



**HAL**  
open science

# ÉVALUATION D'UN RADIOLIGAND DE L'INTÉGRINE $\alpha V\beta 3$ , LE RAFT-RGD, POUR L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE L'ANGIOGENÈSE TUMORALE.

Lucie Sancey

► **To cite this version:**

Lucie Sancey. ÉVALUATION D'UN RADIOLIGAND DE L'INTÉGRINE  $\alpha V\beta 3$ , LE RAFT-RGD, POUR L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE L'ANGIOGENÈSE TUMORALE.. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00080148

**HAL Id: tel-00080148**

**<https://theses.hal.science/tel-00080148>**

Submitted on 14 Jun 2006

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

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

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

École Doctorale d'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

**Discipline : Génie Biologique et Médical**

Présentée et soutenue publiquement par

**LUCIE SANCEY**

Le 1<sup>er</sup> Juin 2006

**ÉVALUATION D'UN RADIOLIGAND DE  
L'INTÉGRINE  $\alpha_v\beta_3$  (RAFT-RGD)  
POUR L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE  
L'ANGIOGÈNE TUMORALE.**

Directeur de thèse : Pr. Jean-Philippe VUILLEZ

Composition du jury :

Mr le Professeur Pascal DUMY

Mr le Professeur Daniel FAGRET

Mr le Professeur Jean-Jacques FEIGE

Mme le Professeur Françoise KRAEBER-BODERE      Rapporteur

Mr le Professeur Jean-Claude MADELMONT      Rapporteur

Mme le Professeur Mireille MOUSSEAU

Mr le Professeur Jean-Philippe VUILLEZ



**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

École Doctorale d'Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

**Discipline : Génie Biologique et Médical**

Présentée et soutenue publiquement par

**LUCIE SANCEY**

Le 1<sup>er</sup> Juin 2006

**ÉVALUATION D'UN RADIOLIGAND DE  
L'INTÉGRINE  $\alpha_v\beta_3$  (RAFT-RGD)  
POUR L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE  
L'ANGIOGÈNE TUMORALE.**

**Directeur de thèse : Pr. Jean-Philippe VUILLEZ**

**Composition du jury :**

**Mr le Professeur Pascal DUMY**

**Mr le Professeur Daniel FAGRET**

**Mr le Professeur Jean-Jacques FEIGE**

**Mme le Professeur Françoise KRAEBER-BODERE**      **Rapporteur**

**Mr le Professeur Jean-Claude MADELMONT**      **Rapporteur**

**Mme le Professeur Mireille MOUSSEAU**

**Mr le Professeur Jean-Philippe VUILLEZ**

*Thèse préparée au sein de l'équipe INSERM E0340 – Radiopharmaceutiques Biocliniques –  
Faculté de Médecine de Grenoble – UJF – Grenoble I*



## **Remerciements**

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma gratitude

Aux membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail,

Au Professeur Daniel FAGRET pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour sa convivialité,

Au Professeur Jean-Philippe VUILLEZ qui m'a soutenue, accompagnée et conseillée tout au long de mon travail et sans qui celui-ci n'aurait pas abouti,

À l'ensemble des personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail dans les services de Médecine Nucléaire, de Cytologie et d'Anatomie Pathologique du CHU de Grenoble, ainsi qu'au sein des laboratoires de Chimie du LEDSS 5 (UMR 5616), Groupe de Recherche sur le Cancer du Poumon INSERM U578, DynaCell TIMC-IMAG (UMR 5525), le laboratoire de Neuro-biophysique INSERM U 318 et Marie-Claire Toufektsian-Riou laboratoire Nutrition, Vieillesse et Maladies Cardiovasculaires,

À toutes les personnes de l'équipe Radiopharmaceutiques Biocliniques, pour leur aide précieuse, leur accueil et leur amitié : Mitra Ahmadi, Valérie Ardisson, Catherine Arnaud, René Bontron, Pierre-Yves Brard, Arnaud Briat (et Séverine), Alexis Broisat, Marie-Dominique Brunet-Desruet, Julien Dimastromatteo, Anne-Sophie Gauchez, Catherine Ghezzi, Stéphanie Guillermet, Stéphane Lado, Florent Lavergne, Jean-Paul Mathieu, Pascale Perret, Laurent Riou, Christiane Ronc, Lotfi Slimani, Danièle Villemain, Hervé Visseaux et Julien Voltaire,

À Danièle Marti-Batlle qui m'a entourée, soutenue et transmis son savoir-faire,

À mes parents, Alex et l'ensemble de mes proches pour leur soutien et leur amour.



## Abréviations

Ang-1 et Ang-2	Angiopoïétine-1 et Angiopoïétine-2
CD	Cluster de Différenciation
CE	Cellules Endothéliales
CT	Computed Tomography
DMI	Densité Microvasculaire Intratumorale
DMSO	DiMéthyl SulfOxide
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane
FDG	Fluoro-Desoxy-Glucose
FGF et FGFR	Fibroblast Growth Factor et Fibroblast Growth Factor Receptor
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MMP	Métalloprotease
p.i.	Post-Injection
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIGF	Placental Growth Factor
PVFD	Polyvinylidene Difluoride
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RGD	Arginine – Glycine – Acide Aspartique
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TGF- $\alpha$ ( $\beta_1$ )	Transforming Growth Factor- $\alpha$ ( $\beta_1$ )
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloprotease
VEGF et VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor et Vascular Endothelial Growth Factor Receptor



# Sommaire



Sommaire

Sommaire

<b>Introduction</b> .....	11
<b>Partie I : Revue Bibliographique</b> .....	13
<b>I - Rappel sur l'importance du cancer en santé publique</b> .....	13
<b>II - Cancer et angiogenèse : intérêt de l'angiogenèse comme cible en cancérologie</b> .....	16
<b>A - Rappel sur les cellules cancéreuses</b> .....	16
<b>B - Importance de l'angiogenèse pour le traitement : rappel sur les stratégies anti-angiogéniques</b> .....	17
<b>1 - Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales</b> .....	19
<b>1-1 Neutralisation des facteurs pro-angiogéniques</b> .....	19
<b>1-2 Inhibition directe de la prolifération des cellules endothéliales</b> .....	21
<b>2 - Inhibition de la migration et de la survie de cellules endothéliales</b> .....	21
<b>C - Imagerie de l'angiogenèse tumorale</b> .....	22
<b>1 - Imagerie par Résonance Magnétique ou IRM</b> .....	22
<b>1-1 Principe</b> .....	22
<b>1-2 Avantages et inconvénients</b> .....	23
<b>1-3 Utilisation</b> .....	23
<b>1-4 Exemples</b> .....	23
<b>2 - Ultrasonographie</b> .....	25
<b>2-1 Principe</b> .....	25
<b>2-2 Avantages et inconvénients</b> .....	25
<b>2-3 Applications</b> .....	25
<b>2-4 Exemple</b> .....	26
<b>3 - Imagerie nucléaire</b> .....	26

3-1 Principe .....	26
3-2 Avantages et inconvénients .....	27
3-3 Applications .....	27
3-4 Exemples .....	27
4 - Tomographie par rayons X .....	31
4-1 Principe .....	31
4-2 Avantages et inconvénients .....	31
4-3 Applications .....	32
4-4 Exemples .....	32
5 - Modalités d'imagerie en développement .....	32
5-1 Imagerie optique .....	32
5-2 Imagerie Infra-Rouge .....	33
5-3 Fluorescence et bioluminescence .....	34
5-4 Microscopie intravitale .....	34
<b>III - Angiogenèse physiologique et pathologique : Justification du choix de l'intégrine <math>\alpha_v\beta_3</math> comme cible .....</b>	<b>35</b>
<b>A - Rappel sur l'angiogenèse physiologique .....</b>	<b>35</b>
1 - Étapes de l'angiogenèse .....	35
2 - Maturation des vaisseaux lors de l'angiogenèse physiologique .....	37
<b>B - Angiogenèse tumorale .....</b>	<b>38</b>
1 - Déroulement de l'angiogenèse tumorale .....	38
1-1 Initiation de la réponse angiogénique .....	40
1-2 Dégradation de la membrane basale .....	41
1-3 Migration et prolifération des cellules endothéliales .....	41
1-4 Formation du néovaisseau .....	41
2 - Caractéristiques des vaisseaux tumoraux .....	42
3 - Les principaux facteurs angiogéniques .....	43
3-1 Le VEGF .....	43
3-2 FGF .....	44
3-3 Hypoxie .....	45

<b>3-4 Angiopoïétine</b> .....	45
<b>4 - Les principaux facteurs angiostatiques endogènes</b> .....	46
<b>4-1 Angiostatine</b> .....	46
<b>4-2 Endostatine</b> .....	47
<b>4-3 Thrombospondine</b> .....	47
<b>5 - Autres acteurs fondamentaux de l'angiogenèse</b> .....	48
<b>5-1 La matrice extracellulaire</b> .....	48
<b>5-2 Les protéases</b> .....	49
<b>5-3 Molécules d'adhésion CE / MEC</b> .....	50
<b>6 - Rôle particulier des intégrines</b> .....	51
<b>6-1 Caractéristiques générales</b> .....	51
<b>6-2 L'intégrine <math>\alpha_v\beta_3</math></b> .....	52
<b>a- Structure de l'intégrine <math>\alpha_v\beta_3</math></b> .....	52
<b>b- Rôles de l'intégrine <math>\alpha_v\beta_3</math></b> .....	54
(a) Survie cellulaire :.....	55
(b) Adhésion cellulaire :.....	57
(c) Migration cellulaire :.....	57
(d) Invasion tumorale et formation de métastases :.....	59
i Mécanisme d'action de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ .....	60
ii Facteurs pronostiques associés à l'angiogenèse.....	62
(e) Intégrine $\alpha_v\beta_3$ : pro- ou anti-angiogénique ?.....	62
(f) Liaison / Activation de l'intégrine : importance du ligand.....	64
<b>6-3 Autres intégrines participant à l'angiogenèse</b> .....	65
<b>a- Sous-unité <math>\beta_1</math></b> :.....	65
<b>b- Intégrine <math>\alpha_5\beta_1</math></b> :.....	65
<b>c- Intégrine <math>\alpha_v\beta_5</math></b> :.....	66
<b>d- Intégrine <math>\alpha_{11b}\beta_3</math></b> :.....	67
<i>En résumé</i> .....	68
<b>IV - Intérêt du motif « RGD » comme ligand : synthèse des études utilisant des peptides RGD</b> .....	69
<b>A - Études <i>in vitro</i></b> .....	69

1 - Séquence RGD : attachement et étalement cellulaire.....	69
2 - RGD et formation de capillaires.....	72
3 - RGD et migration / invasion cellulaire.....	72
4 - RGD et peptides multivalents .....	72
<b>B - Études <i>in vivo</i></b> .....	73
1 - Imagerie .....	73
1-1 Le cyclo(RGD).....	73
1-2 Imagerie des dérivés du cRGD.....	73
1-3 Complémentarité RGD / <sup>18</sup> F-FDG.....	74
2 - Peptides RGD et thérapeutique .....	76
2-1 Cilengitide .....	76
2-2 Vitaxine.....	77
2-3 Dérivés du RGD .....	77
3 - Autres approches.....	78
3-1 RGD et vectorisation de particules virales.....	78
3-2 RGD dans diverses pathologies.....	78
<b>V - Conclusion de la partie I : Intérêt d'un traceur radioactif spécifique de l'intégrine <math>\alpha_v\beta_3</math> dans le ciblage de la néoangiogenèse tumorale.....</b>	<b>80</b>
<b>Partie II : Matériel et Méthode.....</b>	<b>81</b>
<b>I - Produits radiomarqués.....</b>	<b>81</b>
A - RAFT(c[-RGDfV-]) <sub>4</sub> ou RAFT-RGD.....	81
B - RAFT(c[-R $\beta$ ADfV-]) <sub>4</sub> ou RAFT-RAD .....	82
C - cyclo(-RGDyK-) ou cRGD .....	82

<b>D - Méthodes de marquage</b> .....	83
1 - Marquage à l'iode-125.....	83
2 - Marquage au technétium-99m.....	84
3 - Marquage à l'indium-111 .....	84
<b>II - Études cellulaires</b> .....	84
<b>A - Culture cellulaire</b> .....	84
1 - PC-3, Prostate Carcinoma-3 .....	85
2 - KB 3.1, tumeur O.R.L. ....	85
3 - HMVEC, Human Micro-Vascular Endothelial Cells.....	85
4 - TS/A-pc, carcinome mammaire murin .....	86
5 - B16F0, mélanome murin.....	86
<b>B - Congélation des cellules</b> .....	86
<b>C - Décongélation des cellules</b> .....	87
<b>D - Études de captation</b> .....	87
1 - Mise en puits .....	87
2 - Protocole d'incorporation .....	87
3 - Dosage de protéines .....	88
4 - Effet de la concentration .....	88
5 - Étude de compétition.....	89
6 - Étude de captation en présence de chloroquine.....	89
<b>E - Western Blot : détection de l'intégrine <math>\alpha_v\beta_3</math></b> .....	90
<b>F - Cytométrie</b> .....	91
<b>G - Formation de pseudo-capillaires</b> .....	92

<b>H - Test de blessure</b> .....	93
<b>III - Expérimentation animale</b> .....	93
<b>A - Les souris</b> .....	93
<b>B - Induction tumorale</b> .....	94
<b>C - Imagerie corps entier et biodistributions</b> .....	94
<b>1 - Acquisitions planaires</b> .....	94
<b>2 - Acquisition 3D</b> .....	96
<b>3 - Traitement d'images</b> .....	96
<b>3-1 Images planaires</b> .....	96
<b>3-2 Images tridimensionnelles</b> .....	96
<b>D - Autoradiographie</b> .....	99
<b>E - Immunohistochimie</b> .....	100
<b>Partie III : Résultats</b> .....	103
<b>I - Études cellulaires</b> .....	103
<b>A - Caractérisation cellulaire</b> .....	103
<b>1 - Cytométrie</b> .....	103
<b>1-1 Caractérisation des cellules HMVEC</b> .....	103
<b>1-2 Caractérisation des cellules PC-3</b> .....	104
<b>1-3 Caractérisation des cellules KB 3.1</b> .....	105
<b>2 - Western blot</b> .....	106
<b>3 - Synthèse : caractéristiques des modèles cellulaires utilisés</b> .....	107

<b>B - Cinétiques de captation</b> .....	108
<b>C - Effet de la concentration</b> .....	111
1 - Captation sur PC-3 .....	111
2 - Captation sur HMVEC .....	111
<b>D - Inhibition de la fixation</b> .....	113
<b>E - Étude du mécanisme d'internalisation</b> .....	114
<b>F - Propriétés d'inhibition de l'angiogenèse</b> .....	116
1 - Test de blessure .....	116
2 - Réseaux de pseudo-capillaires .....	118
<b>II - Études <i>in vivo</i></b> .....	123
<b>A - Ligands marqués à l'iode-125 : étude sur le modèle PC-3 greffé sur souris nudes</b> .....	123
1 - Biodistributions.....	123
1-1 <sup>125</sup> I-cRGD .....	123
1-2 <sup>125</sup> I-RAFT-RGD .....	124
1-3 <sup>125</sup> I-RAFT-RAD .....	124
1-4 Comparaison des biodistributions des ligands iodés.....	125
2 - Imagerie planaire.....	126
<b>B - Ligands marqués au technétium-99m</b> .....	127
1 - Études sur le modèle KB 3.1 greffé sur souris nudes .....	127
1-1 Biodistributions .....	127
a- <sup>99m</sup> Tc-cRGD .....	127
b- <sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD .....	128
c- Comparaison de la captation tumorale .....	129

1-2 Imagerie planaire .....	129
<b>2 - Études sur le modèle B16F0 greffé sur souris C57Bl/6J .....</b>	<b>131</b>
2-1 Biodistributions .....	131
<i>a- <sup>99m</sup>Tc-cRGD .....</i>	<i>131</i>
<i>b- <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD .....</i>	<i>132</i>
<i>c- <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RAD.....</i>	<i>132</i>
<i>d- Comparaison des distributions des ligands technétiés.....</i>	<i>133</i>
2-2 Imagerie planaire .....	134
<i>a- Ligands technétiés à 1h p.i. ....</i>	<i>134</i>
<i>b- Évolution du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD au cours du temps.....</i>	<i>136</i>
2-3 Pré-injection de ligand froid .....	137
<i>a- Biodistribution et captation tumorale .....</i>	<i>137</i>
<i>b- Rapports T/MC .....</i>	<i>139</i>
2-4 Immunohistochimie et distribution intratumorale .....	139
2-5 Imagerie SPECT .....	141
<i>a- Exemple d'images 3D .....</i>	<i>141</i>
<i>b- Captation tumorale .....</i>	<i>143</i>
<i>c- Rapports « Tumeur / Muscle controlatéral ».....</i>	<i>144</i>
<b>3 - Études sur le modèle TS/A-pc greffé sur souris Balb/c.....</b>	<b>146</b>
3-1 Biodistributions .....	146
<i>a- <sup>99m</sup>Tc-cRGD .....</i>	<i>146</i>
<i>b- <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD .....</i>	<i>147</i>
<i>c- <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RAD.....</i>	<i>147</i>
<i>d- Comparaison des distributions des ligands technétiés.....</i>	<i>148</i>
3-2 Imagerie planaire .....	149
<i>a- Ligands technétiés à 1h p.i. ....</i>	<i>149</i>
<i>b- Évolution du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD au cours du temps.....</i>	<i>150</i>
3-3 Pré-injection de ligand froid .....	152
<i>a- Biodistribution et captation tumorale .....</i>	<i>152</i>
<i>b- Rapports T/MC .....</i>	<i>153</i>
3-4 Immunohistochimie et biodistribution intratumorale.....	154
3-5 Imagerie SPECT .....	156

<i>a- Exemple d'images 3D</i> .....	156
<i>b- Captation tumorale</i> .....	158
<i>c- Rapports « Tumeur / Muscle controlatéral »</i> .....	158
<b>C - Ligand marqué à l'indium-111</b> .....	159
<b>1 - Études sur le modèle B16F0</b> .....	160
<b>1-1 Biodistributions</b> .....	160
<b>1-2 Comparaison avec le ligand marqué au technétium :</b> .....	161
<i>a- Captation tumorale</i> .....	161
<i>b- Rapports T/MC</i> .....	161
<b>1-3 Imagerie planaire</b> .....	162
<b>2 - Études sur le modèle TS/A-pc</b> .....	163
<b>2-1 Biodistributions</b> .....	163
<b>2-2 Comparaison avec le ligand marqué au technétium</b> .....	164
<i>a- Captation tumorale</i> .....	164
<i>b- Rapports T/MC</i> .....	165
<b>2-3 Imagerie planaire</b> .....	166
<b>III - Discussion Générale</b> .....	169
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	181
<b>Références Bibliographiques</b> .....	183
<b>Annexes</b> .....	201



# Introduction



## Introduction

**En oncologie, la Médecine Nucléaire cherche à caractériser les tumeurs solides afin d'obtenir les informations nécessaires à la prise en charge adéquate des patients. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de mettre au point un radioligand ciblant la néoangiogenèse tumorale afin d'améliorer le diagnostic, l'angiogenèse ayant une valeur pronostique, et d'ajuster les traitements anti-angiogéniques qui se développent.**

Première cause de mortalité chez l'homme et deuxième cause chez la femme en France en 2002, le cancer est un problème majeur de santé publique. Il représente à lui seul environ 28 % des décès, pourcentage très proche de celui des affections cardiaques. Entre les années 1980 et 2000, on relève une augmentation de plus de 63 % de l'incidence des cancers. Malgré des efforts de dépistage, il est encore parfois difficile d'établir un diagnostic précoce. Au niveau thérapeutique, les traitements conventionnels entraînent de nombreux effets secondaires et des mécanismes de résistance limitent parfois les possibilités de guérison obligeant à recourir à des multi-thérapies. La recherche doit donc apporter de nouvelles solutions diagnostiques et thérapeutiques afin de limiter la mortalité liée à cette maladie et d'améliorer le confort des patients.

La néoangiogenèse tumorale est une voie actuelle de recherche à la fois pour le diagnostic et pour le traitement. Son ciblage par un radiopharmaceutique apporte la possibilité de visualiser l'ensemble des tumeurs solides en évolution, lorsqu'elles font plus de 2 à 3 mm<sup>3</sup>. Ceci pourrait donc permettre d'une part, de diagnostiquer des événements très précoces, mais également de renseigner sur l'évolution de la pathologie puisqu'on reconnaît une valeur pronostique à l'angiogenèse tumorale. De plus, empêcher le développement des vaisseaux permet de limiter la progression tumorale et la dissémination des cellules métastatiques dans l'organisme, expliquant

le développement de nouveaux traitements à visée anti-angiogénique ; un radiopharmaceutique serait alors utile pour évaluer l'efficacité de ces traitements.

Les cellules endothéliales qui constituent ces vaisseaux en formation surexpriment certains marqueurs spécifiques tels que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Cette protéine membranaire reconnaît de manière spécifique le motif peptidique RGD (-Arg-Gly-Asp-). La mise au point d'un radioligand spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , utilisable en imagerie non invasive des tumeurs dans les services de médecine nucléaire, pourrait donc permettre d'atteindre le double objectif de surveiller le développement tumoral et d'évaluer l'efficacité des traitements. L'équipe du Pr. Pascal Dumy a mis au point un vecteur baptisé RAFT comportant deux faces fonctionnalisées. La première participe au ciblage grâce à 4 cyclo-pentapeptides contenant le motif RGD, et la seconde est couplée à un traceur radioactif pour permettre l'imagerie nucléaire.

Mes travaux ont porté sur l'étude des propriétés biologiques du traceur sur cultures cellulaires puis chez le petit animal lors d'imagerie non invasive corps entier.

**Partie I :**

**Revue Bibliographique**

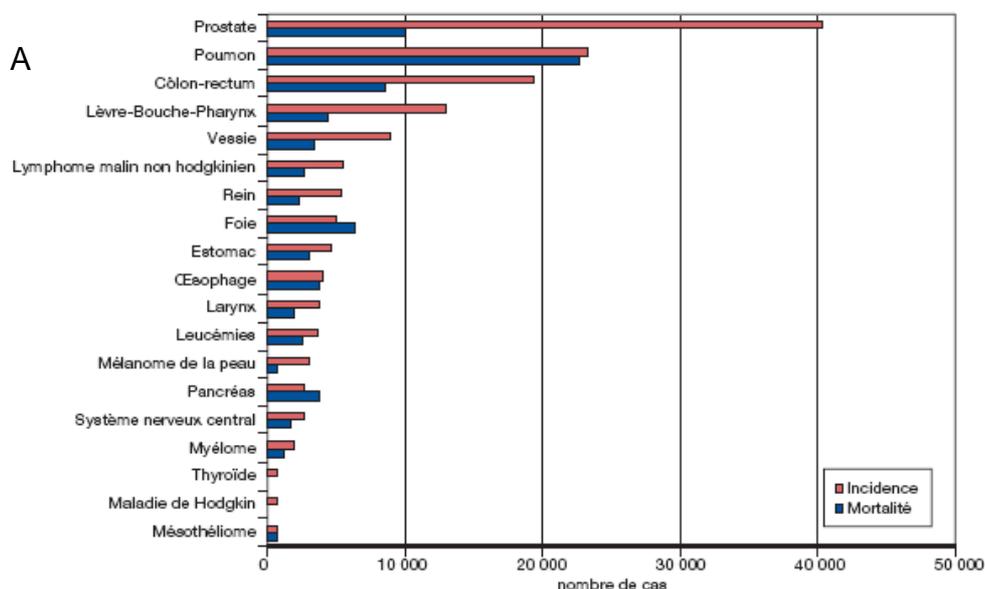


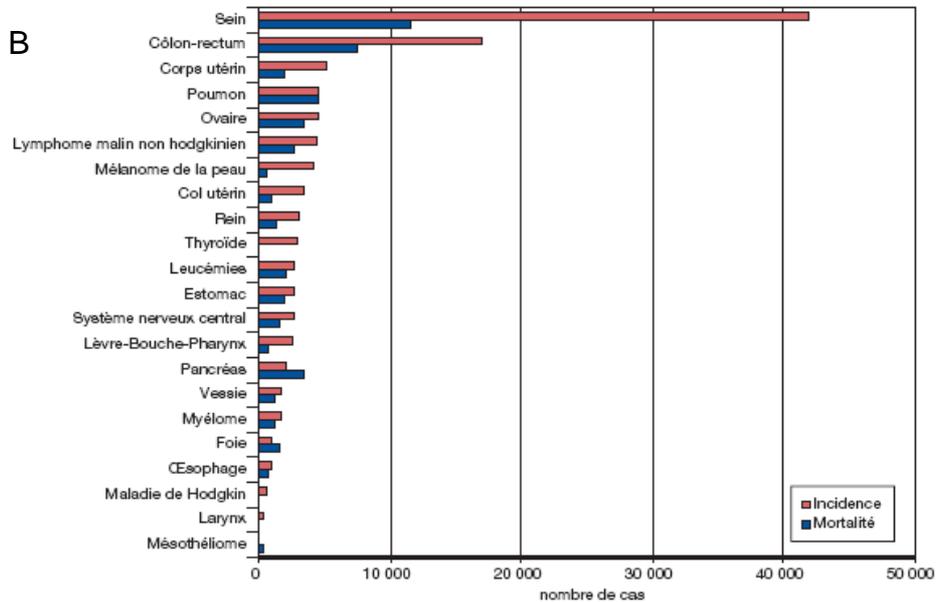
## Partie I : Revue Bibliographique

### I - Rappel sur l'importance du cancer en santé publique

Le cancer et les maladies cardiovasculaires sont les deux premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. En France en 2000, on dénombrait près de 280 000 nouveaux cas de cancers dont 58 % chez l'homme, et près de 150 000 décès dus à cette pathologie la même année dont 61 % survenant chez l'homme. En terme d'incidence, le cancer du sein est le plus fréquent avec environ 42 000 cas, suivi des cancers de la prostate avec environ 40 000 cas et des cancers colorectaux, 36 000 cas. Bien que situé au quatrième rang en terme d'incidence avec environ 28 000 cas, le cancer du poumon génère le plus haut taux de mortalité, notamment chez l'homme, avec environ 27 000 décès en 2000 (Figure 1).

L'augmentation des cancers entre les années 1980 et 2000 est considérable ; en 1980, on dénombre 170 000 cas de cancers contre 278 000 en 2000 soit une augmentation de plus de 63%. En revanche, si l'on considère les variations en terme de taux ajustés sur l'âge, ce pourcentage se stabilise aux environs de 33%. Le vieillissement de la population est donc un paramètre essentiel dans l'augmentation en nombre absolu de nouveaux cas de cancers.





**Figure 1** : Incidence et mortalité des cancers, en France, en 2000 chez l'homme (A) et chez la femme (B). D'après le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire, actualisé en Octobre 2003.

La France a le plus fort taux d'incidence de l'Union Européenne pour l'ensemble des cancers chez l'homme. Ce sont surtout les cancers du poumon et de la prostate qui expliquent ces chiffres élevés chez les hommes. L'incidence des cancers féminins est, relativement aux autres pays européens, assez basse en France mais la survenue de cancers du sein y est plutôt importante (Tableau 1).

	Hommes		Femmes		Deux sexes	
	Taux		Taux		Taux	
	Bruts	Standardisés*	Bruts	Standardisés*	Bruts	Standardisés*
Union Européenne	460,7	412,1	384,2	289,9	421,6	338,8
Allemagne	434,9	396,1	414,2	290,7	424,3	329,7
Autriche	429,3	415,8	389,3	294,0	408,7	340,5
Belgique	523,2	464,6	417,3	321,5	469,0	379,2
Danemark	418,7	379,0	477,7	374,9	448,5	370,3
Espagne	472,6	424,6	302,0	235,6	385,5	318,1
Finlande	408,8	403,3	392,0	305,6	400,2	335,7
France	498,9	465,8	352,0	288,7	423,3	363,9
Grèce	408,8	333,8	291,7	223,7	349,4	272,5
Irlande	348,2	398,0	328,5	327,6	338,3	354,6
Italie	521,3	425,6	404,9	286,0	461,4	342,3
Luxembourg	425,3	427,5	370,0	300,8	397,2	351,9
Pays-Bas	420,1	423,8	383,0	325,9	401,7	361,4
Portugal	422,8	384,4	308,6	247,4	363,7	305,7
Royaume-Uni	428,0	381,3	417,8	316,5	422,8	339,5
Suède	464,0	371,2	447,9	337,8	455,9	346,5
<b>Rang France/Europe</b>	<b>15</b>		<b>5</b>		<b>13</b>	

\* Taux ajustés sur l'âge en utilisant la population européenne comme population de référence.  
Champ : Union Européenne.

Source : OMS, Centre international de recherche sur le cancer.

Tableau 1 : Incidence comparative estimée des cancers entre les différents pays de l'Union Européenne en 1998. Taux pour 100 000 habitants. D'après le site internet [www.ligue-cancer.net](http://www.ligue-cancer.net) : site de la Ligue Nationale Contre le Cancer, données ajustées en 2004.

Entraînant près de 400 décès chaque jour en France et générant des dépenses de santé colossales, près de 15 milliards d'euros pour 2002, le cancer est devenu une priorité au niveau de la santé publique et fait l'objet du Plan Cancer qui doit s'étendre jusqu'à 2007.

## **II - Cancer et angiogenèse : intérêt de l'angiogenèse comme cible en cancérologie**

Le ciblage de la néoangiogenèse tumorale, voie actuelle de recherche pour le diagnostic et pour le traitement, apporte la possibilité de viser l'ensemble des tumeurs solides. Ceci pourrait donc permettre de diagnostiquer des événements très précoces mais également de renseigner sur l'évolution de la pathologie et d'ajuster les traitements. De plus, empêcher le développement de tels vaisseaux limite la progression tumorale et la dissémination des cellules métastatiques dans l'organisme. C'est pourquoi le ciblage de l'angiogenèse se développe autour de deux axes : la thérapeutique et l'imagerie.

### **A - Rappel sur les cellules cancéreuses**

La progression d'une cellule du phénotype normal à un phénotype de cellule cancéreuse requiert un minimum de six altérations géniques : (Hanahan 2000).

- Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération
- Indépendance vis-à-vis de l'ancrage
- Perte d'inhibition de contact
- Inhibition de l'apoptose (immortalité)
- Capacité à induire l'angiogenèse
- Acquisition d'un pouvoir invasif.

Les cellules normales ont un potentiel de réplication limité qui, lorsqu'il est dépassé, fait entrer les cellules en sénescence. Les cellules cancéreuses acquièrent le caractère d'immortalité en échappant à la sénescence par l'inactivation de protéines contrôles telles que p53 et pRb, protéine du rétinoblastome. De plus, les cellules tumorales développent des mécanismes d'élimination du phénotype d'érosion

télomérique, afin d'échapper à la mort programmée. Les multiples mutations des cellules tumorales, notamment celles de protéines du cycle cellulaire, les conduisent à poursuivre le cycle les rendant insensibles aux signaux d'inhibition de prolifération.

Les cellules cancéreuses parviennent à être indépendantes vis-à-vis des signaux de prolifération en produisant elles-mêmes leur facteurs de croissance et en modulant à leur escient l'expression et l'activité des intégrines. Facteurs de croissance et intégrines participent à l'induction de l'angiogenèse et l'acquisition du pouvoir invasif (Paul 2001 ; Evan 2001).

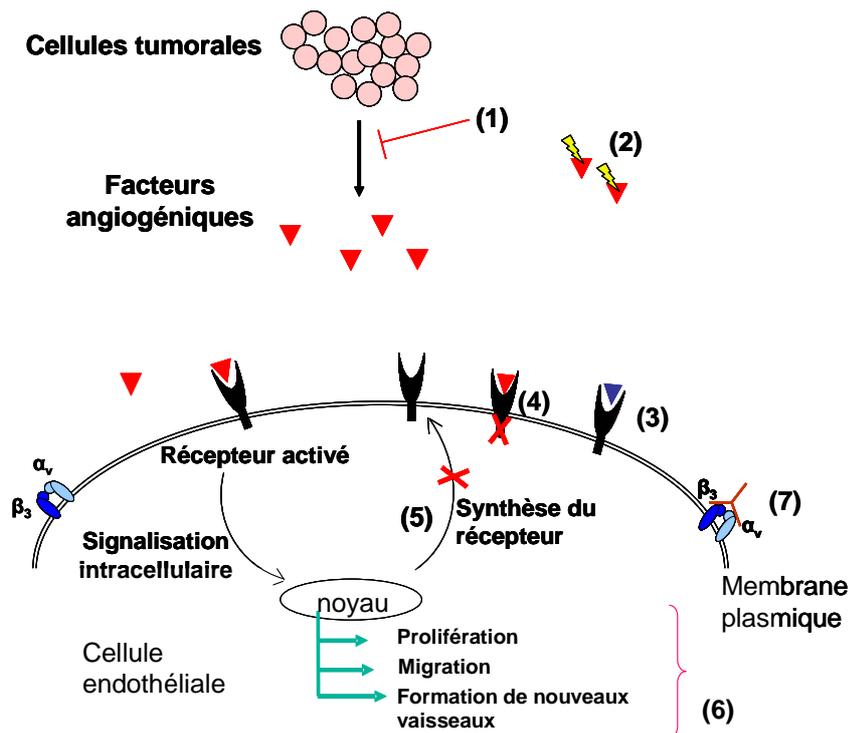
En effet, toute tumeur d'une taille inférieure à 1-3 mm<sup>3</sup> demeure quiescente, ou prolifère lentement grâce à la diffusion passive d'oxygène (Folkman 1990). Au-delà de cette taille, les cellules tumorales entrent en hypoxie et libèrent des facteurs pro-angiogéniques nécessaires à la mise en place du réseau de néovaisseaux apportant l'oxygène et les nutriments dont les cellules ont besoin pour proliférer (processus détaillé dans le chapitre III).

## **B - Importance de l'angiogenèse pour le traitement : rappel sur les stratégies anti-angiogéniques**

Du fait de la dépendance de la tumeur vis-à-vis de l'angiogenèse, les néovaisseaux apparaissent comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement des cancers. Contrairement aux cellules tumorales, les cellules endothéliales ont un pouvoir de prolifération faible et régulé ainsi qu'un génome stable. Les traitements anti-angiogéniques visant les cellules endothéliales nouvellement formées ont par conséquent moins de risque d'entraîner des processus de résistance, contrairement à ce que l'on peut observer lors de chimiothérapies. De plus, le rapport de masse cellulaire au sein des tumeurs est d'environ 1/100 entre cellules endothéliales et tumorales ; empêcher le développement des cellules endothéliales représente donc un enjeu pertinent. Autres avantages des agents anti-angiogéniques, les cibles vasculaires sont aisément accessibles et les thérapies anti-angiogéniques sont

applicables à de nombreux types tumoraux. Dans ce cadre, l'imagerie de l'angiogenèse apparaît nécessaire non seulement à l'évaluation de la pathologie mais aussi à l'évaluation de l'efficacité de ces nouveaux traitements.

Il existe différents niveaux d'inhibition de l'angiogenèse représentés sur la figure 2.



**Figure 2** : Les différents niveaux de blocage de l'angiogenèse.

Afin de limiter la formation de néovaisseaux, il est possible de neutraliser les facteurs angiogéniques en inhibant leur synthèse (1), en les bloquant, par exemple avec un anticorps soluble (2), ou entrant en compétition avec leur récepteur (3). Au niveau de la cellule endothéliale elle-même, on peut aussi cibler et réprimer le signal d'activation des facteurs angiogéniques (4), empêcher leur synthèse (5) ou inhiber l'activation des cellules endothéliales (6). Enfin, il est possible de bloquer les intégrines (7) et les métalloprotéases (2). Le tableau 8 ci-après répertorie quelques uns des composés à action anti-angiogénique actuellement en cours d'essais cliniques.

Composé	Mécanisme d'action	Essai clinique (Février 2006)
Bevacizumab, Avastine	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre VEGF	<b>Phase IV</b> : Cancer colorectal <b>Phase III</b> : Cancer de prostate, pancréas, cancer du sein <b>Phase II</b> : Cancer rénal, pulmonaire, Kaposi
Cilengitide, c(RGDfMeV),	Peptide inhibiteur des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$	<b>Phase I/II</b> : Gliomes, glioblastome, cancers solides, prostate, mélanome
Gleevec, STI-571	Inhibiteur de tyrosine kinase (c-kit, BCL-ABL, PDGFR)	<b>Phase I/II</b> : Leucémies
Marimastat	Inhibiteur de MMP	<b>Phase III</b> : Cancer pulmonaire, du sein, du pancréas, glioblastome
Néovastat	Inhibiteur de MMP, empêche la liaison du VEGF et l'activité tyrosine kinase du VEGFR	<b>Phase III</b> : Cancer pulmonaire, rein <b>Phase II</b> : myélome
SU11248	Inhibiteur des récepteurs du VEGF et du PDGF	<b>Phase III</b> : Cancer gastro-intestinal, rénal <b>Phase II</b> : Cancer pulmonaire
TNP-470	Inhibiteur de l'activité endothéliale	<b>Phase III</b> : Cancer du pancréas
Vitaxine	Anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	<b>Phase I et II</b> : Cancer solide, lymphome, myélome, prostate, mélanome

Tableau 2 : Molécules à visée anti-angiogéniques en essais cliniques. D'après le site internet [www.nci.nih.gov/clinicaltrials](http://www.nci.nih.gov/clinicaltrials).

## 1 - Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales

La prolifération des cellules peut être bloquée soit par des méthodes indirectes comme par des agents neutralisant les facteurs pro-angiogéniques, soit par des méthodes inhibant directement la prolifération des cellules endothéliales.

### 1-1 Neutralisation des facteurs pro-angiogéniques

Les facteurs de croissance jouent des rôles clés dans l'angiogenèse tumorale : leur inhibition paraît donc être une cible pertinente pour les thérapies anti-angiogéniques. De nombreuses molécules ont été développées afin de bloquer ces facteurs soit directement, comme par l'action d'anticorps neutralisants, soit indirectement en entrant en compétition avec eux ou en inhibant le signal d'activation intracellulaire.

Lors de l'utilisation de tels agents, la dose prescrite semble être fondamentale car des études ont montré que l'inhibition du VEGF et de ses voies de signalisation peut entraîner la régression vasculaire des vaisseaux néoformés ainsi que de certains capillaires quiescents tels que ceux de la trachée ou de la thyroïde chez la souris (Inai 2004). Par ailleurs, les **vaisseaux tumoraux persistants semblent retrouver une morphologie semblable à celle de vaisseaux quiescents, ce qui pourrait faciliter l'éradication de la tumeur par agents chimiothérapeutiques** (Jain 2005).

Parmi les agents ciblant les facteurs de croissance, beaucoup sont des inhibiteurs de tyrosine kinase. Le Gleevec ou STI-571, inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de c-kit, BCR-ABL et du récepteur au PDGF (Kilic 2000), est particulièrement actif contre les GIST, tumeurs gastro-intestinales (Joensuu 2001). Il induit cependant certains phénomènes de résistance notamment par amplification de BCR-ABL (Mauro 2001).

Le SU11248, dérivé de la quinolone, est un inhibiteur réversible du VEGF-R2 et plus faiblement des récepteurs du PDGF, actuellement en phase clinique III pour des essais portant sur des cancers gastro-intestinaux et rénaux (Eskens 2004). Il entraîne une diminution de la formation de métastases et de microvaisseaux, et de la prolifération cellulaire sur des modèles animaux (Shaheen 1999 ; Laird 2000). Cependant, il engendre de nombreux effets secondaires plus ou moins importants (Stopeck 2002) : problèmes rénaux, maux de tête et nausées, douleur tumorale...

L'une des molécules les plus avancées dans ce domaine est le Bevacizumab ou Avastine®. Il s'agit du premier anticorps humanisé dirigé contre le VEGF qui a obtenu l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis en 2004 ; des études cliniques de phase IV sont encore en cours actuellement. Ferrara et son équipe ont été les premiers à montrer que les anticorps anti-VEGF ralentissent la croissance tumorale sur des modèles de glioblastomes développés par des souris nude (Kim 1993). Les anticorps humanisés inhibent de manière réversible la néovascularisation et ne présentent pas de toxicité apparente. De plus, ils sont rapidement éliminés de l'organisme après traitement. L'Avastine seule présente une activité anti-tumorale mais elle est testée en complément d'association d'agents chimiothérapeutiques tels que le schéma IFL (irinotecan, 5-fluorouracil et leucovorine) : ces associations permettent d'augmenter la durée et la qualité de vie des patients (Hurwitz 2004). L'Avastine a également été testée en imagerie nucléaire (Fleming 2003).

## 1-2 Inhibition directe de la prolifération des cellules endothéliales

L'un des premiers composés à action antiproliférative identifiés est le TNP-470, analogue peu toxique de la fumagilline (Ingber 1990). Il inhibe spécifiquement la prolifération des cellules endothéliales induite par le b-FGF, leur migration et la formation de tubes capillaires. Le TNP-470, malgré une demi-vie plasmatique de quelques minutes, est actuellement en cours d'essais cliniques de phase III dans le cancer du pancréas.

## 2 - Inhibition de la migration et de la survie de cellules endothéliales

D'autres composés sont développés afin d'empêcher la formation de néovaisseaux en inhibant la migration des cellules endothéliales : parmi eux, les inhibiteurs des métalloprotéases Marimastat et Néovastat. Ces inhibiteurs synthétiques, en cours d'essais cliniques de phase III, ont un spectre d'action assez large et non spécifique des néovaisseaux. Ils peuvent donc entraîner de plus importants effets secondaires que les inhibiteurs de tyrosine kinase, telle que les polyarthrites.

Enfin, des anticorps et des antagonistes des intégrines sont en cours de développement. Le **cilengitide ou cyclo-(RGDfMeV)**, inhibiteur sélectif fort des intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , et pour une moindre part d' $\alpha_v\beta_5$  (Eskens 2003), et la Vitaxine, anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , forme humanisée du LM609, sont en cours d'essais cliniques de phase I / II. Ils semblent entraîner peu d'effets secondaires (Tucker 2003) et notamment aucun impact sur la vasculature saine n'a été mis en évidence. Leur efficacité sur les modèles expérimentaux est certaine (Brooks<sup>b</sup> 1994 ; Ruegg 2002) mais elle n'a pas encore été bien démontrée chez l'homme (Eskens 2004). Par exemple, une étude de la Vitaxine portant sur 14 patients a montré seulement une réponse partielle, sept maladies stabilisées mais aussi un cas de maladie en progression (Gutheil 2000). Le cilengitide et la vitaxine sont administrés par voie intraveineuse, en infusion, lors des essais cliniques ; le développement d'agents oraux est en cours et devrait améliorer le confort des patients. Pour ces agents, il semble également que les combinaisons avec les radioimmunothérapies améliorent le traitement (Burke 2002).

## **C - Imagerie de l'angiogenèse tumorale**

De nombreuses modalités d'imagerie existantes ou en phase de développement sont utilisées afin d'observer les vaisseaux tumoraux et de caractériser les tumeurs solides. Lors d'une étude, il est fréquent d'allier deux modalités d'imagerie différentes, par exemple imagerie anatomique et imagerie fonctionnelle et métabolique. Les techniques d'imagerie par résonance magnétique, ultrasons et nucléaire sont déjà très utilisées en oncologie. L'évolution de ces modalités concerne la **mise au point d'approches moléculaires** de la pathologie (Schirner 2004). Les enjeux de l'imagerie moléculaire sont triples :

- 1 : Permettre de détecter des tumeurs de plus en plus précoces
- 2 : Mettre au point de nouvelles méthodes de caractérisation non-invasives afin d'améliorer le diagnostic et d'adapter le traitement
- 3 : Évaluer l'efficacité du traitement.

### **1 - Imagerie par Résonance Magnétique ou IRM**

#### **1-1 Principe**

L'IRM est une technique d'imagerie non irradiante utilisant les propriétés magnétiques intrinsèques du corps humain. Cette technique repose sur l'étude des protons placés dans un champ magnétique (de 0,3 à 1,5 Tesla en pratique) et soumis à une impulsion de radiofréquence. On observe le réalignement des spins dans le champ magnétique et ses caractéristiques de relaxation T1 et T2. Ce réalignement varie en fonction de l'environnement moléculaire des protons.

L'IRM apporte une imagerie morphologique et fonctionnelle. L'utilisation d'agents de contraste fonctionnalisés permet d'obtenir des paramètres fonctionnels.

## **1-2 Avantages et inconvénients**

Cette technique a le très grand avantage de ne causer aucun effet aux tissus biologiques. Elle est donc sans danger pour l'homme. La résolution de cette technique est infra-millimétrique et atteint même 100  $\mu\text{m}$  pour les IRM dédiées au petit animal. Cette modalité d'imagerie est multiplanaire et très sensible pour les études neurologiques, ostéo-articulaires et du pelvis.

La sensibilité de l'IRM est très variable selon le type de cancer. Globalement, sa spécificité est faible. Le manque d'informations fonctionnelles de l'IRM se traduit par une recherche intensive de mise au point d'agents de contraste fonctionnalisés.

## **1-3 Utilisation**

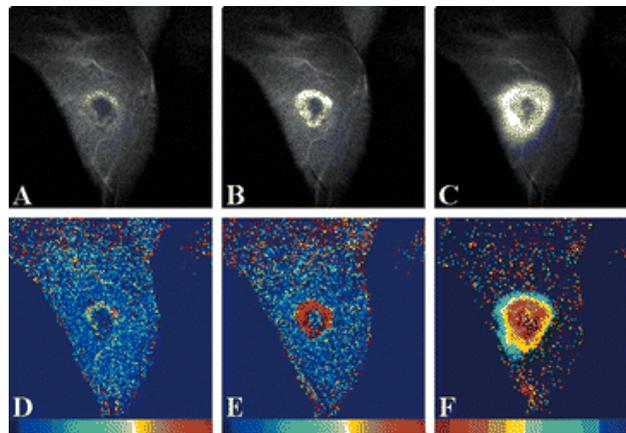
L'IRM est utilisée essentiellement lors de bilan d'extension locale des cancers du sein et du cerveau. C'est donc une méthode de seconde intention qui complète l'exploration anatomique conventionnelle des cancers et apporte des informations spécifiques notamment en angiogénèse tumorale.

Deux types d'agent de contraste sont développés en IRM : les petites molécules à base de chélates de gadolinium et les macromolécules fonctionnalisées. Les petites molécules diffusent rapidement dans les espaces extravasculaire et extracellulaire. Elles permettent de calculer la perfusion tissulaire, la fraction du volume vasculaire et la fraction de perméabilité : ceci permet notamment de différencier les tissus sains des tissus malins. Toutefois, ces techniques ne sont pas toutes standardisées ; bien qu'il semble y avoir une corrélation entre contraste IRM et développement de l'angiogénèse, cette technique n'est pas encore validée et ne peut donc pas être utilisée en routine clinique. Les macromolécules, encore au stade de recherche expérimentale, vont permettre d'allier imagerie de haute résolution et imagerie fonctionnelle (Cristofanilli 2002).

## **1-4 Exemples**

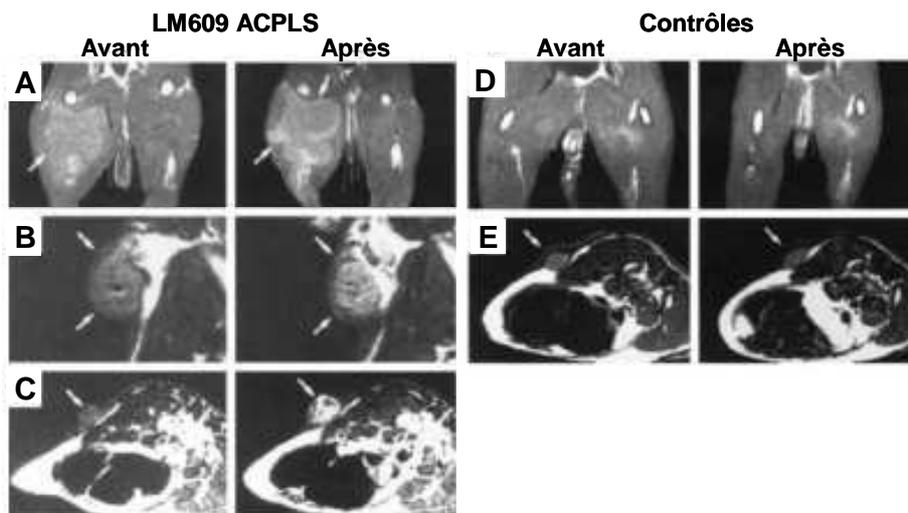
Les images obtenues avec des agents de contraste non ciblés permettent l'obtention d'informations de bonne qualité.

Toutefois, certaines équipes mettent au point des agents de contrastes paramagnétiques spécifiques, afin d'obtenir des informations d'ordre fonctionnel (Figures 3-4).



**Figure 3** : Tumeur transfectée avec le gène codant pour le VEGF165, implantée dans une patte de souris. (A-C) images à 1, 10 et 60 minutes après injection d'un agent de contraste à base de gadolinium ; (D) fraction du volume sang/plasma ; (E) perméabilité ; (F) étude interstitielle. D'après Dafni 2002.

