society* **1996**; 118: 7461-7472.

Hei TK, Zhou H, Chai Y, Ponnaiya B, Ivanov VN. Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. *Current molecular pharmacology* **2011**; 4(2): 96-105.

Hennequin C, Quero L, Favaudon V. Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity. *Cancer Radiothérapie* **2008**; 12(1): 3-13.

Hersey P, Sosman J, O'Day S, Richards J, Bedikian A, Gonzalez R, Sharfman W, Weber R, Logan T, Buzoianu M, Hammershaimb L, Kirkwood JM; Etaracizumab Melanoma Study Group. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha(v)beta(3), + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer* **2010**; 116(6): 1526-1534.

Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Cheresh DA. "Differential αv integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis". *The journal of cell biology* **2003**; 162(5): 933-943.

Hosotani R, Kawaguchi M, Masui T, Koshiba T, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Doi R, Imamura M. Expression of integrin alphaVbeta3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas* **2002**; 25(2): 30-35.

Hsu MY, Shih DT, Meier FE, Van Belle P, Hsu JY, Elder DE, Buck CA, Herlyn M. Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *The American journal of pathology* **1998**; 153(5):1435-1442.

Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature medicine* **2002**; 8(9): 918-921.

Hynes RO. Integrins : Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **2002**; 110: 673-687.

ICRP (International Commission on Radiological Protection). The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, ICRP Publication 103, Annals of the IRCP, 37: 2-4, Elsevier **2007**.

Imhof A, Brunner P, Marincek N, Briel M, Schindler C, Rasch H, Mäcke HR, Rochlitz C, Müller-Brand J, Walter MA. Response, survival, and long-term toxicity after therapy with the radiolabeled somatostatin analogue [90Y-DOTA]-TOC in metastasized neuroendocrine cancers. *Journal of clinical oncology* **2011**; 29(17): 2416-2423.

Jain RK. "Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy". *Nature Medicine* **2001**; 7 (9): 987-989.

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **2005**; 307(5706): 58-62.

Janssen M, Frielink C, Dijkgraaf I, Oyen W, Edwards DS, Liu S, Rajopadhye M, Massuger L, Corstens F, Boerman O. Improved tumor targeting of radiolabeled RGD peptides using rapid dose fractionation. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals* **2004**; 19(4): 399-404.

Janssen ML, Oyen WJ, Dijkgraaf I, Massuger LF, Frielink C, Edwards DS, Rajopadhye M, Boonstra H, Corstens FH, Boerman OC. Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model. *Cancer research* **2002**; 62(21): 6146-6151.

Jiang X, Ellison SJ, Alarid ET, Shapiro DJ. Interplay between the levels of estrogen and estrogen receptor controls the level of the granzyme inhibitor, proteinase inhibitor 9 and susceptibility to immune surveillance by natural killer cells. *Oncogene* **2007**; 26: 4106-4114.

Jin ZH, Jossierand V, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Favrot MC, Coll JL. In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Molecular cancer* **2007**; 6: 41-50.

Jin ZH, Josserand V, Razkin J, Garanger E, Boturyn D, Favrot MC, Dumy P, Coll JL. Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)-4. *Molecular imaging* **2006**; 5(3): 188-197.

Jin ZH, Furukawa T, Galibert M, Boturyn D, Coll JL, Fukumura T, Saga T, Dumy P, Fujibayashi Y. Noninvasive visualization and quantification of tumor $\alpha V\beta 3$ integrin expression using a novel positron emission tomography probe, ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-4. *Nuclear Medicine and Biology* **2011**; 38(4): 529-540.

Kaltsas GA, Papadogias D, Makras P, Grossman AB. Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues. *Endocrine-related cancer* **2005**; 12(4): 683-699.

Kam BL, Teunissen JJ, Krenning EP, de Herder WW, Khan S, van Vliet EI, Kwekkeboom DJ. Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2012**; 39 Suppl 1: S103-112.

Kassis AI. In vivo validation of the bystander effect. *Human and experimental toxicology* **2004**; 23(2): 71-73.

Kim YS, Brechbiel MW. An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biology* **2012**; 33(3): 573-590.

Kingsley DP. An interesting case of possible abscopal effect in malignant melanoma. *The British journal of radiology* **1975**; 48(574): 863-866.

Kraeber-Bodéré F, Bodet-Milin C, Niaudet C, Sai-Maurel C, Moreau A, Faivre-Chauvet A, Thomare P, Deleris G, Estieu-Gionnet K, Bikfalvi A, Barbet J, Paris F. Comparative toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy in carcinoembryonic antigen-expressing medullary thyroid cancer xenograft. *Journal of nuclear medicine* **2010**; 51(4): 624-631.