C'est notamment le cas pour une équipe américaine qui tente de cibler spécifiquement  $\alpha_v\beta_3$ , via l'anticorps monoclonal LM609. Grâce à cet agent, la détection de points très angiogéniques ou « hot spot » est possible, comme l'illustre la figure 4 (Sipkins 1998).



**Figure 4** : IRM de lapins porteurs de tumeurs VX-2, avant et 24h après injection d'agent de contraste paramagnétique spécifique d' $\alpha_v\beta_3$  (LM609 ACPLS). Les tumeurs sont représentées avec des flèches. (A-C) L'agent de contraste réhausse le signal. (D-E) Agent non spécifique : pas de réhaussement. D'après Sipkins 1998.

## **2 - Ultrasonographie**

### **2-1 Principe**

L'ultrasonographie est une méthode d'imagerie non irradiante fondée sur la capacité qu'ont les ultrasons d'être réfléchis par les différents tissus de l'organisme. Les ultrasons, émis par un générateur électrique, pénètrent dans le corps par l'intermédiaire d'une sonde. Grâce à un procédé électronique, leurs échos sont convertis en images.

### **2-2 Avantages et inconvénients**

Cette technique est rapide et peu coûteuse, c'est pourquoi beaucoup de centres possèdent les installations nécessaires. L'injection de produits de contraste échographiques, généralement composés de microbulles de 2 à 3 µm de diamètre, renforce l'efficacité et la spécificité de la technique. Le développement de sondes de haute fréquence augmente la sensibilité de détection notamment pour les flux intra-tumoraux. La résolution atteint 500 µm avec des sondes de 2 à 20 MHz et 10 µm avec des sondes de 20 à 200 MHz, spécifique aux études du petit animal. Il est également possible de réaliser des images 3D et couleur.

L'ultrasonographie est cependant limitée pour certains patients, notamment en cas d'obésité, du fait de l'échogénéicité faible des tissus riches en lipides. L'exploration des organes mous n'est également pas du ressort de l'échographie (tube digestif, poumons). Enfin, chaque examen est « opérateur dépendant » : les mesures réalisées manuellement par une sonde sont difficiles à réinterpréter et à recalculer avec une autre modalité d'imagerie médicale. En cas de doute, l'examen en totalité doit être refait.

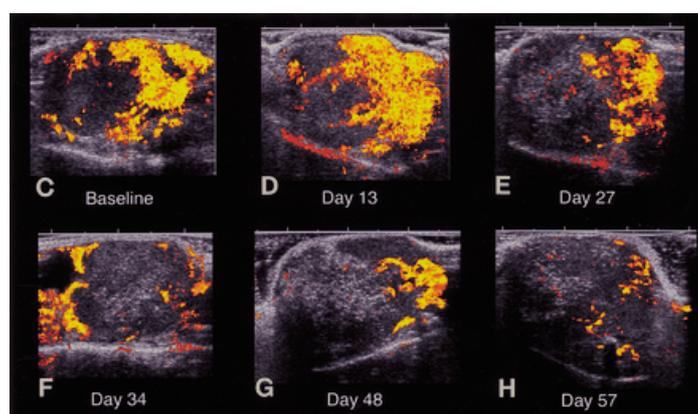
### **2-3 Applications**

L'étude de l'angiogenèse tumorale en écho-doppler est utilisée dans des tumeurs superficielles comme les mélanomes et dans les cancers du sein. Elle permet la détection du flux anormal caractéristique d'une tumeur maligne (Hata 2003).

Cette technique permet d'évaluer par une méthode simple et sans danger pour l'homme, l'efficacité des nouvelles thérapeutiques anti-angiogéniques. Il est possible de visualiser des flux lents dans des microvaisseaux et d'évaluer très précocement l'efficacité d'un traitement, avant toute modification du volume tumoral.

## 2-4 Exemple

Le doppler couleur de la figure 5 a été réalisé sur une souris porteuse d'un adénocarcinome syngénique lors de l'évaluation d'un traitement anti-angiogénique.



**Figure 5** : Doppler couleur (C) à J0, début de traitement anti-VEGF-R2, (D, H) évolution de la tumeur : diminution de la fixation de l'agent de contraste au cours du traitement. D'après Iordanescu 2002.

## 3 - Imagerie nucléaire

### 3-1 Principe

Il s'agit d'une technique d'imagerie moléculaire permettant l'obtention d'images fonctionnelles et métaboliques. Son principe repose sur l'injection par voie intraveineuse d'un traceur radiomarqué spécifique. L'imagerie, par mesure indirecte (débit sanguin) ou directe (consommation de glucose), est obtenue par détection externe grâce à une caméra adaptée. L'imagerie nucléaire comprend deux techniques :

- la TEMP : tomographie par émission monophotonique (émetteurs gamma)
- la TEP : tomographie par émission de positons (émetteurs bêta<sup>+</sup>)

### **3-2 Avantages et inconvénients**

La haute sensibilité de cette technique est son point fort. La faible résolution est de l'ordre de 4 mm chez l'homme mais les caméras TEP dédiées au petit animal atteignent 1,5 mm. Outre le prix élevé des caméras, une autre limitation à l'utilisation de la TEP est la demi-vie courte des radioisotopes utilisés : < 2 h pour le  $^{18}\text{F}$ .

Toutefois, le développement de radioligands spécifiques de l'angiogenèse tumorale possède plusieurs avantages. Tout d'abord, cela permettrait la détection précoce de tumeurs lors des premiers stades de croissance, dès lors que le switch angiogénique s'est mis en place. De plus, les interactions ligand / récepteur étant vasculaires, l'imagerie devrait d'autant plus rapide qu'il n'est pas nécessaire d'attendre le métabolisme ou la captation de la molécule par les cellules tumorales contrairement à certains agents de contraste. Enfin, l'imagerie donnerait des informations d'ordre fonctionnel sur des zones internes à la tumeur, permettant ainsi l'ajustement des traitements administrés aux patients.

### **3-3 Applications**

L'imagerie nucléaire est à la fois utilisée lors du diagnostic tumoral mais également pour la caractérisation des tumeurs et la radiothérapie dans le cas de molécules ayant un fort tropisme tumoral.

Cette modalité d'imagerie permet de connaître le débit sanguin, le taux d'oxygénation des tumeurs, la perméabilité capillaire mais également la concentration de récepteurs spécifiques ou une activité enzymatique particulière.

### **3-4 Exemples**

Les études présentées représentent un échantillon non exhaustif des avancées les plus pertinentes dans le domaine de l'imagerie nucléaire de l'angiogenèse tumorale. D'autres exemples, basés sur le motif RGD, sont détaillés dans le chapitre sur les « Études utilisant des peptides RGD ».

Parmi les radiotraceurs développés, les anticorps anti-VEGF ou le VEGF marqué sont particulièrement avancés, du fait du rôle prépondérant du VEGF dans la croissance tumorale et du développement de l'Avastine® en thérapeutique. Les deux modalités d'imagerie, TEP et TEMP, sont développées conjointement et proposent des essais cliniques.

On observe sur la figure 6 la fixation spécifique du  $^{123}\text{I}$ -VEGF sur son récepteur au niveau d'un adénocarcinome pancréatique et l'image CT correspondante.

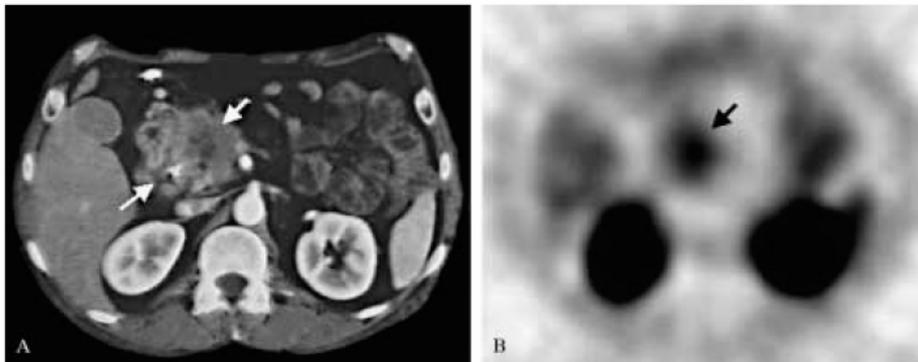


Figure 6 : Imagerie d'un adénocarcinome pancréatique. (A) CT conventionnel, (B) imagerie TEMP du  $^{123}\text{I}$ -VEGF, 1,5h p.i. D'après Li 2004.

L'exemple suivant (Figure 7) met en évidence la fixation de l'anticorps anti-VEGF marqué à l'iode 124 au niveau d'un carcinome ovarien.

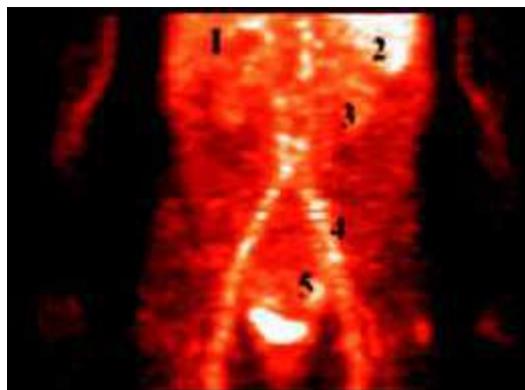


Figure 7 : TEP du  $^{124}\text{I}$ -anti-VEGF (AC monoclonal humanisé) 24h p.i. (1) foie, (2) rate, (3) rein gauche, (4) artère fémorale, (5) carcinome ovarien.

D'après Jayson 2002.

Parmi les études chez l'homme, l'anticorps anti-domaine ED-B de la fibronectine semble très intéressant. Ce fragment recombinant fixe spécifiquement les sites tissulaires en remodelage intensif et / ou en croissance et semble prometteur pour l'imagerie des lésions agressives. Il a déjà été testé sur différents types de tumeurs : cancer colorectal, pulmonaire ou glioblastome (Figure 8).

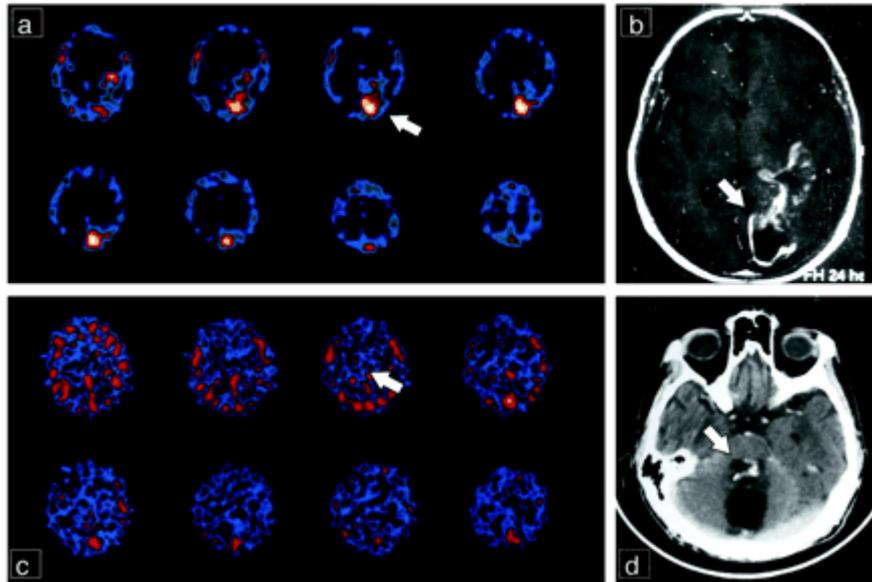


Figure 8 : Scintigraphie de patients au  $^{123}\text{I}$ -L19, anticorps anti-domaine ED-B de la fibronectine. (A) TEMP gamma coupe transaxiale d'un glioblastome, (B) IRM correspondante ; (C) TEMP gamma coupe transaxiale d'un astrocytome, (D) Tomodensitométrie correspondante. D'après Santimaria 2003.

L'endogline ou CD 105 est un marqueur endothélial jouant un rôle fondamental dans la régulation du TGF- $\beta$ , acteur de l'angiogenèse. Son expression est principalement associée aux tissus angiogéniques. Quelques essais d'imagerie ont été publiés sur ce thème en 2000 sur des modèles canins et murins (Figure 9). Aucune étude chez l'homme n'est parue à ce jour.

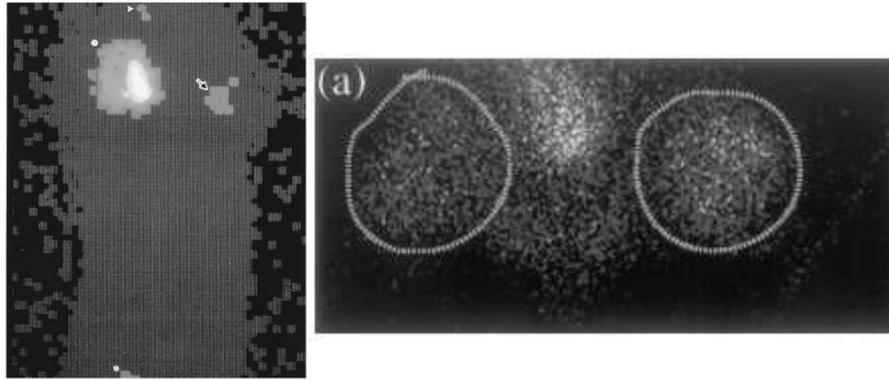


Figure 9 : À gauche, carcinome mammaire canin (flèche) identifié par le  $^{125}\text{I}$ -anti CD 105, 8h p.i. D'après Fonsatti 2000. À droite, scintigraphie au  $^{111}\text{In}$ -anti CD 105 de tumeurs B16 greffées sur les deux membres inférieurs d'une souris, 15 minutes p.i. D'après Bredow 2000.

Enfin, les peptides RGD et leurs dérivés marqués par divers radioisotopes ( $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{18}\text{F}$ ...) sont développés. Ils permettent l'imagerie de tumeurs solides de différents types (Figure 10), même intracrâniennes (Figure 11).

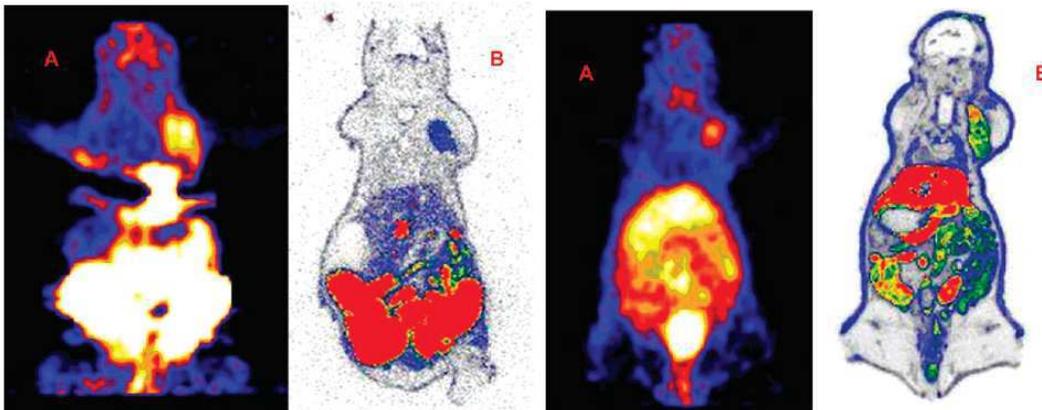


Figure 10 : (A) Imagerie micro-TEP de tumeurs mammaires xéno greffées chez la souris nude : à gauche, 1h après injection de  $^{18}\text{F}$ -peptide RGD, et à droite 2h après injection de  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-RGD. (B) Autoradiographies des sections correspondantes. D'après Chen<sup>d</sup> 2004.

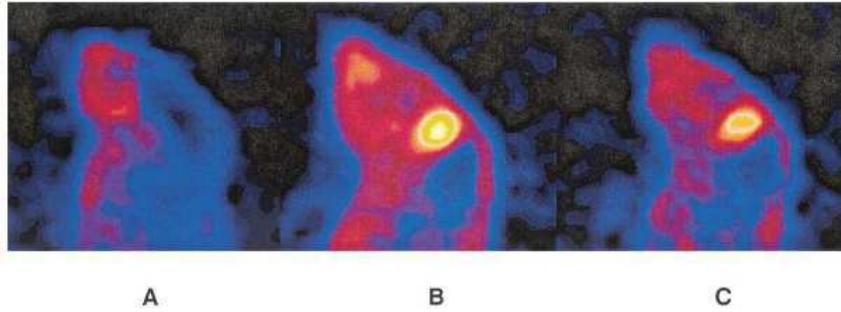


Figure 11 : Imagerie micro-TEP d'un dérivé RGD marqué au  $^{18}\text{F}$  d'une souris saine (A), ou après développement d'un glioblastome à 30 min. p.i. (B) et 60 min. p.i. (C).

D'après Chen<sup>c</sup> 2004.

L'imagerie utilisant des peptides RGD marqués à l'indium-111 permet en général d'améliorer le rapport Tumeur / Sang par rapport aux molécules technétiées, du fait de la très bonne clairance sanguine des composés marqués à l'indium-111 (captation tumorale  $^{111}\text{In}$ -RGD légèrement supérieure ou identique au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RGD). Les acquisitions sont toutefois de mauvaise qualité d'une part par le manque de systèmes de détection adaptés au petit animal et d'autre part, par la diminution très rapide de la captation tumorale. La plupart des images sont réalisées à 2h p.i. (Harris 2003 ; Janssen 2002).

## 4 - Tomographie par rayons X

### 4-1 Principe

Les rayons X traversent le patient. L'image est obtenue par différence d'atténuation des rayons X d'un tissu à l'autre. L'injection de produits de contraste est également possible et permet d'améliorer la sensibilité de la technique.

### 4-2 Avantages et inconvénients

La résolution est infra-millimétrique pour la TDM (tomodensitométrie). L'irradiation du patient est faible. Cette modalité d'imagerie apporte des renseignements d'ordre morphologique mais pas fonctionnel.

### 4-3 Applications

Au niveau tumoral, les données recueillies par TDM sont multiples : flux sanguin tissulaire, volume sanguin, perméabilité capillaire...

### 4-4 Exemples

La figure 12 représente une image TDM en 3D d'une souris porteuse de tumeur (50  $\mu\text{m}$  de résolution). Les vaisseaux larges sont indiqués par une flèche. À droite, l'image de la tumeur apparaît en gros plan. Une autre équipe a également obtenu des images de cette résolution sur une tumeur VX-2 greffée à un lapin (Maehara 2003).

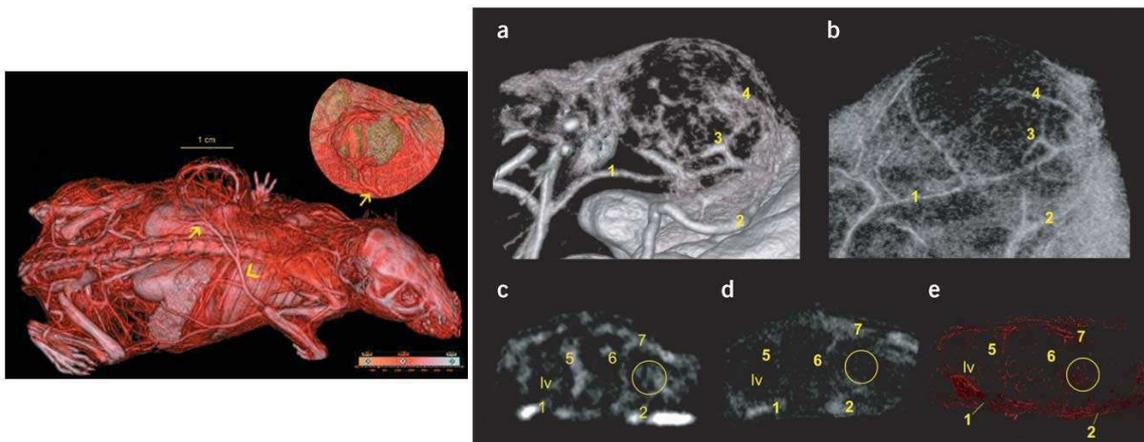


Figure 12 : À gauche, image TDM. À droite : (a) vaisseaux larges intra-tumoraux, (b) capillaires en périphérie, (c, d) image 2D de (c) TDM et (d) IRM, (E) immunohistochimie des vaisseaux correspondants. D'après Kiessling 2004.

## 5 - Modalités d'imagerie en développement

### 5-1 Imagerie optique

Les différentes techniques d'imagerie optique sont récentes et beaucoup d'entre elles sont en cours de développement ou limitée à l'usage expérimental, notamment du fait de leur faible capacité d'analyse en profondeur (souvent infra-millimétrique) (Vavere 2003).

## 5-2 Imagerie Infra-Rouge

L'imagerie Infra-Rouge (IR) et proche IR consiste en l'étude de l'absorbance par les tissus de rayonnements compris entre 600 et 2400 nm (exemples Figures 13-14). Cette technique, non invasive, est utilisée lors de la détection de cancer du sein par dépistage de l'angiogenèse. Chaque sujet est son propre témoin ; il est donc possible d'observer l'efficacité d'un traitement. Deux exemples d'imagerie expérimentale sont présentés dans les figures 13 et 14.

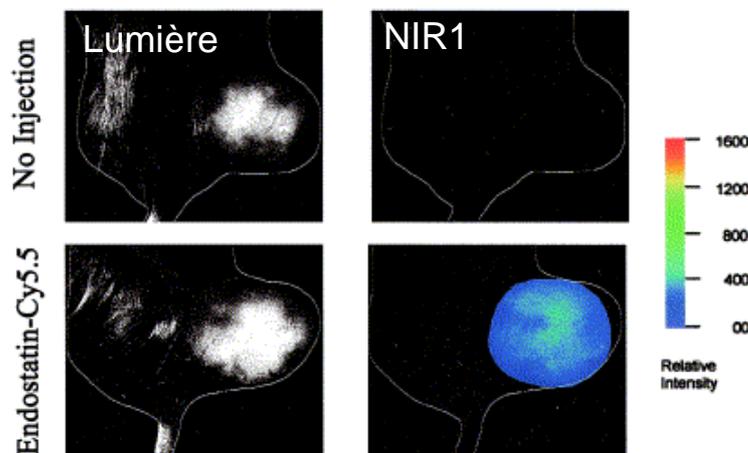


Figure 13 : Souris C57Bl/6 portant une tumeur, sous lumière et en condition proche de l'infra rouge (NIR 1), avec ou sans injection d'endostatine couplée à la cyanine 5.

D'après Citrin 2004.

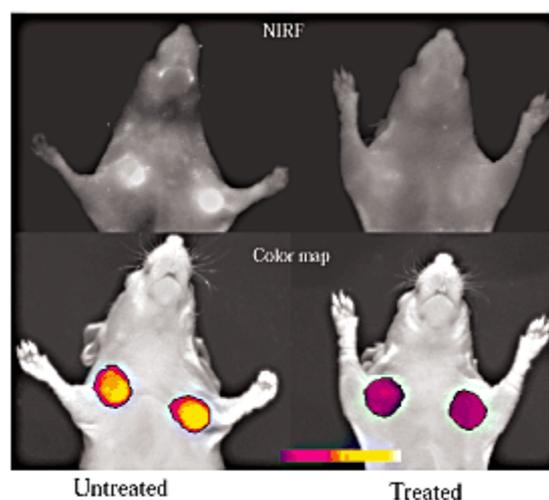


Figure 14 : Image en proche infrarouge (700 nm) de souris portant une tumeur HT1080, non traitée (gauche), traitée (droite) avec un inhibiteur de MMP. En bas, les zones d'intérêt reflètent l'activité tumorale de MMP-2. D'après Bremer 2001.

### **5-3 Fluorescence et bioluminescence**

Elle correspond à l'analyse des tissus grâce à des sondes spécifiques couplées à la GFP ou à une activité enzymatique comme la luciférase. Les tissus sont très réactifs aux longueurs d'ondes reçues, limitant le contraste avec la molécule d'intérêt. La profondeur de champ est donc très faible (Costouros 2002 ; Valesky 2002)

### **5-4 Microscopie intravitale**

Cette technique invasive combine l'illumination optique et la production d'images sous microscope confocal laser ou multi-photons. La limite de cette technique est sans doute la très faible profondeur de l'image, inférieure au millimètre (Roberts 2004).

### **III - Angiogenèse physiologique et pathologique : Justification du choix de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme cible**

#### **A - Rappel sur l'angiogenèse physiologique**

Le processus d'angiogenèse, développement de nouveaux capillaires à partir du réseau préexistant, est le phénomène physiologique majeur de formation de vaisseaux sanguins aux stades plus avancés du développement embryonnaire et de l'adulte.

La prolifération endothéliale, très importante lors du développement embryonnaire et des premiers stades post-nataux, devient très faible à l'âge adulte en conditions physiologiques : 0,01 % des cellules sont dans le cycle cellulaire (Folkman 1984 ; Hanahan 1996 ; Jekunen 2003). Toutefois, en présence de facteurs angiogéniques, les cellules endothéliales de l'adulte sont capables d'entrer rapidement dans le cycle cellulaire : leur « turnover » est alors réduit à quelques jours.

Cette néovascularisation est un événement rare dans des conditions physiologiques normales, limité aux processus de cicatrisation ou de reproduction. Elle est étroitement contrôlée et strictement délimitée (Pavlov 2001). L'angiogenèse peut se développer selon deux procédés : par bourgeonnement, phénomène courant et développé ci-après, ou par intussusception, c'est à dire par scission des vaisseaux existants.

#### **1 - Étapes de l'angiogenèse**

La formation d'un nouveau capillaire sanguin par bourgeonnement suit différentes étapes récapitulées par la figure 15.

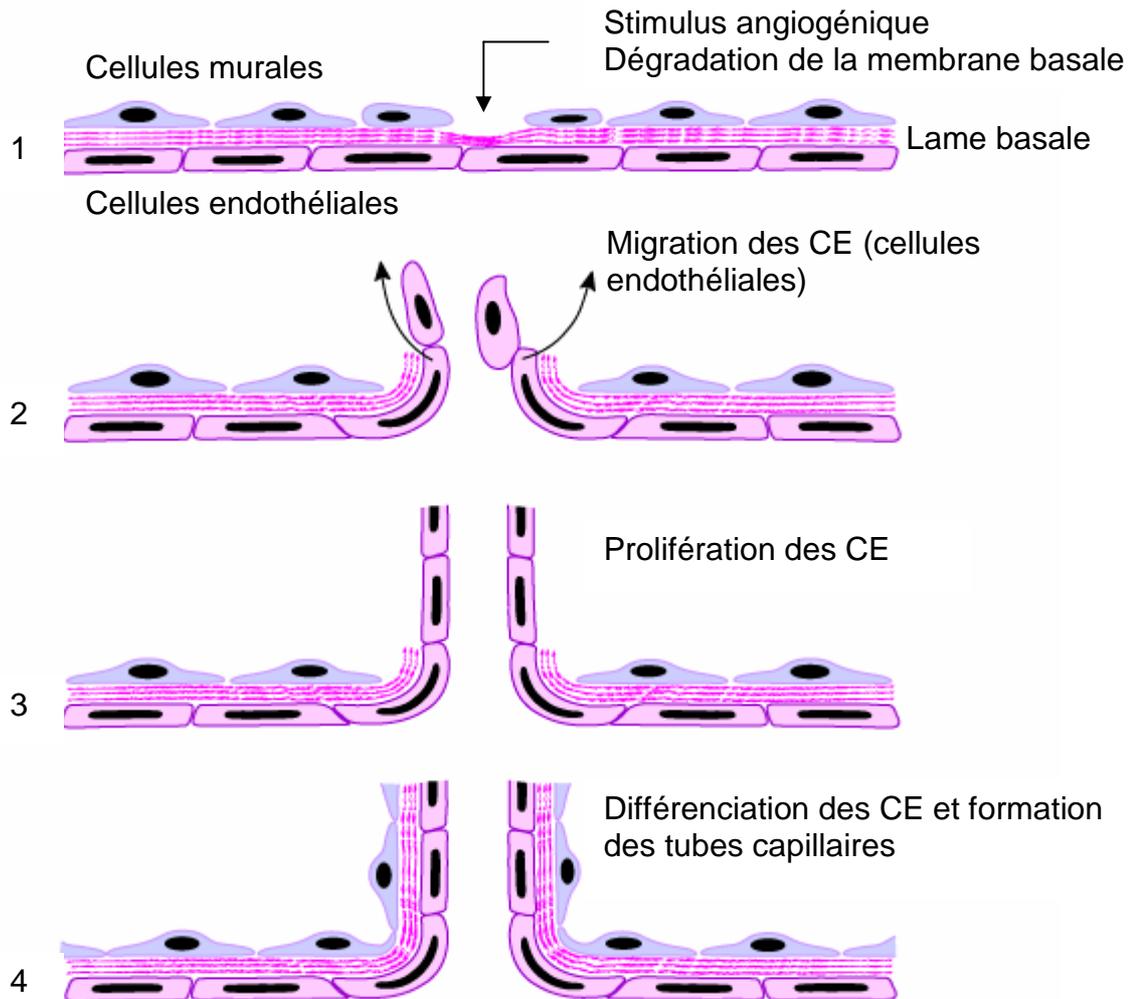


Figure 15 : Les grandes étapes de l'angiogénèse.

D'après <http://edumed.unige.ch>

(1) L'activation des cellules endothéliales quiescentes par des facteurs angiogéniques (cf. Tableaux 4 et 5) entraîne la dégradation locale de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante par les protéases. Cette première étape n'est possible qu'après la perte de contact entre les cellules endothéliales et les péricytes. Pour cela, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et Ang-2 (Angiopoïétine-2) sécrétés par les cellules endothéliales activées, conduisent à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à la perte de contact entre les cellules. Les cellules endothéliales produisent alors les protéases qui dégradent la lame basale puis (2) migrent en direction du stimulus angiogénique par chimiotactisme et (3) prolifèrent sous l'activation du couple VEGF / VEGF-R1.

(4) Enfin, elles se différencient en une structure de type capillaire dépourvu de cellules périvasculaires. Celles-ci sont alors recrutées par TGF- $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta$ ), PDGF (platelet derived growth factor) et Ang-1 pour former un réseau vasculaire fonctionnel irriguant les zones en développement.

L'ensemble de ces étapes est finement régulé par l'activation de gènes jouant un rôle direct ou indirect dans les interactions cellule / cellule ou cellule / matrice extracellulaire (Sanova 1997).

## **2 - Maturation des vaisseaux lors de l'angiogenèse physiologique**

Pour devenir mature, c'est-à-dire donner naissance à un réseau vasculaire fonctionnel, les interactions entre cellules vasculaires et cellules périvasculaires (cellules musculaires lisses et péricytes) s'établissent et la matrice extracellulaire est générée. Cette étape de maturation indispensable requiert divers facteurs de croissance tel que le PDGF mais également le TGF- $\beta$  et l'angiopoïétine (Risau 1995).

Le PDGF et le TGF- $\beta$  sont sécrétés par les cellules endothéliales en cas de lésions afin d'attirer les fibroblastes (Risau 1997) qui sécrètent alors le collagène nécessaire aux premiers stades de la réparation. La cytokine TGF- $\beta_1$ , dont le rôle est complexe, peut induire la migration et la prolifération cellulaire ou au contraire être capable de stabiliser les vaisseaux (Jain 2003).

De même, l'angiopoïétine existe sous deux formes Ang-1 et Ang-2 qui lient les récepteurs Tie-1 et Tie-2. Les principales sources de Ang-1 et Ang-2 sont respectivement les cellules murales et endothéliales. Ang-1 stabilise les vaisseaux et les rend non perméables en renforçant la communication entre les deux types cellulaires. Ang-2, en absence de VEGF, agit comme un antagoniste de Ang-1 et déstabilise les vaisseaux, ce qui conduit à leur régression. En revanche, en présence de VEGF, Ang-2 facilite le bourgeonnement vasculaire et donc la réparation tissulaire.

Le contact établi entre les cellules vasculaires et périvasculaires stabilise les cellules endothéliales en les rendant réfractaires aux stimuli pro- ou anti-angiogéniques (Benjamin 1998).

## B - Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse peut être pathologique et se rencontrer lors d'ischémies, d'inflammations ou de phénomènes infectieux. Le tableau 3 ci-après présente quelques pathologies fréquentes au cours desquelles l'angiogenèse est active.

Organe	Pathologie
Nombreux organes	Cancers, maladies infectieuses, maladies auto-immunes
Vaisseaux sanguins	Malformations vasculaires, athérosclérose
Tissu adipeux	Obésité
Peau	Psoriasis, allergies, sarcome de Kaposi
Yeux	Rétinopathies diabétiques
Poumons	Asthme
Intestins	Ascites, inflammations
Système reproductif	Hyperstimulation ovarienne, endométriose
Os et articulations	Arthrite

Tableau 3 : Maladies dues ou caractérisées par une angiogenèse excessive. D'après Carmeliet 2003.

**Par ailleurs, l'angiogenèse est cruciale dans le développement des tumeurs.**

Afin de mieux comprendre l'importance de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  comme cible, il est nécessaire de rappeler les détails moléculaires de l'angiogenèse.

### 1 - Déroulement de l'angiogenèse tumorale

Dans le cas des cancers, la croissance tumorale requiert la vascularisation de la zone en développement. L'angiogenèse tumorale est un processus complexe au

cours duquel interviennent les cellules vasculaires et les cellules tumorales elles-mêmes.

Il existe au moins quatre mécanismes (cf. Figure 16) qui permettent aux tumeurs de stimuler l'angiogenèse. La première hypothèse, développée par Judah Folkman suggère qu'une tumeur peut rester avasculaire plusieurs années à la taille de 1 à 3 mm<sup>3</sup> (Folkman 1971) puis soudainement être vascularisée : c'est le switch angiogénique. Il peut être provoqué par la synthèse accrue de facteurs pro-angiogéniques et / ou la perte de d'expression de facteurs angiostatiques (Feige 2000). C'est le cas que nous allons développer ci-après.

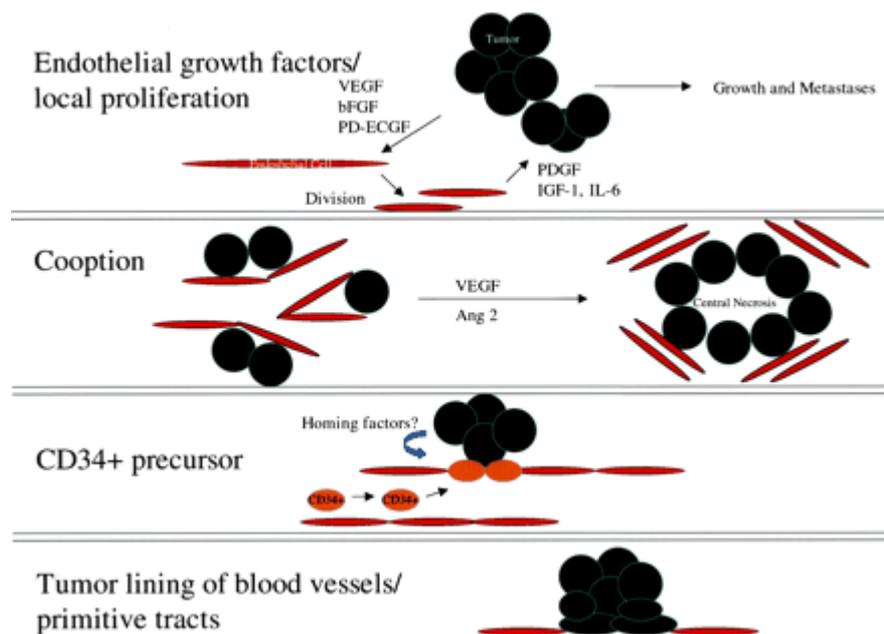


Figure 16 : D'après Scappaticci 2002.

Le second mécanisme possible est la co-optation de vaisseaux existants. Les cellules tumorales se développent autour de vaisseaux existants ; le coeur de la tumeur est alors nécrotique. Sous hypoxie, les cellules produisent du VEGF et l'angiogenèse est initiée en périphérie de la tumeur.

Le troisième mécanisme de régulation de l'angiogenèse est la contribution possible de précurseurs de cellules endothéliales circulantes CD 34<sup>+</sup>, issus de la moelle osseuse ou de l'endothélium (Drake 2003 ; Koizumi 2003). Il ne semble pas que ces cellules soient nécessaires au développement tumoral, et beaucoup d'interrogations persistent notamment au niveau du signal de homing (Ribatti 2004). Toutefois, chez les patients dont la maladie est en progression, le nombre de cellules endothéliales circulantes est élevé et corrélé à la production de VEGF (Beerepoot 2004 ; Rafii 2002).

Enfin, dans le quatrième mécanisme possible, nommé « vascular mimicry », quelques cellules tumorales elles-mêmes peuvent s'insérer dans le vaisseau et ainsi participer à sa formation (environ 3 à 8% des cellules des vaisseaux). Ceci facilite alors leur accès à la circulation (Scappaticci 2002).

Comme lors des cas physiologiques, l'angiogenèse tumorale peut être divisée en 4 principales étapes : (1) activation des cellules endothéliales, (2) dégradation de la membrane basale, (3) migration et prolifération des cellules endothéliales et (4) formation du néovaisseau.

### **1-1 Initiation de la réponse angiogénique**

Toute tumeur d'une taille inférieure à 1-3 mm<sup>3</sup> demeure quiescente ou prolifère lentement grâce à la diffusion passive d'oxygène et de nutriments (Folkman 1990). Lorsque la tumeur grossit davantage, les cellules les plus éloignées des vaisseaux entrent en hypoxie et sécrètent des facteurs de transcription tels que HIF (Kerbel 2002 ; Pugh 2003), et de nombreux facteurs de croissance (FGF, VEGF, PDGF...) (Mattot 1997) : ceci fait basculer l'équilibre en faveur des activateurs de l'angiogenèse et déclenche l'angiogenèse tumorale (Hanahan 1996).

Comme lors de l'angiogenèse physiologique, le VEGF et Ang-2 sécrétés par les cellules endothéliales activées augmentent la perméabilité vasculaire, affaiblissent les jonctions intercellulaires et induisent la perte de contact entre les péricytes et les cellules endothéliales, permettant à ces dernières d'être activées en réponse aux facteurs de croissance.

## **1-2 Dégradation de la membrane basale**

Le VEGF se fixe à son récepteur spécifique VEGF-R2 de manière auto- ou paracrine (Abedi 1997). Les cellules endothéliales entrent alors dans le cycle cellulaire et synthétisent diverses protéases telles que les MMP ou métalloprotéases. Celles-ci dégradent localement la matrice extracellulaire, libérant et activant au passage de nouveaux facteurs de croissance solubles (b-FGF, VEGF et IGF-1) jusqu'alors séquestrés dans la matrice.

## **1-3 Migration et prolifération des cellules endothéliales**

Libérées d'une partie de leurs interactions, les cellules endothéliales migrent et prolifèrent en direction de la source du stimulus angiogénique. La migration cellulaire s'effectue notamment grâce aux intégrines, notamment  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$ , qui permettent l'adhésion à des composants de la matrice extracellulaire (Cheresh, 1992).

## **1-4 Formation du néovaisseau**

Au cours de leur progression les cellules endothéliales reforment les interactions nécessaires à leur survie et à la formation d'un réseau stable. Elles s'organisent de manière à former des structures tubulaires, encore immatures mais fonctionnelles. Elles induisent également la mise en place de la paroi vasculaire qui assure la stabilisation des néovaisseaux (Carmeliet 2003). Toutefois, le recrutement des péricytes n'est pas complet et les vaisseaux formés sont peu fonctionnels et d'organisation anarchique car la vascularisation tumorale est soumise à une restructuration constante du fait de la haute prolifération tumorale.

Les néovaisseaux soutiennent la croissance tumorale :

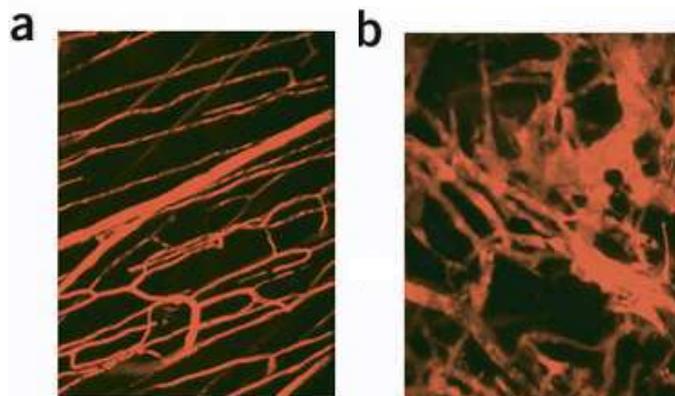
- en fournissant oxygène et nutriments nécessaires à l'expansion tumorale
- en produisant des facteurs qui stimulent la croissance de ces cellules
- et en leur fournissant leur principale voie de colonisation de l'organisme (Folkman 1995).

## 2 - Caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Le remodelage rapide des néovaisseaux tumoraux entraîne la constitution d'un réseau vasculaire fragilisé, tortueux et chaotique (Figure 17), comprenant parfois des segments borgnes (Vicaut 2001). Ce réseau est formé de vaisseaux de diamètre irrégulier dû en partie à la compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération (Jain 2000). Les cellules endothéliales elles-mêmes sont hétérogènes au sein de la tumeur ; certaines sont actives, immatures et en prolifération alors que d'autres sont quiescentes ou même entrent dans des processus d'apoptose (Scappaticci 2002).

La paroi vasculaire est anormale : les péricytes ne forment pas un manchon complet autour des cellules endothéliales, ce qui fragilise les vaisseaux tumoraux (Jain 2003 ; Feige 2000). Par ailleurs, les cellules endothéliales se développent anormalement en se superposant les unes sur les autres (Jekunen 2003). Les jonctions entre cellules endothéliales sont lâches ce qui augmente la perméabilité vasculaire bien que les vaisseaux ne soient pas fenestrés. Ceci facilite alors la dissémination de cellules cancéreuses dans l'organisme. Bien que le réseau lymphatique soit peu développé dans les tumeurs, il participe également à la dissémination des cellules dans l'organisme, notamment lors de cancers du sein ou de mélanomes (Stacker 2002).

Le flux sanguin et la perméabilité varient très fortement d'une tumeur à une autre et même d'une zone à l'autre de la tumeur (Jain 2003). Ces défauts de perfusion rendent difficile le traitement par chimiothérapie ou radiothérapie.



**Figure 17** : Exemples d'organisation vasculaire : (a) organisation physiologique, (b) organisation tumorale. D'après Jain 2003.

### 3 - Les principaux facteurs angiogéniques

#### 3-1 Le VEGF

VEGF (Vascular growth factor) ou VEGF-A appartient à une famille de gènes incluant PlGF (placental growth factor), VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D. Le gène du VEGF, situé sur le chromosome 6 code par épissage alternatif 4 isoformes de 121, 165, 189 et 206 acides aminés, l'isoforme de 165 acides aminés étant majoritaire. Il est sécrété par divers tissus très vascularisés tels que le foie, le cœur et les surrénales, ou par des tissus en développement comme les tumeurs. C'est le facteur pro-angiogénique le mieux caractérisé.

Sa synthèse peut être induite par l'hypoxie, certaines cytokines, comme le TGF- $\alpha$  par exemple, ainsi que par la transformation et la différenciation cellulaire. Le VEGF est également produit en réponse au b-FGF au cours de l'angiogenèse (Sanova 1997). Il est surexprimé par les cellules tumorales, dans un grand nombre de cancers.

Ces différents récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase au niveau de leur domaine cytoplasmique et sont essentiellement exprimés au niveau des cellules endothéliales, d'où la spécificité d'action de la protéine (Figure 18) (Holash 1999).

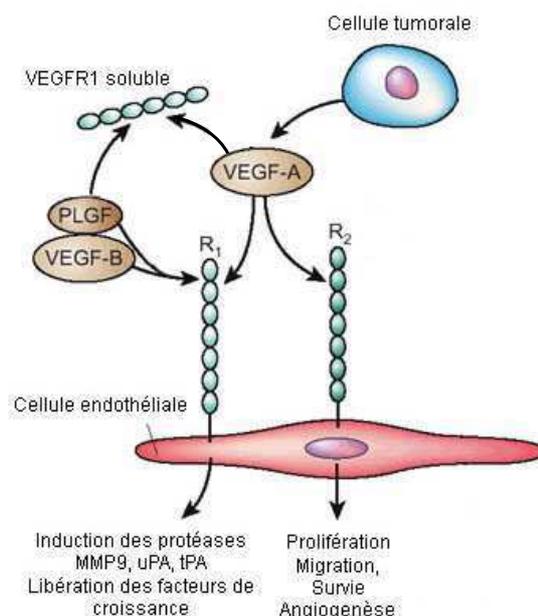


Figure 18 : Les récepteurs du VEGF. D'après Ferrara 2003.

Le VEGF a un rôle prépondérant tant en conditions physiologiques que pathologiques. Il agit de manière directe et dose-dépendante sur l'angiogenèse. Ce facteur de survie est également mitogène et augmente la perméabilité des vaisseaux (Ferrara 1989 ; Ferrara 2003). Il agit en synergie avec les intégrines  $\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  et  $\alpha_v\beta_3$  lors de l'angiogenèse via la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase ou PI3-K (cf. Figure 20) (Liu 2003). Dans les milieux riches en vitronectine, le VEGF interagit spécifiquement avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  pour médier l'adhésion et la migration cellulaires. Il induit également la voie d'activation de RhoA, permettant la réorganisation du cytosquelette d'actine-F et donc la migration cellulaire (van Nieuw Amerongen 2003).

Son rôle est critique puisque l'inactivation d'un seul allèle chez la souris entraîne la mort des embryons entre 9,5 et 10,5 jour (E9,5-E10,5) en raison d'un développement insuffisant du réseau endothélial (Pardanaud 2001). Une baisse de 25 % de son activité entraîne déjà un défaut de perfusion au niveau de la chorde spinale (Carmeliet 2001).

En raison de son rôle prépondérant dans l'induction de l'angiogenèse, de nombreuses équipes ont tenté de mettre au point un inhibiteur du VEGF ; aussi en 2004, le premier médicament à action anti-angiogénique a été mis sur le marché aux États-Unis sous le nom d'Avastine<sup>®</sup> (cf. chapitre II B).

### **3-2 FGF**

Sont regroupées sous le nom de FGF plus d'une vingtaine de protéines dont la plus importante est le b-FGF ou FGF-2 de 18 kDa. Outre son rôle de facteurs de croissance des fibroblastes, il agit sur les cellules endothéliales par des récepteurs à activité tyrosine kinase spécifiques FGFR-1 et FGFR-2. C'est le premier agent angiogénique à avoir été purifié. *In vivo*, il est produit par les cellules endothéliales et tumorales, et semble agir indirectement (Knighton 1990 ; Liekens 2001) sur l'angiogenèse. Toutefois, le b-FGF exerce un puissant effet mitogène et chimiotactique pour les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses des vaisseaux.

Les souris knock-out pour le gène du b-FGF sont viables et fertiles malgré quelques effets secondaires notables (Dono 1998). L'action pro-angiogénique du b-FGF est synergique à celle du VEGF *in vivo* (Asahara 1995).

### **3-3 Hypoxie**

L'hypoxie est un stimulus très important dans l'expansion vasculaire, notamment chez l'embryon. Initialement, l'apport en oxygène est assuré par simple diffusion. Lorsque le tissu croît au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène ou lorsque la consommation d'oxygène devient trop importante, comme lors de prolifération active (Moeller 2004), les cellules entrent en hypoxie. Elles sécrètent alors des facteurs de transcription à l'hypoxie ou HIF, qui participent à la croissance vasculaire. HIF est un hétérodimère  $\alpha\beta$  capable d'induire la transcription du VEGF ; de plus, des protéines spécifiques stabilisent l'ARNm du VEGF, renforçant ainsi la synthèse de VEGF et donc l'angiogenèse (Pugh 2003). En conditions hypoxiques, on observe également la synthèse de NO-synthase (nitric oxide synthase) qui dilate les vaisseaux existants, les rendant perméables en réponse au VEGF (Jain 2003).

### **3-4 Angiopoïétine**

L'angiopoïétine est spécifique de l'endothélium vasculaire. Ses récepteurs Tie-1 et Tie-2 possèdent une activité tyrosine kinase, comme ceux du VEGF. Dans un vaisseau adulte, Ang-1 est associé à Tie-2 pour conserver la stabilité du vaisseau. D'une manière générale, Ang-1 induit des processus participant à la stabilisation des vaisseaux, alors que Ang-2 participe aux phases de remodelage.

Ang-2 semble être le premier marqueur de l'angiogenèse : sa surexpression précoce précède celle de marqueurs tels que le VEGF. Elle est produite par les cellules endothéliales (CE) elles-mêmes. Elle déstabilise les interactions CE / cellules murales et CE / matrice, rendant les CE plus sensibles aux facteurs de croissance. Dans les premiers temps, les vaisseaux régressent mais sous l'induction du VEGF, l'angiogenèse est initiée (Holash 1999 ; Zagzag 1999).

Le tableau 4 récapitule les principaux couples ligand / récepteur qui viennent d'être détaillés.

Ligand / récepteur (Cellule)	Rôles principaux
VEGF / VEGF-R2 (CE)	Augmente la perméabilité vasculaire Induction des protéases : organisation de la matrice Agent mitogène pour CE (auto/paracrine) Inhibe l'apoptose des CE : stabilise les vaisseaux Induit la formation de lumen Induction du PDGF- $\beta$ pour recrutement de cellules murales : stabilise les vaisseaux
b-FGF / FGFR	Prolifération des CE Recrutement des cellules murales
PDGF- $\beta$ / PDGFR- $\beta$ (CE, cellules murales)	Surexprime le VEGF Migration, prolifération et recrutement de cellules murales
Ang-2 / Tie-2 (CE)	Prolifération des CE en présence de VEGF En absence de VEGF, apoptose des CE Stabilise les vaisseaux en facilitant les interactions CE/cellules murales et CE/matrice
Ang-1 / Tie-2 (CE)	Inhibe l'apoptose des CE Vaisseaux non perméables
TGF- $\beta_1$ / TGF- $\beta$ RII (CE, cellules murales)	Entraîne la production de MEC et de protéases, ainsi que la différenciation cellules mésenchymateuses en cellules murales
TGF- $\beta_1$ / ALK1 (CE)	Migration et prolifération des CE
TGF- $\beta_1$ / ALK5 (CE)	Inhibe la prolifération des CE Régule la maturation des vaisseaux

**Tableau 4** : Couples ligand / récepteur et leurs principales actions lors de l'angiogenèse.

## 4 - Les principaux facteurs angiostatiques endogènes

### 4-1 Angiostatine

L'angiostatine est un fragment de 38 kDa du plasminogène qui agit au niveau endothélial. Elle joue un rôle particulièrement important dans l'inhibition du développement métastatique (Zgodziński 1999). L'administration systématique d'angiostatine bloque la néovascularisation et entraîne la régression de la tumeur jusqu'au stade de dormance dans les modèles de tumeurs mammaires, de la

prostate et du colon (O'Reilly 1996). Par conséquent, elle limite aussi la dissémination métastatique de ces modèles. Il semble que l'action anti-angiogénique de l'angiostatine soit due au fait qu'elle interagisse avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  puis perturbe les signaux intracellulaires de celle-ci (Tarui 2001).

#### **4-2 Endostatine**

L'endostatine est un fragment de 20 kDa, généré par clivage du collagène XVIII grâce à la libération par les cellules endothéliales d'enzymes spécifiques (élastase et cathepsine). Ce fragment C-terminal inhibe fortement la prolifération endothéliale, ralentissant ainsi la croissance tumorale *in vivo* (O'Reilly 1997 ; Dhanabal 1999) sans provoquer de mécanisme de résistance (Boehm 1997). Son mécanisme d'action est encore assez mal défini. Il a été démontré que l'endostatine inhibe la migration des cellules endothéliales en désassemblant le cytosquelette d'actine via l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  (Wickström 2003). Il semble également que l'endostatine puisse entrer en compétition avec le b-FGF et de ce fait perturber la transmission du signal mitogénique (Chang 1999) ainsi que la prolifération cellulaire (Wickström 2004).

#### **4-3 Thrombospondine**

La thrombospondine-1 ou TSP-1 est produite par de nombreuses cellules normales et transformées. Elle joue un rôle dans le switch angiogénique en réprimant la prolifération des cellules endothéliales. L'oncogène p53, très fréquemment muté dans les cancers (environ 55% des cancers), participe à l'induction de la production de TSP-1 et réprime ainsi l'angiogenèse tumorale (Rovensky 1998). Au niveau moléculaire, la TSP-1 induit l'expression de TGF- $\beta$ , qui lui même induit l'expression des TIMP, inhibiteurs de métalloprotéases.

La TSP-1 semble jouer un rôle important dans les traitements anti-cancéreux car son expression est fortement induite lors de traitements à faible dose, tant au niveau tumoral que plasmatique. Expérimentalement, des souris TSP-1<sup>-/-</sup> traitées à faible dose par des agents anti-cancéreux ne répondent plus au traitement alors que celui-ci reste efficace à la dose maximale tolérée. Ceci suggère que la TSP-1 pourrait

jouer un rôle secondaire lors de tels traitements en induisant l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose des cellules endothéliales actives (Bocci 2003).

Il existe de nombreux facteurs pro- et anti-angiogéniques naturels. Les plus importants sont indiqués dans le tableau 5 ci-après.

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
Angiogénine	Angiostatine (fragment du plasminogène)
Angiopoïétine-1	Endostatine (fragment du collagène XVIII)
FGF (acide et basic)	Héparinases
G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)	Interféron $\alpha/\beta/\gamma$
Interleukine-8	Interleukine-12
Leptine	Thrombospondine-1/-2
PIGF	TIMP-1/-2 (inhibiteurs de MMP)
PDGF-BB	TNF- $\alpha$ (dose élevée)
PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor)	
TGF- $\alpha/\beta$	
TNF- $\alpha$ (faible dose)	
VEGF	
VPF (vascular permeability factor)	

Tableau 5 : Facteurs pro- et anti-angiogéniques (liste non exhaustive).

## 5 - Autres acteurs fondamentaux de l'angiogenèse

### 5-1 La matrice extracellulaire

Les rôles de la matrice extracellulaire (MEC) sont multiples. Autour des vaisseaux quiescents, la MEC est composée entre autres de collagène I et IV, de laminine, de protéoglycanes. Elle fournit des points d'ancrage aux cellules endothéliales vasculaires, empêchant les vaisseaux de s'effondrer. Lorsque les cellules

endothéliales migrent, les points de contact avec la matrice sont déstabilisés transitoirement puis reformés lorsque les cellules sont assemblées.

De plus, la fibronectine et la fibrine, autres constituants de la MEC, jouent le rôle de guide pour les cellules endothéliales en migration. Lors de l'angiogenèse, les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice changent beaucoup. Certaines protéines matricielles sont clivées et de nouveaux sites de fixation apparaissent. La coupure protéolytique du collagène IV, initialement lié à l'intégrine  $\alpha_1\beta_1$ , laisse apparaître un site de fixation à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . De même, la MMP-2 coupe le collagène I de façon à créer un site de fixation pour l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Cette protéase étant localisée au niveau des sites d'invasion, elle permet ainsi la migration cellulaire en direction du stimulus angiogénique (Stupack 2004).

Enfin, la matrice extracellulaire participe à la régulation de la formation de néovaisseaux. Le remodelage de la MEC lors de l'angiogenèse requiert sa destruction partielle par les protéases. Celles-ci permettent de modifier l'environnement extracellulaire en alternant entre les phases de destruction et de synthèse de la matrice qui favorisent la prolifération, la migration et la différenciation orientée des cellules endothéliales. Enfin, elles permettent la libération de facteurs angiogéniques contenus dans la MEC tels que b-FGF, VEGF ou le TGF- $\beta$ . Le remodelage protéolytique est donc finement régulé : l'absence de destruction de la MEC empêche tout déplacement de cellules endothéliales, alors qu'une trop grande destruction retire le support nécessaire à la migration cellulaire, conduisant là encore à l'inhibition de l'angiogenèse (Carmeliet 2001).

## **5-2 Les protéases**

La dégradation de la MEC est effectuée par des protéases spécialisées dont les principales sont les métalloprotéases ou MMP. On en dénombre actuellement 25 chez les vertébrés. Ces enzymes sont absentes des tissus sains ou exprimées à un très faible taux, alors que leur expression augmente dans les tissus malins. Ces protéinases zinc-dépendantes sont sécrétées sous forme inactive ou pro-MMP par les cellules stromales. Leur activité est régulée au niveau transcriptionnel par des

inhibiteurs spécifiques les TIMPs (tissue inhibitors of metalloprotease) et les cytokines comme le b-FGF (John 2001).

Après activation des MMP, le comportement cellulaire est modifié via des molécules transmembranaires telles que les intégrines qui interagissent avec les constituants extracellulaires des matrices et le cytosquelette. En dégradant la MEC, les protéases altèrent le microenvironnement cellulaire et participent au relargage, à l'activation et à la biodisponibilité de facteurs de croissance. Ainsi, la survie, la prolifération et la migration cellulaire sont régulées par les MMP.

Dans les tumeurs, l'expression des MMP, MMP-2 et MMP-9 en particulier, est généralement augmentée, essentiellement au niveau où les processus d'invasion sont actifs (Lelongt 2002).

### **5-3 Molécules d'adhésion CE / MEC**

La matrice extracellulaire (MEC) régule l'environnement cellulaire. Les changements de composition de la MEC peuvent altérer la sécrétion de certains composants et / ou entraîner un remodelage intensif des interactions cellules / matrice (Brooks 1996). Parmi les molécules d'adhésion intervenant dans ces changements, intégrines mises à part, la VE-cadhérine (Vascular endothelial-cadherin) et le CD31 ou PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) sont des molécules d'adhésion cellule / cellule exprimées précocement sur les angioblastes. CD31 et PECAM-1 sont présents au niveau de diverses cellules hématopoïétiques alors qu'au contraire, la VE-cadhérine est plus spécifique des cellules endothéliales. Elles sont impliquées dans les jonctions inter-cellules endothéliales nécessaires à la formation du lumen, à la perméabilité vasculaire ainsi qu'à la polarité cellulaire (George 1993 ; Yang 1993). La VE-cadhérine est en contact avec le cytosquelette d'actine via un complexe moléculaire comprenant la caténine. Toutes ces interactions cellules / cellules empêchent la migration cellulaire et contribuent ainsi à la stabilisation des vaisseaux. Lors de l'angiogenèse, le VEGF participe à l'affaiblissement des jonctions intercellulaires (Dejana 1996).

## 6 - Rôle particulier des intégrines

### 6-1 Caractéristiques générales

Les intégrines sont des récepteurs cellulaires exprimés par les cellules adhérentes des organismes multicellulaires, de manière constitutive ou après activation cellulaire et reconnaissant certains constituants de la matrice extracellulaire. Ce sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  transmembranaires associées pour former 24 intégrines différentes. On connaît actuellement 18 sous-unités  $\alpha$  et 8  $\beta$ . **Les intégrines sont fortement exprimées sur certains types cellulaires : fibroblastes, plaquettes, cellules tumorales et cellules endothéliales néoformées.** Au niveau de ces dernières, leur expression est autant basale qu'apicale ; les intégrines sont donc en contact avec la circulation (Conforti 1992).

Les intégrines ont des rôles dans l'agrégation plaquettaire, les fonctions immunitaires et les processus de réparation et d'invasion tissulaire. Les intégrines assurent notamment les interactions entre les microfilaments d'actine du cytosquelette des cellules endothéliales et certains constituants spécifiques de la MEC. Elles reconnaissent notamment le collagène, la laminine, la fibronectine ou la vitronectine (Rovensky 1998). Ces récepteurs cellulaires ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque mais forment des complexes, regroupés sur les rafts lipidiques membranaires, avec des kinases et autres protéines qui transmettent des informations de part et d'autre des cellules vasculaires afin que celles-ci soient en coordination avec leur environnement (Jin 2004). Les informations transmises incluent des variations intracellulaires de calcium et de pH, la synthèse d'inositol ainsi que des phosphorylations de diverses protéines, telles que FAK, Src ou Ras, conduisant à la formation de signaux de survie. Les intégrines peuvent transmettre des signaux communs ou spécifiques d'un type d'intégrine.

Leurs rôles principaux lors de l'angiogenèse sont la survie cellulaire, la prolifération, et la migration des cellules endothéliales (Giancotti 1999 ; Rüegg 2003).

## 6-2 L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est **surexprimée lors de l'angiogenèse** et du remodelage vasculaire **au niveau des cellules endothéliales**. Il est à noter que les vaisseaux quiescents des tissus sains n'expriment pas ou très faiblement cette intégrine, comme le montre le tableau 6 (Max 1997 ; Brooks 1994). On la retrouve également, à plus faible taux, sur les cellules épithéliales et intestinales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et les ostéoclastes ainsi que certaines cellules rénales (Natali 1997). Par ailleurs, **certaines cellules tumorales surexpriment cette intégrine. La surexpression localisée et temporaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est un facteur fondamental dans le choix de cette molécule comme cible de l'angiogenèse.**

Tissu		Proportion de microvaisseaux $\alpha_v\beta_3^+$			
		0-30%	31-50%	51-70%	71-100%
Colon	Malin n = 15		3	9	3
	Sain n = 5		1	4	
Pancréas	Malin n = 10	1	1	5	3
	Sain n = 5	1	3	1	
Poumon	Malin n = 13	2	2	7	2
	Sain n = 3	2	1		
Sein	Malin n = 12		6	6	
	Sain n = 3	3			

Tableau 6 : Proportion de vaisseaux  $\alpha_v\beta_3^+$  sur des lames histologiques.

D'après Max 1997.

### **a- Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$**

La structure cristallographique de la partie extracellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été découverte par l'équipe du Pr. Arnaout, Laboratoire de Biologie Structurale, Massachusetts en 2001 (Figure 19).

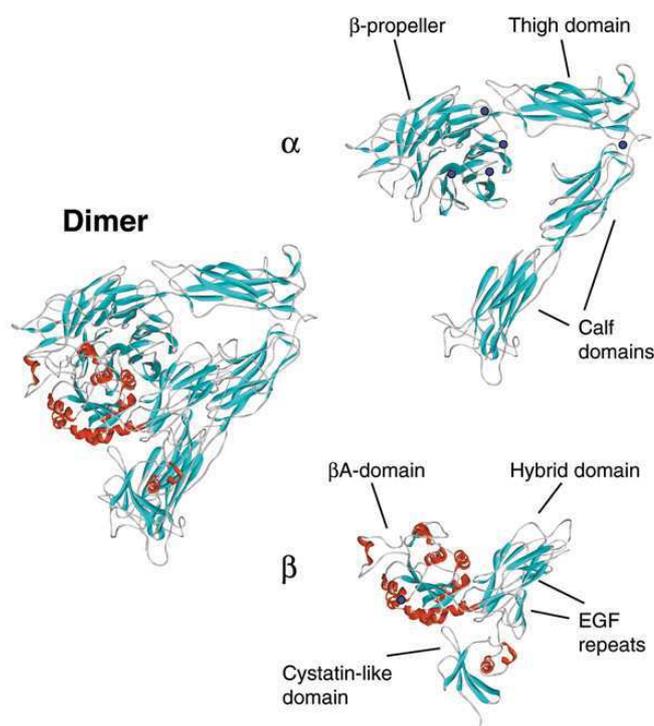


Figure 19 : Structure extracellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . D'après Humphries 2002, adapté de Xiong 2001.

**La plupart des ligands de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  interagissent avec celle-ci par une séquence peptidique RGD.** Bien que le modèle d'activation de l'intégrine ne soit pas encore certain, il pourrait s'agir d'un mécanisme en deux étapes : le premier stade à faible affinité pour le ligand serait activé par des événements intracellulaires et conduirait à un stade de haute affinité. Ce dernier est caractérisé par un changement de conformation observé par cristallographie. L'interaction intégrine / ligand est stabilisée par la présence de cations (Xiong 2002). Il est admis que la sous-unité  $\alpha_v$  lie l'acide aminé arginine (R ou Arg) de la séquence peptidique RGD reconnue, au niveau de la région hélice- $\beta$  alors que l'acide aminé acide aspartique (D ou Asp) se lie à la sous-unité  $\beta_3$  au niveau du domaine  $\beta A$  (Wittekindt 2004 ; Shimaoka 2003). La glycine (G ou Gly) n'interagit pas de manière spécifique avec les différents domaines mais agit comme un espaceur. L'ensemble du site de reconnaissance est très confiné puisque les contacts s'effectuent dans une zone de 350 Å<sup>2</sup> environ. Les liaisons RGD / intégrine sont essentiellement de nature électrostatique due aux charges positives de l'arginine et négatives de l'acide

aspartique, et pour une moindre partie de nature hydrophobe. Les résidus adjacents au motif RGD contribuent de manière essentielle à la liaison et à sa spécificité (Takagi 2004).

Les peptides généralement utilisés lors de tests négatifs possèdent soit la structure RAD soit RGE. La structure RAD possède un groupement méthyle sur l'alanine qui induit un changement de conformation des acides aminés adjacents, suffisant à rendre les liaisons électrostatiques avec le récepteur instables ; ceci permet de dire que les peptides RAD sont des peptides non spécifiques de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

### ***b- Rôles de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$***

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est capable de lier différents ligands comme la fibronectine et la vitronectine (cf. Tableau 7) grâce au motif peptidique RGD (Arginine - Glycine - Acide aspartique) qu'ils contiennent. Elle est activée en présence de VEGF, de b-FGF, de TGF- $\beta_1$  (Gloe 2002 ; Brooks 1994 ; Ruoslahti 1994 ; Friedlander 1995) et en conditions d'hypoxie. Il semblerait qu'elle soit par ailleurs en relation directe avec les récepteurs VEGF-R2, PDGF-R2 et IR (insuline receptor) (Eliceiri<sup>b</sup> 2001). Il semblerait également que certains inhibiteurs naturels de l'angiogenèse (endostatine, angiostatine, TSP-1 et tumstatine) exercent leur action en liant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  entraînant, par exemple, la dissociation des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire (Ilvanainen 2003).

Chez les souris, le knock-out de la partie  $\alpha_v$  entraîne la mort *in utero* ou quelques jours après la naissance. En revanche, celui de la partie  $\beta_3$  entraîne moins de conséquences : les souris sont viables et fertiles mais subissent des hémorragies du fait de l'absence de l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  au niveau des plaquettes. L'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  semble être compensée partiellement par l'expression des intégrines  $\alpha_v\beta_5$  et  $\alpha_5\beta_1$  (Eliceiri 2000). Toutefois, malgré le rôle central de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , la délétion des gènes codant pour  $\alpha_v$  et  $\beta_3$  n'empêche ni la vasculogenèse ni l'angiogenèse, ce qui rend difficile l'explication des rôles précis de cette intégrine. De plus, les souris  $\beta_3$ -null, comme les  $\beta_5$ -null, développent une angiogenèse très active en réponse au VEGF, à l'hypoxie ou au développement tumoral (Reynolds 2002).

(a) Survie cellulaire :

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  participe à la survie cellulaire car l'administration d'antagonistes de l'intégrine entraîne la mort des cellules vasculaires (Figure 20). Les intégrines non liées ou liées à des antagonistes recrutent l'activation de caspases, notamment les caspases 8 et 9, menant la cellule à l'apoptose (Kumar 2003). La sous-unité  $\beta_3$  joue ici un rôle prépondérant ; les intégrines regroupées en clusters et non liées ou liées à un antagoniste, induisent l'apoptose via le domaine intracellulaire de  $\beta_3$ . Celui-ci semble réprimer un inhibiteur de caspase-8, conduisant ainsi à son activation. Ce programme de mort cellulaire est indépendant de l'anoïkis ou mort cellulaire due à l'absence d'adhésion (Stupack 2001 ; Chen 2001).

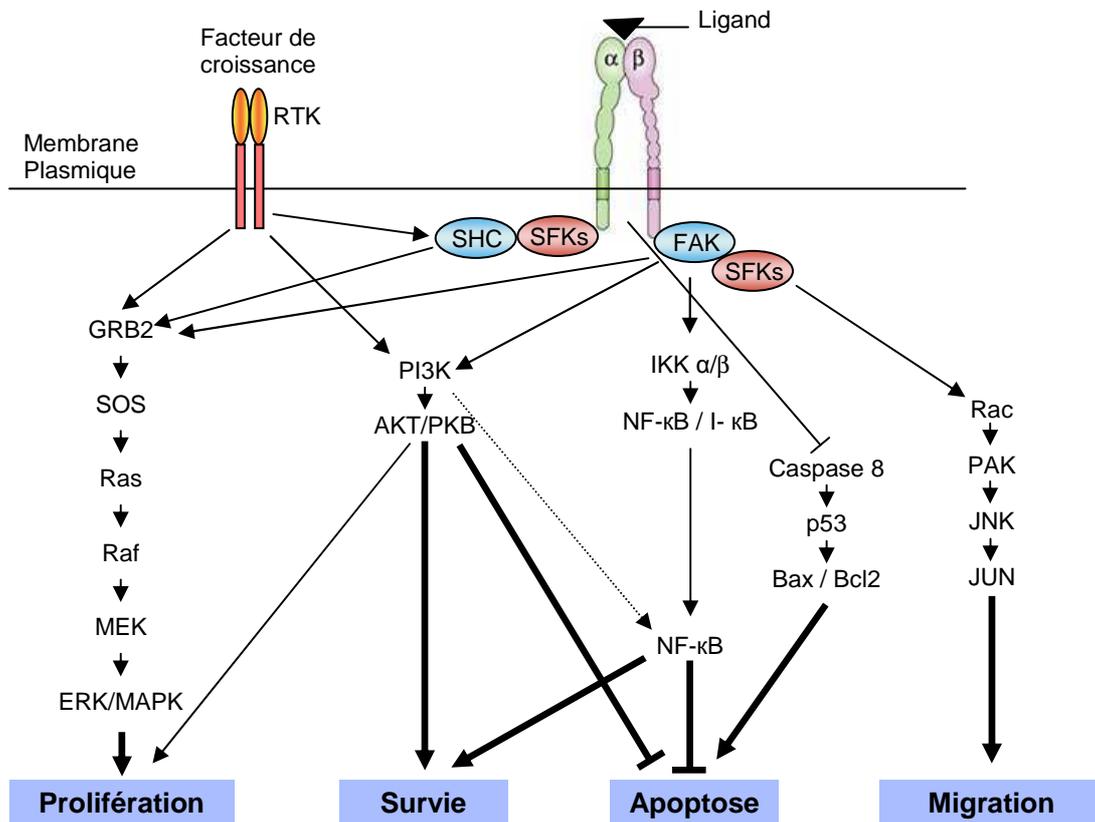
Au contraire, les intégrines liées à des constituants de la matrice extracellulaire entraînent, au niveau moléculaire, la transduction de messages intracellulaires conduisant à l'activation de l'oncogène Ras, la phosphorylation de FAK (Focal Adhesion Kinase) ou encore de la PI3-K (phosphatidyl-inositol 3-kinase). Ceci déclenche d'une part, l'inactivation des protéines pro-apoptotiques Bad et caspase-9 et la synthèse de cyclines contribuant au signal de survie et à la progression du cycle cellulaire (Eliceiri<sup>b</sup> 2001). D'autre part, le facteur de transcription c-Jun est activé entraînant la synthèse de protéines précoces. Ces deux voies participent à la prolifération cellulaire (Giancotti 1999).

*Il est à noter que la phosphorylation de FAK s'effectue par les domaines cytoplasmiques de sous-unités  $\beta$  regroupées en cluster (Clark 1995) et qu'elle est nécessaire tout au long de la progression du cycle cellulaire en G1.*

De plus, dans l'endothélium activé et les tumeurs, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  réprime l'activité de p53. Ce facteur de transcription induit l'expression de p27<sup>kip1</sup> et p21<sup>waf1/cip1</sup> qui régulent le passage des points de contrôle du cycle cellulaire G1 et G2, et peuvent induire l'apoptose (Sablina 2001). La répression de p53 entraîne donc un effet anti-apoptotique. En effet, la présence d'antagonistes entraîne l'activation de p53 (Scatena 2002 ; Strömblad 1996).

*p53 (non mutée) régule positivement la thrombospondine-1, inhibiteur angiogénique, et négativement le VEGF. Or dans de nombreux cancers, cette protéine est mutée, participant donc au développement tumoral (Jouanneau 1999).*

Une autre voie de survie spécifique à  $\alpha_v\beta_3$  est l'activation et la translocation nucléaire du facteur de transcription **NF- $\kappa$ B**, conduisant à la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire (Scatena 2002).



**Figure 20** : Voies générales de signalisation régulées par les intégrines et les facteurs de croissance (SFK = Famille de tyrosine kinases). Adapté d'après Guo 2004 et Rüegg 2003.

En plus des voies chimiques d'activation de la survie cellulaire, l'organisation du cytosquelette d'actine et la génération de forces de tension participent à la progression du cycle en G1. Il semble en effet que l'étalement des cellules endothéliales soit nécessaire à la traduction de la cycline D1 et la répression de  $p27^{kip1}$ , et donc nécessaire à la survie cellulaire. L'étalement cellulaire qui reflète les forces de tension mécaniques dépendantes des intégrines a ainsi un effet proliférateur (Schwartz 2001).

(b) Adhésion cellulaire :

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  participe à l'adhésion cellulaire en liant certains composés de la MEC tels que la vitronectine, la fibronectine ou le fibrinogène, indépendamment de la présence de facteurs de croissance (Eliceiri 2001). Elle est également capable de coopérer de façon particulière avec le facteur de croissance b-FGF. Cette association entraîne l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B, du facteur de transcription ERK et l'entrée de calcium intracellulaire induisant la réorganisation du cytosquelette, la formation de fibres de stress et l'adhésion cellulaire. L'étalement cellulaire médié par  $\alpha_v\beta_3$  peut s'effectuer même lorsque les motifs de liaison RGD sont très éloignés ; une étude a notamment démontré qu'un espacement de 440 nm des points d'ancrage permet l'étalement cellulaire. De même, un espace de 140 nm entre les motifs RGD permet la formation de contacts focaux et de fibres de stress (Massia 1991).

(c) Migration cellulaire :

La migration cellulaire est un processus régulé par des variations de composants cellulaires et matriciels. La cellule doit acquérir une asymétrie spatiale pour générer les forces nécessaires à son déplacement. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a un rôle majeur dans la migration des cellules endothéliales : la présence d'antagonistes d' $\alpha_v\beta_3$  réduit la mobilité cellulaire en diminuant physiquement les interactions cellules / matrice et / ou en altérant le signal intracellulaire transmis (Rupp 2004). Plus précisément, la sous-unité  $\alpha_v$  semble jouer un rôle fondamental dans l'adhésion cellulaire. L'une des façons de moduler la balance entre adhésion et migration est de modifier l'expression et la distribution des intégrines à la surface cellulaire. Lors de la migration, l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  augmente, notamment au niveau des points focaux du front de migration (Gao 2002). L'activation de l'intégrine est alors  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (Bretscher 1996). Cette caractéristique d'induction se retrouve chez plusieurs intégrines présentes sur le front de migration, alors que leur expression diminue au niveau des uropodes. Il semble que les intégrines soient ainsi « recyclées » de l'arrière à l'avant de la cellule en migration par voie endocytaire (Figure 21) (Lauffenburger 1996) permettant ainsi la création de nouveaux points de

contacts nécessaires à la migration. En revanche,  $\alpha_5\beta_1$  participe à la création de points d'ancrage centraux.

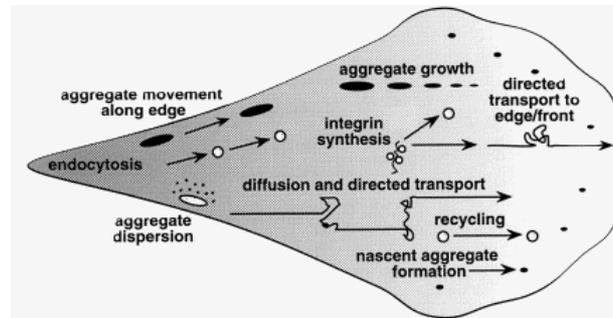


Figure 21 : Recyclage des intégrines lors de la migration cellulaire. D'après Lauffenburger 1996.

**La transmission du signal entraînant la migration cellulaire nécessite le clustering ou regroupement des intégrines.** Lorsque les intégrines activées lient des constituants de la matrice extracellulaire, elles se rassemblent en clusters (Figure 22) en association avec des protéines du cytosquelette telles que la paxilline et la taline, et un complexe enzymatique regroupant entre autres FAK et Src permettant la formation de filaments d'actine. L'adhésion par les intégrines active les GTPases qui régulent le cytosquelette d'actine, entraînant l'assemblage de fibres de stress, des filopodes et des lamellipodes (Figure 23). Les intégrines non liées à la matrice extracellulaire restent diffuses en surface (Schoenwaelder 1999).

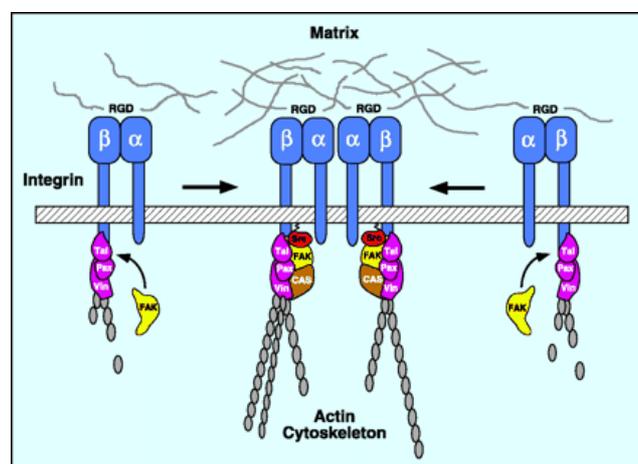
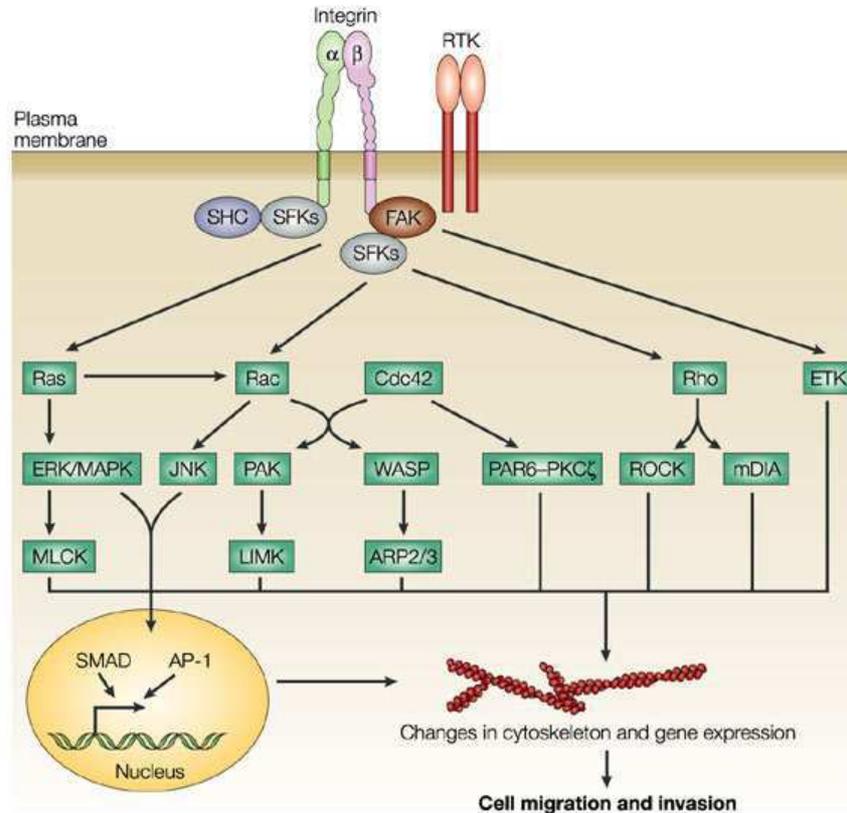


Figure 22 : Cluster d'intégrines et association au cytosquelette. Tal, taline ; Pax, paxilline ; Vin, vinculine ; CAS, p130<sup>CAS</sup>. D'après Giancotti 1999.



**Figure 23 :** Voies de signalisation des intégrines conduisant à la réorganisation du cytosquelette. D'après Guo 2004.

(d) Invasion tumorale et formation de métastases :

On rappelle que les intégrines sont exprimées à la fois par les cellules endothéliales et par certaines cellules tumorales. Les cellules tumorales bénéficient des signaux induits par les intégrines lors de l'initiation, la progression et l'invasion tumorale. Lors de leur développement, les cellules tumorales sont capables d'activer les cellules endothéliales et d'initier ainsi l'angiogenèse nécessaire à leur prolifération et à leur survie via les intégrines. Le rôle des intégrines dans les cancers est très complexe et varie selon le type de cancer et les cellules impliquées. De plus, l'expression des intégrines peut varier de la tumeur primaire aux métastases (Nip 1992).

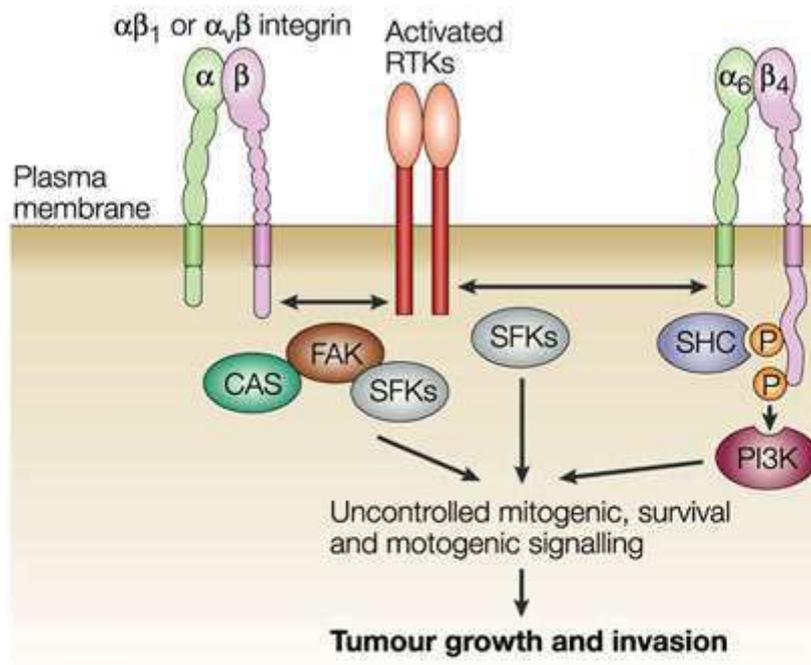
Au cours de leur progression, certaines tumeurs acquièrent la capacité de former des métastases : les mélanomes humains forment, dès les premiers stades de la maladie, des métastases (Brooks 1996). Celles-ci sont issues des tumeurs primaires

après progression de leurs caractères invasifs. L'invasion métastatique est tout d'abord régionale et concerne les ganglions proches puis elle s'étend à certains organes de filtration du sang tels que le foie ou encore les os, poumons et cerveau. Les cellules métastatiques se détachent tout d'abord des cellules voisines puis dégradent la membrane basale et pénètrent dans le réseau sanguin pour atteindre un nouveau site d'invasion. Pour cela, les cellules tumorales régulent l'expression des intégrines selon leur besoin ; l'augmentation du niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est corrélée à l'augmentation de l'invasion et à la formation de métastases (Chattopadhyay<sup>b</sup> 2001).

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est souvent surexprimée par les cancers agressifs (Jin 2004 ; Albelda 1990) et les mélanomes (Montgomery 1994 ; van Leeuwen 1996, Petitclerc 1999). Expérimentalement, le blocage d' $\alpha_v\beta_3$  réprime de manière significative le nombre de métastases et permet d'allonger la durée de vie des animaux (Felding-Habermann 2002). La sous-unité  $\alpha_v$ , plus particulièrement, est fortement impliquée dans la tumorigenèse des mélanomes : alors que des lignées tumorales  $\alpha_v^-$  perdent leur pouvoir tumorigène, celui-ci est restauré suite à la transfection stable de la sous-unité  $\alpha_v$  (Felding-Habermann 1992).

#### i Mécanisme d'action de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Les intégrines présentes en surface des cellules tumorales participent au développement cellulaire par l'activation de FAK (Figure 24). D'une manière générale, les intégrines empruntent les mêmes voies de régulation lors de l'angiogenèse au niveau endothélial et lors de la progression tumorale. Les points importants sont résumés dans la figure 24. Par l'intermédiaire de la voie d'activation de FAK, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  participe à la résistance à l'anoïkis, ou apoptose induite par liaisons à la matrice extracellulaire inappropriées ou absentes, et à la croissance indépendante de l'ancrage des cellules tumorales (Cleardin 1998).



**Figure 24** : Voies d'activation des intégrines lors de la croissance et l'invasion tumorale. D'après Guo 2004.

$\alpha_v\beta_3$  est particulièrement surexprimée lors de la migration et l'invasion dans le stroma, du fait notamment de ses capacités à recruter la métalloprotéase MMP-2 (Guo 2004). La sous-unité  $\beta_3$  recrute la MMP-2 ; la liaison MMP-2 /  $\alpha_v\beta_3$  est alors nécessaire à l'activation et la maturation de la protéase. L'intégrine étant localisée au niveau du front de migration cellulaire, la MMP-2 dégrade la matrice adjacente et facilite l'invasion cellulaire (Silletti PNAS 2001). L'association MMP-2 / intégrine s'effectue de manière RGD-indépendante, ce qui laisse vacant le site de fixation aux composants matriciels possédant le motif RGD et permet la migration cellulaire (Chattopadhyay 2001).

**D'une manière générale, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est un facteur de pronostic des tumeurs solides : cette intégrine ayant un rôle important dans l'angiogénèse et le caractère invasif des tumeurs, son ciblage est particulièrement pertinent pour la recherche de nouveaux traitements contre le cancer.**

## ii Facteurs pronostiques associés à l'angiogenèse

Divers facteurs associés à l'angiogenèse sont prédictifs de l'agressivité de la pathologie. Il a notamment été démontré que la densité microvasculaire intratumorale (DMI), en corrélation directe avec le taux d'expression du VEGF, est un facteur de pronostic dans diverses tumeurs solides : cancer du sein (Weidner 1991), de la prostate, du colon (Takebayashi 1996), du poumon (Brock 2002), du cerveau (Meitar 1996), cancer gastrique, mélanome... Non seulement, le taux de récurrence des tumeurs augmente avec la vascularisation, mais le pouvoir métastatique est également en corrélation avec la DMI, la présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et le taux d'expression du VEGF.

En effet, la présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est un facteur de mauvais pronostic et d'agressivité, notamment pour les mélanomes (Felding-Habermann 2002), le cancer du sein (Brooks 1995), le cancer du colon (Vonlaufen 2001) et les glioblastomes (Bello 2001) ; l'expression de l'intégrine est effectivement corrélée aux temps et taux de survie des patientes atteintes de cancer du sein (Gasparini 1998). Par ailleurs, le taux d'expression du VEGF est corrélé à l'agressivité de la pathologie et donc au taux de survie (Gasparini 2000). La DMI semble également être prédictive de la réponse aux traitements anti-cancéreux (Hasan 2002).

Les méthodes de mesure de la DMI sont essentiellement immunohistochimiques, à la suite de prélèvements invasifs. La mise en place d'une méthode non invasive de mesure de la DMI, directe ou indirecte, semble nécessaire afin de déterminer la probabilité de réussite du traitement anti-cancéreux et de survie du patient.

### (e) Intégrine $\alpha_v\beta_3$ : pro- ou anti-angiogénique ?

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est particulièrement importante car elle est surexprimée lors de l'angiogenèse (Fons 2000 ; Brooks 1994). Elle a longtemps été considérée comme « régulateur positif » de l'angiogenèse car l'action d'antagonistes pharmacologiques supprime l'angiogenèse pathologique (Jain 2003). Liée à des composants de la matrice extracellulaire, elle induit la prolifération des cellules endothéliales par

l'activation de la MAPK (mitogen-activated protein kinase), la suppression de l'activité de p53 et la réduction de l'expression de p21<sup>waf1</sup>. Elle augmente la survie cellulaire par l'activation de NF- $\kappa$ B et l'augmentation du rapport Bcl-2/Bax et par l'inactivation de la caspase 8. Elle stimule la mobilité cellulaire et est colocalisée à la MMP-2 aux sites d'invasion (Rüegg 2003).

Son rôle est en fait plus complexe et encore mal compris : des délétions ont montré qu'elle joue le rôle de régulateur négatif, puisqu'elle inhibe l'angiogenèse en supprimant le signal de survie cellulaire médié par VEGF et son récepteur Flk-1 (Robinson 2004). De plus, la délétion de la sous-unité  $\beta_3$  augmente l'angiogenèse tant physiologique que pathologique. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est également capable d'activer les thrombospondines ou d'autres inhibiteurs d'angiogenèse tels que la tumstatine, l'endostatine ou l'angiostatine.

Par conséquent, si l'on considère que les agents pharmacologiques type cyclo(RGD) sont en fait des agonistes de la fonction « régulateur négatif » de l'intégrine, alors les données vont dans le même sens car :

- le knock out des gènes  $\alpha_v$  et  $\beta_3$  n'empêche pas l'angiogenèse (défectueuse),
- l'administration d'agonistes active la fonction de régulateur négatif et inhibe ainsi l'angiogenèse (Hynes 2002).

Trop de données manquent encore pour déterminer le rôle exact de cette intégrine ; elle pourrait être à la fois régulateur négatif et positif selon les substrats et le contexte cellulaire. De plus, il existe des interactions entre  $\alpha_v\beta_3$  et le récepteur au VEGF, VEGF-R2. Une des fonctions de l'intégrine pourrait donc être de réguler la voie de signalisation du VEGF / VEGF-R2 en réprimant l'expression et la fonction du récepteur ; l'absence de l'intégrine conduirait à sa dérégulation (Reynolds 2002).  $\alpha_v\beta_3$  semble jouer un rôle de régulateur entre l'induction et la répression de l'angiogenèse.

(f) Liaison / Activation de l'intégrine : importance du ligand.

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  reconnaît le motif peptidique RGD (Arginine - Glycine- Acide aspartique) de la plupart de ses ligands. D'autres intégrines ont également la capacité de reconnaître le motif RGD, notamment  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_{11b}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$  et  $\alpha_v\beta_8$ . Ce sont les résidus adjacents qui déterminent la spécificité et l'affinité des liaisons aux intégrines (Takagi 2004).

Il semble que le nombre de ligands ait une influence importante sur la transmission du signal (Figure 25).

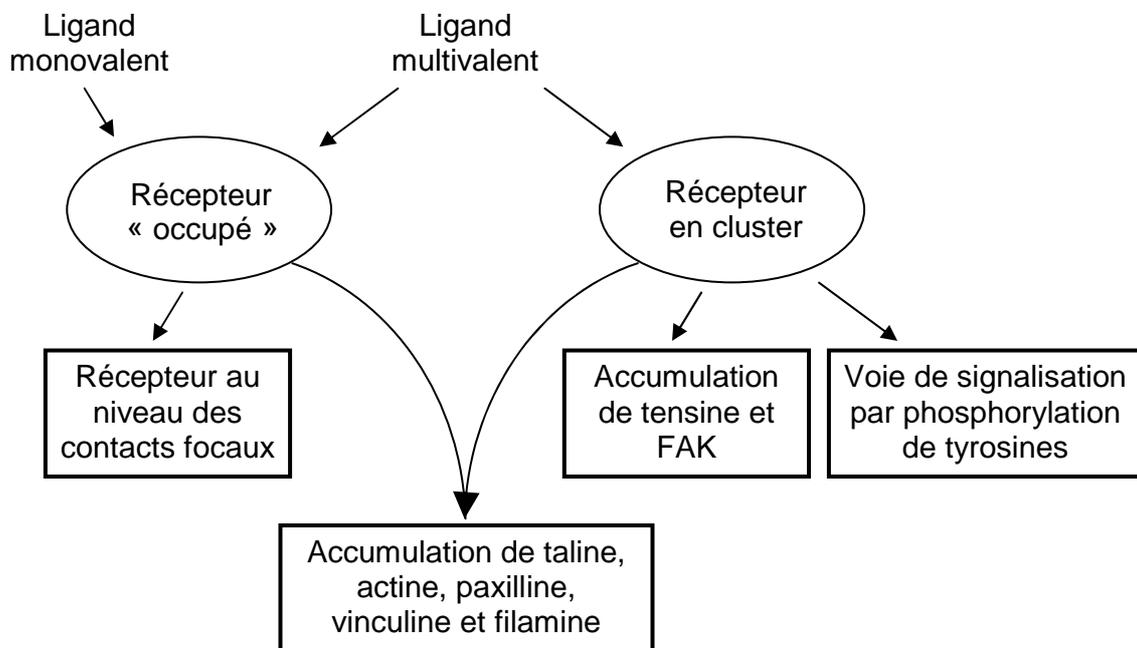


Figure 25 : Rôles de l'intégrine en réponse à différents ligands extracellulaires.

Adapté d'après Miyamoto 1995.

En effet, la fixation d'un monomère de vitronectine (Bhattacharya 1995) ou d'une molécule de cyclo(RGD) monomérique (Miyamoto 1995) sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  n'entraîne pas de cascade d'activation contrairement à un polymère. Les anticorps et autres ligands multivalents, activent la phosphorylation de protéines intracellulaires. Ces molécules sont capables d'induire la formation de clusters d'intégrines, élément nécessaire à l'activation de l'intégrine et donc à la phosphorylation de protéines qui en découle (Stupack 2002).

Par ailleurs, le mode d'internalisation de la molécule semble dépendre du nombre et / ou de la taille du ligand. Les intégrines sont capables d'induire l'internalisation de certains composés de la matrice extracellulaire pour leur dégradation. Bien que ce mécanisme soit encore mal défini, on sait que l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  entraîne l'internalisation de la vitronectine matricielle et  $\alpha_v\beta_3$  celle de la vitronectine altérée.

Les molécules de petite taille telles que les monomères sont internalisées par phénomène passif ; au contraire les polymères et autres molécules de grande taille sont internalisés par un mécanisme dépendant des intégrines (regroupées en clusters), réduisant le nombre d'intégrines fonctionnelles en surface (Castel 2001). Cette internalisation entraîne par ailleurs le détachement des cellules et donc la mort cellulaire (Schraa 2002).

### **6-3 Autres intégrines participant à l'angiogenèse**

#### ***a- Sous-unité $\beta_1$ :***

La famille des intégrines  $\beta_1$  a été identifiée sous le nom de VLA (Very Late Activation antigens) du fait de leur expression sur les cellules T après leur activation. La sous-unité  $\beta_1$  est associée à de nombreuses unités  $\alpha$  parmi lesquelles  $\alpha_v$  et  $\alpha_5$  sont les plus importantes. On dénombre 4 isoformes de la sous-unité  $\beta_1$  :  $\beta_1A$ ,  $\beta_1B$ ,  $\beta_1C$  et  $\beta_1D$ . Sa délétion entraîne la mort des embryons au stade E5,5 ce qui rend difficile l'évaluation de son rôle. Les deux intégrines  $\alpha_v\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$  sont exprimées au niveau vasculaire. Sous l'activation du VEGF, la sous-unité  $\beta_1$  entraîne l'adhésion et la migration cellulaire. Elle est également responsable de la formation de structures capillaires sur le collagène de type I.

#### ***b- Intégrine $\alpha_5\beta_1$ :***

Intégrine pro-angiogénique fixant spécifiquement la fibronectine,  $\alpha_5\beta_1$  est surexprimée sur les cellules T infectées par le VIH, certains cancers du sein et joue un rôle important dans la formation de métastases lymphatiques (Cox 1994). Son rôle est essentiel lors des premiers stades de l'angiogenèse (Robinson 2004). Elle

est notamment capable de capter la fibronectine sécrétée et de la convertir en matrice (Ruoslahti 1999). Son knock-out entraîne la mort embryonnaire et l'action d'inhibiteurs spécifiques bloque l'angiogenèse. Comme pour  $\alpha_v\beta_3$ , son expression augmente lors de l'angiogenèse. Elle contribue à la survie cellulaire en condition de stress, tel que le manque de facteurs de croissance, en induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. En présence de b-FGF, elle participe à l'angiogenèse notamment à la formation du lumen (Bayless 2000) et la migration cellulaire (Jin 2004). De plus, sa liaison à la matrice est nécessaire lors de l'angiogenèse induite par les facteurs de croissance et dépendante d' $\alpha_v\beta_3$  (Eliceiri 2001). La sous-unité  $\beta_1$  régule l'expression des intégrines  $\alpha_v$ ; elle diminue l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en réprimant la stabilité de l'ARNm de la sous-unité  $\beta_3$  et au contraire, induit l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  aux niveaux traductionnel ou post-transcriptionnel (Retta 2001).

Cette intégrine est également une cible potentielle pour des agents anti-angiogéniques car des anticorps monoclonaux spécifiques bloquent l'angiogenèse induite par le VEGF dans des modèles aviaires et murins. Le premier antagoniste d' $\alpha_5\beta_1$ , un anticorps monoclonal, est récemment entré en essai clinique de phase II dans le traitement de carcinomes rénaux métastatiques (<http://www.nci.nih.gov/clinicaltrials>).

### ***c- Intégrine $\alpha_v\beta_5$ :***

$\alpha_v\beta_5$  est exprimée sur de nombreux types cellulaires et intervient dans l'adhésion, la migration et l'angiogenèse.  $\alpha_v\beta_5$  est le récepteur principal de la vitronectine; elle est par ailleurs capable d'endocyter et de dégrader la vitronectine altérée de la matrice (Panetti 1993). Cette intégrine est capable d'induire l'angiogenèse en réponse aux facteurs de croissance TGF- $\alpha$  ou VEGF (Friedlander 1995; Eliceiri 2000). L'action d'antagonistes d' $\alpha_v\beta_5$  réprime l'angiogenèse tumorale en induisant l'apoptose des cellules endothéliales. Comme la plupart des intégrines,  $\alpha_v\beta_5$  est activée en présence de cations bivalents, notamment  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (Kerr 2000). Elle présente une forte homologie avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  puisque les sous-unités  $\beta$  ont 53% d'homologie, et peut lier des peptides contenant le motif RGD. Elle est par ailleurs associée avec le

VEGF-R2 par son extrémité cytoplasmique et interagit la voie de signalisation de celui-ci en régulant l'adhésion et la migration cellulaire.