Kumar CC. Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Current drug targets* **2003**; 4(2): 123-131.

Lacave R, Larsen CJ, Robert J. *Cancérologie fondamentale* **2005**; 395-402. Editions Montrouge: John Libbey Eurotext.

Lambert AW, Ozturk S, Thiagalingam S. Integrin signaling in mammary epithelial cells and breast cancer. *ISRN Oncology* **2012**; 493283 (en presse).

Liu Z, Shi J, Jia B, Yu Z, Liu Y, Zhao H, Li F, Tian J, Chen X, Liu S, Wang F. Two ^{90}Y -labeled multimeric RGD peptides RGD4 and 3PRGD2 for integrin targeted radionuclide therapy. *Molecular Pharmaceutics* **2011**; 8(2): 591-599.

Ljungman M. The influence of chromatin structure on the frequency of radiation-induced DNA strand breaks: a study using nuclear and nucleoid monolayers. *Radiation research* **1991**; 126(1): 58-64.

MacDonald TJ, Taga T, Shimada H, Tabrizi P, Zlokovic BV, Cheresch DA, Laug WE. Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist. *Neurosurgery* **2001**; 48(1): 151-157.

Mariani G, Erba PA, Signore A. Receptor-mediated tumor targeting with radiolabeled peptides: there is more to it than somatostatin analogs. *Journal of nuclear medicine* **2006**; 47: 1904-1907.

Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **2010**; 10(10): 753-768.

Matsuura M, Suzuki T, Saito T. Osteopontin is a new target molecule for ovarian clear cell carcinoma therapy. *Cancer science* **2010**; 101(8): 1828-1833.

Mitjans F, Meyer T, Fittschen C, Goodman S, Jonczyk A, Marshall JF, Reyes G, Piulats J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. *International journal of cancer* **2000**; 87(5): 716-723.

Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *The journal of cell biology* **1996**; 135(6 Pt 1): 1633-1642.

Nabors L, Mikkelsen T, Batchelor T, Lesser G, Rosenfeld M, Ye X, Piantadosi S, Olson J, Brem S, Grossman S. A randomized phase II trial of EMD 121974 in conjunction with comitant and adjuvant temozolomide with radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM). *Journal of clinical oncology* **2009**; 27; 15s (suppl; abstr 2001).

Nam JM, Chung Y, Hsu HC, Park CC. beta1 integrin targeting to enhance radiation therapy. *International journal of radiation biology* **2009**; 85(11): 923-928.

Nemeth JA, Cher ML, Zhou Z, Mullins C, Bhagat S, Trikha M. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clinical and experimental metastasis* **2003**; 20(5): 413-420.

Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics* **2002**; 36: 617-656.

O'Donoghue JA, Bardiès M, Wheldon TE. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *Journal of nuclear medicine* **1995**; 36(10): 1902-1909.

Oei AL, Verheijen RH, Seiden MV, Benigno BB, Lopes A, Soper JT, Epenetos AA, Massuger LF. Decreased intraperitoneal disease recurrence in epithelial ovarian cancer patients receiving intraperitoneal consolidation treatment with yttrium-90-labeled murine HMFG1 without improvement in overall survival. *International journal of cancer* **2007**; 120(12): 2710-2714.

Oh S, Xiaofei E, Ni D, Pirooz SD, Lee JY, Lee D, Zhao Z, Lee S, Lee H, Ku B, Kowalik T, Martin SE, Oh BH, Jung JU, Liang C. Downregulation of autophagy by Bcl-2 promotes MCF7 breast cancer cell growth independent of its inhibition of apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **2011**; 18(3): 452-64.

Ohba K, Omagari K, Nakamura T, Ikuno N, Saeki S, Matsuo I, Kinoshita H, Masuda J, Hazama H, Sakamoto I, Kohno S. Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis. *Gut* **1998**; 43(4): 575-577.

Paolillo M, Russo MA, Serra M, Colombo L, Schinelli S. Small molecule integrin antagonists in cancer therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2009**; 9(12): 1439-1446.

Patel SR, Jenkins J, Papadopolous N, Burgess MA, Plager C, Gutterman J, Benjamin RS. Pilot study of vitaxin--an angiogenesis inhibitor-in patients with advanced leiomyosarcomas. *Cancer* **2001**; 92(5): 1347-1348.