#### **d- Intégrine $\alpha_{11b}\beta_3$ :**

Cette intégrine est très proche sur les plans structurel et fonctionnel de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Du fait de cette homologie, elle est également capable de reconnaître le motif peptidique RGD, notamment sur la fibronectine ; ce sont les acides aminés adjacents à la séquence RGD qui influent sur l'affinité de la liaison. L'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  est essentiellement exprimée sur les plaquettes et les mégacaryocytes ; son niveau d'expression varie en fonction de l'état d'activation des cellules (de 40 000 à 80 000 intégrines par cellules). Elle régule l'agrégation, l'étalement cellulaire ainsi que la rétraction du caillot (Shattil 1995).

Le tableau 7 rassemble les différentes intégrines et leurs ligands respectifs.

<b>Intégrines</b>		<b>Ligands</b>
$\beta_1^*$	$\alpha_1$	Laminine, collagène
	$\alpha_2$	Laminine, collagène, $\alpha_3\beta_1$
	$\alpha_3$	Laminine, collagène, fibronectine, épiligrine, entactine, $\alpha_2\beta_1$
	$\alpha_4^*$	Fibronectine (CS-1), VCAM
	$\alpha_5^*$	Fibronectine (RGD), L1-CAM, fibrinogène
	$\alpha_6$	Laminine, mérosine, kalinine
	$\alpha_7^*$	Laminine
	$\alpha_8^*$	Fibronectine
	$\alpha_9$	Ténascine
	$\alpha_{10}$	Collagène
	$\alpha_{11}$	Collagène
$\beta_2$	$\alpha_L$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	$\alpha_M$	iC3b, fibrinogène, facteur X, ICAM-1
	$\alpha_X$	iC3b, fibrinogène
$\alpha_v^*$	$\beta_1^*$	Fibronectine, vitronectine
	$\beta_3^*$	Fibronectine, vitronectine, facteur de von Willebrand (fvW), collagène dénaturé, thrombospondine, Del-1
	$\beta_5^*$	Vitronectine, ostéopontine, Del-1
	$\beta_6^*$	Fibronectine
	$\beta_8^*$	Fibronectine
$\alpha_{11b}\beta_3^*$	Fibronectine, fibrinogène, fvW, thrombospondine, vitronectine	
$\alpha_6\beta_4$	Laminine	
$\alpha_4\beta_7$	Fibronectine (CS-1), VCAM, MADCAM	
$\alpha_E\beta_7$	Cadhérine-E	

**Tableau 7** : La famille des intégrines. Les intégrines capables de reconnaître le motif peptidique RGD sont indiquées par un astérisque. D'après Jin 2004.

*En résumé...*

**Les néovaisseaux tumoraux sont de morphologie et de constitution anormales. D'organisation chaotique, ils sont constitués de cellules endothéliales quiescentes et d'autres activées. Ces dernières expriment à leur surface certains marqueurs spécifiques tels que les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  qui reconnaissent le motif peptidique RGD de ses ligands. Ces néovaisseaux forment une cible de détection potentielle commune à l'ensemble des tumeurs solides en progression.**

**Une molécule pertinente et spécifique de l'angiogenèse tumorale doit permettre la caractérisation tumorale (amélioration du diagnostic et information pronostique) et l'évaluation de l'efficacité du traitement.** Les avancées de la recherche en thérapie anti-angiogénique ont été récompensées avec la mise sur le marché aux États-Unis en 2004 de l'Avastine et chaque année, des millions d'euros sont investis dans ce domaine. De même, les chercheurs spécialisés dans chacune des modalités d'imagerie tentent de mettre au point de nouveaux outils diagnostiques.

## IV - Intérêt du motif « RGD » comme ligand : synthèse des études utilisant des peptides RGD

Depuis plus de 20 ans, l'angiogenèse et ses mécanismes de régulation sont étudiés. Les axes de recherche sont divisés en deux groupes : la régulation de l'angiogenèse à but thérapeutique et plus récemment l'imagerie de l'angiogenèse à visée diagnostique. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , surexprimée lors de l'angiogenèse au niveau des cellules endothéliales, est avec certains facteurs angiogéniques l'une des cibles les plus pertinentes de l'angiogenèse tumorale ; c'est pourquoi le couple RGD / intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est particulièrement étudié.

### A - Études *in vitro*

#### 1 - Séquence RGD : attachement et étalement cellulaire

Dans les années 1980, les séquences nécessaires à l'attachement de la fibronectine aux cellules ont été découvertes (Pierschbacher 1983). L'importance du motif peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) est apparue dès les premiers tests d'inhibition de l'attachement des cellules à la fibronectine (Pierschbacher 1984) ; en effet, les peptides synthétiques contenant le motif RGD, ajoutés au milieu de culture, entraînent le détachement des cellules à la fibronectine (Figure 26).

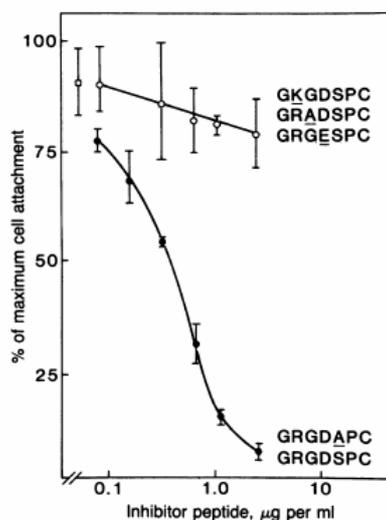


Figure 26 : Inhibition de l'attachement de cellules rénales de rat (NRK) à la fibronectine en présence de peptides. D'après Pierschbacher 1984.

De plus, le changement d'un acide aminé du triplet RGD altère le détachement des cellules à la fibronectine, comme le montre le tableau suivant (Tableau 8), ainsi qu'à la vitronectine (Hayman 1985). Afin d'augmenter la stabilité des composés RGD linéaires, les dérivés du RGD ont été rapidement cyclisés.

Peptide et séquence	Interaction avec la cellule
G- <b>R-G-D</b> -S-P-C	Actif
G- <b>K-G-D</b> -S-P-C	Inactif
G- <b>R-A-D</b> -S-P-C	Inactif
G- <b>R-G-E</b> -S-P-C	Inactif
G- <b>R-G-D-A</b> -P-C	Actif
Fibronectine site d'attachement :	
A-V-T-G- <b>R-G-D-S</b> -P-A-S-S-K	Actif
Fibronectine second site d'attachement :	
G-H-V-P- <b>R-G-D-V</b> -D-Y-H-L-Y	Actif
Fibronectine site de phosphorylation :	
V-Q-A-D- <b>R-E-D</b> -S-R-E	Inactif
Collagène $\alpha 2(I)$ :	
A-P-G-L- <b>R-G-D</b> -T-G-A-T-G-R	Actif
Thrombine :	
G-E-G-K- <b>R-G-D</b> -A-C-E-G-D-S	Actif

Tableau 8 : Séquences peptidiques et attachement cellulaire. D'après Pierschbacher 1984.

En condition standard de culture, les cellules endothéliales expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  essentiellement au niveau des points d'adhésion focaux, ce qui permet l'étalement et la bonne adhésion cellulaire. L'ajout d'antagonistes mono- ou multivalents entraîne la dissociation des points d'adhésion et une redistribution des intégrines en surface. Les cellules s'arrondissent et se détachent du support comme le montre cet exemple de S. Castel en 2000 (Figure 27). Il faut noter que la capacité de détachement varie selon le type de cellules, le support utilisé et la dose. En effet les cellules peuvent posséder différentes molécules d'adhésion, ayant plus ou moins d'affinité avec le support défini ; les peptides RGD n'interagissant qu'avec un nombre limité de ces molécules, les résultats sont donc variables.

Les antagonistes monovalents semblent être internalisés par mécanisme passif alors que les molécules multivalentes seraient endocytées avec l'intégrine. Il semble également que les antagonistes multivalents soient dégradés via les lysosomes lors de ce processus (Schraa 2002) comme le montrent les figures 27 et 28.

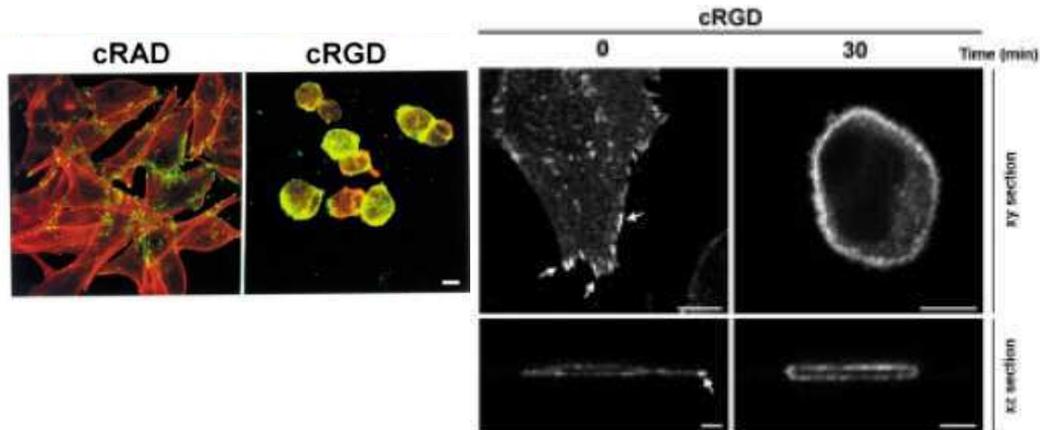


Figure 27 : Effet d'antagonistes (jaune) sur l'étalement cellulaire (actine rouge) et la localisation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . A gauche, le cRAD peptide contrôle n'a pas d'effet sur la forme des cellules  $\alpha_v\beta_3^+$  alors que le cRGD entraîne leur arrondissement. A droite, les intégrines initialement localisées au niveau des points focaux se redistribuent autour de la cellule en présence d'antagonistes. D'après Castel 2000.

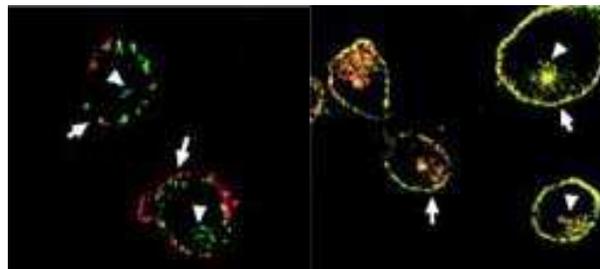


Figure 28 : Intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (rouge) et antagonistes (vert). Alors que l'intégrine (flèche) reste en surface, le cRGD (gauche, pointe) est internalisé. Les anticorps comme 17E6 (droite) sont endocytés avec l'intégrine. D'après Castel 2001.

## 2 - RGD et formation de capillaires

Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  sont impliquées dans la formation du lumen. Les peptides RGD ajoutés au milieu de culture limitent la formation de vacuoles. Étant donné que les deux intégrines interviennent dans ce processus, le phénomène est seulement ralenti en présence de peptides RGD. L'addition simultanée d'antagonistes des deux intégrines provoque au contraire la répression quasi totale de la formation de vacuoles (Bayless 2000).

## 3 - RGD et migration / invasion cellulaire

La fixation de peptides RGD à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Cheresh 1987) réprime la capacité d'invasion des cellules tumorales, de manière dose-dépendante, réversible et non toxique (Figure 29) (Gehlsen 1988 ; Nicosia 1991).

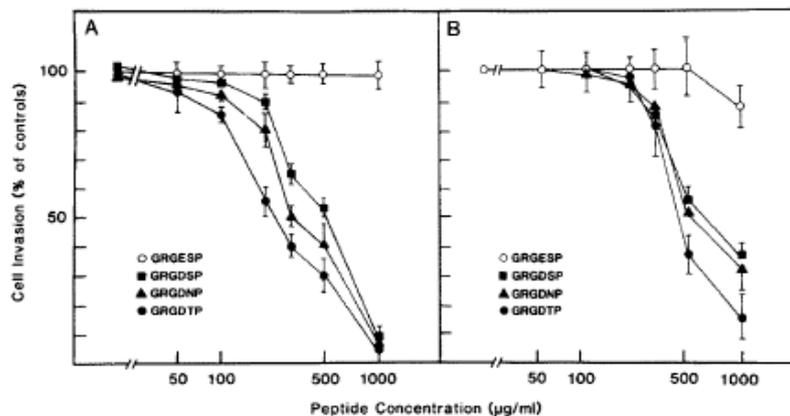


Figure 29 : Effet de peptide RGD sur l'invasion de cellules tumorales : (A) mélanome A375M, (B) glioblastome *RuGli*. D'après Gehlsen 1988.

## 4 - RGD et peptides multivalents

Bien que les peptides monovalents puissent lier l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , il semble que les ligands multivalents se fixent davantage et / ou avec une meilleure affinité et soient capables d'induire les voies d'activation intracellulaires de l'intégrine. Ceci pourrait être dû à des changements de conformation des ligands ou à une augmentation locale de la densité. La fixation des composés polyvalents entraîne, ou s'effectue, grâce au regroupement en clusters des intégrines (Zanetti 1994).

## **B - Études *in vivo***

### **1 - Imagerie**

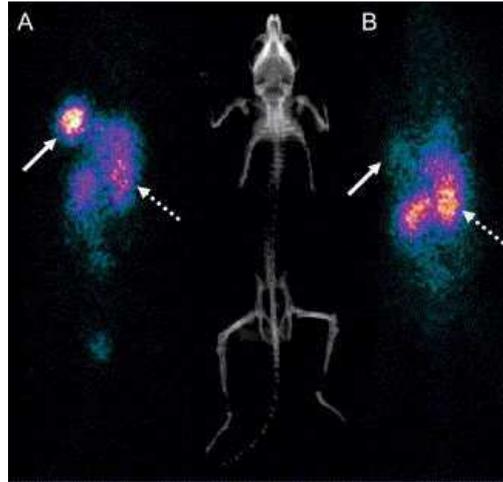
#### **1-1 Le cyclo(RGD)**

Très peu d'études ont été effectuées avec des peptides RGD non cycliques (Fani 2006), car la cyclisation permet d'augmenter la sélectivité à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  par rapport à  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Le cyclo pentapeptide (RGDfV) ou cRGD a été modifié à plusieurs reprises afin d'augmenter sa spécificité, son élimination par voie rénale et sa stabilité. Il a rapidement été marqué au  $^{18}\text{F}$  afin de permettre son utilisation en TEP. Chez l'animal, son élimination est principalement rénale et secondairement hépatobiliaire. La captation tumorale avoisine les 1 % DI / g à 1h p.i. sur un modèle d'adénocarcinome greffé à la souris nude (Ogawa 2003). Certains essais ont été réalisés avec un marquage à l'iode 125 ou au technétium 99m.

#### **1-2 Imagerie des dérivés du cRGD**

De nombreuses équipes utilisent les dérivés du RGD dans le but de mettre au point un radiopharmaceutique à visée diagnostique.

L'équipe de Mitra A., Université du Maryland, États-Unis, a récemment obtenu des images (Figure 30) au technétium de bonne qualité en utilisant un polymère de RGD (Mitra 2005). La captation sanguine très faible permet d'obtenir d'excellents rapports signal / bruit à 24h, proche de 18. À ce temps, les rapports tumeur / foie et tumeur / rate sont proches de 1 et le rapport tumeur / rein avoisine les 0,5. Dans ce modèle de tumeur prostatique greffée à la nude, la captation tumorale est de 4,6 % DI / g, 24h p.i. Bien que le rapport tumeur / sang augmente de manière significative à 48 et 72h, étant donné la demi-vie courte du technétium 99m (6,02 heures), les doses injectées ne permettent plus de visualiser la tumeur avec précision.



**Figure 30** : Scintigraphie d'une souris portant une tumeur (flèche pleine) 24h p.i. de  $^{99m}\text{Tc}$ -copolymer-RGD4C (A) ou du contrôle non spécifique (B). Reins : flèche discontinue. D'après Mitra 2005.

L'équipe de P. Conti a travaillé avec différents composés portant le RGD et marqués avec différents isotopes ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  ou  $^{18}\text{F}$ ) pour l'imagerie TEP et TEMP. Tous ont une clairance sanguine rapide et des ratios tumeur / sang et tumeur / muscle élevés. L'élimination s'effectue principalement par voie rénale et de manière plus faible par voie hépatobiliaire. De manière générale, ils ont observé que le coulage au PEG (polyéthylène glycol) permet une meilleure rétention tumorale (Chen<sup>c</sup> 2004). Dans les expériences d'imagerie, ils utilisent l'équivalent de 10 mg / kg de cRGD par animal.

La captation tumorale varie selon le type de tumeur greffée, le peptide et le radioisotope employé. Par exemple, le modèle MDA-MB-435 (carcinome mammaire) capte environ 1,5 à 3 % DI / g (Chen<sup>d</sup> 2004) alors que le modèle U87-MG (glioblastome) capte de 2 à 5 % DI / g (Chen<sup>b</sup> 2004).

### **1-3 Complémentarité RGD / $^{18}\text{F}$ -FDG**

Lors d'une expérience, l'équipe de P. Conti a comparé le  $^{18}\text{F}$ -FDG au  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-PEG-(RGD)<sub>2</sub>, peptide RGD dimérique, pour la détection de tumeurs pulmonaires et de ses métastases. Alors que le  $^{18}\text{F}$ -FDG permet la détection de la tumeur primaire, le peptide RGD permet également de visualiser la métastase controlatérale pulmonaire (Figure 31). Ceci prouve que les peptides RGD peuvent être utilisés dans la détection des tumeurs solides en complément du  $^{18}\text{F}$ -FDG.

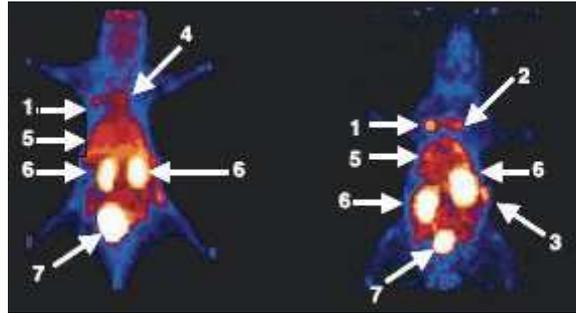


Figure 31 : Imagerie micro-TEP d'une souris portant une tumeur pulmonaire NCI-H1975, à gauche avec  $^{18}\text{F}$ FDG et droite  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-PEG-(RGD)<sub>2</sub>. (1) Tumeur principale, (2) métastase controlatérale, (3) tumeur sous-cutanée, (4) coeur, (5) foie, (6) rein (7) vessie. D'après Chen 2005.

Le groupe de R. Haubner a participé au lancement des phases cliniques en comparant chez l'homme des analyses au  $^{18}\text{F}$ -FDG (Fluoro-Désoxy-Glucose), traceur de référence dans la détection des tumeurs, et  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD. On remarque sur la figure 32 que le patient (A) capte fortement le FDG mais pas le galacto-RGD, contrairement au patient (B) qui capte fortement les deux radiotraceurs. On peut alors supposer **une expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  différente chez les deux personnes**. D'autres études doivent être réalisées afin de démontrer la capacité de cette technique en tant que **nouvel indicateur pronostic** complémentant le  $^{18}\text{F}$ -FDG : un fort marquage étant indicateur de la présence de l'intégrine, donc des néovaisseaux et de la croissance tumorale.

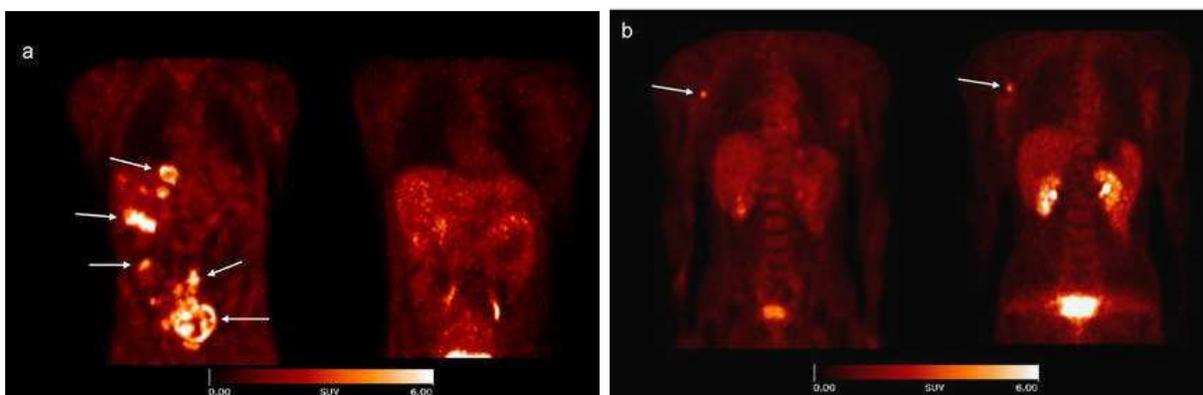


Figure 32 : Images TEP de patients ayant reçu du  $^{18}\text{F}$ -FDG (gauche) et du  $^{18}\text{F}$ -Galacto-RGD (droite). (A) Mélanome de grade IV et métastases hépatiques ; (B) Mélanome de grade III et métastase lymphatique. D'après Haubner 2005.

Suite à cette étude clinique, des biodistributions et des pharmacocinétiques ont été menées. La clairance sanguine chez l'homme est rapide ; l'élimination du composé s'effectue principalement par la voie rénale et pour une part plus faible par la voie hépatobiliaire. La captation tumorale augmente fortement dans les 10 premières minutes après injection puis se stabilise et diminue lentement au-delà de 1 heure environ. Une forte **variation inter et intra-patient est observée**, comme décrit dans les modèles expérimentaux (Beer 2005). **Le galacto-RGD, comme d'autres composés ciblant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , pourrait être utilisé lors de la détermination de l'agressivité des cancers chez les patients, de manière non-invasive.**

## 2 - Peptides RGD et thérapeutique

Le cyclo-peptide RGD possède également des propriétés d'inhibition de l'angiogenèse *in vivo*. Les études thérapeutiques mettent en place des protocoles très divers : co-incubation du peptide avec les cellules tumorales avant implantation, injection i.v. ou i.p. du peptide chez l'animal ayant développé une tumeur, en une ou généralement plusieurs administrations. Il en résulte une diminution significative (selon les études) de la densité vasculaire intratumorale (Kawaguchi 2001), de la taille de tumeurs et de la capacité à former des métastases.

### 2-1 Cilengitide

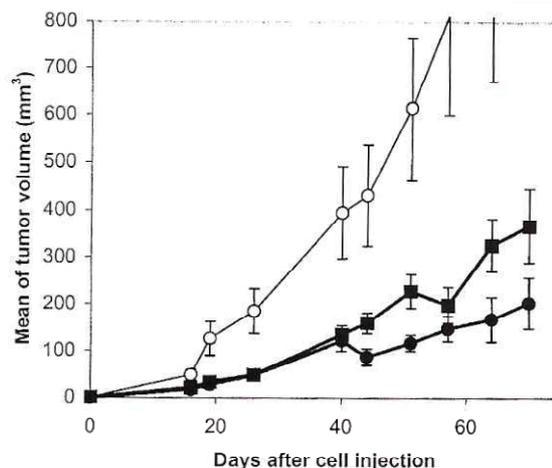
Le cyclo-(RGDfMeV) ou cilengitide réprime la croissance tumorale de mélanomes  $\alpha_v\beta_3$  négatifs greffés à la souris nude et entraîne parfois la régression totale de la tumeur. Chez l'homme la molécule est en cours d'essais cliniques de phase I / II. L'arrêt de croissance des tumeurs ORL a déjà été mis en évidence (Raguse 2004) mais son efficacité ne semble pas pertinente pour tous les types de cancers, notamment lorsque le composé est administré seul. Les études actuelles favorisent davantage les combinaisons avec la radiothérapie notamment.

## 2-2 Vitaxine

La vitaxine, anticorps anti-intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , est également en phase clinique I / II. Les premiers résultats démontrent quelques réponses partielles notamment pour les sarcomes ainsi que des stabilisations dans divers cas (cancer ovarien, rénal, ORL ou du colon) (Gutheil 2000). Des mises au point sont nécessaires afin de déterminer les posologies optimales ; peu d'effets secondaires dus à l'anticorps ont été démontrés en dessous de 50 mg (Posey 2001).

## 2-3 Dérivés du RGD

Parmi les dérivés des peptides RGD, certains composés tels que les anticorps et les protéines modifiées ont été développés, notamment l'anticorps 17E6, spécifique de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Figure 33). *In vivo*, cet anticorps provoque le ralentissement de la croissance tumorale, comme le montre la figure 33 ci-après (Mitjans 2000).



**Figure 33** : Observation du développement des mélanomes M21 injectés chez la nude. Les cellules incubées en présence de PBS (○), d'anticorps spécifique 17E6 injectés à J0 (■) ou J0, 40, 42, 44, 47, 49 et 51 (●). 17E6 réprime significativement le développement tumoral. D'après Mitjans 2000.

Par ailleurs, la conformation du peptide utilisé est fondamentale dans la reconnaissance du ligand. Une équipe polonaise a ainsi observé que les polymères (RGD)<sub>n</sub> et (DGRRGD)<sub>n</sub> n'entraînent pas les mêmes effets sur le développement tumoral puisque seul le polymère (RGD)<sub>n</sub> réprime la croissance tumorale (Figure 34) (Okroj 2003).

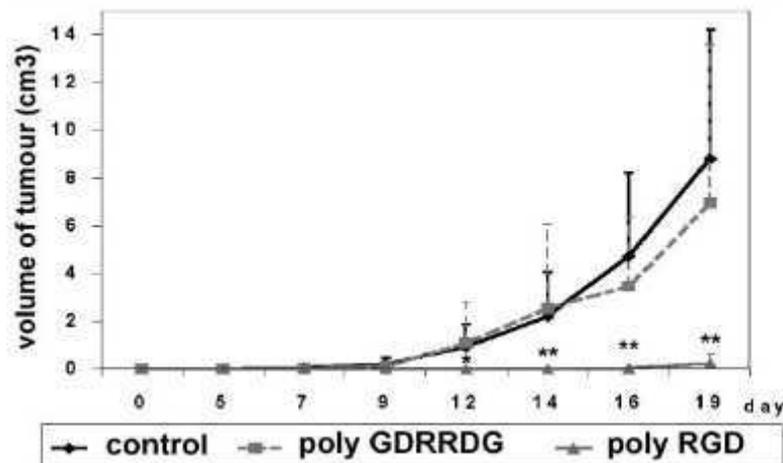


Figure 34 : Développement des tumeurs Ab chez le hamster. Les cellules sont injectées à l'animal après 15 minutes d'incubation avec ou sans peptide. D'après Okroj 2003.

### 3 - Autres approches

#### 3-1 RGD et vectorisation de particules virales

De nombreux virus et bactéries expriment en surface des protéines contenant le motif peptidique RGD. On trouve parmi ces premiers les adénovirus et les picornavirus. Ceci leur permet de lier les différentes intégrines qui reconnaissent ce motif telles que  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_5\beta_1$ , ou  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , et facilite leur internalisation. Cette caractéristique offre une possibilité thérapeutique, notamment par thérapie génique et drug delivery (Williams 2004 ; Nemerow 1999 ; Cox 1994 ; Hood 2002).

#### 3-2 RGD dans diverses pathologies

Essentiellement étudiés pour l'imagerie des néovaisseaux tumoraux et la thérapeutique, les peptides RGD peuvent toutefois être utilisés dans d'autres applications comme la détection de procédés inflammatoires, ischémiques et osseux. Dans ce cas de procédés inflammatoires, le cyclo RGD permettrait de discerner la phase aiguë de la phase chronique (Pichler 2005).

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  possède un rôle très important au niveau osseux ; elle est notamment présente sur les ostéoclastes et facilite leur adhésion à la matrice osseuse notamment à l'ostéopontine. Ceci constitue le premier stade de la résorption osseuse (Cox 1994). Expérimentalement, même si les mécanismes d'action sont encore mal connus, les composés dérivés du RGD limitent la résorption osseuse et semblent prévenir de la perte osseuse induite par la chute d'estrogène en réduisant le nombre d'ostéoclastes (Engleman 1997). Chez les souris déficientes en  $\beta_3$ , on observe une augmentation de la masse osseuse avec l'âge conduisant à l'ostéosclérose. Ceci semble dû à un fonctionnement anormal des ostéoclastes (McHugh 2000).

Enfin, dans les membres ischémiques, de nouveaux vaisseaux surexprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  tentent de se former afin d'oxygéner correctement les tissus. Dans un modèle de membre inférieur ischémié chez la souris, une scintigraphie au  $^{125}\text{I}$ -c(RGD(I)yV) a permis de mettre en évidence une hausse de contraste dans le membre ischémié par rapport au membre controlatéral (Lee 2005).

## **V - Conclusion de la partie I : Intérêt d'un traceur radioactif spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans le ciblage de la néoangiogenèse tumorale.**

Le ciblage de la néoangiogenèse tumorale doit permettre d'établir le diagnostic initial de la présence de la tumeur suite au switch angiogénique, de donner des informations relatives à l'évolution de celle-ci ou à l'efficacité du traitement administré.

L'imagerie nucléaire permet l'obtention d'informations de manière non-invasive sur l'ensemble des organes, même les plus internes : le développement d'un traceur radioactif dans le ciblage de la néoangiogenèse tumorale permettra de réaliser l'imagerie fonctionnelle et hautement spécifique des néovaisseaux dans les services de Médecine Nucléaire.

Comme il a été précédemment démontré, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  paraît être une cible pertinente dans l'imagerie des néovaisseaux tumoraux. Le développement de peptides contenant le motif « RGD » semble également pertinent pour le ciblage de cette intégrine. De plus, l'utilisation de ligands multivalents pourrait conférer des propriétés particulières aux traceurs notamment lors de la captation cellulaire. Le ciblage de la néoangiogenèse tumorale à l'aide d'un radioligand possédant 4 motifs peptidiques « RGD » tel que le RAFT-RGD pourrait permettre d'améliorer la captation et la rétention tumorale nécessaire à l'imagerie diagnostique des tumeurs solides.

De plus, le ciblage de la néoangiogenèse tumorale permet d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques. La Médecine Nucléaire peut répondre à ce besoin grâce à la radiothérapie. Par l'utilisation d'un traceur radioactif, les médecins pourraient réaliser, et éventuellement coupler, les modalités diagnostiques d'imagerie et thérapeutiques de l'angiogenèse tumorale.

**Partie II :**

**Matériel et Méthode**



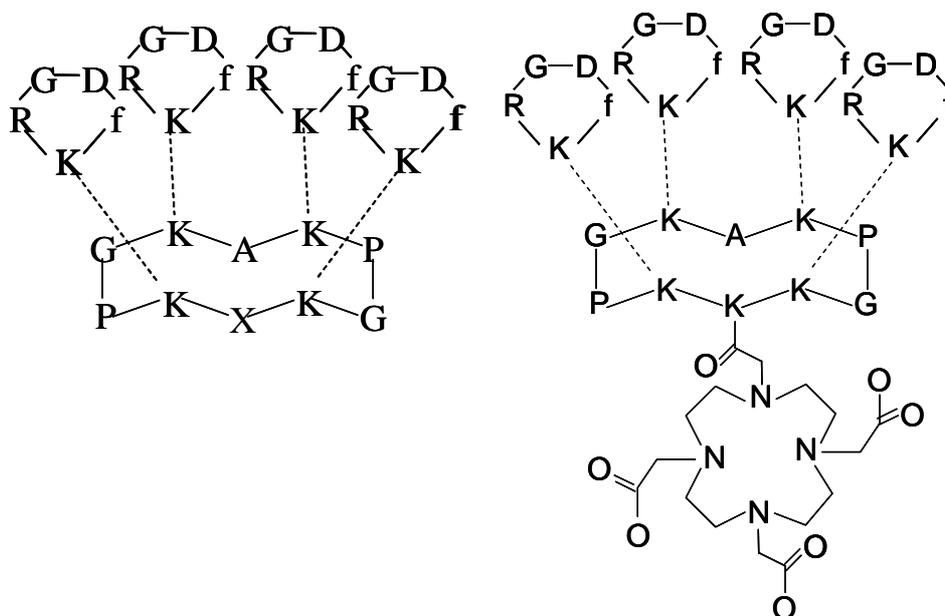
## Partie II : Matériel et Méthode

### I - Produits radiomarqués

Nos produits ont été synthétisés par le laboratoire de chimie LEDSS 5 (Boturyn 2004), dirigé par Pr. P. Dumy, faculté de Chimie de Saint-Martin d'Hères. La formule chimique et les applications du RAFT décrites ci-après ont été protégées par dépôt de brevet.

#### A - RAFT(c[-RGDfV-])<sub>4</sub> ou RAFT-RGD

La formule générale du peptide est représentée ci-après, figure 35. Dans la formule de gauche, l'acide aminé « X » représente différents acides aminés utilisés : tyrosine (Y) ou lysine (L). Les tyrosines permettent le marquage à l'iode-125 ; la lysine est liée à une histidine, permettant ainsi le marquage au technétium-99m. Dans la formule de droite, la lysine est couplée à un groupement DOTA afin de permettre le marquage à l'indium-111.



**Figure 35** : A gauche, RAFT-RGD marquable à l'iode-125 ou au technétium-99m, à droite, RAFT-RGD couplé au DOTA, permettant le marquage à l'indium-111.



Ce peptide monocyclique possède la formule suivante : RGDyK, soit Arginine – Glycine - Acide Aspartique - D tyrosine - Lysine (Figure 37). L'ensemble est marquable à l'iode-125. Lorsque la tyrosine est remplacée par une histidine, la molécule est marquable au technétium-99m.

## **D - Méthodes de marquage**

### **1 - Marquage à l'iode-125**

Le marquage est effectué de manière identique sur les différents peptides, sous hotte plombée et ventilée. La technique utilisée est la chloramine T. Un réactif oxydant transforme les ions  $I^-$  du iodure de sodium marqué de chez Amersham Pharmacia en  $I^+$  qui se substituent sur la tyrosine. La réaction est arrêtée par addition d'agent réducteur de l'iode non substitué. Trois formes de peptides sont obtenues : diiodé, monoiodé et non marqué. Après marquage, le rendement est déterminé par analyse sur chromatographie en couche mince. Seuls les échantillons contenant moins de 5% d'iode libre sont utilisés afin de ne pas fausser les interprétations.

De façon plus précise, on ajoute à 20 à 50  $\mu\text{g}$  de peptide 20  $\mu\text{l}$  de chloramine T à 1 mg/ml puis la quantité d'iode radioactif désirée (5 à 10  $\mu\text{l}$  environ suivant la date d'arrivée). Après homogénéisation, on attend 20 minutes puis arrête la réaction à l'aide du réducteur, le pyrosulfite de sodium (40  $\mu\text{l}$ ). On attend 15 minutes puis réalise le contrôle qualité.

Lors de cette étape, une goutte de NaI froide est déposée en bas d'une plaque de silice, afin de faciliter la migration de l'iode libre. On dépose alors 1  $\mu\text{l}$  de l'échantillon à tester sur cette même goutte, sous hotte ventilée. On fait migrer l'échantillon dans une cuve à chromatographie contenant une solution acétonitrile / eau 35 / 75 pendant 30 minutes puis réalise le chromatogramme et détermine la quantité d'iode libre.

## 2 - Marquage au technétium-99m

Le marquage du RAFT-RGD au technétium s'effectue de manière indirecte grâce au kit ISOLINK® (Mallinckrodt,  $\text{Na}_2(\text{K}_2)\text{BH}_3\text{CO}_2$ ). Le technétium-99m sous forme  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (740 MBq) est mis en contact avec l'ISOLINK® 20 minutes à 100°C, ISOLINK qui se comporte comme un réducteur et crée un complexe de degré d'oxydation 1,  $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ . De 25 à 100 µg de peptide sont ajoutés au complexe à 60°C pendant 30 minutes, à un pH compris entre 7 et 8. Le produit marqué est analysé par chromatographie sur couche mince dans un solvant acétonitrile / NaCl 0,9 % 60 / 40 ou par chromatographie liquide haute performance sur colonne C18 acétonitrile / H<sub>2</sub>O / TFA 0,1 %.

Le marquage du cRGD est similaire. Les 50 µg de peptides sont incubés à 60°C pendant 30 minutes avec 2 GBq de complexe technétié. La méthode d'analyse est identique. Ces deux traceurs sont stables à 90 %, 24 heures après marquage.

## 3 - Marquage à l'indium-111

Le marquage à l'indium est uniquement effectué pour le RAFT-RGD couplé au DOTA. Dans un solvant d'acétate d'ammonium 0,1M, 100 µg de peptides et 55 MBq d'indium-111 sont chauffés à 70°C pendant 30 minutes. Le pH de la solution doit être compris entre 4 et 5. La stabilité du produit est bonne car 24 heures après marquage on retrouve plus de 90 % de produit marqué non dégradé.

# II - Études cellulaires

## A - Culture cellulaire

Divers types cellulaires, humains et murins, ont été utilisés. Il s'agit d'une part d'une lignée de cellules endothéliales non transformées ainsi que de plusieurs lignées capables d'induire une tumeur solide chez la souris.

### **1 - PC-3, Prostate Carcinoma-3**

Cette lignée humaine a été établie à partir d'un sujet masculin de type caucasien, âgé de 62 ans, atteint d'un adénocarcinome prostatique de grade IV (réf. 90112714, LGC for ECACC European Collection of Cells Cultures, Illkirch, France). Ces cellules adhérentes sont de morphologie épithéliale. Leur temps de doublement de population est d'environ 24 heures. Elles se développent en monocouche ou en multicouches et **ont la particularité d'exprimer en surface l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$** .

Différents milieux de culture ont été décrits. Le milieu choisi comporte RPMI 1640 (VWR Int.) et Ham's F 12 (Sigma Aldrich, France) (1:1), SVF 10 %, L-Glutamine 1 % (200 mM), 10 000 UI / ml de pénicilline et 10 000  $\mu$ g / ml de streptomycine.

### **2 - KB 3.1, tumeur O.R.L.**

Cette lignée humaine a été établie à partir d'une tumeur O.R.L d'un individu adulte mâle, en 1954 (ref. ACC136, DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany). Cette souche a développé différents mutants dont des lignées multi-drogue résistantes. Ces cellules sont de morphologie variable : généralement adhérentes, elles peuvent également être en suspension. Lorsqu'elles sont adhérentes, elles acquièrent une morphologie épithéliale. Leur temps de doublement de population est approximativement de 80 heures.

Le milieu de culture choisi est composé de EMEM, Eagle's modified Essential Medium, SVF 15 %, 0,01 % d'acides aminés non essentiels (Sigma Aldrich, France), L-Glutamine 200 mM, 10 000 UI / ml de pénicilline et 10 000  $\mu$ g / ml de streptomycine.

### **3 - HMVEC, Human Micro-Vascular Endothelial Cells**

Les HMVEC sont des cellules humaines microvasculaires non différenciées de derme adulte (ref. CC-2517 Cambrex, Emerainville, France). Elles sont cultivées grâce au kit EGM-2-MV® BulletKit®, comprenant 500 ml de EBM-2-MV® auxquels

sont ajoutés les aliquotes suivants : 0,5 ml EGF (Epidermal Growth Factor) recombinant humain, 2 ml FGF, 0,5 ml VEGF, 0,5 ml acide ascorbique, 0,2 ml hydrocortisone, 0,5 ml IGF (Insulin-like Growth Factor) recombinant, 25 ml SVF, 0,5 ml gentamicine, amphotericin-B. Ces cellules expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  : l'expression de l'intégrine varie avec l'état de prolifération ou de quiescence des cellules.

#### **4 - TS/A-pc, carcinome mammaire murin**

Cette lignée est issue d'une souris de type Balb/c et nous a été généreusement donnée par l'équipe du Pr. Marie Favrot (Pr. J-L. Coll). Les cellules TS/A-pc expriment de manière constitutive l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Le milieu de culture est à base de RPMI 1640 suppléé par 10 % de SVF, 200 mM de L-Glutamine, 10 000 UI / ml de pénicilline et 10 000  $\mu\text{g}$  / ml de streptomycine.

#### **5 - B16F0, mélanome murin**

Cette lignée est issue d'une souris de type C57Bl/6J (Réf. CRL-6322 ATCC, par LGC Promochem Strasbourg France). Les cellules B16F0 expriment de manière constitutive l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Cowden Dahl 2005). Le milieu de culture est à base de DMEM suppléé par 10 % de SVF, 200 mM de L-Glutamine, 10 000 UI / ml de pénicilline et 10 000  $\mu\text{g}$  / ml de streptomycine.

Toutes ces cellules sont placées dans une étuve à 37°C, à 5 % de  $\text{CO}_2$ .

### **B - Congélation des cellules**

La congélation est identique pour l'ensemble des lignées cellulaires.

Les cellules sont centrifugées à 200g pendant 5 minutes puis homogénéisées dans une solution de SVF pur à 4°C, à raison de  $1.10^6$  cellules pour 0,5 ml de SVF. Après répartition dans les ampoules, 0,5 ml de SVF/DMSO 20 %, à 4°C sont lentement

ajoutés au mélange. Le DMSO permet la conservation des cellules pendant la congélation. L'ampoule est alors placée à -20°C pendant 15 à 30 minutes puis dans l'azote liquide ou à -80°C pour sa conservation.

### **C - Décongélation des cellules**

La décongélation suit le même protocole pour l'ensemble des lignées cellulaires.

L'ampoule contenant les cellules est placée au bain marie à 37°C puis le contenu est placé dans 30 ml de milieu sans SVF et centrifugé 5 minutes à 200 g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est homogénéisé dans 10 ml de milieu complet, dans une boîte de 25 cm<sup>2</sup>, placée ensuite à l'étuve.

### **D - Études de captation**

#### **1 - Mise en puits**

Lors des études de captation, les cellules sont placées en boîte de 6 puits, à 20 000 cellules / ml, soit approximativement 160 000 cellules HMVEC par puits. L'étude est réalisée après obtention de 80% à 90% de confluence.

#### **2 - Protocole d'incorporation**

Le jour de l'étude les milieux sont éliminés par aspiration et remplacés par 5 ml de milieu sans SVF pour les cellules cancéreuses et 3 ml pour les HMVEC. Le milieu doit être pauvre en sérum afin de limiter les interactions aspécifiques avec les protéines du sérum. Le radioligand est ajouté à raison de 1 µCi / 1 µM environ, soit 100 µl, par puits à t = 0. À des temps compris entre 1 et 30 minutes -1, 5, 10, 15, 22 et 30 minutes en général- le milieu est aspiré. Les puits sont lavés 3 fois par 3 ml de PBS puis les cellules sont lysées par 3 ml de SDS 1 %.

Pour chaque puits, 1 ml de suspension cellulaire est prélevé puis analysé au compteur gamma (Cobra II Packard) afin de déterminer la quantité de radioactivité captée. D'autre part, quelques microlitres de la solution mère radiomarquée sont analysés au compteur gamma afin d'étalonner les calculs.

### **3 - Dosage de protéines**

Une méthode dérivée de la méthode de Lowry est utilisée afin de déterminer la concentration protéique de chacun des échantillons. Cette méthode consiste à réaliser une courbe étalon, à l'aide de solutions de concentrations protéiques connues, par dosage d'absorption, ceci grâce à la relation suivante :

$$\text{Absorption à 640 nm} = f(\text{concentration de protéine}).$$

La suspension protéique de chacun des puits est placée 15 à 30 minutes à l'étuve à 70°C. Dans une cuve à spectrophotométrie, on place 0,2 ml de l'échantillon à doser ainsi que 1 ml de solution C pendant 10 minutes. Cette solution est obtenue par mélange de 10 ml de solution A avec 0,2 ml de solution B.

La solution A contient 20 g de bicarbonate de sodium et 4 g d'hydroxyde de sodium pour un litre d'eau pure. La solution B est constituée de 0,5 g de sulfate de cuivre penta hydraté et 1 g de citrate de sodium pour 100 ml d'eau pure.

Puis, on ajoute 100 µl de liquide de Folin 0,5 N, on agite la solution et place les échantillons à l'obscurité pendant 30 minutes.

L'absorbance est déterminée à 640 nm à l'aide d'une lampe à tungstène.

### **4 - Effet de la concentration**

Lors de cette étude, les cellules PC-3 sont cultivées en plaques de 6 puits et le protocole d'incorporation suit le schéma précédemment décrit. Les concentrations de <sup>125</sup>I-RAFT-RGD ajoutées au milieu sont de 0,2 , 0,8 et 2,2 nmol.

Les études réalisées sur HMVEC ont été réalisées sur plaques de 6 puits également. Les radioligands sont ajoutés aux doses suivantes :

Ligand	Nombre de nmol injectées par puits				
<sup>125</sup> I-cRGD	0,571	5,706	11,412	22,824	57,060
<sup>125</sup> I-RAFT-RGD	1,943	3,886	7,772	19,430	38,860
<sup>125</sup> I-RAFT-RAD	1,667	3,334	6,668	16,670	33,340

Tableau 9 : Quantité de ligands ajoutés par puits en nmol.

Dans chaque cas, la quantité de radioligand et le dosage protéique sont déterminés comme précédemment décrit.

### 5 - Étude de compétition

Les deux ligands, cRGD et RAFT-RGD, l'un marqué l'autre froid en excès, sont ajoutés simultanément au milieu de culture sans sérum des cellules HMVEC. Dans une première expérience, le cRGD marqué est ajouté seul (8,8 nmol) au milieu de culture ou avec 2,5 fois plus de RAFT-RGD froid (22 nmol). Dans une seconde expérience, le RAFT-RGD marqué est ajouté seul (2,2 nmol) ou avec 100 fois plus de cRGD froid (215 nmol).

La quantité de radioligand et le dosage protéique sont déterminés comme précédemment décrit.

### 6 - Étude de captation en présence de chloroquine

La chloroquine est une substance lysosomotropique qui bloque l'endocytose. Elle est ajoutée au milieu de culture (100 µmol / puits) 30 minutes avant l'addition du radioligand. Puis, les milieux avec et sans chloroquine sont éliminés à t = 1, 15, 30, 60 et 120 minutes. La radioactivité et la quantité de protéine sont déterminées comme précédemment décrit.

**E - Western Blot : détection de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$** 

Les western blots ont été réalisés à partir d'extraits de cellules en culture. À confluence, les cellules sont décollées puis lysées avec une solution de PBS / SDS 1 % en présence d'inhibiteurs de protéases. Les concentrations protéiques des extraits sont quantifiées comme précédemment décrit. Chaque échantillon est préparé afin de contenir 10 % de glycérol et 1 % de SDS dans une solution tampon Tris-HCl 50 mM. Pour les échantillons nécessaires à la détection de l'intégrine  $\beta_3$ , on se place en conditions non réductrices, c'est-à-dire sans  $\beta$ -mercaptoéthanol.

Le gel de séparation est à 8 % d'acrylamide, pH 8,8, alors que le gel de tassement est à 4 %, pH 6,8. L'électrophorèse s'effectue à 150 V (120 mA), pendant une heure et demi dans un tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 %. Lors du transfert sur membrane PVDF (Pierce), le voltage est abaissé à 100 V pendant une heure et la température du tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM, méthanol 20 % est régulée par des blocs de glace.

Les différents anticorps et conditions de blocages sont récapitulés dans le tableau 10.

Intégrine détectée	Anticorps primaire (provenance)	Anticorps secondaire (espèce) (provenance)	Blocage
$\alpha_v$ PM : 125kDa	IgG <sub>1</sub> de souris (BD Biosciences) 1/250	Anti-IgG <sub>1</sub> de souris (rat) couplé HRP (BD Biosciences) 1/5000	Lait ½ écrémé
$\beta_3$ humain PM : 90-100kDa	IgG de lapin (Chemicon Int.) 1/1000	Anti-IgG de lapin couplé HRP (Chemicon Int.) 1/5000	Lait écrémé
$\beta_3$ murin PM : 90-100kDa	IgG2a de rat (Emfret Analytics, Allemagne) 7/1000	Anti-IgG2a de rat (chèvre) couplé HRP (eBioscience) 1/25000	BSA

Tableau 10 : Anticorps et conditions utilisées lors de western blot.

La détection s'effectue grâce au kit de détection Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) sur un film CL-XPosure (Pierce) exposé 5 à 10 minutes en chambre noire.

## F - Cytométrie

Les cellules sont cultivées comme précédemment décrit puis trypsinisées avec une trypsine sans EDTA (BD biosciences) et réparties à raison de 5 millions de cellules par tube. Le marquage s'effectue à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 150 µl de PBS et 15 µl d'anticorps primaire couplé à un fluorochrome. Le tube est placé à l'obscurité 30 minutes puis deux lavages successifs au PBS / BSA 1 %, sont effectués. En fin de marquage, les cellules sont reprises dans 500 µl de PBS / BSA 1 %. Les anticorps proviennent de chez BD Biosciences, sauf l'anti-intégrine  $\alpha_v\beta_5$  (Chemicon) et sont couplés au FITC, sauf pour l'anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$  couplé à l'APC (cf. Tableau 11).

Pour chaque expérience, différents tubes de contrôles sont réalisés en parallèle : l'un pour le contrôle isotypique, le second pour l'autofluorescence et un dernier pour la viabilité cellulaire à l'iodure de propidium. Lors du contrôle isotypique, l'anticorps ajouté aux cellules est issu de la même souche que le premier anticorps utilisé (ex. : IgG1K de souris anti-CD51 / CD61 humain vs. IgG1K de souris). L'autofluorescence est mesurée sur les cellules qui ont uniquement subi un lavage après trypsination.

Marqueur	Excitation (nm)	Emission (nm)
FITC	490	520
APC	595 - 647	640 - 680
Iodure de propidium	370 - 560	631

Tableau 11 : Les différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission utiles.

Pour rappel, les cellules sont sélectionnées en fonction de leur taille et de leur granulosité, ce qui évite de tenir compte des débris cellulaires. L'autofluorescence et le contrôle isotypique permettent de placer la valeur « zéro » de fluorescence d'une souche donnée pour un anticorps et une fluorescence donnée. La fluorescence sera prise en compte uniquement si elle dépasse ce seuil (Figure 38).

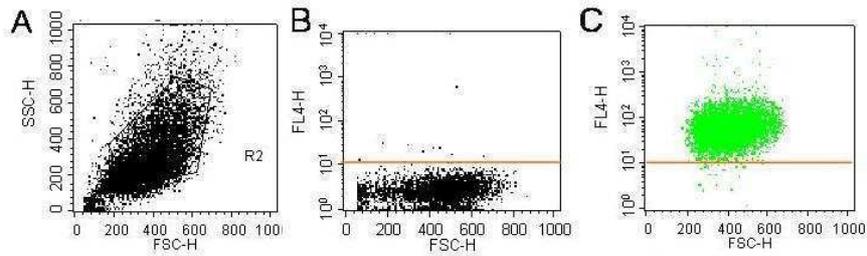


Figure 38 : Exemple de population totale (A), contrôle isotypique (B) et (C) cellules de la population totale de taille adéquate dont la fluorescence est supérieure à celle du contrôle isotypique.

## G - Formation de pseudo-capillaires

Dans une plaque 24 puits, 200  $\mu$ l de matrigel® (BD Biosciences, à 10 mg / ml) sont déposés par puits puis placés à l'étuve pendant 30 minutes à 1 heure. Le gel se forme alors de manière concave. Pour combler le creux, on dépose 50  $\mu$ l de matrigel® et laisse à nouveau à l'étuve 30 minutes à 1 heure. *Chaque dépôt de gel est critique puisque la moindre bulle d'air dans le gel empêche la prise de vue photographique.*

Les cellules endothéliales HMVEC, à confluence, sont trypsinisées et ensemencées à raison de 60 000 cellules par puits dans 250  $\mu$ l de milieu complet. À 1 heure, le surnageant est éliminé. Les puits sont **délicatement** rincés et on dépose 200  $\mu$ l de milieu sans sérum par puits. Enfin, le ligand (ou du PBS) est ajouté au milieu à raison de 50  $\mu$ l de façon à ce que la concentration finale soit 1, 4, 16 et 32  $\mu$ M de cRGD ou 1, 4, 8  $\mu$ M de RAFT-RGD et RAFT-RAD.

La formation du réseau de pseudo-capillaires est photographiée à différents temps après mise en puits. L'aire occupée par le réseau de pseudo-capillaires est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. *Chaque prise de vue est repérée dans l'espace afin de suivre l'évolution des mêmes cellules au cours du temps.*

## **H - Test de blessure**

Les cellules endothéliales HMVEC sontensemencées dans une boîte de pétri de 35 mm ou des plaques de 24 puits. Lorsque les cellules sont à pleine confluence, on réalise une blessure dans le tapis cellulaire à l'aide d'un cône jaune. Ceci décolle les cellules sur une largeur d'environ 15 à 20 cellules endothéliales. Cet espace permet aux cellules de proliférer et migrer pour combler la lacune rapidement (< 24h dans les conditions de culture standard).

Les cellules décollées sont délicatement éliminées par deux lavages successifs avec du PBS. Après ajout du milieu complet à 0,5 % de SVF ou du ligand / sérum 0,5 %, les cellules sont placées sous une caméra, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les mêmes cellules, repérées dans l'espace, sont photographiées toutes les 10 minutes pendant 12 h (tests de blessure) ou 24 h (films). Les quantités de ligands testées sont 1, 4 et 8 µM de RAFT-RGD ou RAFT-RAD et 1, 4 et 16 et 32 µM de cRGD.

## **III - Expérimentation animale**

### **A - Les souris**

Trois types de souris ont été utilisés. Il s'agit de souris femelles âgées de 5 à 6 semaines de type nude, Balb/c et C57Bl/6J provenant des laboratoires Charles River, St Germain sur l'Arbresle, France. Les animaux sont placés en stabulation une semaine avant toute expérimentation.

Les souris nude ont une aplasie du thymus ce qui leur donne la particularité d'être déficientes en lymphocytes T ; ceci facilite entre autre le développement de tumeurs xénogreffées. Ces souris sont fragiles ; c'est pourquoi elles sont placées dans une animalerie spécifique avec litière, alimentation et boissons stériles.

Les souris Balb/c et C57Bl/6J ont été choisies car elles permettent le développement de tumeurs syngéniques, respectivement les TS/A-pc et les B16F0. L'ensemble des protocoles est en accord avec les lois d'éthiques et a été soumis et validé par le comité d'éthique du CRESSA (CRESSA, La Tronche, France).

## **B - Induction tumorale**

Après obtention de cultures cellulaires à 90 % de confluence environ, le milieu cellulaire est éliminé et remplacé par du milieu sans SVF. Les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir (PC-3, KB 3.1, TS/A-pc) ou après action de la trypsine 2,5 % (B16F0) et comptées. Après centrifugation 5 minutes à 200 g, le culot cellulaire est homogénéisé dans une solution de liquide physiologique stérile. On injecte alors  $5 \cdot 10^5$  à  $10^6$  cellules pour un volume de 50  $\mu$ l par souris en sous-cutané, au niveau de la patte postérieure. Les souris sont toutes des femelles de 6 semaines (20 g) provenant de Charles River.

En 8 à 10 jours, la tumeur syngénique atteint une masse comprise entre 0,1 et 1 gramme ; pour les xénogreffes, en 20 jours la masse tumorale est inférieure à 0,4 g.

## **C - Imagerie corps entier et biodistributions**

### **1 - Acquisitions planaires**

Pour chaque modèle tumoral,  $10^6$  cellules dans 50 à 100  $\mu$ l de liquide physiologique sont injectées en sous-cutané au modèle murin permettant le développement tumoral. Par exemple,  $10^6$  cellules d'adénosarcome mammaire murin (TS/A-pc) ou

de mélanome murin (B16F0) sont injectées en sous-cutané au niveau de la patte postérieure droite de souris Balb/c femelles (6 semaines, 20 g) ou C57Bl/6J (6 semaines, 20 g) respectivement. Neuf jours après l'implant, une dose de radioligand (cf. Tableau 12) est injectée dans la veine caudale puis les souris sont anesthésiées par l'injection intrapéritonéale (30 µl) d'un mélange kétamine (10% g/vol - 75 mg/kg) / xylazine (2% g/vol - 15 mg/kg) (1:1) avant d'être placées sous caméra.

Radioligand	Activité / Volume
<sup>125</sup> I-Ligand	3,7 MBq / 100 µl
<sup>99m</sup> Tc-Ligand	16 à 37 MBq / 50 à 100 µl
<sup>111</sup> In-RAFT-RGD	1,6 à 3,7 MBq / 50 à 100 µl

Tableau 12 : Activités et volumes des radioligands injectés *in vivo* avant imagerie planaire.

L'imagerie planaire corps entier est réalisée grâce à une γ caméra petit animal (Biospace Mesures, France) de 30 à 40 minutes, de 60 à 80 minutes, de 120 à 140 minutes et de 240 à 260 minutes post-injection. Le choix du collimateur varie selon le radioligand à détecter. Lors de la détection de ligands iodés, le collimateur choisi est le 1.7/0.2/20 (détection 15 à 75 keV), alors que lors de l'imagerie des ligands technétiés, on utilise le 1.3/0.2/20 (détection 122 à 170 keV).

L'imagerie planaire au <sup>111</sup>In-RAFT-RGD a été réalisée sur la gamma caméra SoftCam, DSX rectangular dédiée à l'homme. Les souris sont placées face ventrale contre la caméra.

Les animaux, encore profondément endormis, sont euthanasiés par dislocation vertébrale et les principaux organes d'intérêt sont prélevés afin de quantifier la biodistribution du radioligand. Les organes sont pesés séparément et la quantité de radioactivité contenue dans chacun d'eux est déterminée grâce au compteur gamma. Le calcul suivant est réalisé :

$$\text{Volume injecté par souris} \Leftrightarrow \text{Nombre de } \mu\text{Ci} \Leftrightarrow \text{Nombre de CPM}$$

$$\text{CPM de l'organe} \times 100 / \text{CPM de la dose injectée} = \% \text{ de Dose injectée}$$

## **2 - Acquisition 3D**

Sur le même principe que lors de l'imagerie planaire, les souris ayant développé une tumeur sont anesthésiées par induction au mélange kétamine / xylazine (1:1) à raison de 20 µl puis placées sur l'axe rotatif et maintenues par anesthésie gazeuse à l'isoflurane 1,5 % tout au long de l'acquisition. Les images sont réalisées entre 60 et 90 minutes après l'injection du radioligand technétié (26 à 37 MBq / 50 à 100 µl). La détection est effectuée avec les deux têtes de gamma caméra sur lesquelles sont placés les collimateurs 3D de caractéristique 1.3/0.2/35 pour une meilleure résolution.

Lors de telles acquisitions, les animaux sont réchauffés uniquement par l'anesthésique inhalé ; toutefois, il est bon de couper le circuit de chauffe pendant de courtes périodes afin de rester dans une gamme de températures habituelles.

## **3 - Traitement d'images**

### **3-1 Images planaires**

Les images planaires sont traitées grâce au logiciel gamma vision + (Biospace Mesures, France). Les images acquises permettent de quantifier deux zones d'intérêt en cpm / mm<sup>2</sup> : la zone tumorale et une zone contrôle sur le muscle controlatéral. L'image finale est lissée, pour réduire la pixellisation, par une transformation gaussienne de Gauss = 0,3.

### **3-2 Images tridimensionnelles**

Les images 3D sont tout d'abord reconstruites grâce au logiciel d'acquisition Gamma Acquisition. Les paramètres de reconstruction incluent les traitements suivants : une gauss d'ordre 3, 3 itérations successives et les filtres post-traitement (sigma 1 = 10, sigma 2 = 2, facteur =2).

Afin de former une image 3D sous forme de film, le fichier de reconstruction (.hx) est traité par le logiciel Amira 3.1. L'objet en rotation est centré sur la boîte (bounding

box) et tourne selon l'axe des z (coordonnées 0 ; 0 ; -1). Pour la mise au point du film, on demande la création de 200 plans en mono (les films stéréo ne sont pas très lisibles avec les logiciels classiques) (cf. Figure 39).

Afin de déterminer le rapport « Tumeur / Muscle controlatéral » sur les acquisitions 3D, on crée une coupe oblique dans l'espace passant par le cœur tumoral et la patte opposée. Cette coupe est extraite puis enregistrée sous forme de fichier .bvr permettant ainsi le traitement de la coupe sous forme planaire, par gamma vision + (cf. Figures 40-41).

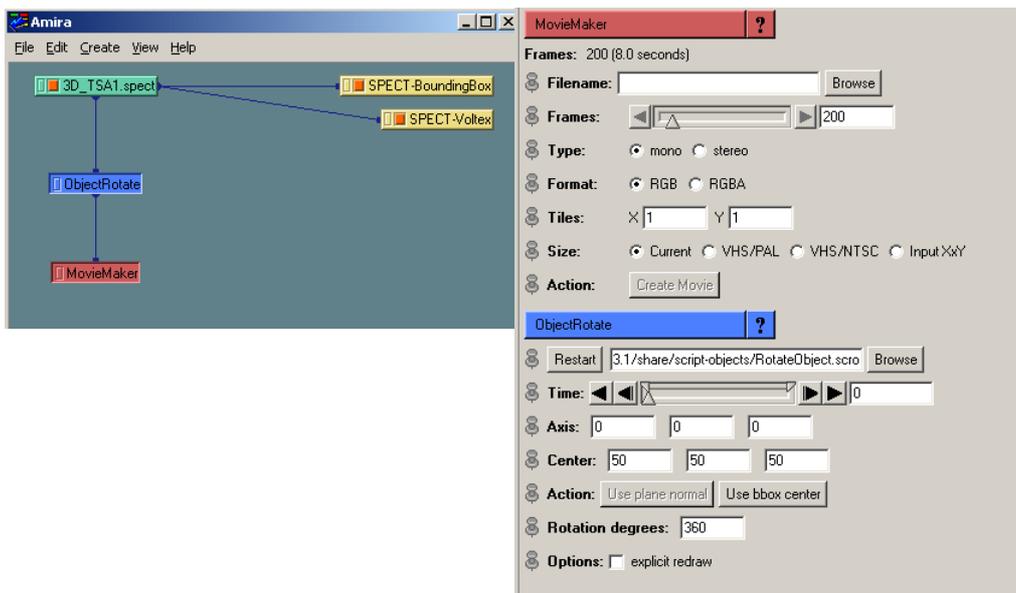


Figure 39 : Exemple de chemin de création d'un film 3D sous Amira 3.1.

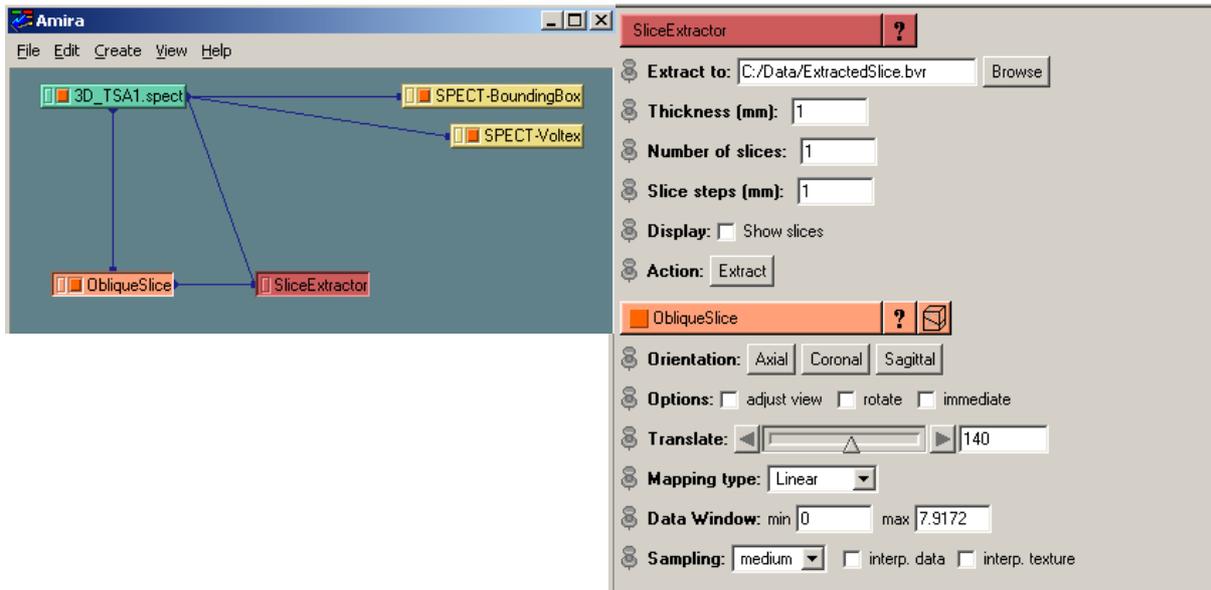


Figure 40 : Exemple de chemin de création d'une coupe oblique sous Amira 3.1.

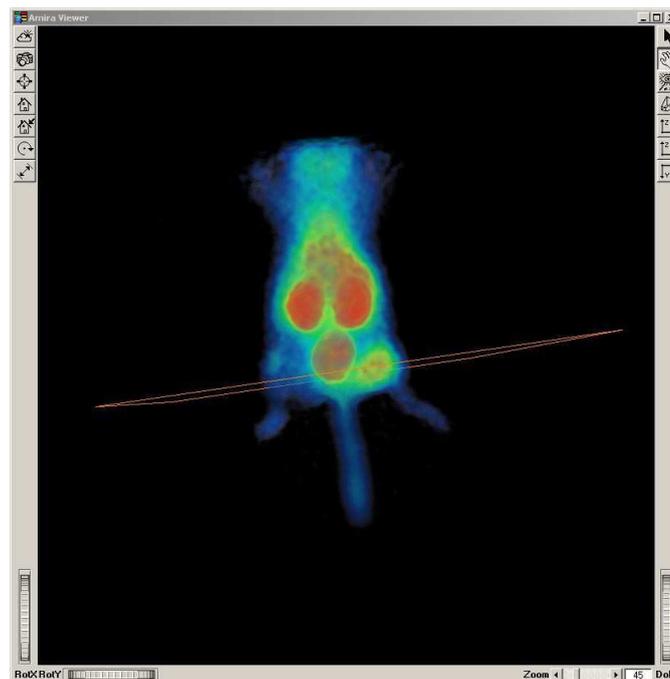


Figure 41 : Exemple de coupe oblique passant par la tumeur et la patte opposée sous Amira 3.1.

La création de coupes sériées est également possible grâce au module « SliceExtractor ». Il est ainsi possible de quantifier les rapports T/MC sur toute la longueur de la tumeur.

Enfin, si une zone doit être masquée avant la création du film (ex. : point d'injection du radioligand au niveau de la queue, tâche d'urine), on crée alors un « Castfield » et sélectionne la zone à masquer. On va ensuite procéder à deux opérations entre les images. La première consiste à ajouter les images du fichier source et du « labels » sous forme « A+B ». Il en résulte une image montrant la sélection enregistrée. La seconde opération consiste à soustraire la quasi totalité de cette zone au fichier source, afin d'estomper la zone à masquer, sous forme « A - 0,98 x B » (Figure 42).

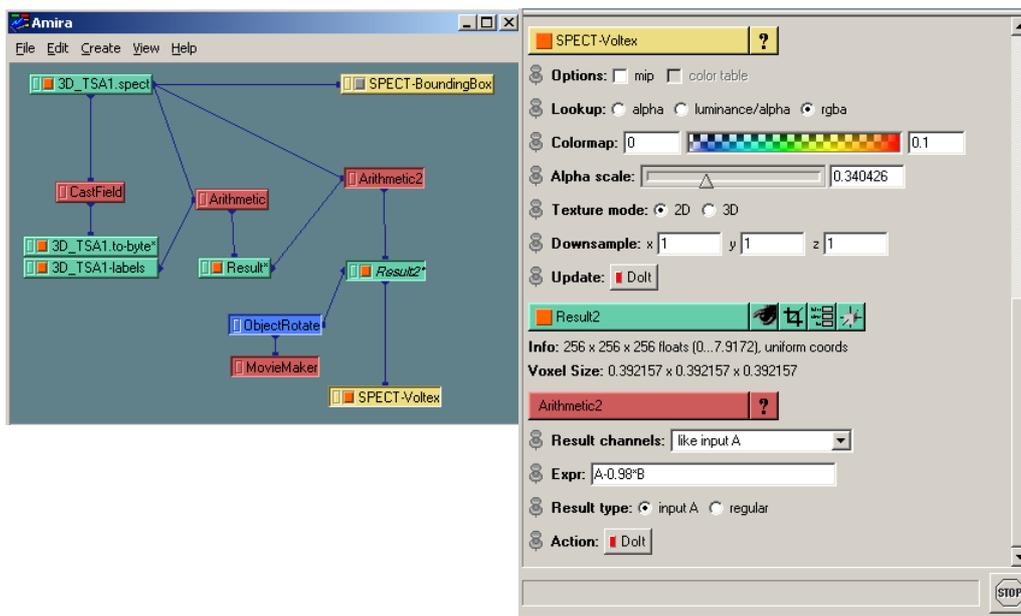


Figure 42 : Exemple de chemin permettant d'estomper ou de masquer une zone, sous Amira 3.1.

## D - Autoradiographie

Après extraction, les tumeurs contenant le radioligand sont rapidement congelées après quantification de la radioactivité. Elles sont placées dans une solution d'isopentane, elle-même placée dans un bain d'azote liquide. Les tumeurs ainsi congelées peuvent être conservées à -80°C.

Les tumeurs sont coupées à l'aide d'un cryo-microtome, HM 505E Microm, France. Des coupes de 20 ou 40 µm sont prélevées pour l'analyse autoradiographique. Elles

sont adjacentes à des coupes de 8 à 10  $\mu\text{m}$ , coupes analysées en immunohistochimie.

Les coupes de 20  $\mu\text{m}$  sont analysées grâce au  $\beta$  Imager (Biospace France) après une acquisition de 12 heures.

## **E - Immunohistochimie**

Le marquage immunologique cible les vaisseaux tumoraux par détection de la protéine membranaire CD 31 présente en surface des cellules endothéliales ou l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  par détection des CD 51, pour  $\alpha_v$ , ou CD 61, pour  $\beta_3$ .

Après dépôt sur lame, les coupes fraîches de 8 à 10  $\mu\text{m}$  sont placées dans un bain d'acétone à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes puis séchées à l'air libre 15 à 60 minutes.

Le premier anticorps monoclonal anti-CD 31 de souris produit par le rat est appliqué pendant 1 heure minimum. Puis les lames sont rincées dans deux bains de PBS, BSA à 0,3%. On applique ensuite le second anticorps anti-IgG 2a de rat biotinylé, produit chez la souris. Après 30 minutes, on rince de la même façon les lames. On dépose la streptavidine couplée à la peroxydase pendant 30 minutes, on rince à nouveau et on révèle la fixation par un chromogène aqueux AEC, ou 3-amino-9-éthylcarbazole.

Pour le marquage des CD 51 ou CD 61, un seul anticorps biotinylé est appliqué pendant un minimum de 2 heures. Les lames suivent alors les mêmes étapes de rinçage puis d'exposition à la streptavidine / peroxydase et au chromogène.

On contre-colore ensuite les lames à l'aide d'une solution d'hématoxyline de Harris quelques secondes. Les noyaux cellulaires sont alors colorés en bleu. Après passage dans un bain de HCl (150  $\mu\text{l}$  à 37 % dans 250 ml d'eau distillée) puis un bain de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (250  $\mu\text{l}$  à 20 % dans 250 ml d'eau distillée), on fixe une lamelle sur

l'échantillon par montage aqueux afin de protéger les coupes. Tous les réactifs utilisés proviennent de BD Pharmingen.

Pour chaque marquage, 3 contrôles sont réalisés afin de vérifier la spécificité du marquage. Les lames sont alors colorées à l'hématoxyline seule (noyaux cellulaires en bleu), ou marquées par l'anticorps secondaire seul (pas de marquage) ou par l'ensemble des anticorps (coloration rouge au niveau de l'antigène d'intérêt).



**Partie III :**

**Résultats**



# Études cellulaires



## Partie III : Résultats

### I - Études cellulaires

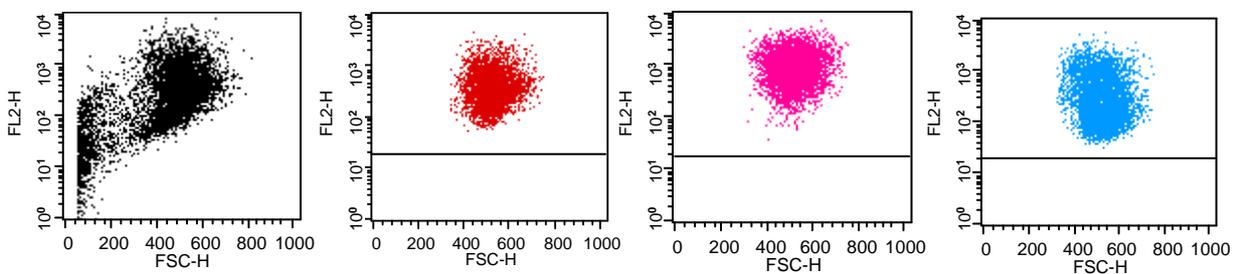
#### A - Caractérisation cellulaire

##### 1 - Cytométrie

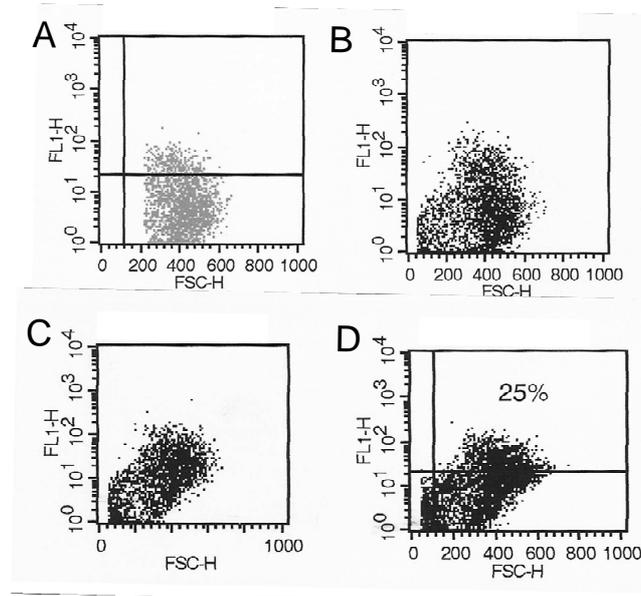
L'expression de différentes intégrines et marqueurs cellulaires a été testée sur les modèles cellulaires humains HMVEC, PC-3 et KB 3.1 en vue de leur caractérisation par la technique de cytométrie en flux.

##### 1-1 Caractérisation des cellules HMVEC

Les résultats sont présentés dans les figures 43 et 44. Ils indiquent que les cellules HMVEC expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (CD51 / 61, rouge) ainsi que le CD31 (rose) et le CD34 (bleu) (Figure 47) et que 25 % de ces cellules expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  (Figure 44) ; la fluorescence mesurée étant supérieure à celle des contrôles isotypiques. En revanche, les HMVEC n'expriment pas l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .



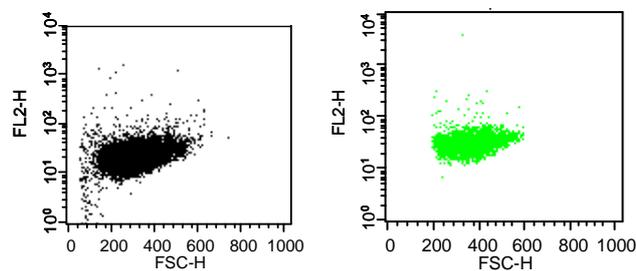
**Figure 43** : Marquage des HMVEC par un anticorps anti-intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (CD51 / 61, rouge), anti-CD31 (rose) et anti-CD34 (bleu) marqueurs vasculaires.



**Figure 44** : Cellules HMVEC, (A) autofluorescence, (B) exemple de contrôle isotypique (de l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$ ), (C) intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  et (D) intégrine  $\alpha_v\beta_5$ .

### 1-2 Caractérisation des cellules PC-3

Les résultats des cellules PC-3, présentés dans la figure 45, indiquent que ces cellules n'expriment pas l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (peu de différence avec le contrôle isotypique). En revanche, 47 % des cellules expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  (Figure 46).



**Figure 45** : PC-3 marquées par le contrôle isotypique (noir, valeur seuil 70) ou l'anticorps anti-intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (vert).

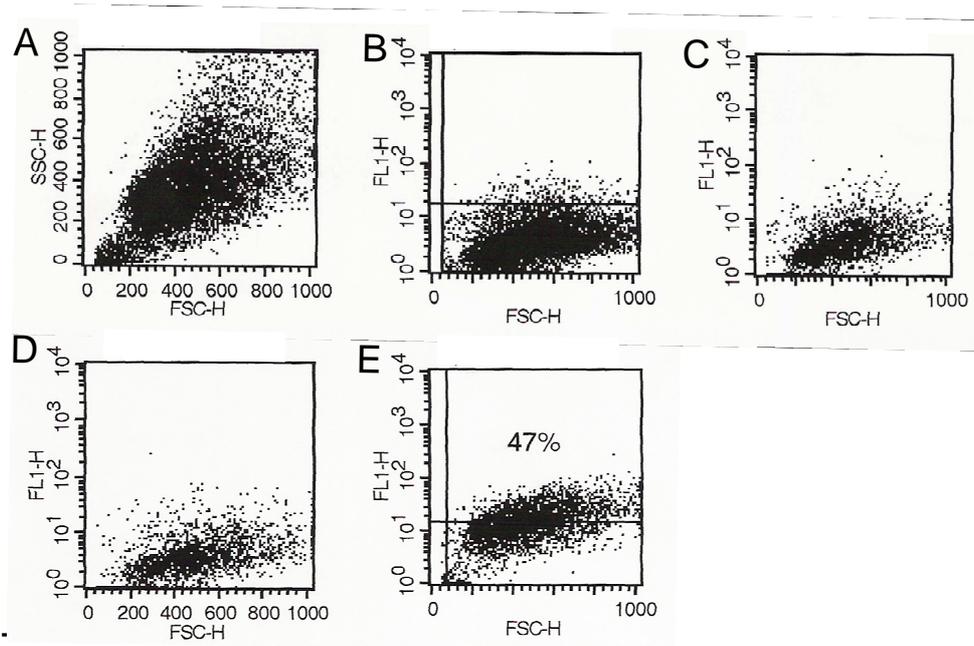


Figure 46 : Cellules PC-3, (A) dispersion cellulaire en fonction de la taille et de la granulosité, (B) autofluorescence (C) exemple de contrôle isotypique (type FITC, FL1-H), (D) marquage de l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  et (E) marquage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ .

### 1-3 Caractérisation des cellules KB 3.1

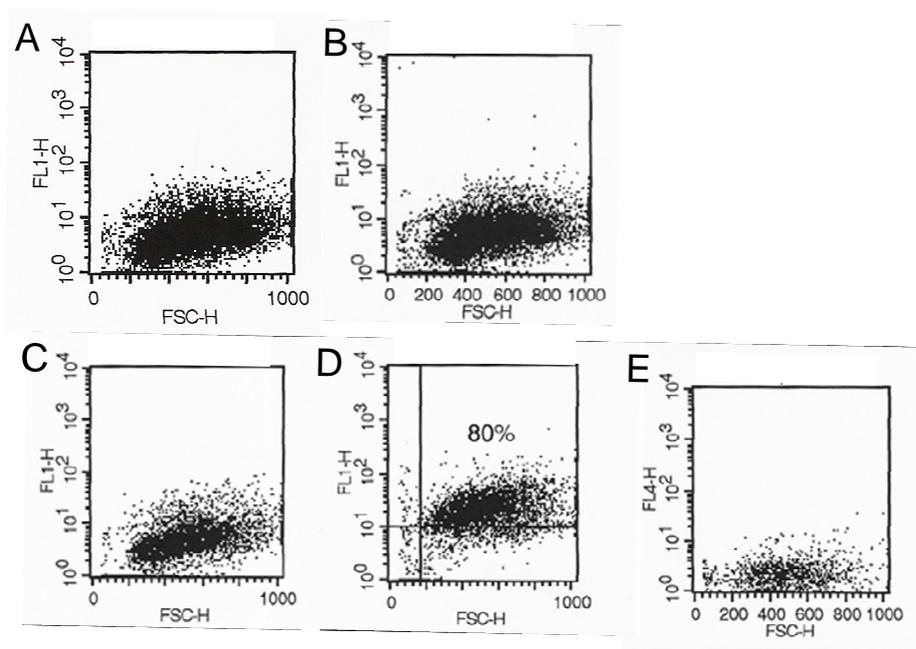


Figure 47 : Cellules KB 3.1, (A) autofluorescence, (B) exemple de contrôle isotypique (type FITC, FL1-H), (C) marquage de l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$ , (D) marquage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  et (E) marquage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

Lors de ces expériences, 80 % des cellules KB 3.1 expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ . L'absence d'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est franche car la fixation de l'anticorps est légèrement inférieure à celle du contrôle isotypique (Figure 47).

## 2 - Western blot

L'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  a été étudiée par western blot sur l'ensemble des modèles cellulaires utilisés (Figure 48).

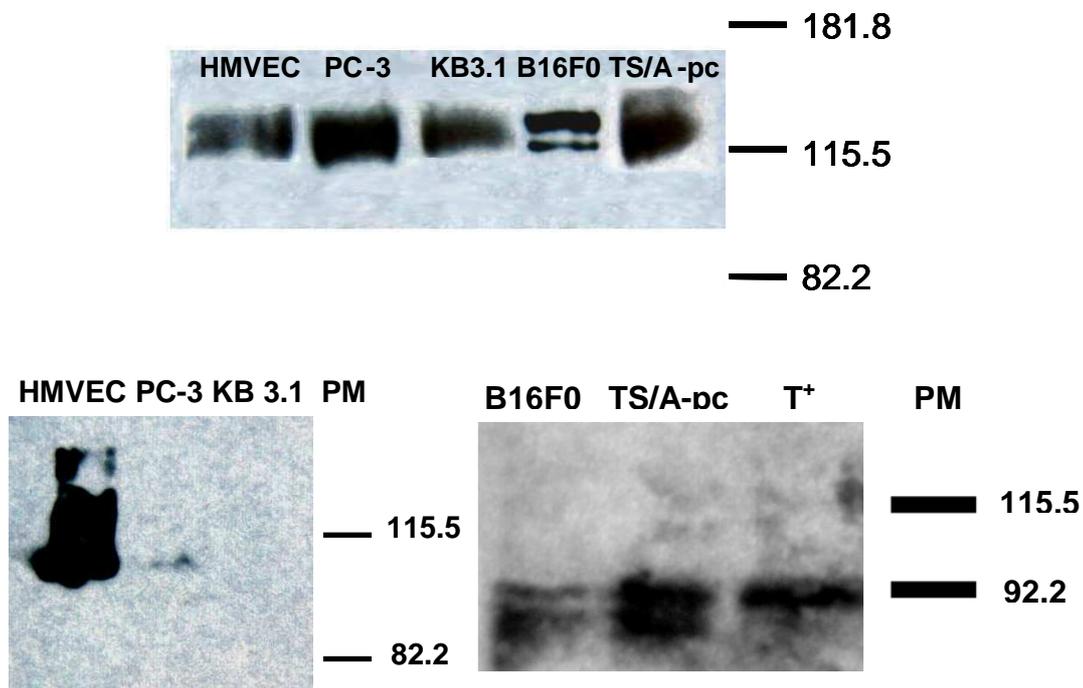


Figure 48 : Western blot de la sous-unité  $\alpha_v$  de l'intégrine (haut) et  $\beta_3$  (bas).

Les blots observés sont situés entre 109 et 123 kDa pour  $\alpha_v$  et très proche de 100 kDa pour  $\beta_3$ . Ces résultats sont conformes avec ce qui est décrit sur les fiches des fournisseurs, respectivement 125 et 90 - 100 kDa. Plus particulièrement, pour la sous-unité  $\beta_3$ , la présence d'un fort amas est due à l'agrégation de plusieurs sous-unités  $\beta_3$  (lignée HMVEC) ; le témoin positif murin, extrait de rate murine, confirme la présence de la sous-unité  $\beta_3$ .

On constate que les taux d'expression de la partie  $\alpha_v$  sont du même ordre de grandeur pour toutes les lignées, avec une légère surexpression au niveau des cellules PC-3 et des lignées murines TS/A-pc et B16F0.

On a vérifié la présence des deux sous-unités  $\alpha_v$  et  $\beta_3$  sur les cellules endothéliales HMVEC et les cellules cancéreuses humaines PC-3, contrairement aux résultats obtenus par cytométrie. Par ailleurs, les cellules endothéliales HMVEC expriment très fortement la sous-unité  $\beta_3$ , alors que les cellules tumorales PC-3 l'expriment plus faiblement.

Les cellules KB 3.1 n'expriment pas la partie  $\beta_3$  et donc n'expriment pas l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

Enfin, la sous-unité  $\beta_3$  est exprimée par les deux lignées murines B16F0 et TS/A-pc, avec une expression plus importante pour les cellules de la lignée TS/A-pc.

### **3 - Synthèse : caractéristiques des modèles cellulaires utilisés**

Les cellules endothéliales HMVEC expriment très nettement l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , comme décrit dans la littérature, ainsi que l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  ; cette dernière est par ailleurs présente sur l'ensemble des lignées testées. Aucune lignée n'exprime l'intégrine  $\alpha_{Iib}\beta_3$ .

En ce qui concerne les lignées tumorales humaines PC-3 et KB 3.1, seules les PC-3 expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , à un taux qui semble nettement inférieur à celui observé sur les HMVEC.

Enfin, les lignées tumorales murines B16F0 et TS/A-pc ont pu être caractérisées par western blot. Toutes deux expriment très nettement la sous-unité  $\alpha_v$ . La sous-unité  $\beta_3$  est également présente dans les deux types cellulaires murins, avec une expression plus importante dans la lignée TS/A-pc.

Les expériences de caractérisation cellulaire ont démontré les données suivantes récapitulées dans le tableau 13 :

Lignées	Cytométrie			Western Blot	
	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$	$\alpha_{IIb}\beta_3$	$\alpha_v$	$\beta_3$
HMVEC	+++	+	-	++	+++
PC-3	-	++	-	+++	+
KB 3.1	-	+++	-	++	-
B16F0	ND	ND	ND	+++	+
TS/A-pc	ND	ND	ND	+++	++

Tableau 13 : Expression cellulaire des intégrines. ND : non déterminé.

## B - Cinétiques de captation

Trois types cellulaires exprimant différents niveaux de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ont été étudiés en présence de l'un des 3 radioligands  $^{125}\text{I}$ -cRGD (contrôle positif),  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD (molécule d'intérêt) ou  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD (molécule non spécifique). Les résultats sont rapportés dans les figures 49, 50 et 51.

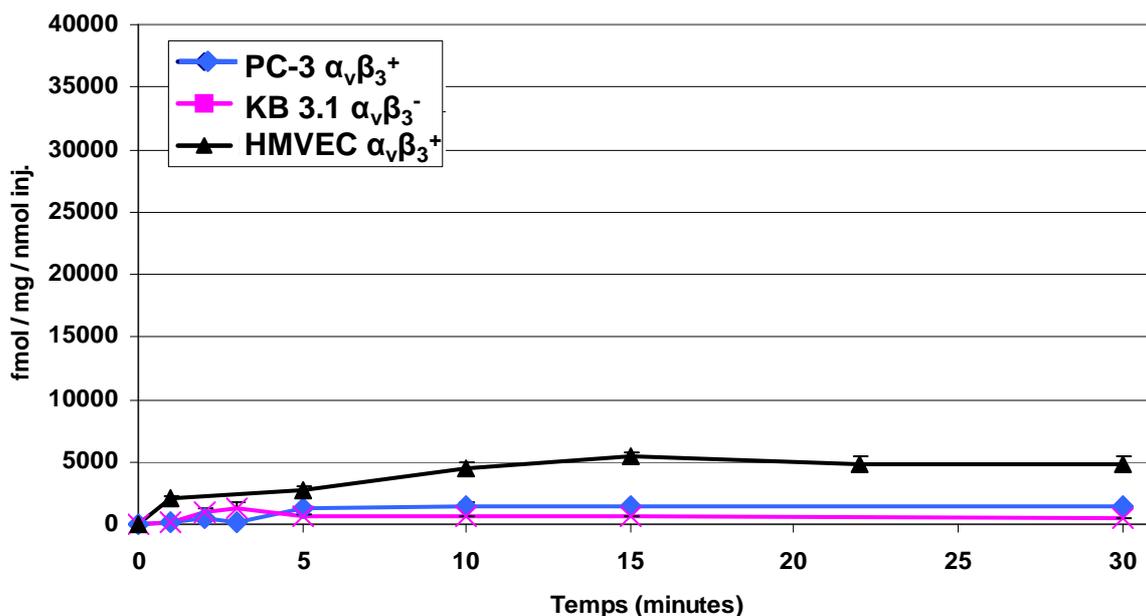


Figure 49 : Cinétique de captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD sur les trois types cellulaires.

Le  $^{125}\text{I}$ -cRGD est faiblement capté par les cellules KB 3.1 et PC-3. Les cellules HMVEC,  $\alpha_v\beta_3^+$ , captent davantage ce radioligand ; la captation variant très peu entre 10 et 30 minutes (Figure 49).

Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD (Figure 50) est très peu capté par les cellules KB 3.1.,  $\alpha_v\beta_3^-$ . En revanche, les cellules  $\alpha_v\beta_3^+$  captent davantage le traceur. Dans ces conditions d'expérimentation, le plateau de captation n'est pas atteint à 30 minutes ni pour les HMVEC, ni pour les PC-3. Ces dernières captent par ailleurs davantage de  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD que les HMVEC. Les différences de captation entre ces deux lignées cellulaires sont significatives dès 5 minutes ( $p < 0,01$ ).

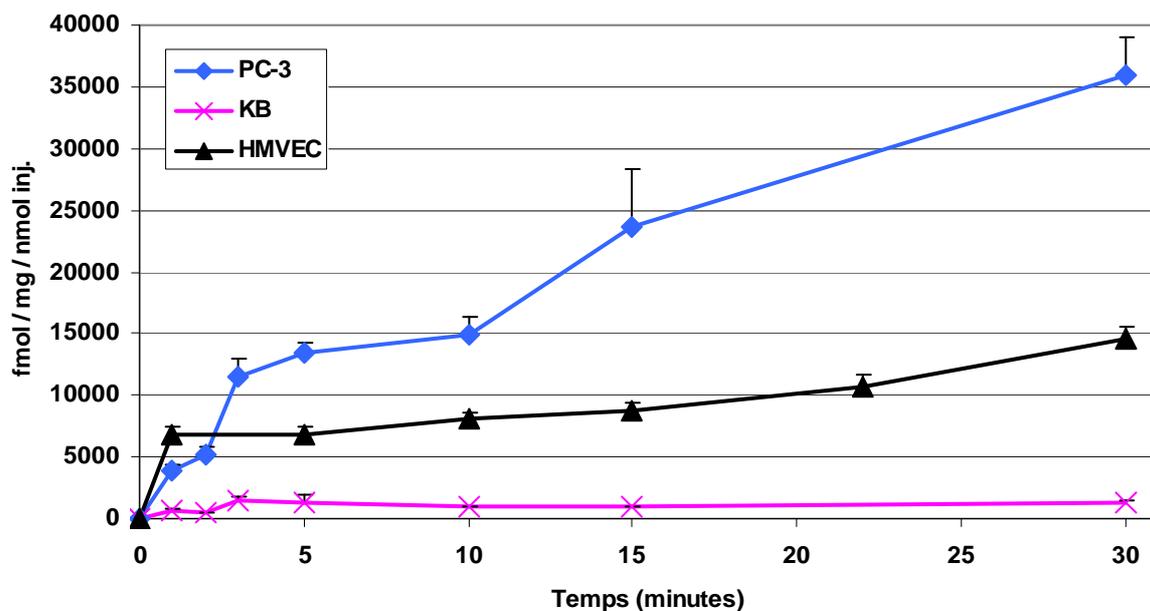


Figure 50 : Cinétique de captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD sur les trois types cellulaires.

Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD, molécule de contrôle non spécifique, est peu capté par l'ensemble des cellules (Figure 51). La captation varie peu au cours du temps.

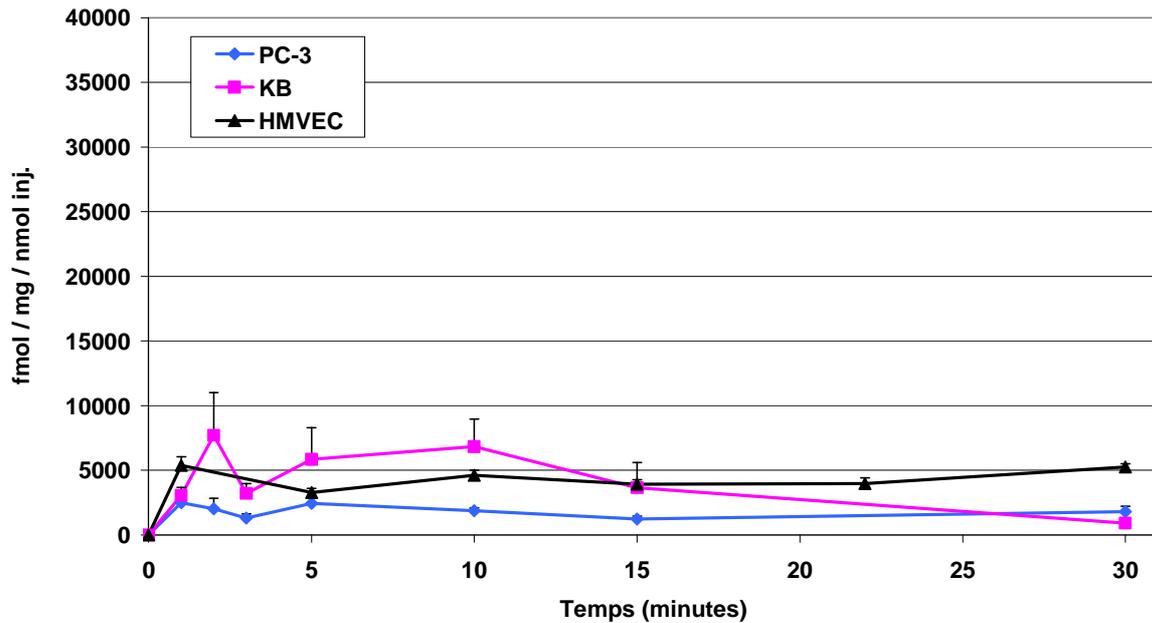


Figure 51 : Cinétique de captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD sur les trois types cellulaires.

Sur le modèle cellulaire PC-3, exprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en surface, le  $^{125}\text{I}$ -cRGD est faiblement capté. Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est 10 à 25 fois plus capté ( $p < 0,0001$ ) que le  $^{125}\text{I}$ -cRGD ; cette captation n'atteint pas de plateau dans nos conditions expérimentales. La molécule de contrôle non spécifique  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD est faiblement captée par les cellules PC-3.

Les cellules KB 3.1,  $\alpha_v\beta_3$  négatives, captent peu l'ensemble des radioligands ; il n'y a pas de différence de captation significative entre les différents traceurs.

Les HMVEC, cellules endothéliales  $\alpha_v\beta_3^+$ , captent peu le  $^{125}\text{I}$ -cRGD et le contrôle non spécifique  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD. Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est quant à lui capté 1,5 à 2,3 fois plus que le  $^{125}\text{I}$ -cRGD, soit une différence de captation significative sur ce type cellulaire ( $p < 0,0001$ ).

## C - Effet de la concentration

### 1 - Captation sur PC-3

La captation de différentes concentrations de  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD par les cellules PC-3  $\alpha_v\beta_3^+$  est représentée figure 52. La captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD à 0,2 nmol augmente, puis atteint un plateau à 15 minutes. Entre 0,2 et 0,8 nmol de traceur, la captation est similaire. En revanche, à 2,2 nmol, la captation cellulaire augmente d'un facteur 2 à 4, de manière significative ( $p < 0,0001$ ).

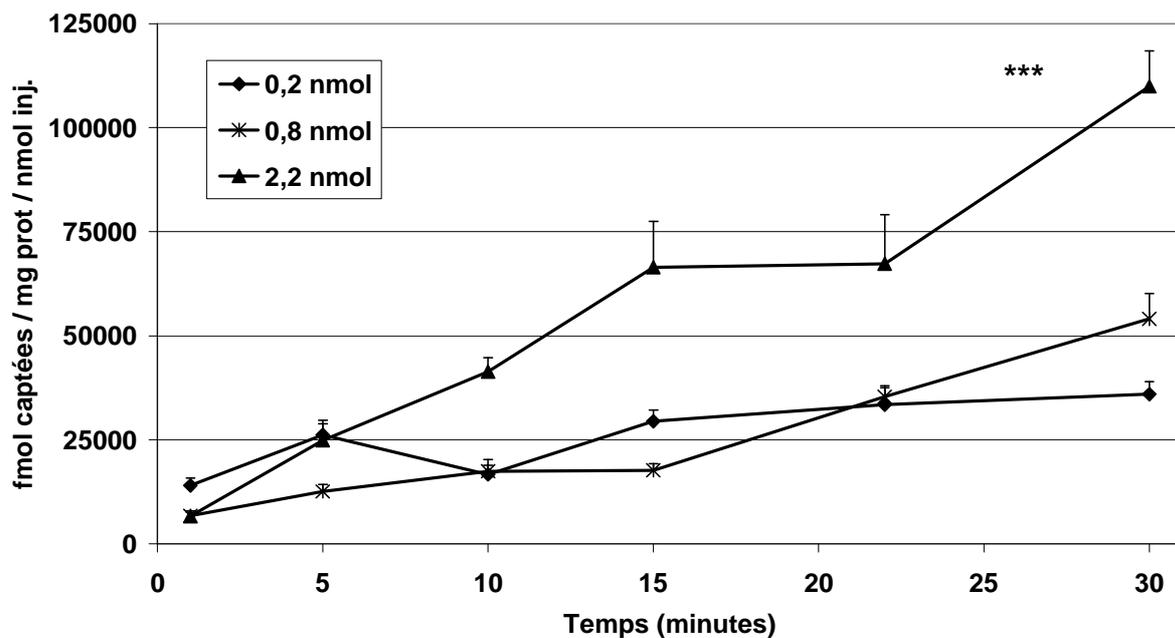


Figure 52 : Effet de la concentration du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD sur la captation du traceur par les cellules PC-3.