Pauwels S, Barone R, Walrand S, Borson-Chazot F, Valkema R, Kvols LK, Krenning EP, Jamar F. Practical dosimetry of peptide receptor radionuclide therapy with (90)Y-labeled somatostatin analogs. *Journal of nuclear medicine* **2005**; 46 Suppl 1: 92S-8S.

Pèlegrin A, Xavier F, Barbet J, Bartholeyns J, Baty D, Buchegger F, Chatal JF, Dufief F, Gurreau D, Gruaz-Guyon A, Lamotte D, Leserman L, Mach JP, Robert B, Saccavini JC, Teillaud JL, Teulon I. Immunotargeting of tumors: state of the art and prospects in 2000. *Bulletin du cancer* **2000**; 87(11): 777-791.

Pfaff M, Jurdi P. Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk 2) and integrin alphavbeta3. *Journal of cell science* **2001**; 114 (15): 2775-2786.

Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute* **2006**; 98(24): 1777-1785.

Pinon P, Wehrle-Haller B. Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation. *Pigment Cell and Melanoma Research* **2011**; 24(2): 282-294.

Posey JA, Khazaeli MB, DelGrosso A, Saleh MN, Lin CY, Huse W, LoBuglio AF. A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals* **2001**; 16(2): 125-132.

Pouget JP, Navarro-Teulon I, Bardiès M, Chouin N, Cartron G, Pèlegrin A, Azria D. Clinical radioimmunotherapy--the role of radiobiology. *Nature reviews. Clinical oncology* **2011**; 8(12): 720-734.

Prise KM, Folkard M, Michael BD. A review of the bystander effect and its implications for low-dose exposure. *Radiation protection dosimetry* **2003**; 104(4): 347-355.

Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **2009** ; 9(5): 351-360.

Rao DV, Howell RW. Time-dose-fractionation in radioimmunotherapy: implications for selecting radionuclides. *Journal of nuclear medicine* **1993**; 34(10): 1801-1810.

Reardon DA, Neyns B, Weller M, Tonn JC, Nabors LB, Stupp R. Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future oncology* **2011**; 7(3): 339-354.

Reardon DA, Perry JR, Brandes AA, Jalali R, Wick W. Advances in malignant glioma drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* **2011**; 6(7): 739-753.

Rees GJ, Ross CM. Abscopal regression following radiotherapy for adenocarcinoma. *The British journal of radiology* **1983**; 56(661): 63-66.

Rees GJ. Abscopal regression in lymphoma: a mechanism in common with total body irradiation? *Clinical radiology* **1981**; 32(4): 475-480.

Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC, Hodivala-Dilke KM. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nature medicine* **2009**; 15(4): 392-400.

Ricono JM, Huang M, Barnes LA, Lau SK, Weis SM, Schlaepfer DD, Hanks SK, Cheresch DA. Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin alphavbeta5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis. *Cancer research* **2009**; 69(4): 1383-1391.

Robinson SD, Hodivala-Dilke KM. The role of β 3-integrins in tumor angiogenesis: context is everything. *Current opinion in cell biology* **2011**; 23(5): 630-637.

Rolleman EJ, Valkema R, de Jong M, Kooij PP, Krenning EP. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2003**; 30(1): 9-15.

Ross FP, Christiano AM. Nothing but skin and bone. *The Journal of Clinical Investigation* **2006**; 116(5): 1140-1149.

Rüegg C, Alghisi GC. Vascular integrins: therapeutic and imaging targets of tumor angiogenesis. *Recent results in cancer research* **2010**; 180: 83-101.

Sablina AA, Chumakov PM, Levine AJ, Kopnin BP. p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling. *Oncogene* **2001**; 20(8): 899-909.

Sancey L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C, Vuillez JP. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the α v β 3 integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2007**; 34: 2037-2047.

Sancey L, Garanger E, Foillard S, Schoehn G, Hurbin A, Albiges-Rizo C, Boturyn D, Souchier C, Grichine A, Dumy P, Coll JL. Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Molecular therapy* **2009**; 17(5): 837-843.

Sancey L. Evaluation d'un radioligand de l'intégrine α v β 3 (RAFT-RGD) pour l'imagerie moléculaire de l'angiogenèse tumorale. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble I, 1 juin **2006**.

Sarma HD, Das T, Banerjee S, Venkatesh M, Vidyasagar PB, Mishra KP. Studies on efficacy of a novel ^{177}Lu -labeled porphyrin derivative in regression of tumors in mouse model. *Current radiopharmaceuticals* **2011**; 4: 150-160.