### 2 - Captation sur HMVEC

Sur les cellules HMVEC,  $\alpha_v\beta_3^+$ , la captation des différents traceurs varie avec la quantité de ligand, tant à 30 minutes qu'à 60 minutes.

À 30 minutes (Figure 53), la captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD est faible, homogène et proportionnelle à la quantité de ligand ajoutée. Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est en revanche capté davantage que le  $^{125}\text{I}$ -cRGD et ceci de manière significative ( $p < 0,01$ ). La captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD diminue avec l'augmentation de la quantité de ligand ajoutée et semble devenir proportionnelle au-delà de 20 nmol. Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD est peu capté et de manière proportionnelle à la quantité de ligand ajoutée.

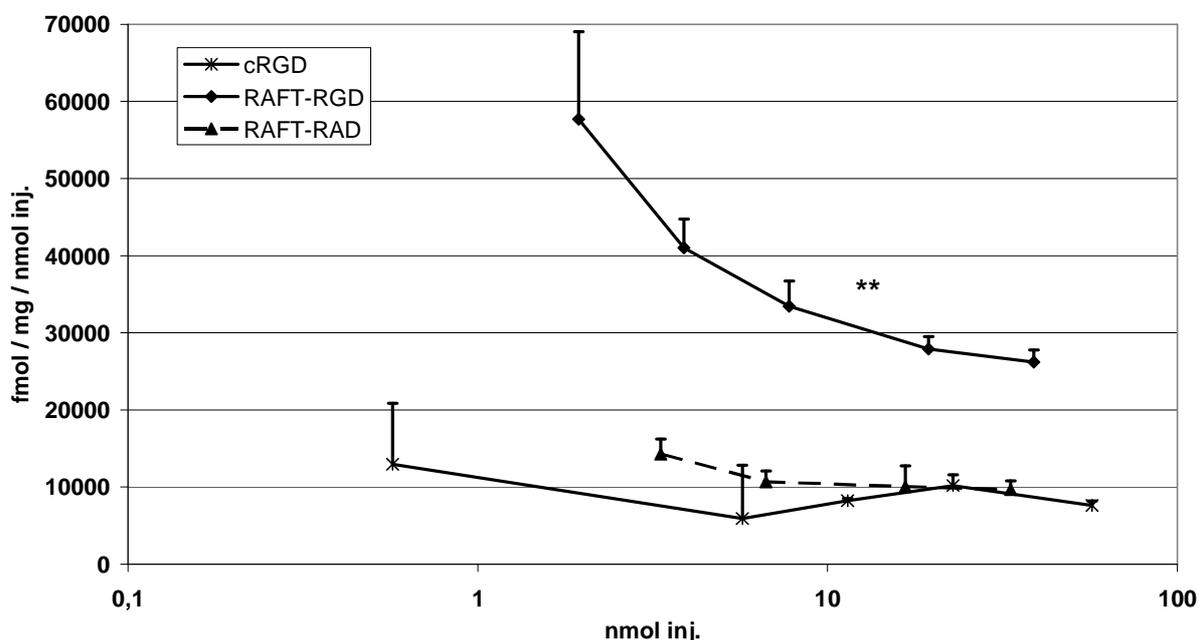


Figure 53 : Captation des radioligands à 30 minutes par les cellules HMVEC.

À 60 minutes (Figure 54), la captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD est forte dans les faibles quantités de ligand puis devient proportionnelle à la quantité de ligand ajoutée au-delà de 6 nmol. Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est davantage capté que le  $^{125}\text{I}$ -cRGD et ceci de manière significative ( $p < 0,01$ ). La captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD diminue avec l'augmentation de la quantité de ligand ajoutée, quelque soit sa valeur. Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD est peu capté, comparé à la molécule spécifique  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD ( $p < 0,01$ ).

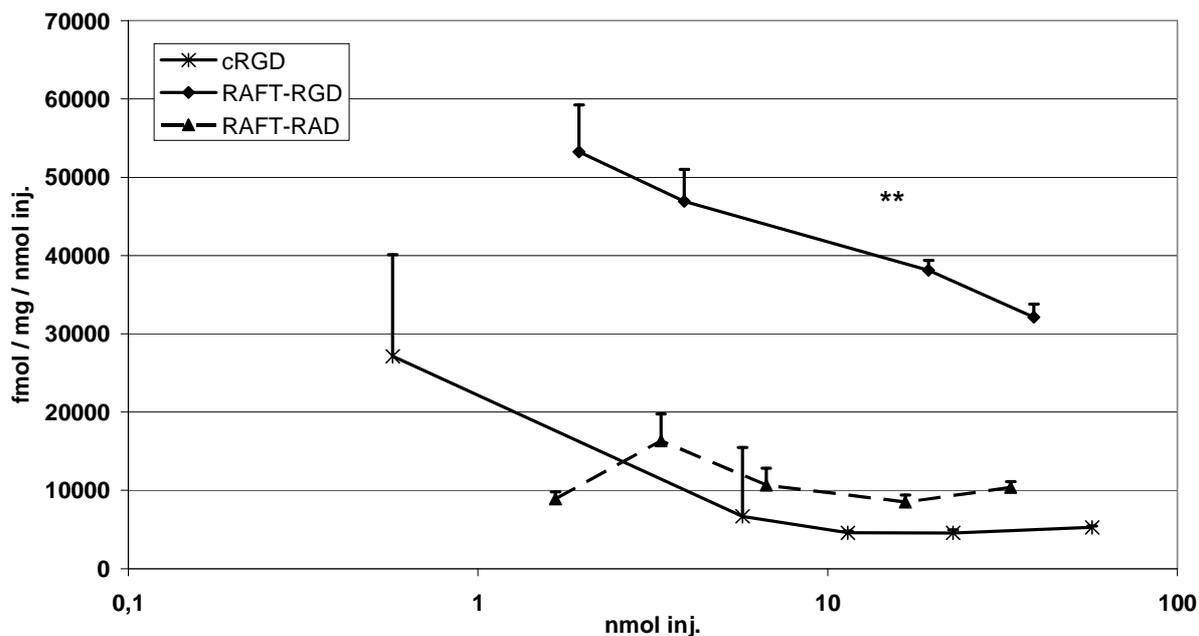


Figure 54 : Captation des radioligands à 60 minutes par les cellules HMVEC.

## D - Inhibition de la fixation

Des expériences d'inhibition de la fixation ont été réalisées sur les cellules endothéliales afin de montrer la spécificité de la liaison du RAFT-RGD sur les cellules  $\alpha_v\beta_3^+$  et de comparer l'affinité du ligand par rapport au contrôle spécifique cRGD.

Les résultats présentés dans la figure 55 indiquent que la captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD est réprimée d'environ 50 % par l'ajout d'un excès de 2,5x RAFT-RGD (nombre de mole). Cette différence de captation est significative tant à 15 qu'à 30 minutes ( $p < 0,001$ ). En revanche, la fixation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD n'est quant à elle réprimée significativement qu'à 30 minutes ( $p < 0,0001$ ) en présence d'un fort excès de cRGD (100x).

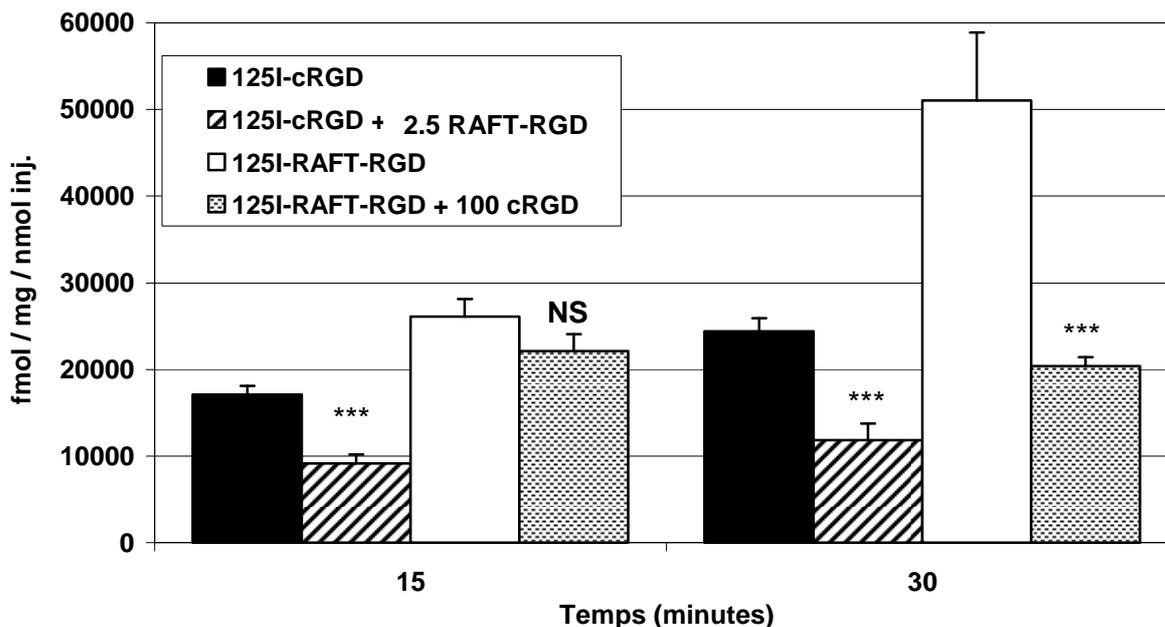


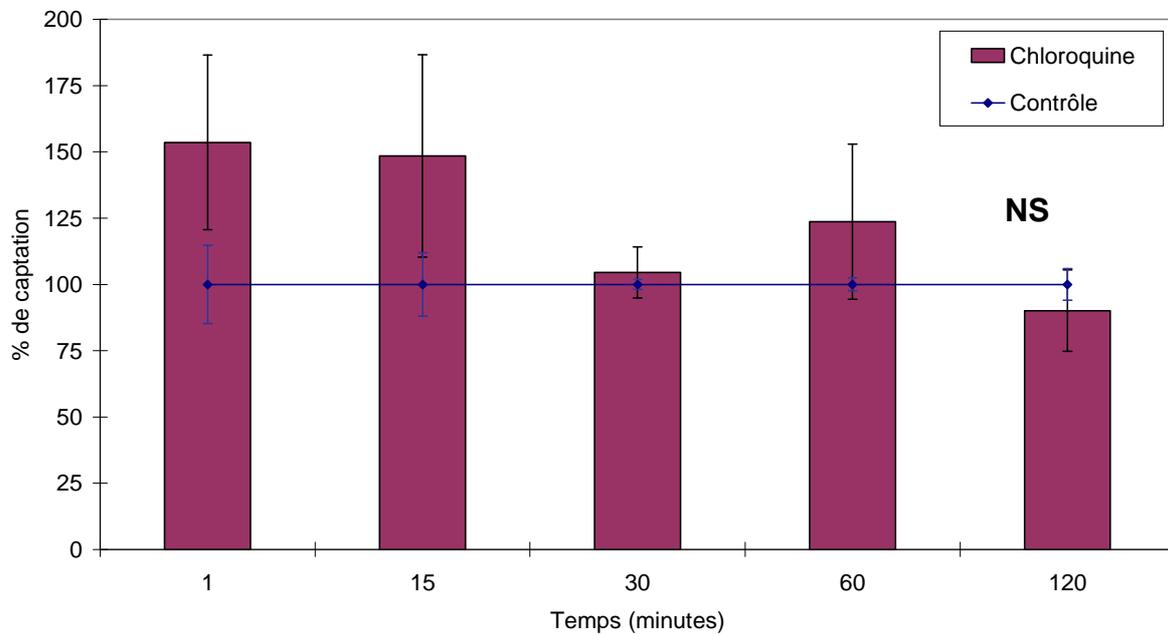
Figure 55 : Études de compétition sur les cellules HMVEC.

Le RAFT-RGD en excès diminue donc de manière significative la fixation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD, molécule de référence. De même, le cRGD diminue de manière significative la fixation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD. Les deux ligands se lient donc aux mêmes sites de fixation sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

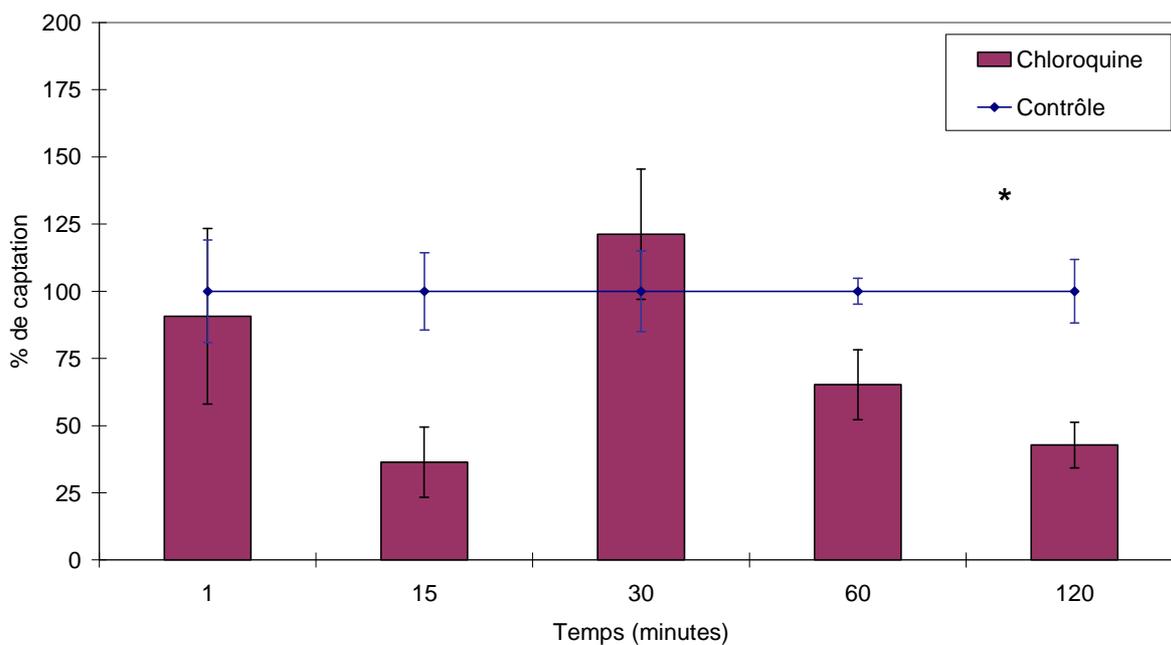
## E - Étude du mécanisme d'internalisation

Les intégrines, récepteurs membranaires, fixent et internalisent divers ligands. Ces derniers peuvent être internalisés par divers mécanismes dont l'endocytose. La chloroquine est une drogue qui empêche tout transfert de la surface cellulaire à l'endosome, par inhibition de l'endocytose. Des études de captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD et du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD ont été réalisées en présence de chloroquine afin d'observer l'effet sur la captation des traceurs. La radioactivité détectée lors de cette expérience correspond à celle des radioligands liés à la surface cellulaire et ayant pénétré la cellule par diffusion.

La chloroquine n'a pas d'effet sur la captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD ( $p > 0,1$  ; Figure 56) ; en revanche, elle inhibe de manière significative la captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD ( $p < 0,05$  ; Figure 57).



**Figure 56** : Effet de la chloroquine sur la captation par les cellules HMVEC du  $^{125}\text{I}$ -cRGD.



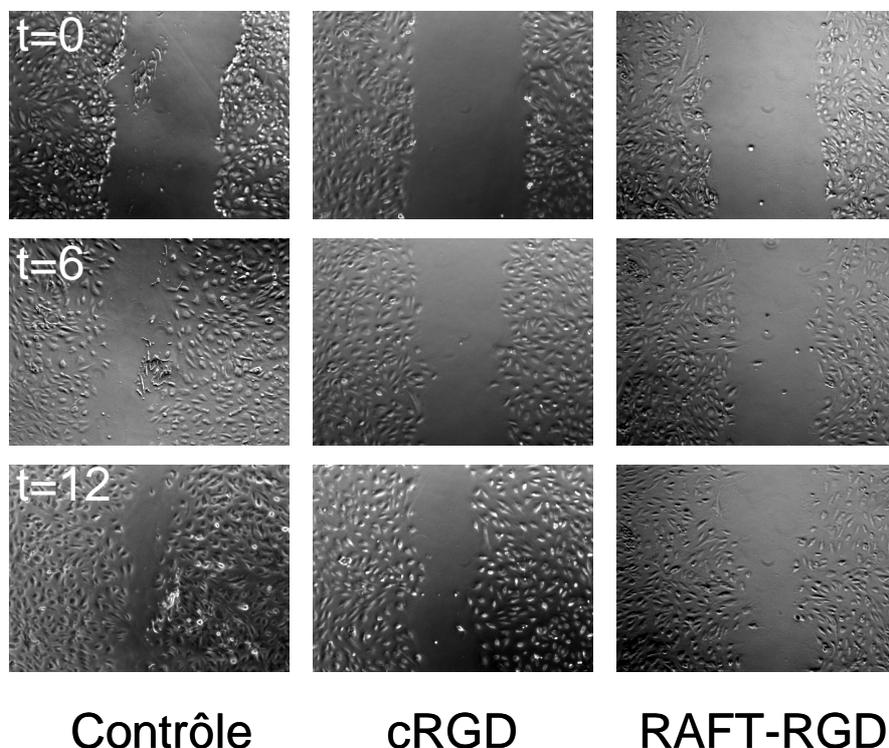
**Figure 57** : Effet de la chloroquine sur la captation par les cellules HMVEC du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD.

## F - Propriétés d'inhibition de l'angiogénèse

Le cyclo-RGD est actuellement en essais cliniques de phase I / II dans les glioblastomes, les mélanomes, le cancer de la prostate et l'ensemble des tumeurs solides. Son efficacité anti-angiogénique a été démontrée sur différents modèles cellulaires et animaux. Nous avons donc voulu déterminer les propriétés anti-angiogéniques du RAFT-RGD par deux tests simples d'angiogénèse : le test de blessure et la formation de pseudo-capillaires.

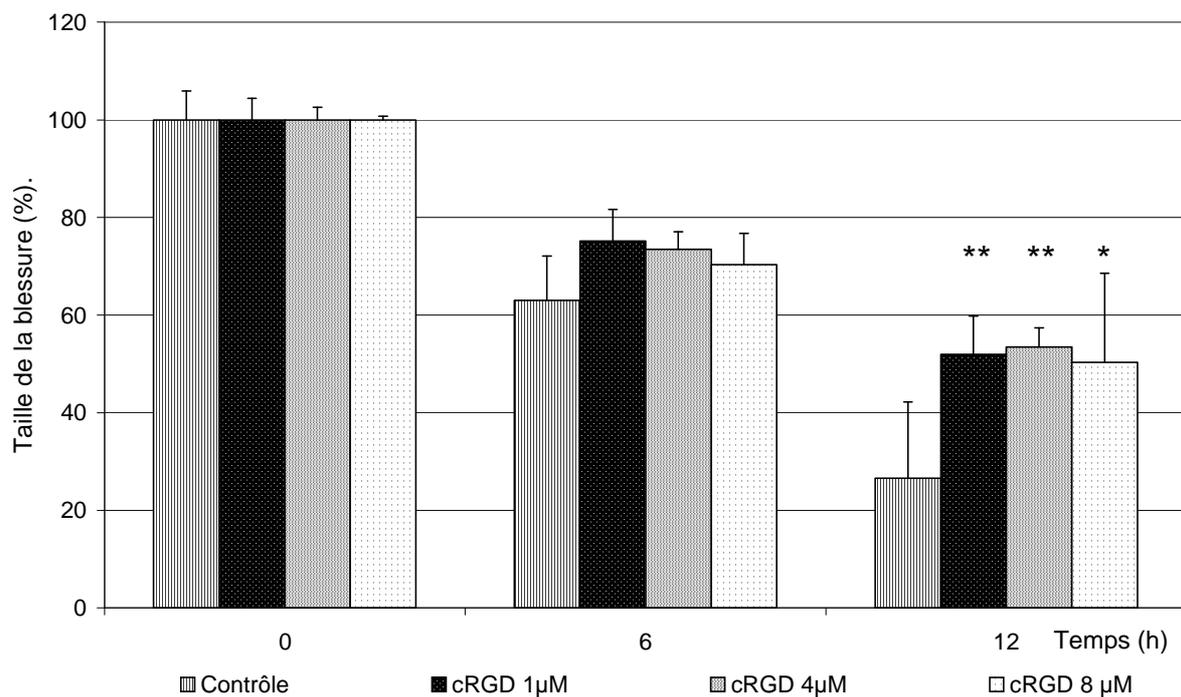
### 1 - Test de blessure

Une blessure de 200  $\mu\text{m}$  environ est réalisée sur le tapis de cellules endothéliales HMVEC à confluence. La cicatrisation, recouvrement de la zone dépourvue de cellule, est alors observée sous condition contrôle, ou en présence de cRGD ou de RAFT-RGD (Figure 58).



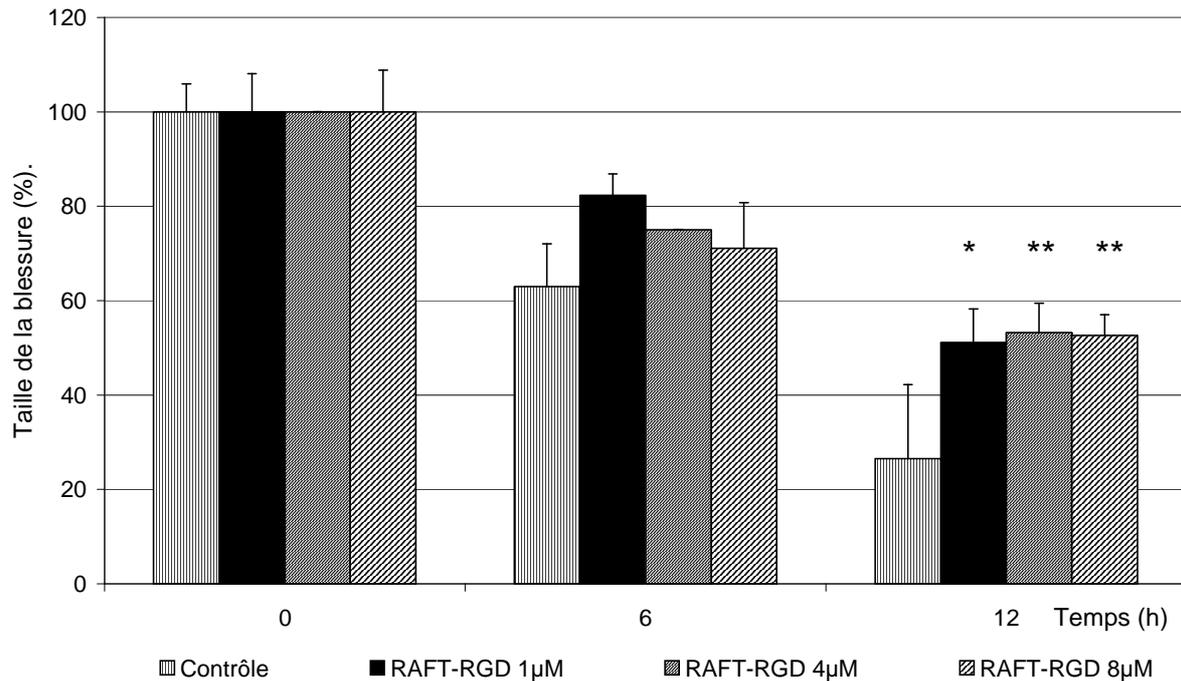
**Figure 58** : Exemples d'images de blessure en condition contrôle, en présence de cRGD ou de RAFT-RGD, réalisées à t = 0, 6 et 12 heures.

Dans cette expérience, malgré un ralentissement de la fermeture à 6h en présence de cRGD, les différences observées ne sont pas significatives par rapport au contrôle. À 12h, les différences deviennent significatives par rapport au contrôle quelque soit la quantité de cRGD testée (cRGD 1  $\mu\text{M}$   $p < 0,01$  ; 4 $\mu\text{M}$   $p < 0,01$  et 8  $\mu\text{M}$   $p < 0,05$  respectivement) (Figure 59).



**Figure 59** : Taille de la blessure du tapis cellulaire au cours du temps, en condition contrôle (rayures verticales) ou en présence de cRGD (points).

De manière analogue, le RAFT-RGD n'inhibe pas de manière significative la fermeture de la blessure à 6h. À 12h, les différences deviennent significatives par rapport au contrôle quelque soit la quantité de RAFT-RGD testée (1  $\mu\text{M}$   $p < 0,05$  ; 4  $\mu\text{M}$   $p < 0,01$  et 8  $\mu\text{M}$   $p < 0,05$ ) (Figure 60).



**Figure 60** : Taille de la blessure du tapis cellulaire au cours du temps, en condition contrôle (rayures verticales) ou en présence de RAFT-RGD (hachuré).

Le test de blessure indique que le RAFT-RGD et le cRGD ont des propriétés d'inhibition similaires et significatives à faibles doses. À 12 heures, les ligands inhibent la fermeture de la blessure d'environ 50 % par rapport à la condition contrôle. Entre 1 et 8 µM, l'effet dose est non significatif.

## 2 - Réseaux de pseudo-capillaires

Les cellules endothéliales HMVEC sontensemencées sur matrice de gel MATRIGEL® en présence ou non de peptides « RGD ». La matrice de gel est constituée de protéines matricielles hautement concentrées en laminine et collagène IV et enrichie en facteurs de croissance. Les cellules endothéliales adhèrent à la matrice et s'organisent en réseau de pseudo-capillaires au cours du temps, comme l'indique l'exemple figure 61.

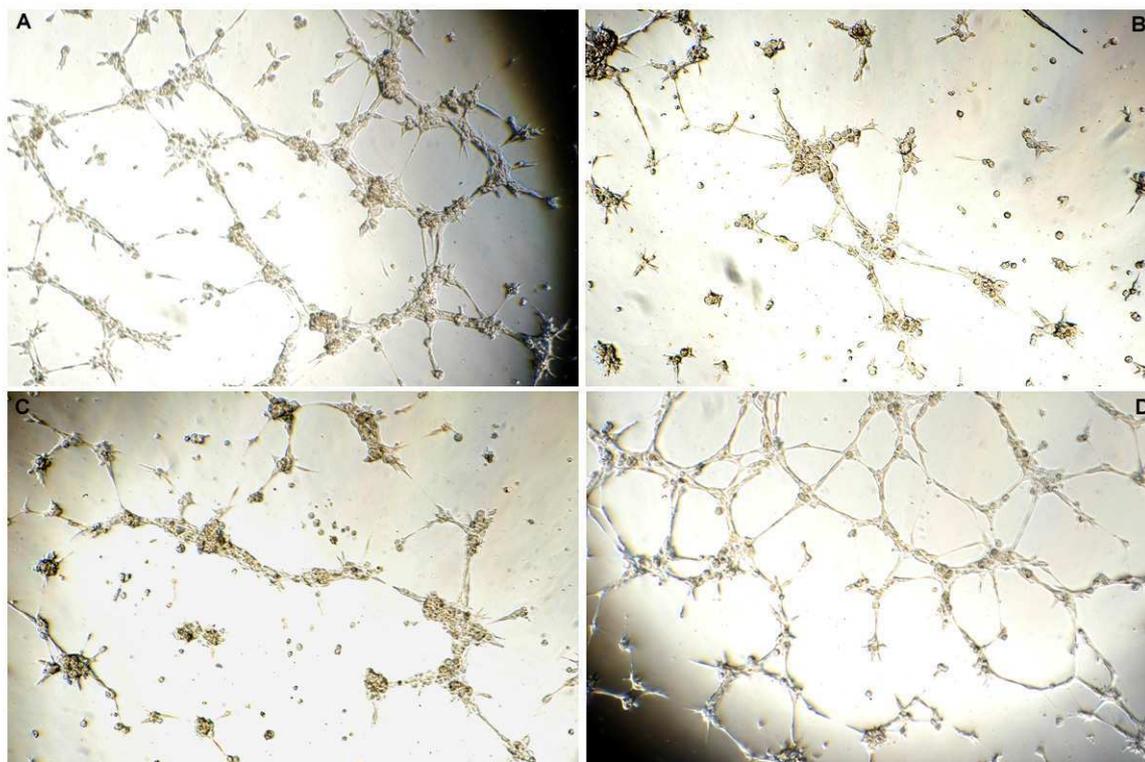
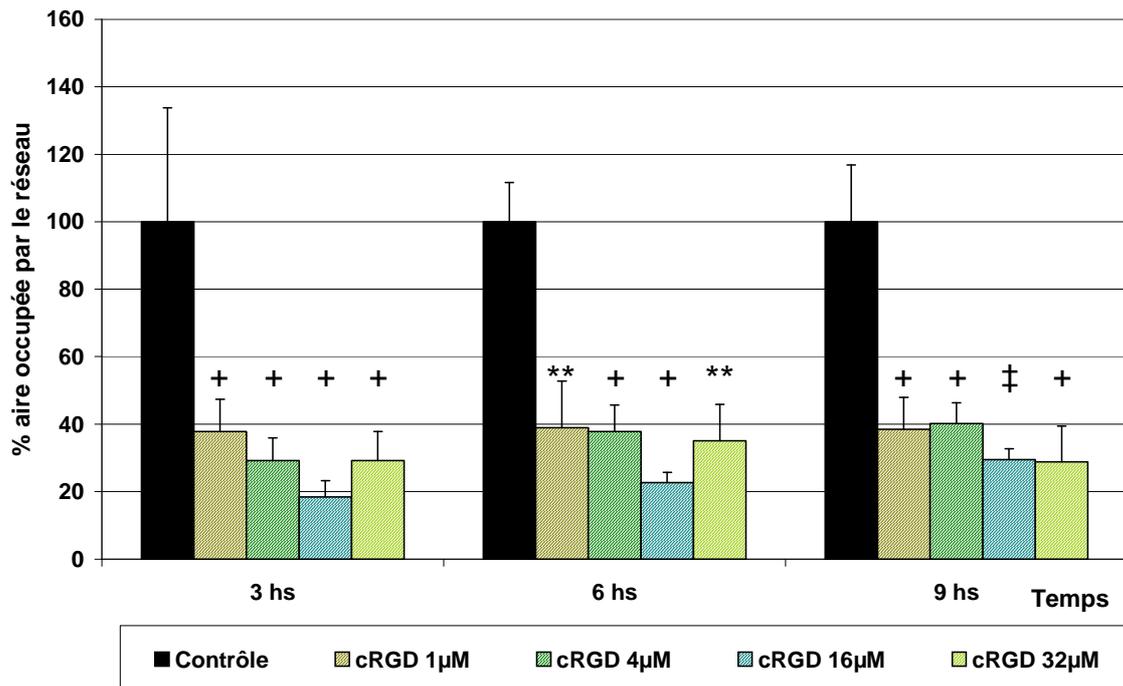


Figure 61 : Exemples représentatifs de pseudo-capillaires obtenus à 9 h en condition contrôle (A), en présence de cRGD (B), de RAFT-RGD (C) ou de RAFT-RAD (D).

Le ligand cRGD (Figure 62) inhibe significativement la formation du réseau de pseudo-capillaires, dès 3 heures ( $p < 0,0001$ ) (Figure 66) ; à 6 et 9 heures, la formation du réseau est également inhibée de manière significative ( $0,0001 < p < 0,01$ ). Aucun effet de la dose n'a pu être mis en évidence.

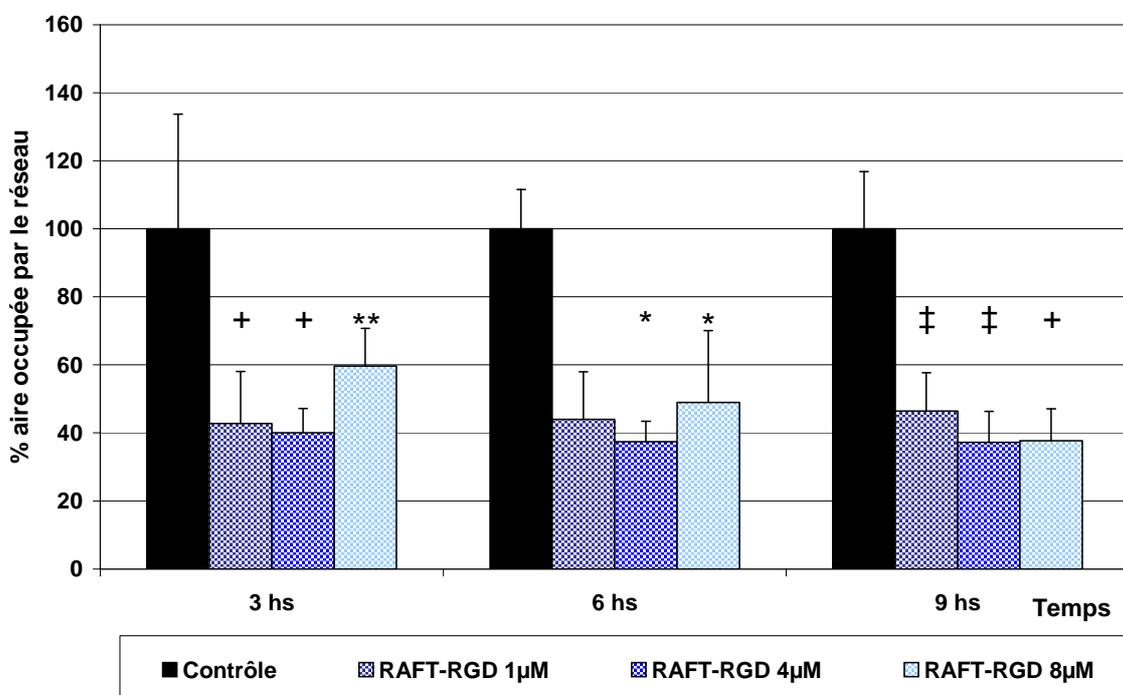
De même, le RAFT-RGD (Figure 63) inhibe de manière significative la formation du réseau dès 3 heures ( $p < 0,0001$  sauf pour RAFT-RGD  $8 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,01$ ) ; à 6 et 9 heures, la formation du réseau est inhibée de manière significative ( $0,0001 < p < 0,05$ ). Aucun effet de la dose n'a pu être mis en évidence.

En revanche, le RAFT-RAD n'a pas d'effet sur la mise en place du réseau de pseudo-capillaires (figure 64).



**Figure 62** : Pourcentage de l'aire occupée par le réseau de pseudo-capillaires à 3, 6 et 9hs après ensemencement en condition contrôle et en présence de cRGD (n ≥ 6).

\*\* p < 0,01, + p < 0,001 et ‡ p < 0,0001 vs. contrôle.



**Figure 63** : Pourcentage de l'aire occupée par le réseau de pseudo-capillaires à 3, 6 et 9hs après ensemencement en condition contrôle et en présence de RAFT-RGD (n ≥ 6).

\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, + p < 0,001 et ‡ p < 0,0001 vs. contrôle.

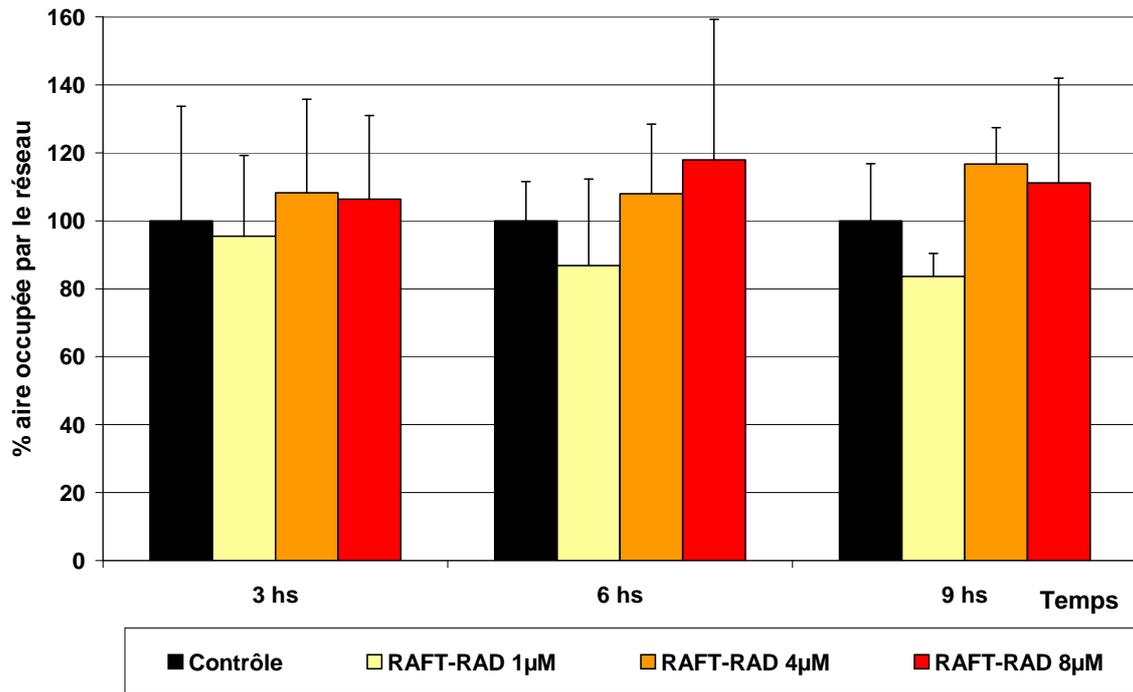


Figure 64 : Pourcentage de l'aire occupée par le réseau de pseudo-capillaires à 3, 6 et 9hs après ensemencement en condition contrôle et en présence de RAFT-RAD ( $n \geq 6$ ).  $p > 0,1$  vs. contrôle.

Dans ce test de pseudo-capillaires, le cRGD et le RAFT-RGD semblent posséder des propriétés d'inhibition similaires et significatives à faibles doses. Par ailleurs, aucun effet de la concentration n'est observé dans ces conditions. Le RAFT-RAD, molécule non spécifique, n'interfère pas avec la mise en place du réseau de pseudo-capillaires (Figure 64).



# Études *in vivo*



## II - Études *in vivo*

### A - Ligands marqués à l'iode-125 : étude sur le modèle PC-3 greffé sur souris nudes

#### 1 - Biodistributions

Les premières expérimentations *in vivo* ont été réalisées avec les radioligands marqués à l'iode-125 ( $^{125}\text{I}$ -cRGD,  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD et  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD), sur un modèle de xénogreffe de cellules tumorales humaines PC-3, de statut  $\alpha_v\beta_3^+$ , sur souris nudes.

##### 1-1 $^{125}\text{I}$ -cRGD

Le  $^{125}\text{I}$ -cRGD, comme l'indique la figure 65, est éliminé par voie rénale. Au niveau tumoral, la captation atteint 1,58 puis 2,15 % DI / g, respectivement à 1 et 2 heures post-injection. Cette valeur diminue ensuite pour atteindre 0,65 % DI / g à 4h et 0,02% DI / g à 24h p.i. Les autres organes captent peu le traceur.

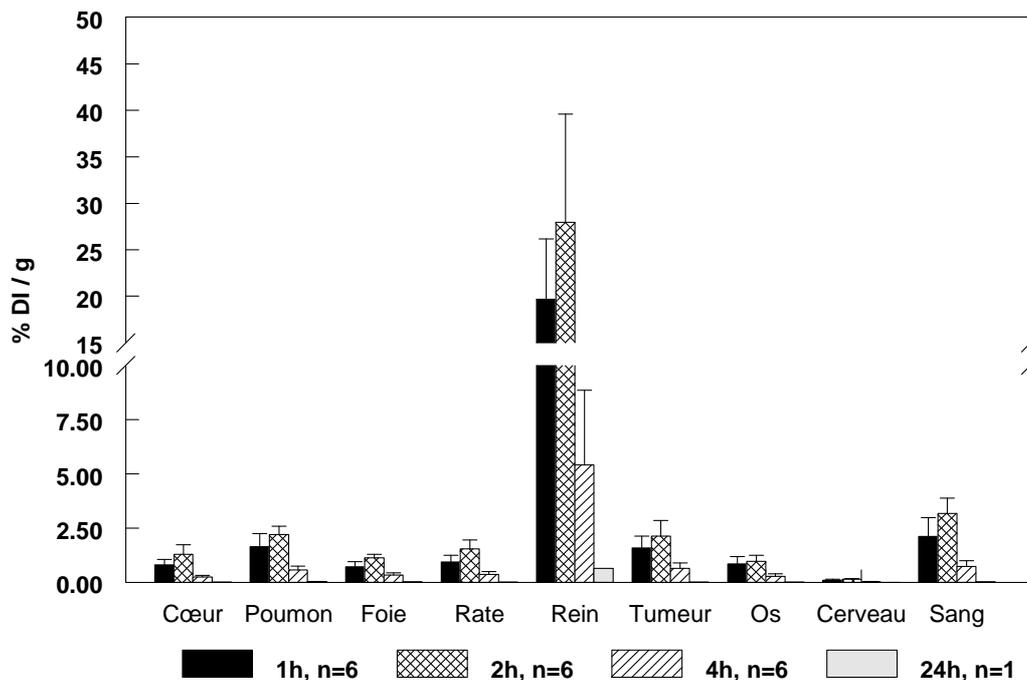


Figure 65 : Biodistribution du  $^{125}\text{I}$ -cRGD chez la nude greffée avec PC-3.

### 1-2 $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD

Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est également éliminé par voie rénale (Figure 66). La captation tumorale est de 2,62 % DI / g à 1h p.i. ; pourcentage qui décroît au cours du temps et atteint 1,06 puis 1,20 et 0,07 % DI / g à respectivement 4, 6 et 18 heures p.i.

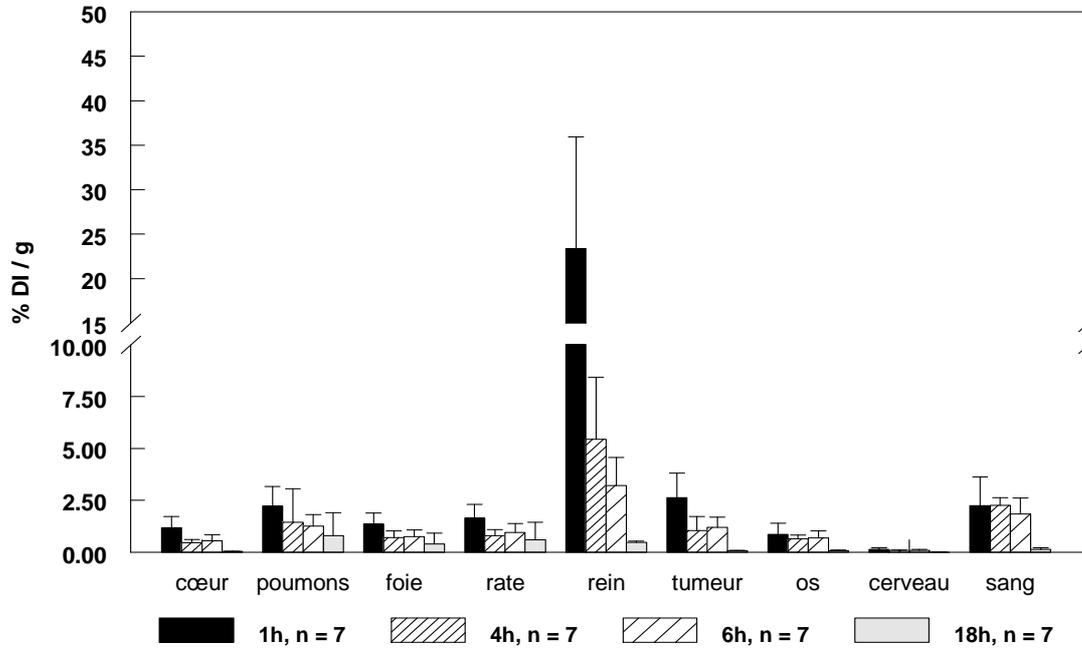


Figure 66 : Biodistribution du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD chez la nude greffée avec PC-3.

### 1-3 $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD

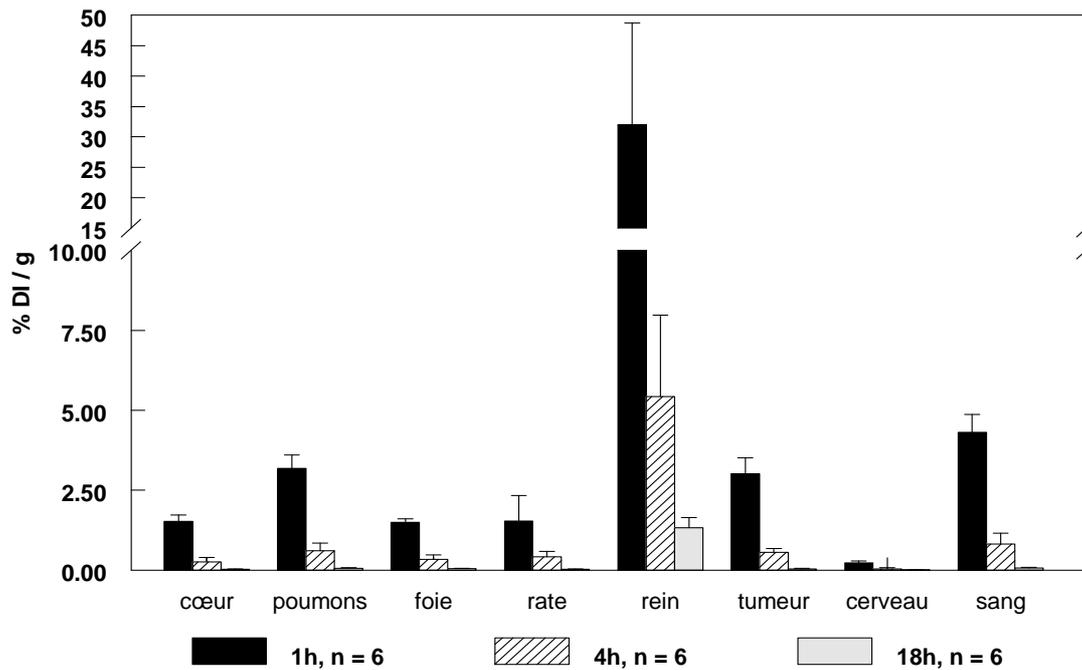


Figure 67 : Biodistribution du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD chez la nude greffée avec PC-3.

Le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD est également éliminé par voie rénale. Au niveau tumoral, la captation atteint 3 % DI / g à 1 heure post-injection, puis 0,56 % à 4 heures et 0,04 % DI / g à 18 heures (Figure 67). La clairance sanguine est rapide.

#### 1-4 Comparaison des biodistributions des ligands iodés

Les ligands iodés sont tous éliminés par voie rénale et de clairance sanguine rapide. À 1 heure p.i, la captation tumorale du  $^{125}\text{I}$ -cRGD est proche de 1,6 % DI / g, celle du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD proche de 2,6 %. La différence de captation tumorale entre les deux ligands n'est significative ni à 1 heure, ni à 4 heures ( $p > 0,05$ ) (Figure 68). En revanche, le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD, molécule non spécifique, est autant capté par les tumeurs que le RAFT-RGD, tant à 1 heure qu'à 4 heures p.i. ( $p > 0,1$ ).

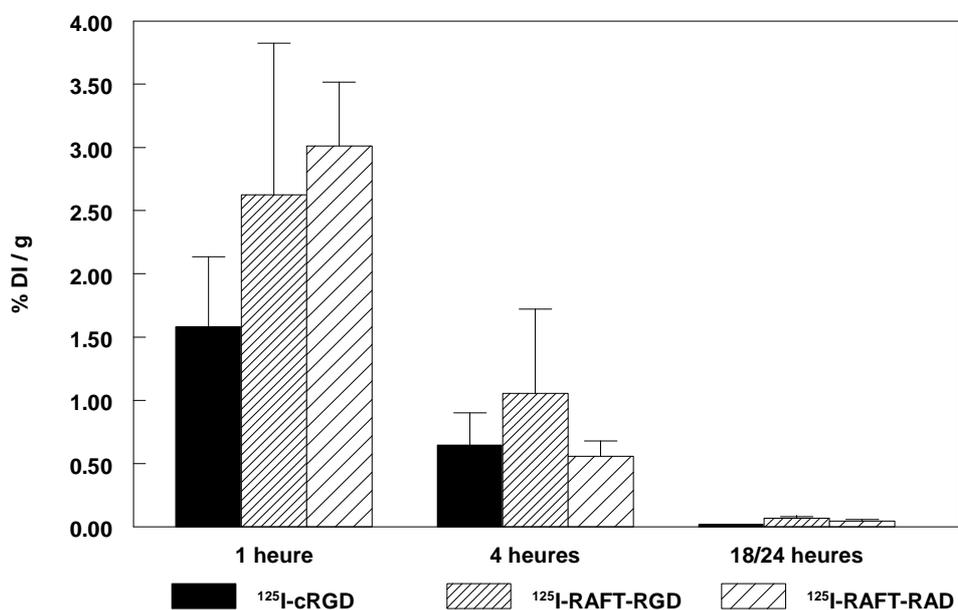
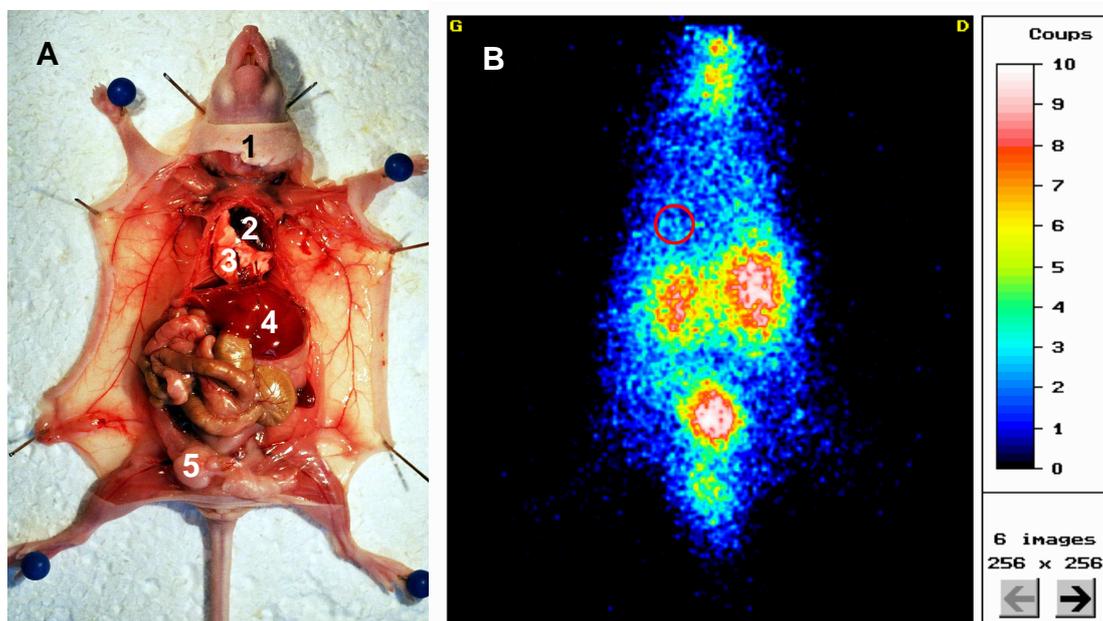


Figure 68 : Captation tumorale des ligands marqués à l'iode-125 au cours du temps, chez la nude greffée avec PC-3.

## 2 - Imagerie planaire

Lors de l'imagerie planaire les animaux sont placés face ventrale sur la caméra.

Aucune tumeur PC-3 n'a pu être visualisée sur ce modèle d'étude (Figure 69) avec les traceurs iodés. On observe une accumulation du ligand au niveau de la thyroïde et des muqueuses stomacale et intestinale. Ceci nous fait supposer la présence de désiodases qui dégradent le ligand *in vivo* et l'empêchent d'atteindre sa cible en quantité suffisante.



**Figure 69** : (A) Anatomie d'une souris nude : 1 Thyroïde ; 2 coeur ; 3 poumons ; 4 foie ; 5 vessie ; 6 rein gauche. (B) Image scintigraphique du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD, chez la souris nude greffée avec une tumeur PC-3 au niveau de l'omoplate, 1h post-injection. L'emplacement de la tumeur est représenté par un cercle.

Afin de vérifier que les tumeurs sont suffisamment vascularisées pour permettre l'imagerie gamma, nous avons réalisé une acquisition après injection de Sestamibi marqué au technétium-99m. Le Sestamibi est un marqueur de perfusion largement utilisé en cardiologie nucléaire et décrit pour se fixer dans les tumeurs.

La tumeur n'est pas visible dans ce cas, comme l'atteste la figure 70.

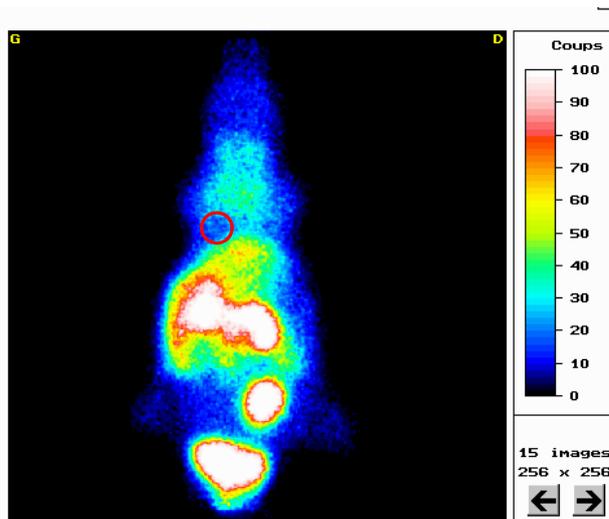


Figure 70 : Image scintigraphique d'une souris nude après injection de  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi, 1h p.i. L'emplacement de la tumeur est représenté par un cercle.

## B - Ligands marqués au technétium-99m

### 1 - Études sur le modèle KB 3.1 greffé sur souris nudes

#### 1-1 Biodistributions

Sur le même principe que les ligands iodés, les ligands technétiés ont été injectés à des souris nude porteuses de carcinome KB 3.1.,  $\alpha_v\beta_3$  négatif. Les résultats sont présentés dans les figures 71 à 72. La molécule de RAFT-RAD marquée au technétium-99m n'était pas encore disponible lors de la réalisation de cette étude.

#### a- $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD

Le ligand cRGD marqué au technétium-99m est rapidement éliminé chez la souris nude, par voies hépatobiliaire et rénale. La tumeur KB 3.1 capte  $0,73 \pm 0,11$  % DI / g à 4 h et  $0,71 \pm 0,18$  % DI / g à 24 h (Figure 71).

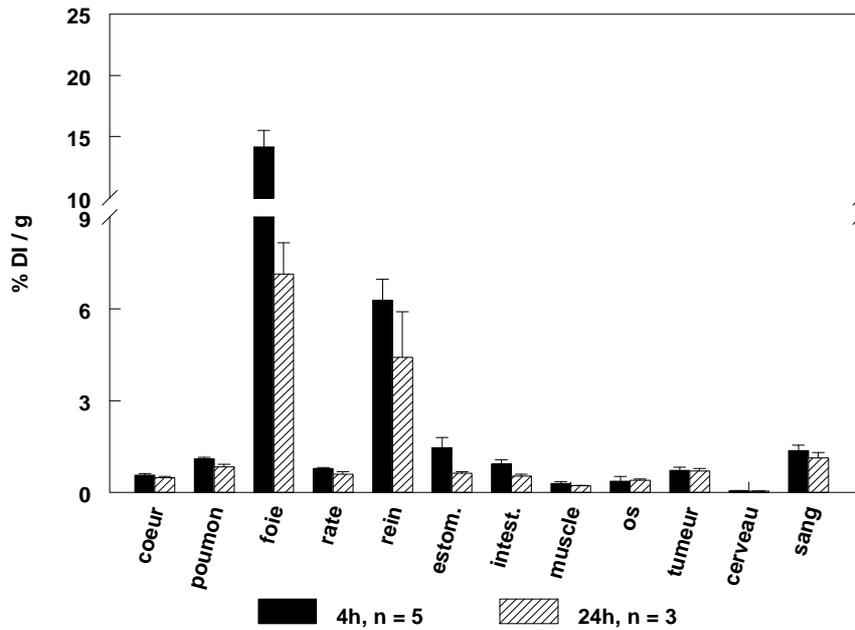


Figure 71 : Biodistribution du <sup>99m</sup>Tc-cRGD chez la souris nude greffée avec le carcinome humain KB 3.1 ; n = 5 à 4 h et n = 3 à 24 h.

### b- <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD

Le <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD est davantage éliminé par voie rénale que le contrôle positif cRGD ( $p < 0,0001$ ) et plus faiblement par voie hépatobiliaire ( $p < 0,01$ ). La tumeur capte  $0,91 \pm 0,23$  % DI / g à 4 heures, pourcentage qui diminue au cours du temps jusqu'à  $0,85 \pm 0,18$  à 24 heures (Figure 72).

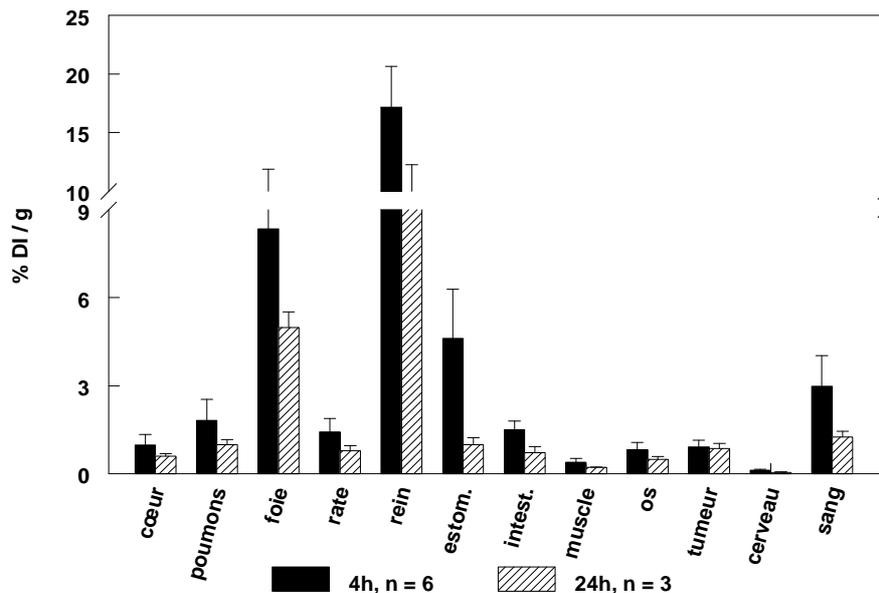


Figure 72 : Biodistribution du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD chez la souris nude greffée avec le carcinome humain KB 3.1 ; n = 6 à 4 h et n = 3 à 24 h.

### c- Comparaison de la captation tumorale

La captation tumorale des ligands (Figure 73) est similaire à 4 h et à 24 h ( $p > 0,1$ ). De plus, il n'existe pas de différence de captation significative entre les temps de 4 et 24 heures pour chacun des radioligands ( $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD  $p = 0,69$  ;  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD  $p = 0,80$ ).

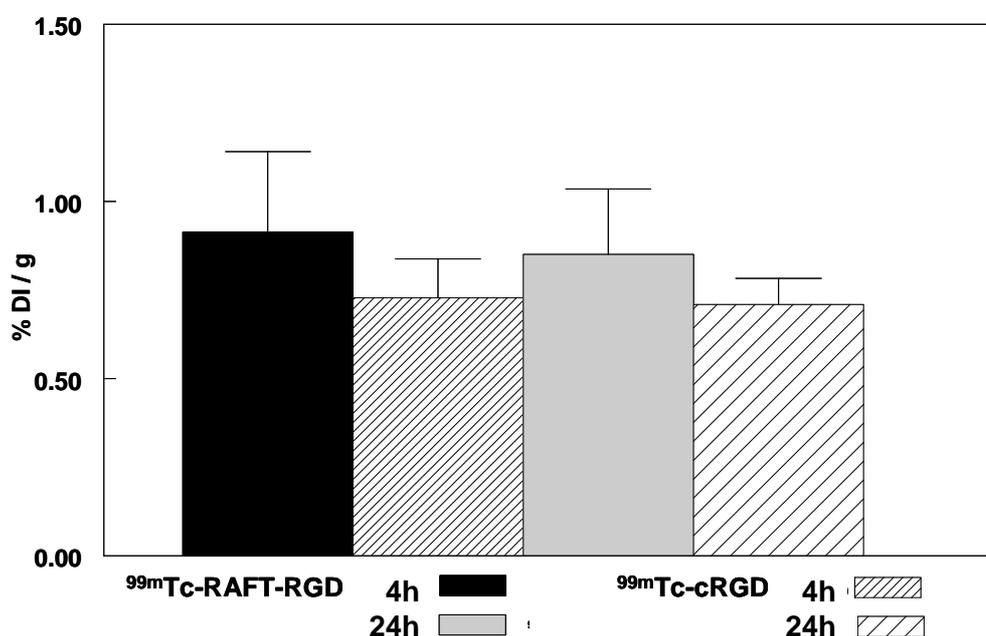
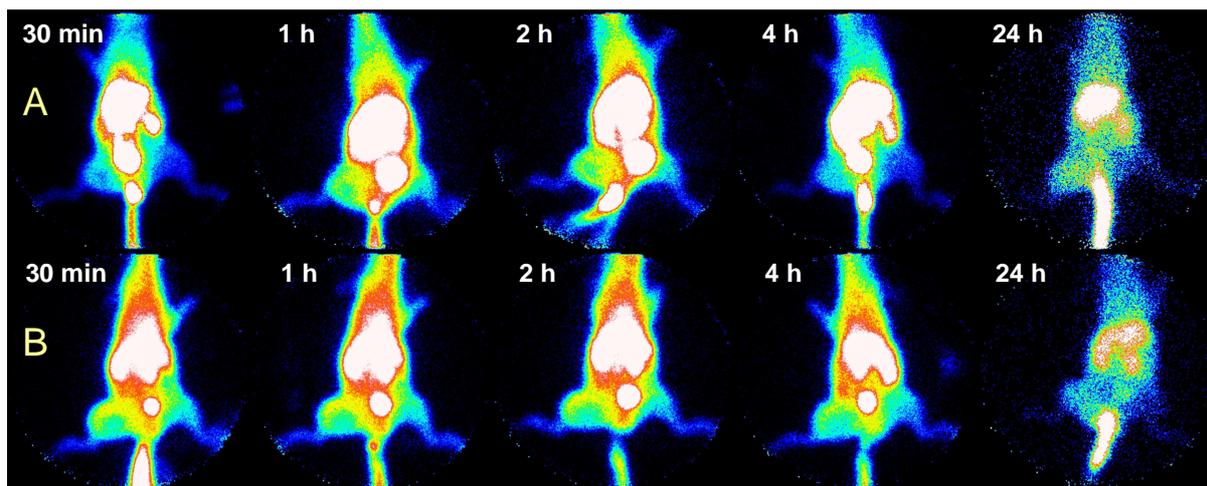


Figure 73 : Captation tumorale des ligands technétiés à 4 et 24 heures.

### 1-2 Imagerie planaire

Suite à l'injection de radioligands, les souris sont anesthésiées et placées sous gamma caméra dédiée au petit animal (Biospace Mesures) de 30 minutes à 24 heures p.i. Les images obtenues sont représentées dans la figure 74.



**Figure 74** : Exemples d'imagerie planaire corps entier de souris greffées avec le carcinome KB 3.1, réalisés à 30 minutes, 1, 2, 4 et 24 heures après injection de (A)  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD et (B)  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. Les tumeurs ont été greffées sur le membre inférieur situé à gauche de l'image.

Pour chaque animal, la tumeur est visible dès 30 minutes et jusqu'à 24 heures, avec l'un et l'autre des radioligands. Les différents rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » observés sont récapitulés dans le tableau 14.

	Temps	$^{99m}\text{Tc}$ -cRGD	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD
Imagerie	30 minutes	1,92 ± 0,17	1,52 ± 0,31
	1 heure	1,72 ± 0,43	1,52 ± 0,22
	2 heures	1,79 ± 0,09	1,66 ± 0,23
	<b>4 heures</b>	<b>1,79 ± 0,11</b>	<b>1,78 ± 0,40</b>
	24 heures	2,94 ± 0,82	2,51 ± 0,71
Biodistribution	<b>4 heures</b>	<b>2,52 ± 0,61</b>	<b>2,41 ± 0,54</b>
	24 heures	3,15 ± 0,49	3,95 ± 0,69

**Tableau 14** : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus après quantification d'images scintigraphiques planaires (Imagerie) et après sacrifice et prélèvement d'organes (Biodistribution).

Aucune différence entre les deux radioligands n'a pu être démontrée lors de cette expérience ; en effet, bien qu'il existe une différence significative du rapport T/MC avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD entre 4 et 24 heures d'après les résultats de biodistribution ( $p < 0,01$ ), celle-ci n'apparaît plus après quantification des images scintigraphiques planaires *in vivo* ( $p > 0,05$ ).

## 2 - Études sur le modèle B16F0 greffé sur souris C57Bl/6J

### 2-1 Biodistributions

Les ligands technétiés ont également été injectés à des souris porteuses de mélanome syngénique de type B16F0, modèle tumoral  $\alpha_v\beta_3$  positif très angiogénique.

#### a- $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD

La biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD sur le modèle C57Bl/6J greffé avec le mélanome B16F0 est présentée dans la figure 75. Le  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD est éliminé par voie rénale et hépatobiliaire. Au niveau tumoral, la captation est de  $1,60 \pm 0,36$  % DI / g. La cinétique sanguine du ligand est lente puisque l'on retrouve encore  $5,79 \pm 1,59$  % DI / g, à 1 heure post-injection.

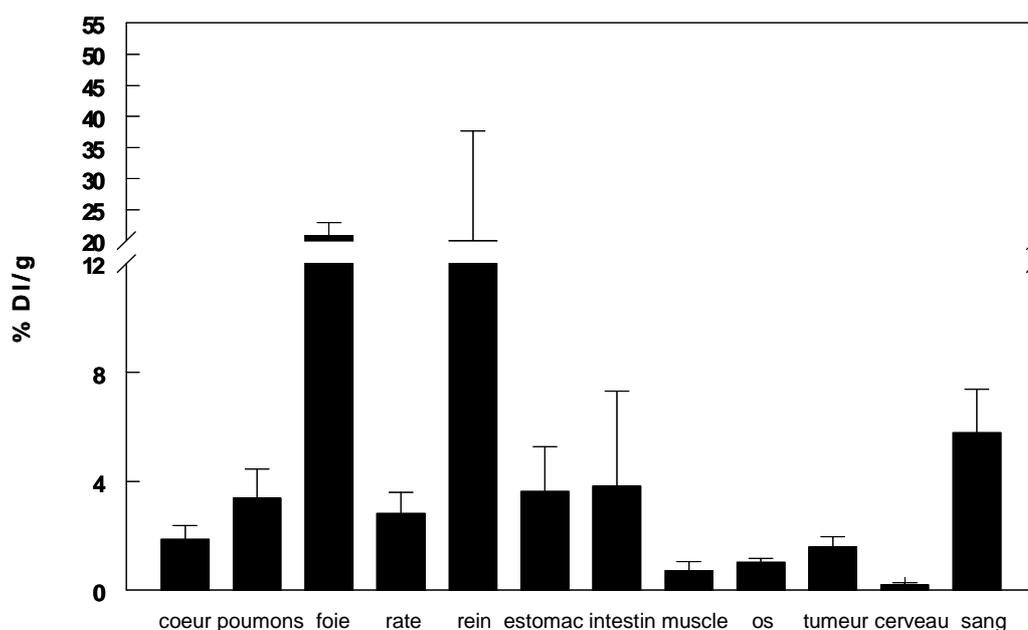


Figure 75 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD à 1h, chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0 ; n=6.

**b-  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD**

Le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est éliminé par voies rénale et hépatobiliaire. La clairance sanguine est également assez lente. Au niveau tumoral, la captation varie peu entre 1 et 4 heures avec respectivement  $2,41 \pm 0,51$  et  $2,23 \pm 0,35$  % DI / g ( $p > 0,1$ ) (Figure 76). Le muscle et le cerveau captent très peu le traceur.

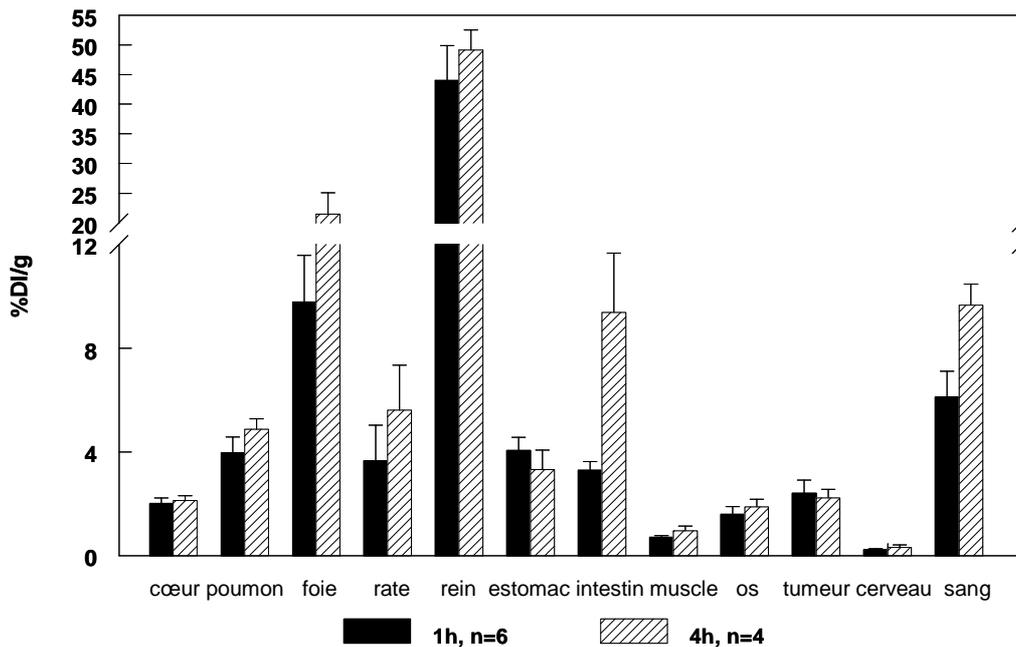
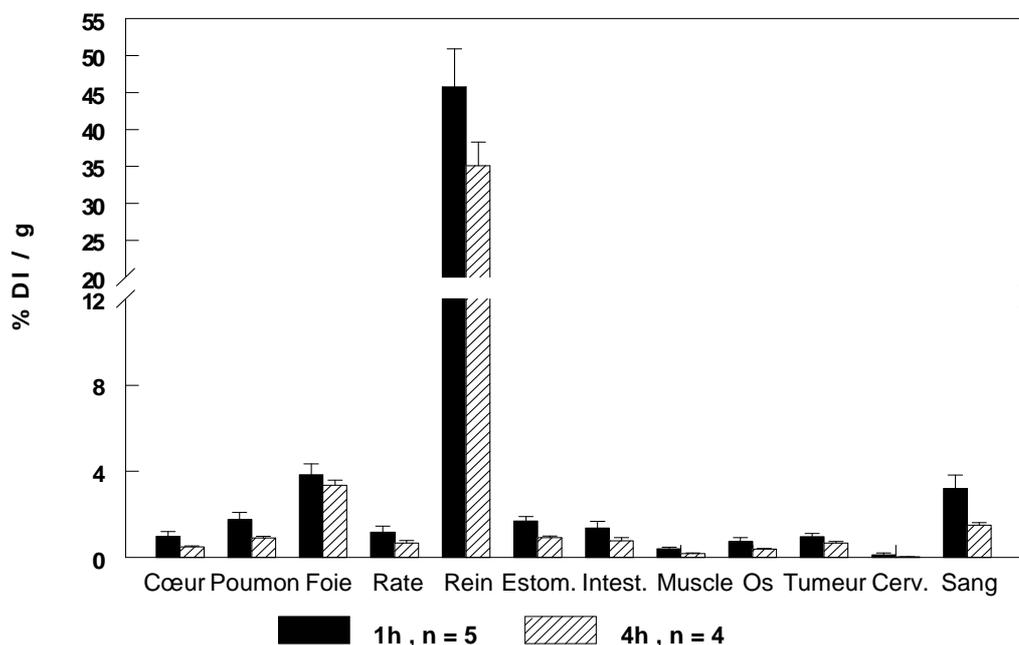


Figure 76 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0.

**c-  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD**

La clairance sanguine du contrôle non spécifique  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD est plus rapide que celle du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ( $p < 0,001$  à 1h et  $p < 0,0001$  à 4h). La captation tumorale est plus faible que celle des peptides contenant le motif « RGD » avec 0,98 et 0,68 % DI / g à respectivement 1h et 4h (vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD  $p < 0,001$  et vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD  $p < 0,01$ ). L'ensemble des organes capte très peu ce traceur (Figure 77) : l'activité musculaire est par ailleurs significativement plus faible qu'avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ( $p < 0,0001$ ).



**Figure 77** : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD à 1h et 4h, chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0.

#### **d- Comparaison des distributions des ligands technétiés**

Les ligands technétiés sont éliminés principalement par voie rénale mais également par voie hépatobiliaire. Leur clairance sanguine est lente. À 1 heure p.i, la captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD est proche de 1,60 % DI / g, celle du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD proche de 2,41 % soit un rapport de 1,5 en faveur du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ; cette différence de captation entre les deux ligands est significative ( $p < 0,01$ ). De plus, le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD est peu capté par les tumeurs (Figure 78), moins de 1 % DI / g ; ces différences de captation sont significatives tant par rapport au  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ( $p < 0,001$ ) que par rapport au  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD ( $p < 0,01$ ).

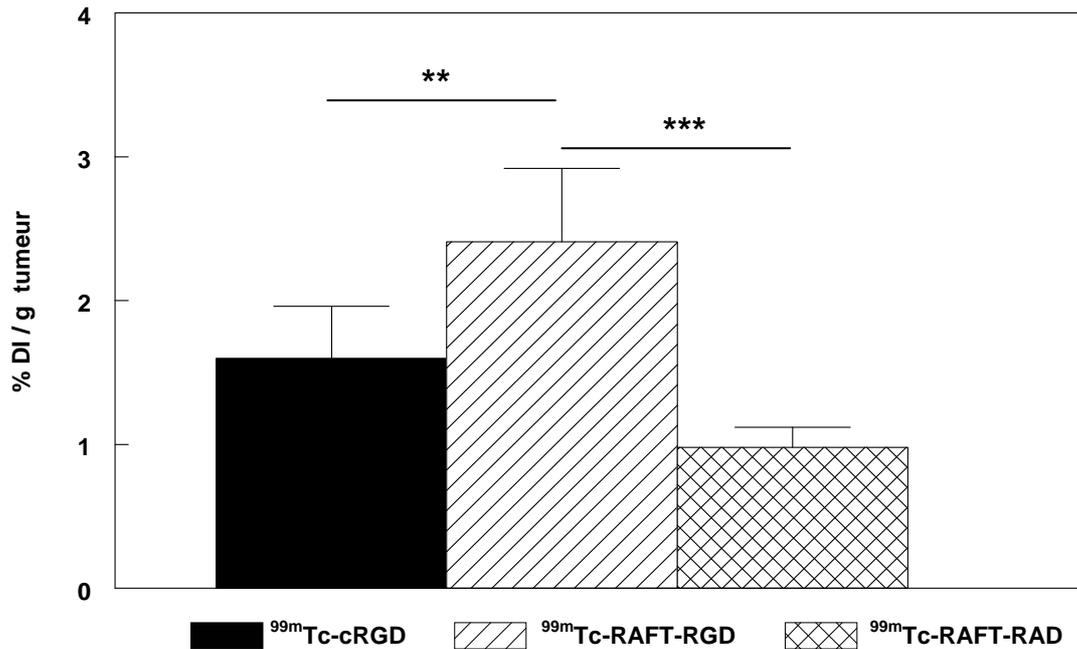


Figure 78 : Captation tumorale des ligands technétiés par la souche B16F0, à 1h p.i.

\*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  vs.  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$ .

## 2-2 Imagerie planaire

### a- Ligands technétiés à 1h p.i.

L'imagerie planaire corps entier réalisée à l'aide des radioligands  $^{99m}\text{Tc-cRGD}$ ,  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$  et  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$  est représentée figure 79.

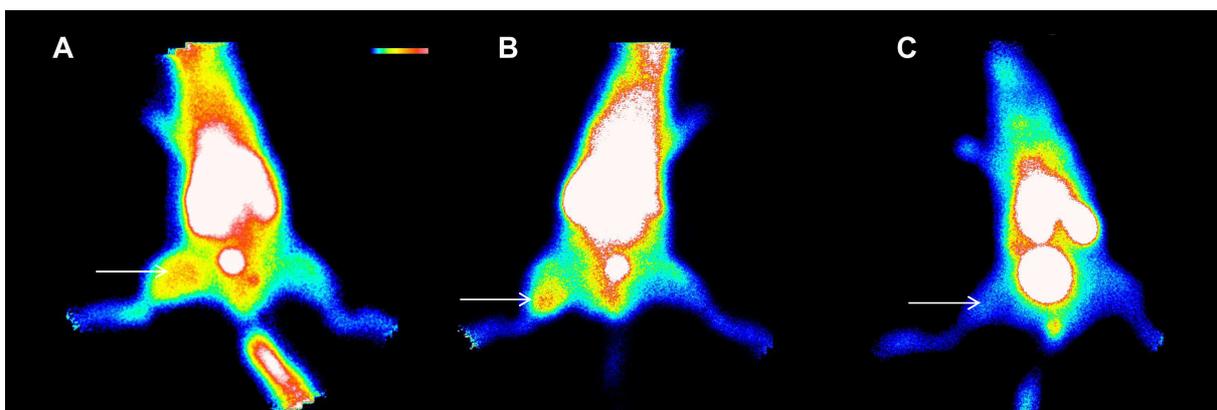


Figure 79 : Exemples d'imagerie planaire corps entier de souris greffées avec le mélanome B16F0, réalisés 1 heure après injection de (A)  $^{99m}\text{Tc-cRGD}$ , (B)  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$  et (C)  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ . Les tumeurs ont été greffées sur le membre inférieur situé à gauche de l'image (flèche).

**Avec les traceurs possédant le motif « RGD », les tumeurs B16F0  $\alpha_v\beta_3$  positives sont visibles une heure après injection ; avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD les tumeurs sont peu ou non visibles.**

Les différents rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » (T/MC) observés lors de l'imagerie sont récapitulés dans le tableau 15. Les mêmes rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » établis en biodistribution après sacrifice des animaux et prélèvement d'organes sont également rappelés dans le tableau 15.

Rapports T/MC	$^{99m}\text{Tc}$ -cRGD	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD
Imagerie	2,49 ± 0,75	2,17 ± 0,51	1,23 ± 0,36
Biodistribution	2,36 ± 0,53	3,33 ± 0,67	2,46 ± 0,58

Tableau 15 : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus 1 h p.i. chez les souris greffées avec B16F0 ; n = 6 (n = 5 pour le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD).

En imagerie, les différences observées entre les traceurs possédant le motif « RGD » ne sont pas significatives, alors qu'il existe une différence d'après les biodistributions ( $p < 0,05$ ). De plus, les rapports T/MC sont significativement différents entre biodistribution et imagerie, pour le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ( $p < 0,01$ ).

Les rapports T/MC obtenus par biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD sont hauts ; toutefois, la clairance du composé est très rapide et l'ensemble des organes capte peu le traceur. En imagerie en revanche, le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD présente un rapport T/MC significativement plus faible que les autres ligands ( $p < 0,01$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD et  $p < 0,01$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD).

### ***b- Évolution du $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD au cours du temps***

L'imagerie planaire réalisée suite à l'injection de  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD a été observée de 30 minutes à 4 heures post-injection. Les tumeurs sont visibles dans tous les cas. On remarque sur les images (Figure 80) l'élimination rénale et hépatobiliaire du traceur.

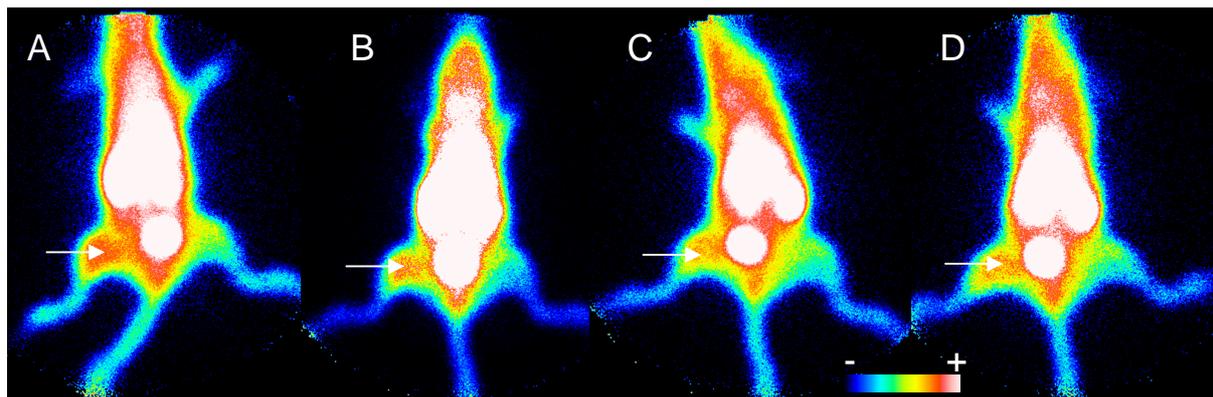


Figure 80 : Imagerie planaire corps entier de souris greffées avec le mélanome B16F0, réalisés à 30 minutes (A), 1h (B), 2hs (C) et (D) 4hs p.i. de  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. Les tumeurs ont été greffées sur le membre inférieur situé à gauche de l'image (flèche).

Les différents rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » observés sont récapitulés dans le tableau 16.

		Rapports T/MC	
Imagerie	30 minutes		2,22 ± 1,05
	1 heure		2,21 ± 1,14
	2 heures		2,20 ± 0,79
	4 heures		<b>2,15 ± 0,80</b>
Biodistribution	4 heures		<b>2,04 ± 0,61</b>

Tableau 16 : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus d'après 6 animaux au cours du temps et après euthanasie.

De ces résultats, deux points peuvent être soulignés. Tout d'abord, les rapports obtenus par imagerie sont corrélés à ceux obtenus par biodistribution, à 4h ( $p > 0,1$ ). De plus, les meilleurs rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » sont obtenus à des temps variables d'un animal à l'autre, mais ceux-ci varient peu entre 30 minutes et 4 heures. On retiendra par conséquent que chaque temps post-injection peut être utilisé lors de l'imagerie, notamment une heure post-injection.

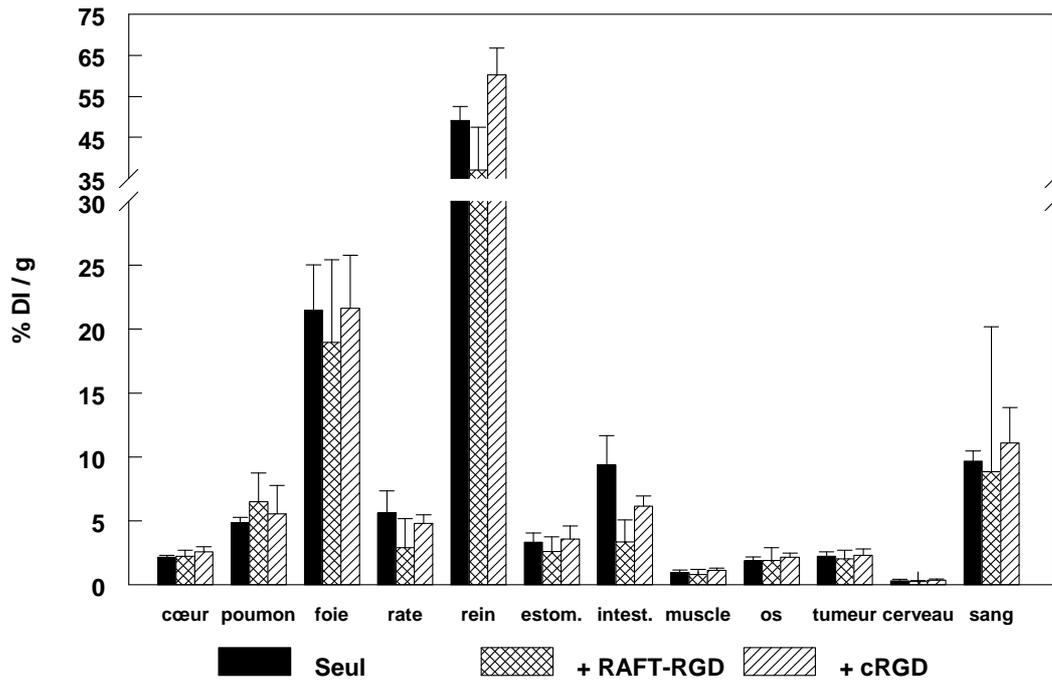
## **2-3 Pré-injection de ligand froid**

Afin de vérifier que la fixation du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est spécifique, des expériences de pré-injection de ligand froid ont été réalisées et les résultats sont présentés dans les figures 81 et 82. Dans cette étude, une pré-injection de 100x cRGD ou de 100x RAFT-RGD est administrée 10 minutes avant l'injection du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD.

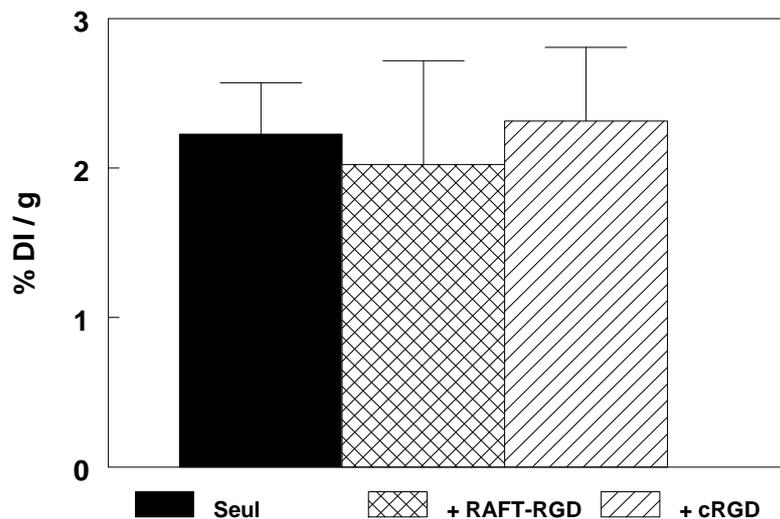
### ***a- Biodistribution et captation tumorale***

Les biodistributions du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD administré seul ou après l'injection de ligand froid sont représentées dans la figure 81.

La présence de ligand non marqué ne modifie pas la distribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. Au niveau tumoral, la captation ne varie pas de manière significative ( $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD seul vs. RAFT-RGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD,  $p > 0,1$  ;  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD seul vs. cRGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD,  $p > 0,1$ ).



**Figure 81** : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0, 4 heures après l'injection du radioligand seul (noir), en présence ou non de RAFT-RGD (hachuré) ou cRGD (rayé).



**Figure 82** : Captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (noir) en présence ou non de RAFT-RGD (hachuré) ou cRGD (rayé).

**b- Rapports T/MC**

Les différents rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » observés dans l'expérience de pré-injection de ligand froid sont récapitulés dans le tableau 17.

	Temps	<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD seul	RAFT-RGD + <sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD	cRGD + <sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD
Imagerie	30 minutes	1,65 ± 0,38	2,47 ± 1,26	1,57 ± 0,59
	1 heure	1,53 ± 0,38	2,24 ± 0,95	1,59 ± 0,59
	2 heures	1,74 ± 0,41	2,45 ± 1,22	1,50 ± 0,49
	4 heures	<b>1,71 ± 0,54</b>	<b>2,42 ± 1,27</b>	<b>1,63 ± 0,63</b>
Biodistribution	4 heures	<b>1,95 ± 0,54</b>	<b>2,63 ± 0,47</b>	<b>2,06 ± 0,35</b>

Tableau 17 : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral ».

Le RAFT-RGD froid ne modifie pas le rapport T/MC tant par imagerie ( $p > 0,1$ ) que suite aux biodistributions ( $p > 0,1$ ) ; de même, le cRGD froid ne modifie aucun rapport T/MC (imagerie  $p > 0,5$  ; biodistribution  $p = 0,08$ ). L'expérience n'a pas permis de montrer la spécificité du ligand RAFT-RGD, dans nos conditions d'expérimentation.

**2-4 Immunohistochimie et distribution intratumorale**

L'analyse immunohistochimique et la distribution intratumorale du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD ont été observées sur coupes adjacentes de tumeurs grâce au  $\beta$ -imager (Biospace Mesures, Paris, France). Des images représentatives sont présentées dans les figures 83 et 84.

Les tumeurs B16F0 possèdent une vascularisation très hétérogène (Figure 83) : certaines zones sont riches en capillaires larges (encadré du bas) et d'autres sont très peu vascularisées (encadré du haut).

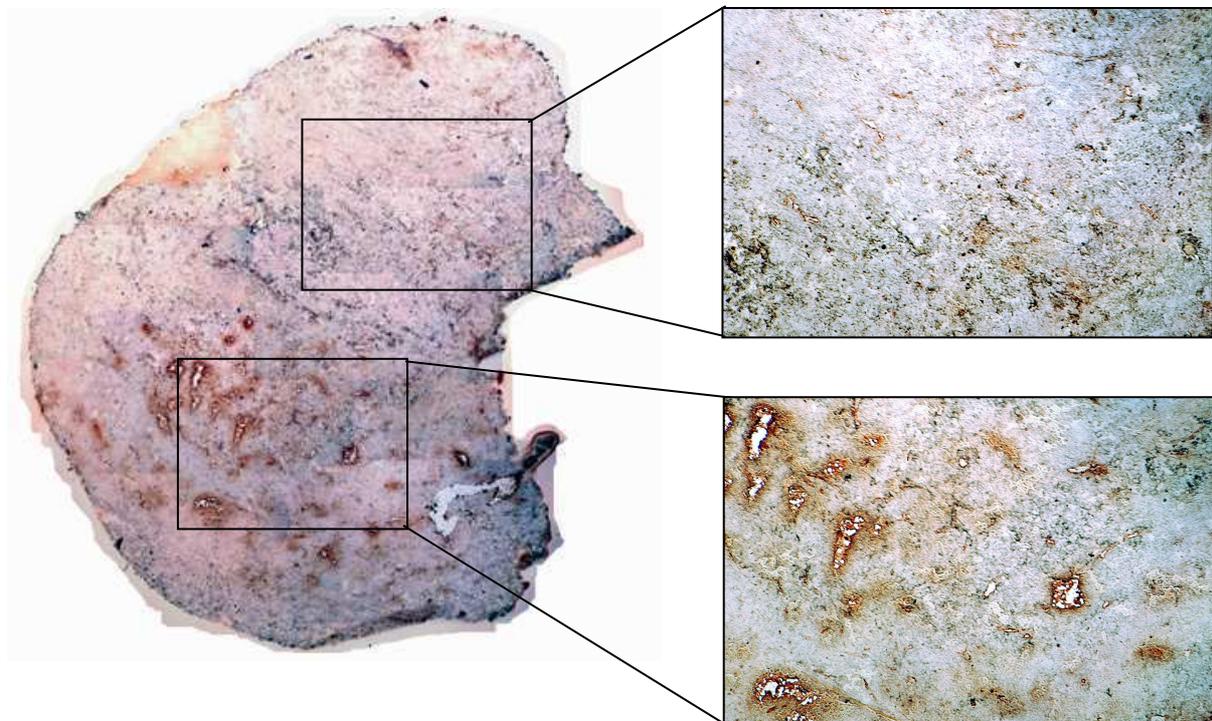


Figure 83 : Coupe de tumeur B16F0 immunomarquée par l'anticorps anti-CD 31 (rouge/brun) et colorée à l'hématoxyline (bleu).

La distribution intratumorale du radioligand est également hétérogène : les zones de plus faible fixation correspondent à des zones peu vascularisées mais parfois également à des zones nécrotiques. Au contraire, les zones bien vascularisées captent davantage de radioligand. En général, les différences de captation entre ces deux zones peu et très vascularisées sont supérieures à 2. Le rapport de captation « zone vascularisée vs. zone peu vascularisée » de l'exemple présenté figure 92 est de 2,1.

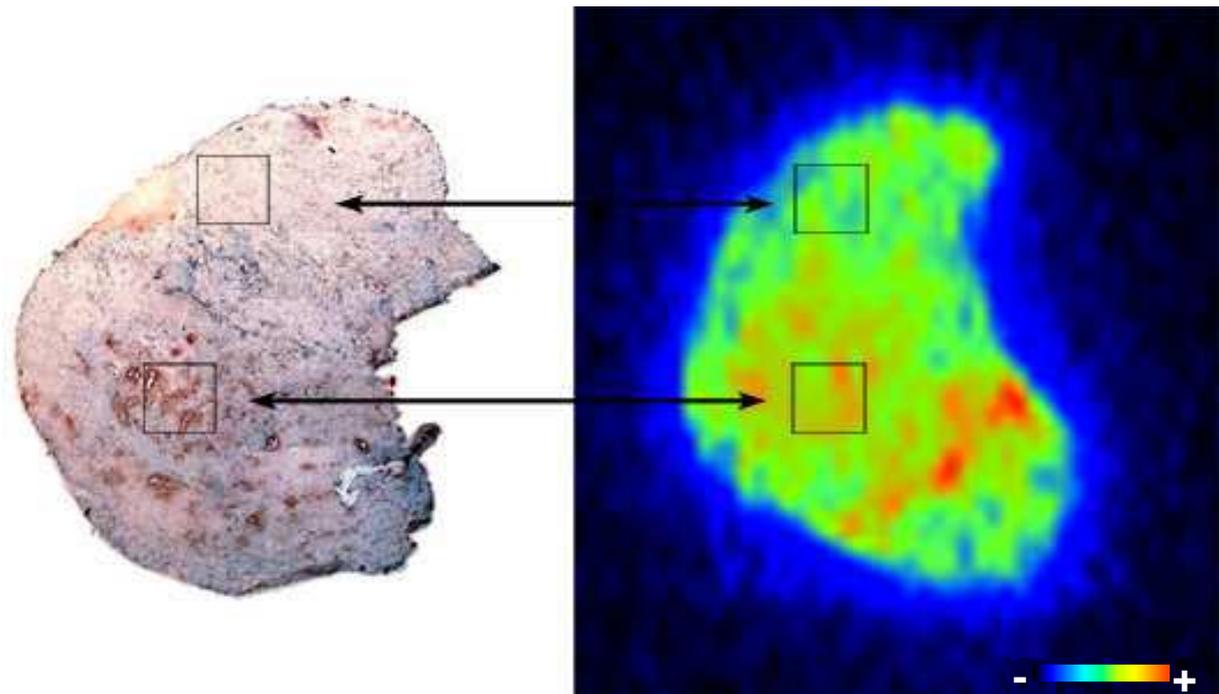


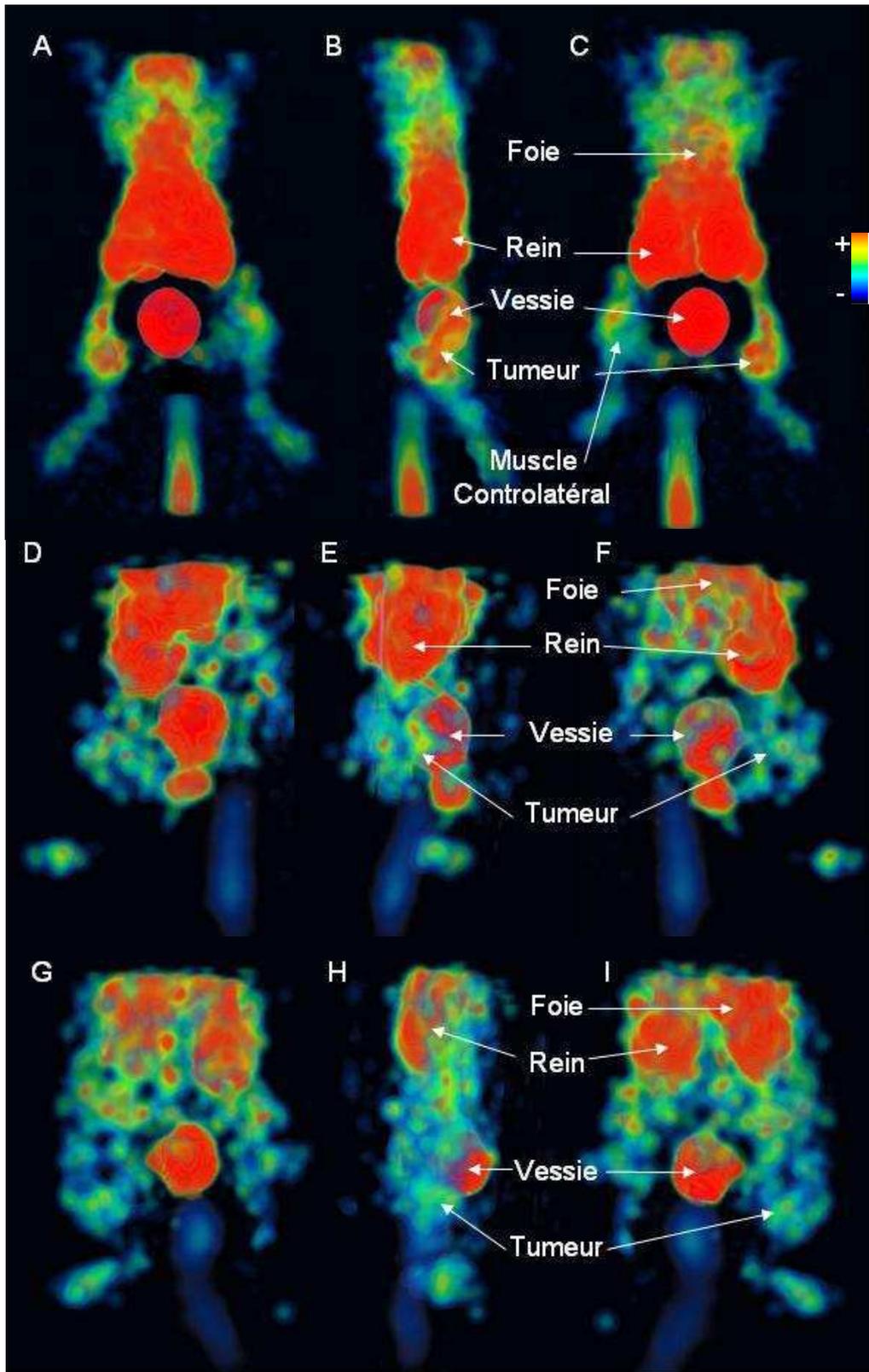
Figure 84 : Distribution intratumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD dans une tumeur B16F0. La zone encadrée en haut de l'image est peu vascularisée et fixe peu de radioligand au contraire de la zone située en bas de l'image, très vascularisée et de forte captation. Échelle de captation : bleu < vert < rouge.