Sastry KS. Biological effects of the Auger emitter iodine-125: a review. Report No. 1 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Medical Physics* **1992**; 19(6): 1361-1370.

Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *The journal of cell biology* **1998**; 141(4): 1083-1093.

Schraa AJ, Kok RJ, Berendsen AD, Moorlag HE, Bos EJ, Meijer DK, de Leij LF, Molema G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *Journal of controlled release* **2002**; 83(2): 241-251.

Selwyn RG, Nickles RJ, Thomadsen BR, De Werd LA, Micka JA. A new internal pair production branching ratio of ⁹⁰Y: the development of a non-destructive assay for ⁹⁰Y and ⁹⁰Sr. *Applied Radiation and Isotopes* **2007**; 65(3):318-327.

Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer cell* **2004**; 5(5): 405-406.

Sharkey RM, Hajjar G, Yeldell D, Brenner A, Burton J, Rubin A, Goldenberg DM. A phase I trial combining high-dose ⁹⁰Y-labeled humanized anti-CEA monoclonal antibody with doxorubicin and peripheral blood stem cell rescue in advanced medullary thyroid cancer. *Journal of nuclear medicine* **2005**; 46(4): 620-633.

Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews. Molecular cell biology* **2010**; 11(4): 288-300.

Shen S, DeNardo GL, Yuan A, DeNardo DA, DeNardo SJ. Planar gamma camera imaging and quantification of yttrium-90 bremsstrahlung. *J Nucl Med* **1994**; 35(8):1381-1389.

Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresch DA. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**; 98(1): 119-124.

Sisson JC, Yanik GA. Theranostics: evolution of the radiopharmaceutical meta-iodobenzylguanidine in endocrine tumors. *Seminars in nuclear medicine* **2012**; 42(3): 171-184.

Streuli CH, Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *The biochemical journal* **2009**; 418(3): 491-506.

Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The journal of cell biology* **2001**; 155: 459-470.

Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenschein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of clinical oncology* **2010**; 28(16): 2712-2718.

Stupp R, Rugg C. Integrin inhibitors reaching the clinic. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of clinical oncology* **2007**; 25(13): 1637-1638.

Taga T, Suzuki A, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH, Stins M, Shimada H, Barsky L, Weinberg KI, Laug WE. Alpha v integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *International journal of cancer* **2002**; 98(5): 690-697.

Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene* **2001**; 20(2): 167-177.

Teunissen JJ, Kwekkeboom DJ, de Jong M, Esser JP, Valkema R, Krenning EP. Peptide receptor radionuclide therapy. Best practice and research. *Clinical gastroenterology* **2005**; 19(4): 595-616.

Thumshirn G, Hersel U, Goodman SL, Kessler H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry* **2003**; 9: 2717-2725.

Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **1989**; 24(3): 148-154.

Travis EL. Organizational response of normal tissues to irradiation. *Seminars in radiation oncology* **2001**; 11(3): 184-196.

Tubiana M et collectif. Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales. **2008**. Editions Hermann/Médecine.

Tucker GC. Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Current oncology reports* **2006**; 8(2): 96-103.

Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Molecular cancer therapeutics* **2007**; 6(3): 789-801.

Valkema R, Pauwels SA, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Jamar F, de Jong M, Barone R, Walrand S, Kooij PP, Bakker WH, Lasher J, Krenning EP. Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with (90)Y-DOTA(0), Tyr(3)-octreotide and (177)Lu-DOTA(0), Tyr(3)-octreotate. *Journal of nuclear medicine* **2005**; 46 Suppl: 1 83S-91S.

Veeravagu A, Liu Z, Niu G, Chen K, Jia B, Cai W, Jin C, Hsu AR, Connolly AJ, Tse V, Wang F, Chen X. Integrin alphavbeta3-targeted radioimmunotherapy of glioblastoma multiforme. *Clinical cancer research* **2008**; 14(22): 7330-7339.

Vengalil S, O'sullivan JM, Parker CC. Use of radionuclides in metastatic prostate cancer: pain relief and beyond. *Current opinion in supportive and palliative care* **2012**; 6(3): 310-315.

Verheijen RH, Massuger LF, Benigno BB, Epenetos AA, Lopes A, Soper JT, Markowska J, Vyzula R, Jobling T, Stamp G, Spiegel G, Thurston D, Falke T, Lambert J, Seiden MV. Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium-90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after a surgically defined complete remission. *Journal of clinical oncology* **2006**; 24(4): 571-578.

Vignot S, Soria JC. Thérapies moléculaires ciblées. De la biologie aux applications cliniques. Editions John Libbey Eurotext, **2008**.

Vuillez JP. Radioimmunothérapie: quelques réflexions sur le rationnel et les mécanismes d'action. *Médecine Nucléaire* **2009**; 33: 465-468.

Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **1988**; 35: 95-125.

Ward PA. Inflammation and $\alpha v \beta 3$ integrin. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2012**; 185(1): 5-6.

Weiss JF, Landauer MR. Radioprotection by antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**; 899: 44-60.

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine* **2008**; 359: 492-507.

Wilder RL. Integrin alpha v beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* **2002**; 61 (Suppl 2): 96-99.

Wiseman GA, Kornmehl E, Leigh B, Erwin WD, Podoloff DA, Spies S, Sparks RB, Stabin MG, Witzig T, White CA. Radiation dosimetry results and safety correlations from 90Y-ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: combined data from 4 clinical trials. *Journal of nuclear medicine* **2003**; 44(3): 465-474.

Witzig TE, Flinn IW, Gordon LI, Emmanouilides C, Czuczman MS, Saleh MN, Cripe L, Wiseman G, Olejnik T, Multani PS, White CA. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology* **2002**; 20(15): 3262-3269.

Wu H, Beuerlein G, Nie Y, Smith H, Lee BA, Hensler M, Huse WD, Watkins JD. Stepwise in vitro affinity maturation of Vitaxin, an alphav beta3-specific humanized mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**; 95(11): 6037-6042.

Wu JM, Staton CA. Anti-angiogenic drug discovery: lessons from the past and thoughts for the future. *Expert opinion on drug discovery* **2012**; 7(8): 723-743.

Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha v \beta 3$. *Science* **2001**; 294 (5541): 339-345.

Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha v beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**; 296: 151-155.

Xiong Z., Cheng Z., Zhang X., Patel M., Wu J.C., Gambhir S.S., Chen X. Imaging Chemically Modified Adenovirus for Targeting Tumors Expressing Integrin $\alpha v \beta 3$ in Living Mice with Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase PET Reporter Gene. *Journal of nuclear medicine* **2006**; 47:130-139.

Yorke ED, Beaumier PL, Wessels BW, Fritzberg AR, Morgan AC Jr. Optimal antibody-radionuclide combinations for clinical radioimmunotherapy: a predictive model based on mouse pharmacokinetics. *International journal of radiation applications and instrumentation. Part B, Nuclear medicine and biology* **1991**; 18(8): 827-835.

Yoshimoto M, Ogawa K, Washiyama K, Shikano N, Mori H, Amano R and Kawai K. $\alpha v \beta 3$ Integrin-targeting radionuclide therapy and imaging with monomeric RGD peptide. *International journal of cancer* **2008**; 123: 709-715.

Zhang X., Xiong Z., Wu Y., Cai W., Tseng J.R., Gambhir S.S., Chen X. Quantitative PET Imaging of Tumor Integrin $\alpha v \beta 3$ Expression with ^{18}F -FRGD2. *Journal of nuclear medicine* **2006**; 47: 113-121.

Annexe

Résultats de dosimétrie obtenue avec les valeurs obtenues de biodistribution du ^{90}Y -RAFT-RGD grâce au logiciel OLINDA (Organ Level Internal Dose Assessment, Vanderbilt University). Modèle OLINDA : Adulte mâle de 70 kg.

Organes cibles	Dose Absorbée (mGy/MBq)	Dose Absorbée (mGy/MBq)
Cerveau	$1,96.10^{-5}$	$1,96.10^{-5}$
Estomac	$4,82.10^{-2}$	$4,82.10^{-2}$
Reins	$2,63.10^{-2}$	$2,63.10^{-2}$
Foie	$1,30.10^{-2}$	$1,30.10^{-2}$
Poumons	$2,04.10^{-2}$	$2,04.10^{-2}$
Muscle	$9,66.10^{-6}$	$9,66.10^{-6}$
Pancreas	$1,18.10^{-4}$	$1,18.10^{-4}$
Moelle osseuse*	$4,52.10^{-3}$	$1,38.10^{-3}$
Os	$4,01.10^{-4}$	$4,01.10^{-4}$
Rate	$5,97.10^{-4}$	$5,97.10^{-4}$
Dose efficace corps entier (mSv/MBq)	0,114	0,110

*Résultats pour la moelle osseuse obtenus à partir des activités mesurées dans l'os (colonne de gauche) ou à partir de l'activité sanguine (colonne de droite)