## 2-5 Imagerie SPECT

L'imagerie SPECT corps entier a été réalisée une heure après l'administration des radioligands technétiés, grâce à la gamma caméra dédiée au petit animal (Biospace Mesures, Paris, France), à deux têtes avec les collimateurs haute résolution 35/1.3/0.2.

### *a- Exemple d'images 3D*

Pour le modèle syngénique B16F0 (Figure 85), toutes les tumeurs sont observables une heure après l'injection du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (A-C) ou du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD (D-F), alors que le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD (G-I) ne permet pas de visualiser les tumeurs.



**Figure 85** : Exemples d'images en 3 dimensions obtenues suite à l'injection du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (A-C), du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD (D-F) ou du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD (G-I) chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0. Vues de (A, D, G) face ventrale, (B, E, H) latéral droit et (C, F, I) face dorsale.

On constate sur cet exemple au  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (Figure 93, A-C) que la tumeur s'est développée sur la quasi-totalité du membre inférieur droit. Le point d'injection du traceur est visible sur la queue de l'animal. La tumeur de l'animal représenté en B-D est peu visible avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD. Enfin, sur le dernier animal (G-I), la tumeur ne se distingue quasiment pas du membre controlatéral.

### ***b- Captation tumorale***

La captation tumorale est calculée d'après traitement de l'imagerie tridimensionnelle. Le volume de la tumeur (Figure 86) est déterminé manuellement par la sélection des pixels les plus radioactifs (point le plus chaud et ceux à 50 % de cette valeur). Le logiciel AMIRA 3.1® détermine le pourcentage de dose injectée de radioactivité dans ce volume et celle contenue dans l'animal entier, représentant 100 % de la dose injectée.

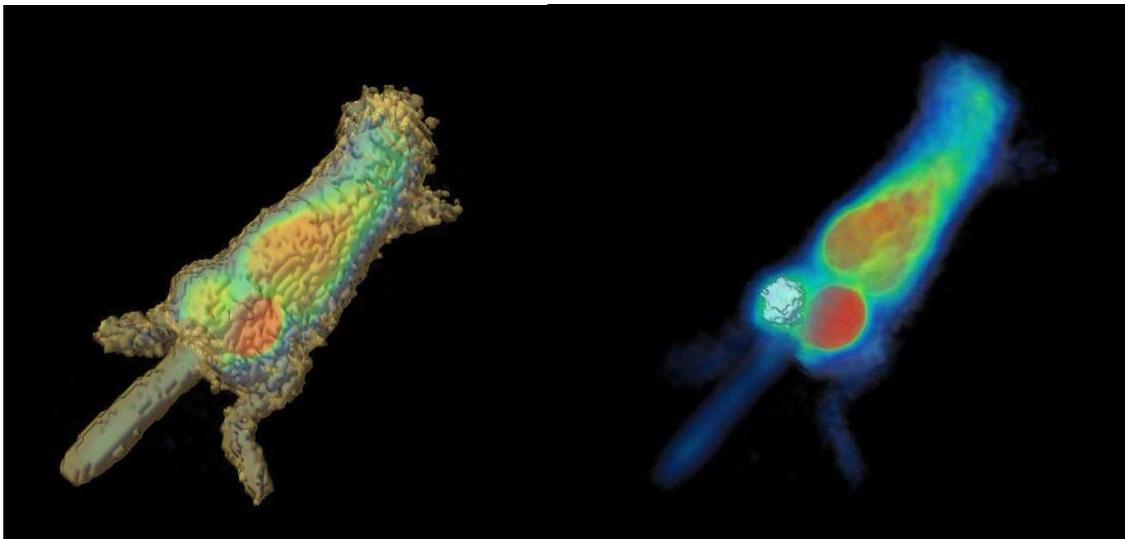


Figure 86 : Exemples de calcul de la dose injectée (gauche) et de la dose contenue dans la tumeur (droite). Les pixels retenus pour ces calculs sont blanchis.

Les résultats obtenus pour les trois traceurs sont représentés dans le tableau 18.

Souris	<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD		<sup>99m</sup> Tc-cRGD		<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RAD	
	% DI bio.	% DI Imagerie	% DI bio.	% DI Imagerie	% DI bio.	% DI Imagerie
1	0,47	2,62	0,21	0,26	0,76	0,26
2	1,10	2,11	0,04	0,07	0,03	0,27
3	0,28	0,63	0,16	0,33	0,05	2,02
4	0,48	1,53	0,63	0,63	0,35	0,33
5	0,50	0,60				
<b>Moyenne ± Écartype</b>	<b>0,57 ± 0,31</b>	<b>1,50 ± 0,89</b>	<b>0,26 ± 0,26</b>	<b>0,32 ± 0,24</b>	<b>0,30 ± 0,34</b>	<b>0,72 ± 0,86</b>

Tableau 18 : Pourcentages de la dose injectée obtenus d'après les acquisitions tomographiques (Imagerie) et d'après sacrifice et prélèvement des organes (bio.).

Pour le <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD, les pourcentages de dose injectée observés par imagerie et suite à la biodistribution sont significativement différents d'après le test non paramétrique de Wilcoxon, avec  $p < 0,05$ . Les tumeurs B16F0 ont été prélevées partiellement ce qui sous-estime le pourcentage de la dose injectée. Ceci n'a pas d'influence sur les valeurs précédemment décrites en % DI / g puisque le poids de chaque tumeur entre en compte dans le calcul.

Pour les expériences avec les traceurs <sup>99m</sup>Tc-cRGD et <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RAD, les tumeurs ont été prélevées en totalité. Toutefois, les animaux ne sont pas entièrement dans le champ de détection de la gamma-caméra. Les résultats de pourcentage de dose injectée observés par imagerie surestiment donc la valeur réelle. Cependant, ceci n'interfère pas avec la valeur de %DI qui restent similaires d'après le même test ( $p > 0,05$ ).

### ***c- Rapports « Tumeur / Muscle controlatéral »***

Il est possible de réaliser des coupes dans l'espace d'après les images tridimensionnelles (Figure 87).

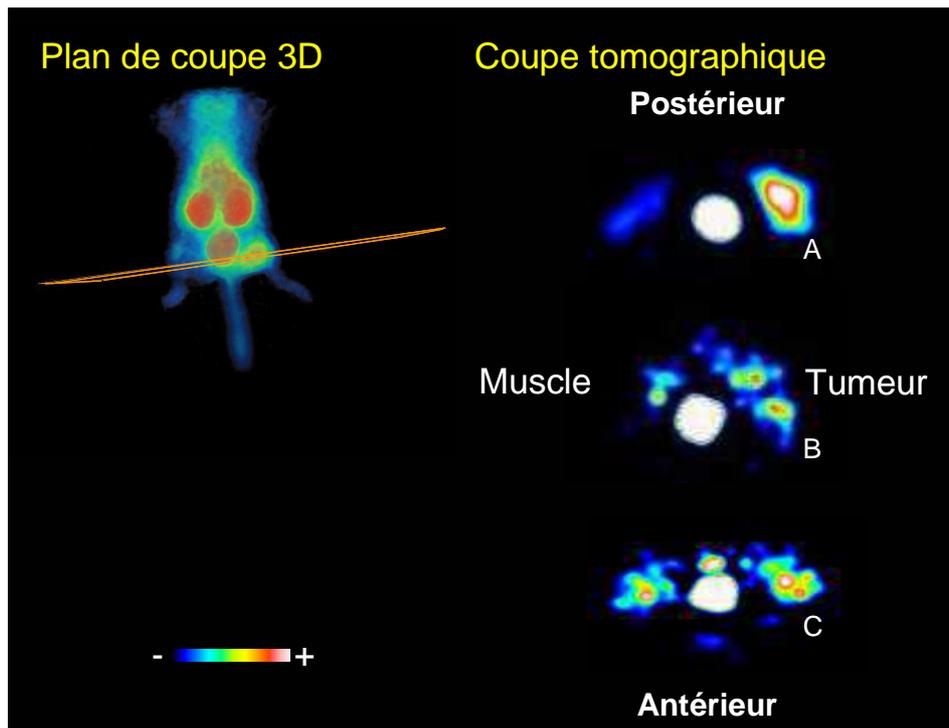


Figure 87 : Exemple de coupe dans l'espace 3D. Les plans représentés à droite passent par le membre inférieur gauche, la vessie et le membre inférieur droit sur lequel la tumeur est greffée. Les 3 coupes sont situées dans le milieu de la tumeur.

(A)  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, (B)  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD et (C)  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD.

Ceci permet de calculer les rapports T/MC lors de l'imagerie SPECT ; ces rapports sont présentés dans le tableau 19.

Souris	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD		$^{99m}\text{Tc}$ -cRGD		$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD	
	T/MC Bio.	T/MC Imagerie	T/MC Bio.	T/MC Imagerie	T/MC Bio.	T/MC Imagerie
1	3,41	2,53	2,64	4,10	1,89	1,61
2	3,17	2,26	3,35	2,29	3,23	1,59
3	2,76	1,56	1,99	1,97	2,25	0,76
4	3,13	2,54	2,95	2,81	1,70	1,23
5	2,07	2,41				
<b>Moyenne ± Écartype</b>	<b>2,91 ± 0,52</b>	<b>2,26 ± 0,41 *</b>	<b>2,73 ± 0,57</b>	<b>2,79 ± 0,94 **</b>	<b>2,27 ± 0,68</b>	<b>1,30 ± 0,40</b>

Tableau 19 : Rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » obtenus d'après les acquisitions tomographiques (Imagerie) et d'après prélèvement des organes (bio).

\*p < 0,05 et \*\* p < 0,01 vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD.

Les différents rapports T/MC observés par imagerie et *post mortem* lors de la biodistribution sont similaires pour chacun des traceurs ( $p > 0,05$ , test-t apparié ou test non paramétrique de Wilcoxon). En revanche, les rapports T/MC obtenus avec les traceurs « RGD » par imagerie sont significativement supérieurs à ceux du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD ( $p < 0,05$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD et  $p < 0,01$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD).

### 3 - Études sur le modèle TS/A-pc greffé sur souris Balb/c

Les cellules TS/A-pc greffées aux souris Balb/c constituent le second modèle de tumeurs syngéniques étudié. Ces cellules tumorales expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en surface et forment des tumeurs vascularisées de manière homogène.

#### 3-1 Biodistributions

Les résultats obtenus suite à l'injection de traceurs technétiés sont présentés dans les figures 88 à 90.

##### a- $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD

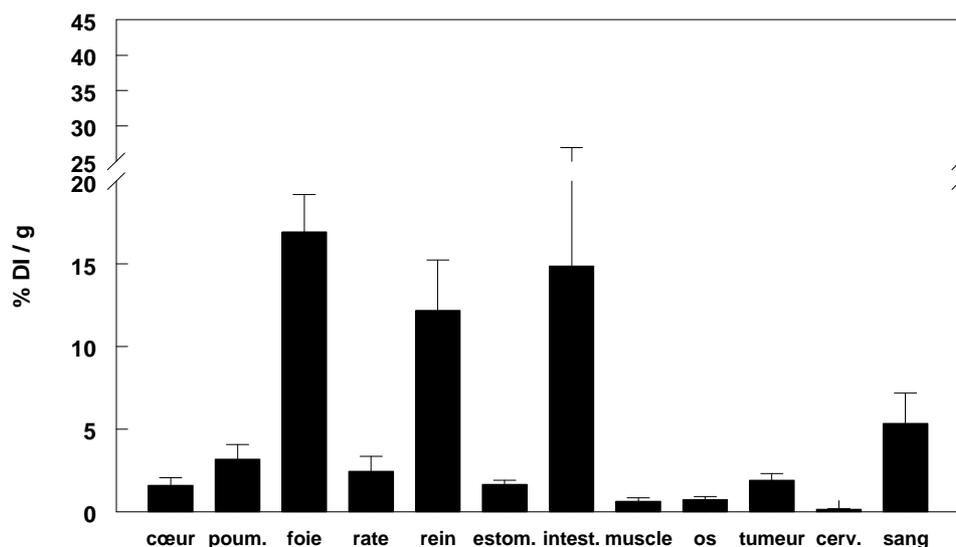
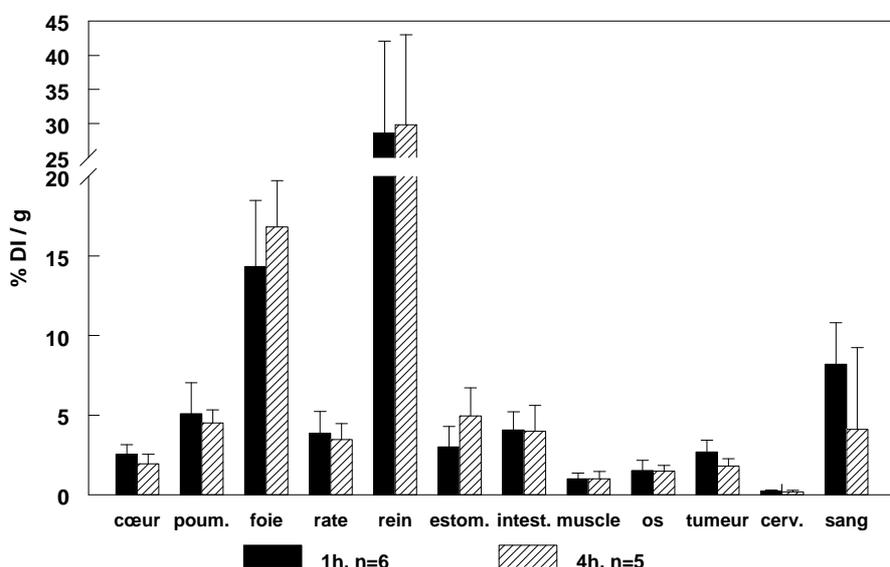


Figure 88 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD à 1h, chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc ; n=6.

Le contrôle positif  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD est éliminé par voie rénale, hépatobiliaire ainsi que par les muqueuses intestinales. La clairance sanguine est lente puisque l'on retrouve  $5,33 \pm 1,84$  % DI / g, une heure après l'injection. La captation tumorale est de  $1,91 \pm 0,39$  % DI / g (Figure 88) à 1h.

### **b- $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD**

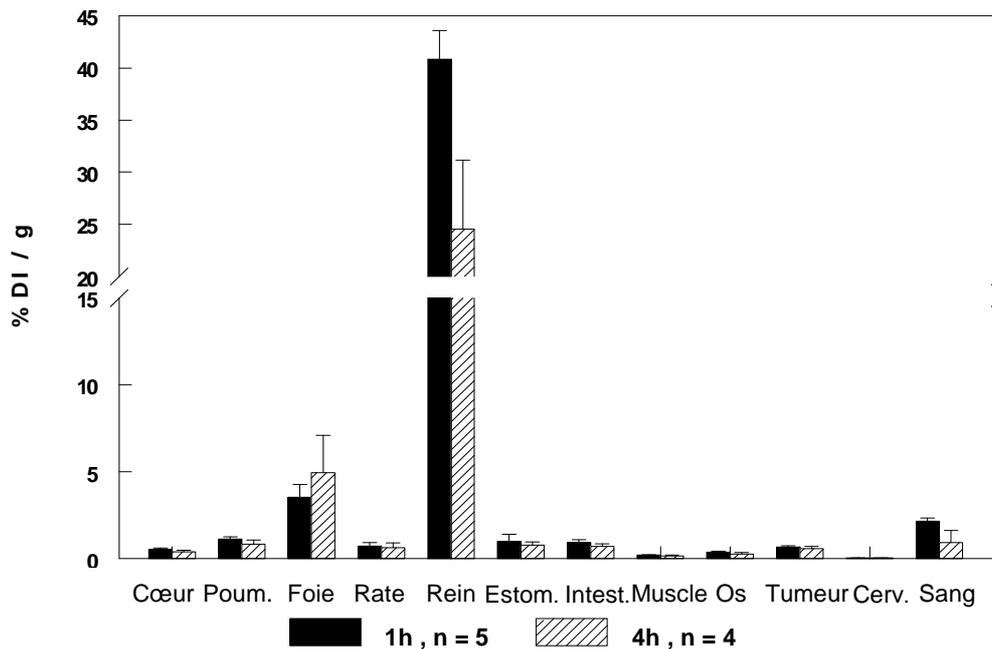
Le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est éliminé par voies rénale et hépatobiliaire (Figure 89). La clairance sanguine est plus lente que celle du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD, avec plus de 8 % DI / g 1h après injection dans ce modèle. Au niveau tumoral, la captation varie de  $2,67 \pm 0,76$  % DI / g à  $1,80 \pm 0,46$  % DI / g entre 1 et 4 heures respectivement ( $p = 0,053$ ).



**Figure 89** : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc.

### **c- $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD**

Le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD est rapidement et essentiellement éliminé par voie rénale, comme pour le modèle B16F0. La clairance sanguine est rapide et le traceur est très peu capté par l'ensemble des organes (Figure 90) : l'activité musculaire est par ailleurs significativement plus faible que celle des traceurs possédant le motif « RGD » ( $p < 0,01$ ). Au niveau tumoral, la captation est faible avec respectivement  $0,68$  et  $0,58$  % DI / g à 1 et 4 heures p.i.



**Figure 90** : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD, chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc.

#### ***d- Comparaison des distributions des ligands technétiés***

Les souris Balb/c éliminent les ligands technétiés par voies rénale et hépatobiliaire ; il est cependant à noter que le contrôle non spécifique  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD est plus rapidement éliminé que les traceurs possédant le motif « RGD ».

À 1 heure p.i, la captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD est de  $1,91 \pm 0,39$  % DI / g, celle du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD de  $2,67 \pm 0,76$  % ; cette différence de captation entre les deux ligands n'est cependant pas significative ( $p = 0,055$ ) (Figure 91). La molécule non spécifique  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD est moins captée au niveau tumoral que les ligands possédant le motif « RGD », et ce de manière significative ( $p < 0,001$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD et  $p < 0,0001$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD).

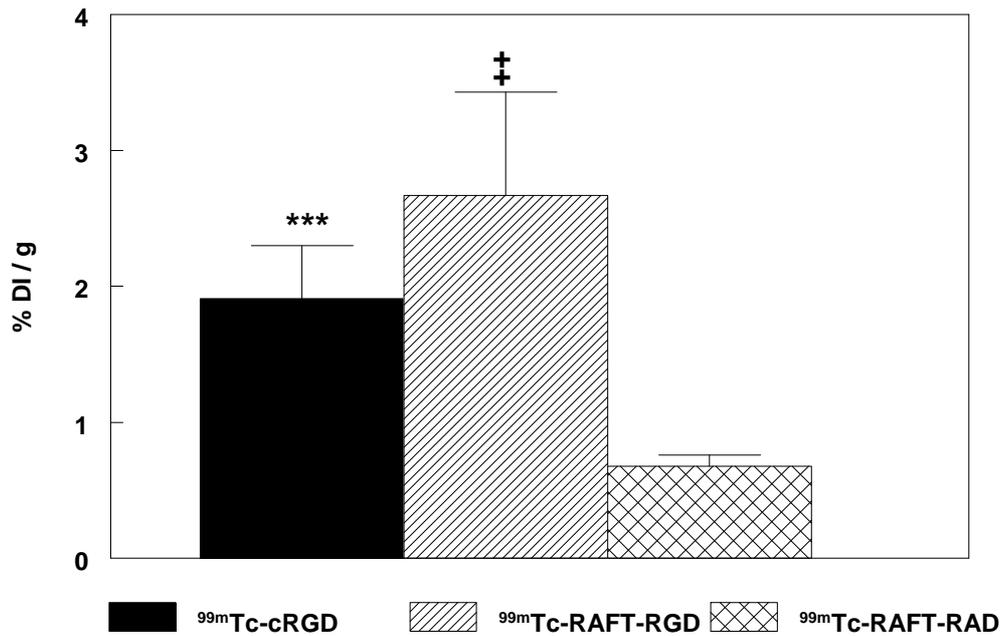


Figure 91 : Captation tumorale des ligands technétiés par la souche TS/A-pc, à 1h p.i. \*\*\*  $p < 0,001$  et ‡  $p < 0,0001$  vs.  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ .

### 3-2 Imagerie planaire

#### a- Ligands technétiés à 1h p.i.

L'imagerie planaire corps entier a été réalisée sur des souris Balb/c à l'aide des radioligands  $^{99m}\text{Tc-cRGD}$ ,  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$  et  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$  (Figure 92).

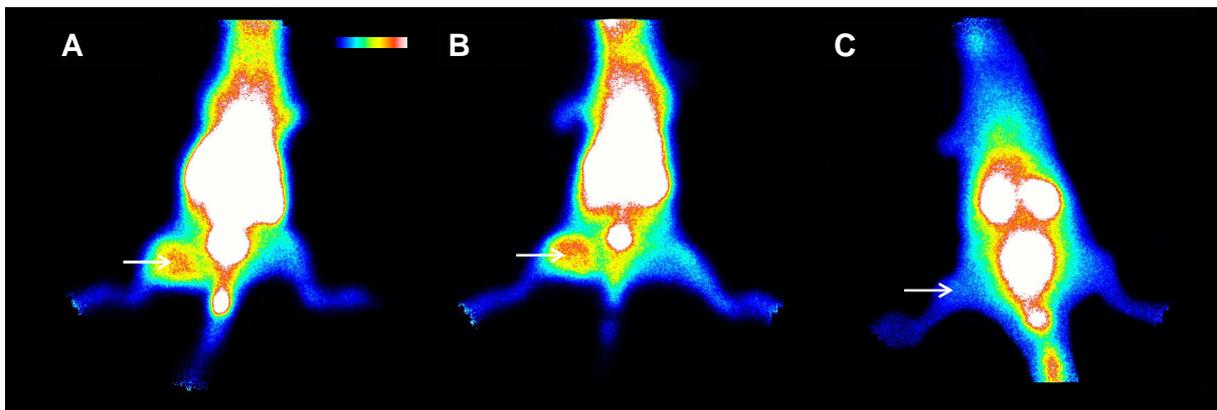


Figure 92 : Exemples d'imagerie planaire corps entier de souris greffées avec le carcinome TS/A-pc, réalisés 1 heure après injection de (A)  $^{99m}\text{Tc-cRGD}$ , (B)  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$  et (C)  $^{99m}\text{Tc-RAFT-RAD}$ . Les tumeurs ont été greffées sur le membre inférieur situé à gauche de l'image (flèche).

**Pour le modèle syngénique TS/A-pc  $\alpha_v\beta_3$  positif, toutes les tumeurs sont observables une heure après l'injection des traceurs  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD et  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. En revanche, les tumeurs ne sont pas ou peu visibles avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD.**

Les différents rapports T/MC observés lors de l'imagerie scintigraphique *in vivo* (Imagerie) sont récapitulés dans le tableau 20 et comparés aux mêmes rapports obtenus après sacrifice des animaux et prélèvement d'organes (Biodistribution).

Rapports T/MC	$^{99m}\text{Tc}$ -cRGD	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD
Imagerie	2,76 ± 0,46	2,66 ± 0,49	1,38 ± 0,30
Biodistribution	3,22 ± 0,81	2,73 ± 0,27	3,15 ± 0,32

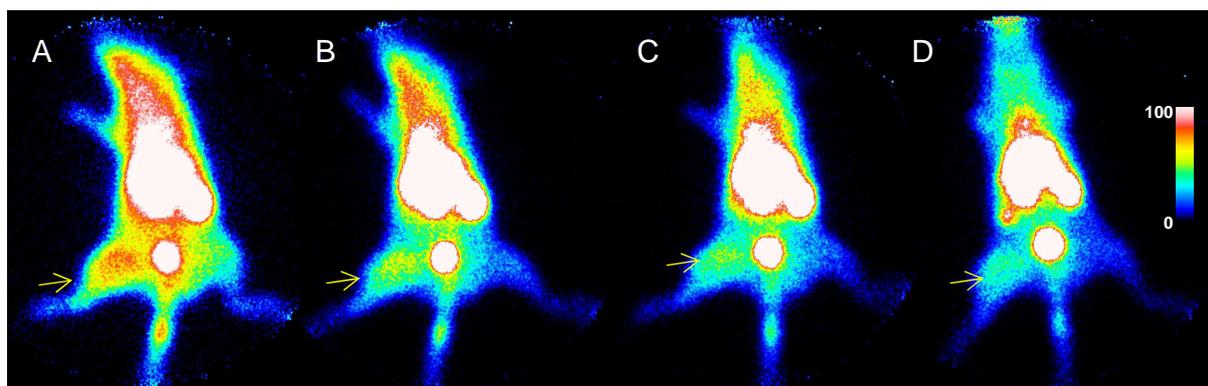
**Tableau 20** : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus 1h après injection des traceurs chez les souris greffées avec TS/A-pc ; n=6 (n = 5 pour le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD).

Avec ce modèle d'étude, il n'existe aucune différence significative de captation entre les deux radioligands  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD et  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, tant au niveau des rapports T/MC observés d'après imagerie et biodistribution, que dans la captation tumorale elle-même.

En revanche, bien que les rapports T/MC du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD obtenus par biodistribution soient supérieurs à ceux du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ( $p < 0,05$ ), les rapports obtenus en imagerie sont plus faibles que ceux des ligands possédant le motif « RGD » ( $p < 0,001$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD et  $p < 0,001$  vs.  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD).

### ***b- Évolution du $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD au cours du temps***

L'imagerie planaire corps entier réalisée suite à l'injection de  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD a été observée de 30 minutes à 4 heures post-injection (Figure 93). Les tumeurs sont visibles dans tous les cas par le gamma-caméra dédiée au petit animal.



**Figure 93** : Exemples d'imagerie planaire corps entier de souris greffées avec le carcinome TS/A-pc, réalisés (A) 30 minutes, (B) 1 heure, (C) 2 heures et (D) 4 heures après injection de  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. La tumeur a été greffée sur le membre inférieur situé à gauche de l'image (flèche).

Les différents rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » observés sont récapitulés dans le tableau 21.

		Rapports T/MC	
Imagerie	30 minutes		$2,47 \pm 0,58$
	1 heure		$2,43 \pm 0,63$
	2 heures		$2,63 \pm 0,77$
	4 heures		<b><math>2,83 \pm 0,74</math></b>
Biodistribution	4 heures		<b><math>2,14 \pm 1,09</math></b>

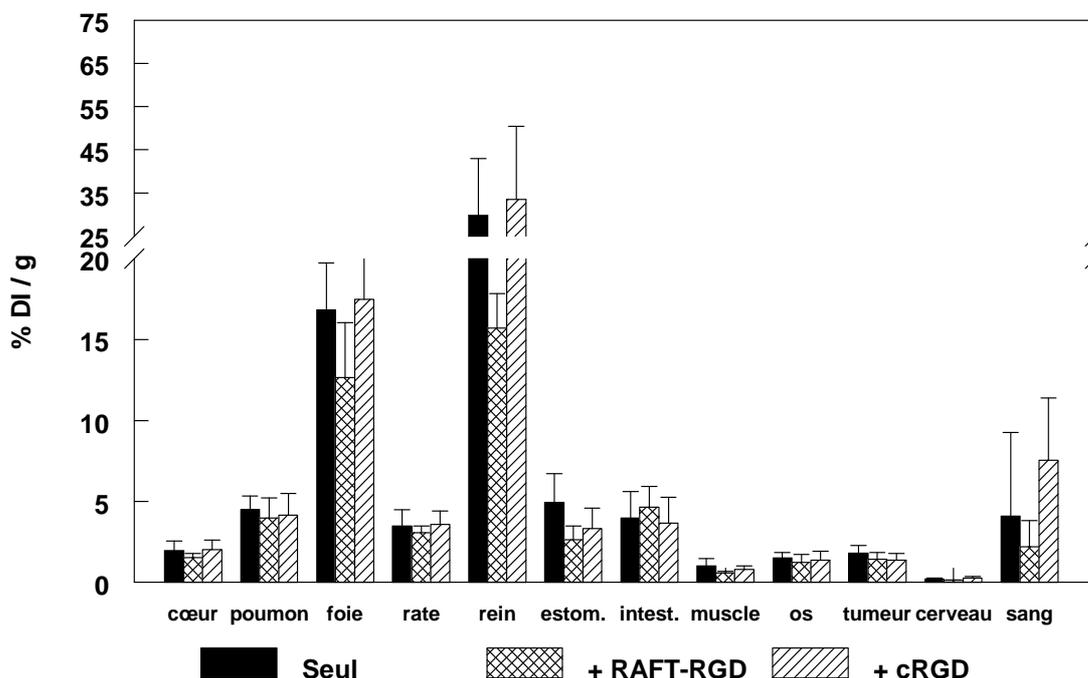
**Tableau 21** : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus d'après 5 animaux au cours du temps et après euthanasie.

Les rapports obtenus par imagerie ne sont pas significativement différents de ceux obtenus par biodistribution, à 4h ( $p > 0,1$ ). Il n'existe pas de différence significative entre les différents rapports T/MC observés par imagerie au cours du temps. Ces rapports permettent la visualisation de la tumeur par détection externe.

### 3-3 Pré-injection de ligand froid

#### a- Biodistribution et captation tumorale

Une étude de pré-injection de ligands froids a été menée sur le modèle TS/A-pc,  $\alpha_v\beta_3$  positif. La biodistribution du ligand technétié  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est représentée dans la figure 94.



**Figure 94** : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc, 4 heures après l'injection du radioligand, en présence ou non de RAFT-RGD ou cRGD non marqués.

La présence de ligand non marqué ne modifie pas la distribution générale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. Au niveau tumoral (Figure 95), la captation ne varie pas de manière significative ( $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD seul vs. RAFT-RGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD,  $p > 0,1$  ;  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD seul vs. cRGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD,  $p > 0,1$ ).

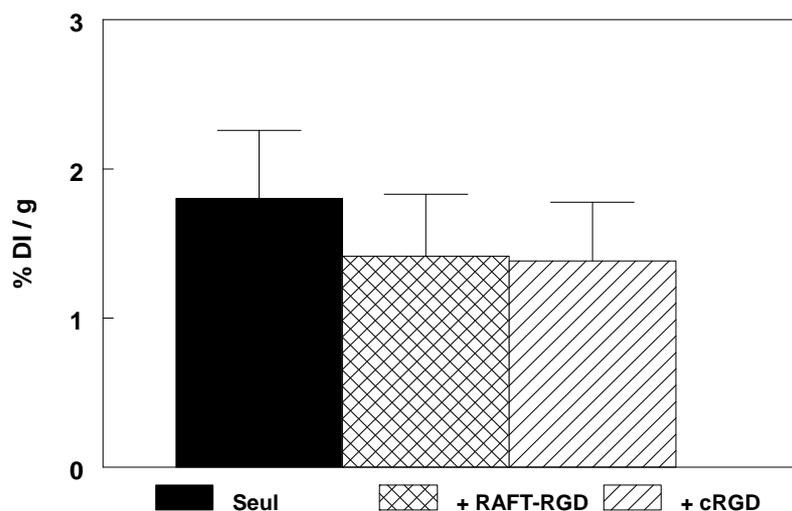


Figure 95 : Captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (noir) en présence ou non de RAFT-RGD (hachuré) ou cRGD (rayé) non marqués.

### ***b- Rapports T/MC***

Les différents rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » observés dans l'expérience de pré-injection de ligands froids sont présentés dans le tableau 22.

	Temps	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD seul	RAFT-RGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD	cRGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD
Imagerie	30 minutes	2,47 ± 0,58	2,61 ± 0,35	1,94 ± 0,50*
	1 heure	2,43 ± 0,63	2,60 ± 0,47	2,05 ± 0,35
	2 heures	2,63 ± 0,77	2,80 ± 0,53	2,01 ± 0,27*
	4 heures	<b>2,83 ± 0,74</b>	<b>2,86 ± 0,43</b>	<b>2,00 ± 0,46*</b>
Biodistribution	4 heures	<b>2,14 ± 1,09</b>	<b>2,38 ± 0,33</b>	<b>1,73 ± 0,27</b>

Tableau 22 : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral ». (\*  $p < 0,05$  entre les groupes « cRGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD » et « RAFT-RGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD »)

À 4 heures p.i, malgré l'absence de significativité au niveau tumoral, il existe des différences significatives entre les rapports T/MC, notamment entre le groupe RAFT-

RGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD et le groupe cRGD +  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. En effet, entre ces groupes les rapports sont différents à 30 minutes ( $p < 0,05$ ), 2 heures ( $p < 0,01$ ) et 4 heures ( $p < 0,01$ ). On note qu'à 1 heure la différence est de  $p = 0,0507$ .

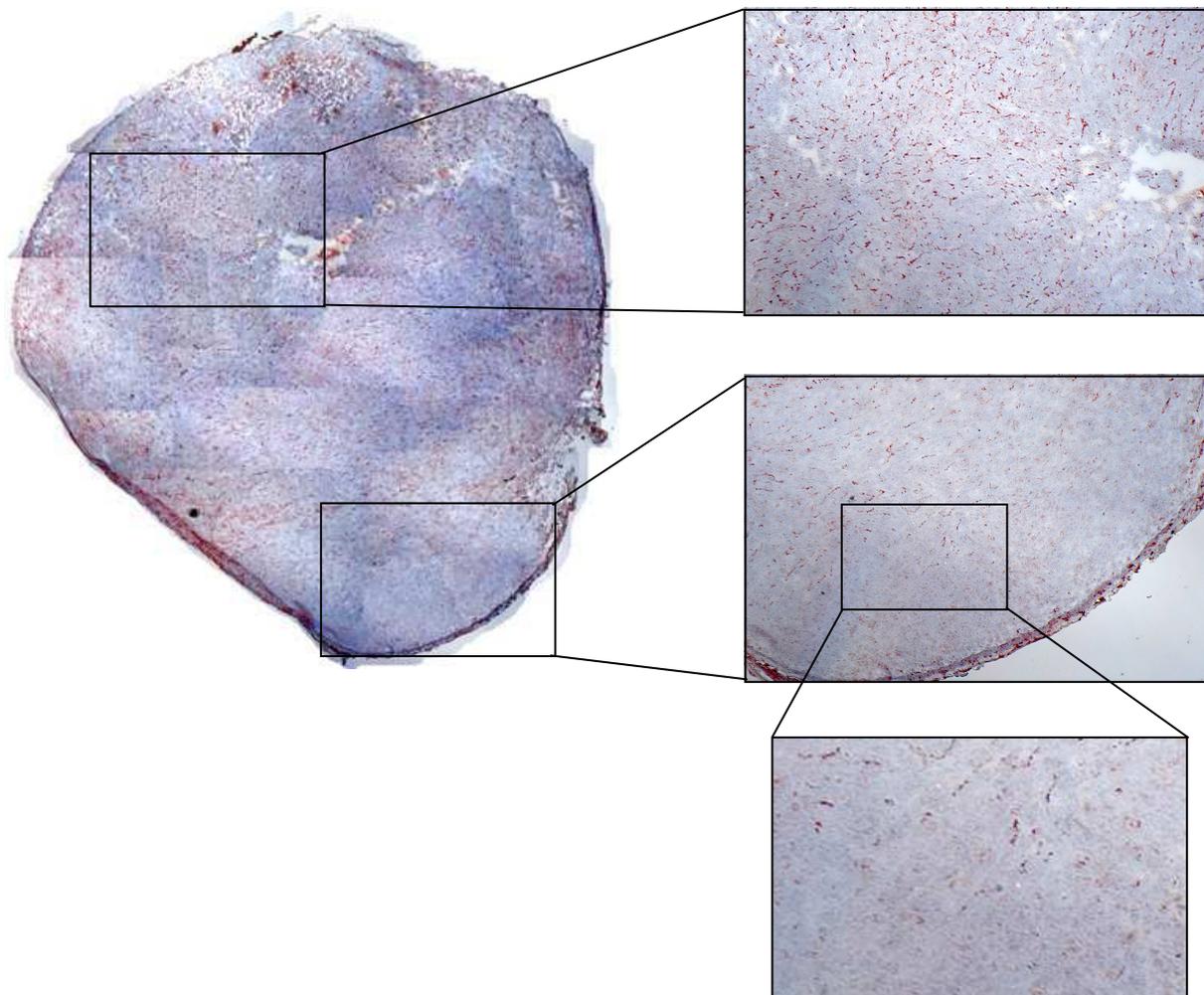
La pré-injection d'un excès de ligand froid n'a pas permis de diminuer la captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD dans notre modèle. Cependant, cette pré-injection affecte le rapport T/MC ; il semble que celui-ci soit diminué en présence de cRGD non marqué et qu'il augmente en présence de RAFT-RGD.

### **3-4 Immunohistochimie et biodistribution intratumorale**

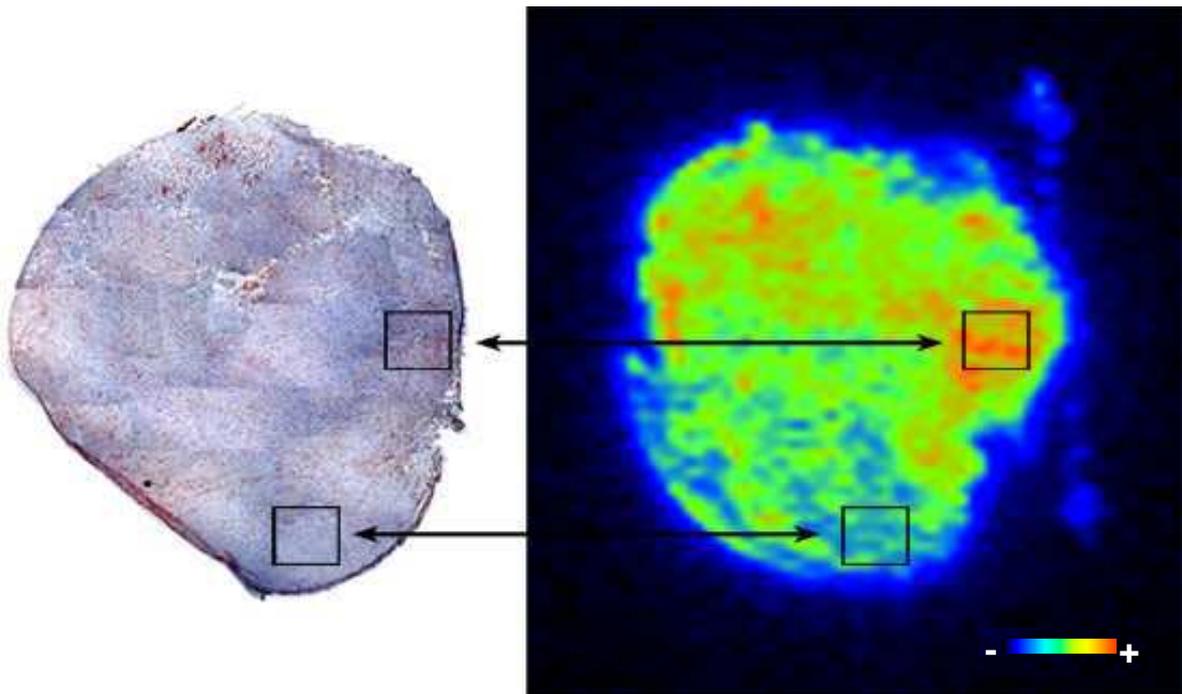
Des coupes de tumeurs TS/A-pc ont été analysées par immunohistochimie et comparées à la distribution intratumorale du traceur  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, observée par le  $\beta$ -Imager (Biospace Mesures). Un résultat représentatif est indiqué dans les figures 96 et 97.

Les tumeurs TS/A-pc possèdent une vascularisation très homogène (Figure 96) : les capillaires se développent conjointement à la tumeur. Les tumeurs sont donc très vascularisées et comportent peu de zones nécrotiques.

De même, la distribution intratumorale (Figure 97) du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est également homogène. Les zones de plus faible fixation correspondent aux zones les moins vascularisées. Sur ce modèle, les différences de captation du traceur oscillent d'un facteur de 1 à 1,5 entre les zones de vascularisation différentes. Le rapport de captation « zone vascularisée vs. zone peu vascularisée » de l'exemple présenté est de 1,3.



**Figure 96** : Coupe de tumeur TS/A-pc immunomarkée par l'anticorps anti-CD 31 (rouge/brun) et colorée à l'hématoxyline (bleu). En haut, une zone riche en capillaires, en bas, une zone à plus faible densité vasculaire.



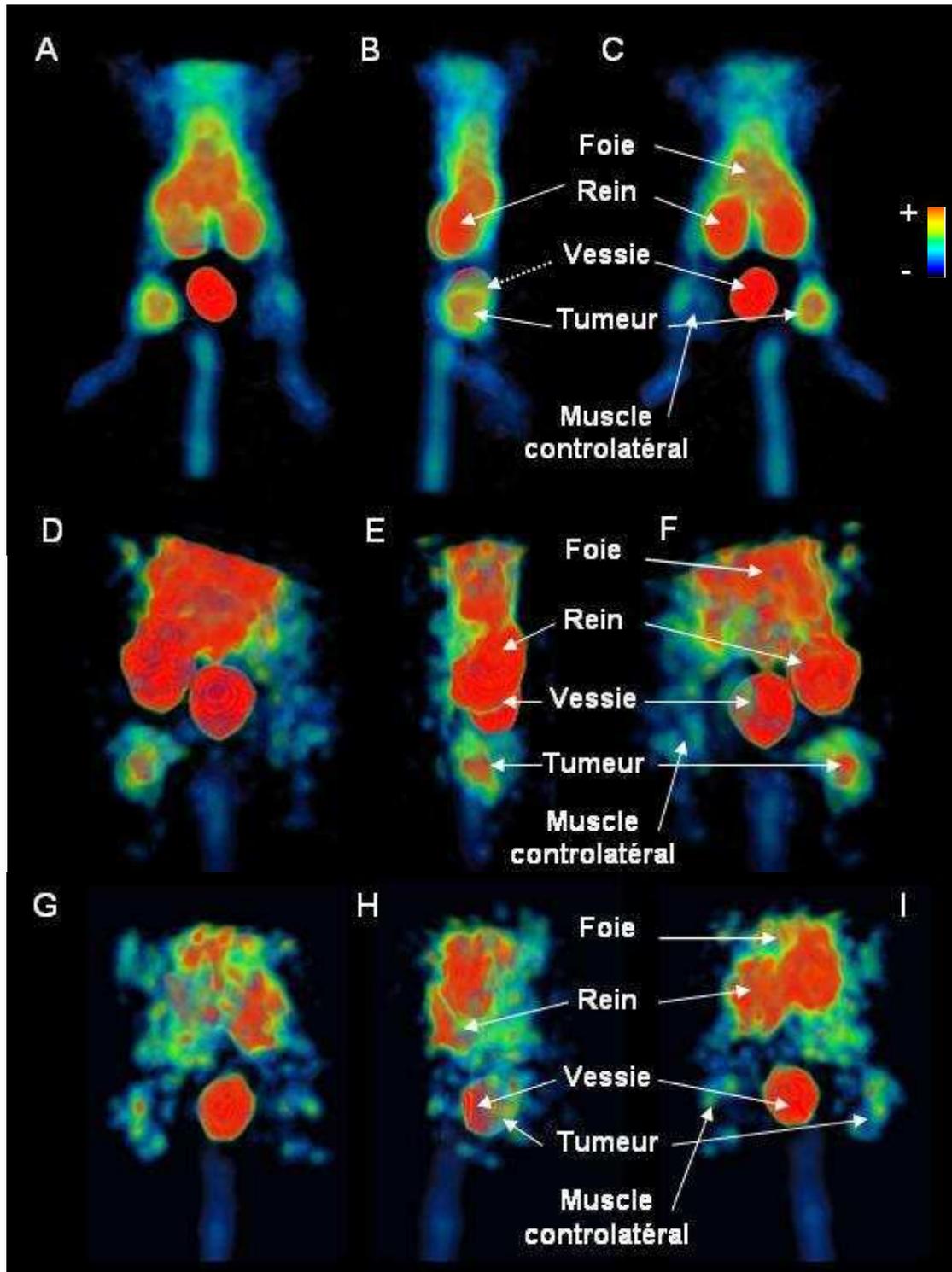
**Figure 97** : Distribution intratumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD dans une tumeur TS/A-pc. La zone encadrée en bas de l'image est peu vascularisée et fixe peu de radioligand au contraire de la zone située en haut de l'image, davantage vascularisée et qui capte plus de radioligand. Échelle de captation : bleu < vert < rouge.

### 3-5 Imagerie SPECT

L'imagerie SPECT corps entier a été réalisée une heure après l'administration des radioligands technétiés, par la gamma caméra dédiée au petit animal avec les collimateurs haute résolution.

#### *a- Exemple d'images 3D*

Pour le modèle syngénique TS/A-pc (Figure 98), toutes les tumeurs sont observables une heure après l'injection du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (A-C) ou du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD (D-F), alors que le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD (G-I) ne permet pas de visualiser les tumeurs.



**Figure 98** : Exemples d'images en 3 dimensions obtenues suite à l'injection du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (A-C), du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD (D-F) ou du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD (G-I) chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc. Vues de (A, D, G) face ventrale, (B, E, H) latéral droit et (C, F, I) face dorsale.

On constate sur cet exemple du traceur  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD (A-C) que la tumeur est bien délimitée. L'élimination du traceur s'effectue par les reins et le foie, le haut de la tête de l'animal est ici hors du plan. La tumeur est également visible avec le traceur  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD (D-F) ; par ailleurs, cet animal ne possède qu'un rein fonctionnel puisque le rein gauche n'élimine pas le traceur. Enfin, le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD (G-I) ne permet pas de discriminer le membre portant la tumeur du membre contrôle.

### ***b- Captation tumorale***

La captation tumorale a été calculée d'après le traitement de l'imagerie tridimensionnelle de la même façon que pour le modèle B16F0. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 23.

Souris	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD		$^{99m}\text{Tc}$ -cRGD		$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD	
	% DI bio.	% DI Imagerie	% DI bio.	% DI Imagerie	% DI bio.	% DI Imagerie
1	1,49	1,24	0,66	0,98	0,32	0,23
2	0,49	0,66	0,35	0,42	0,50	0,44
3	1,44	2,39	0,52	0,99	0,32	0,50
4	2,67	2,23	1,05	1,29	0,48	0,50
5	2,49	2,00				
6	1,88	1,33				
<b>Moyenne ± Écartype</b>	<b>1,74 ± 0,80</b>	<b>1,64 ± 0,68</b>	<b>0,65 ± 0,30</b>	<b>0,92 ± 0,37</b>	<b>0,41 ± 0,10</b>	<b>0,42 ± 0,13</b>

Tableau 23 : Valeurs de dose injectée obtenues par biodistribution et imagerie.

Pour chacun des traceurs, les pourcentages de dose injectée ainsi observés par imagerie sont similaires à ceux retrouvés suite à la biodistribution pour les tumeurs TS/A-pc ( $p > 0,05$ ) d'après le test non paramétrique de Wilcoxon.

### ***c- Rapports « Tumeur / Muscle controlatéral »***

L'analyse des coupes d'images permet de calculer les rapports T/MC lors de l'imagerie SPECT. Les valeurs sont présentées dans le tableau 24.

Souris	<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD		<sup>99m</sup> Tc-cRGD		<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RAD	
	T/MC bio.	T/MC Imagerie	T/MC bio.	T/MC Imagerie	T/MC bio.	T/MC Imagerie
1	5,30	5,71	4,10	4,12	2,16	3,82
2	4,71	3,97	3,84	4,46	1,37	1,45
3	3,82	3,77	4,12	3,15	2,65	2,13
4	4,01	3,77	3,63	4,78	1,06	1,40
5	4,41	3,79				
6	3,02	3,48				
<b>Moyenne ± Écartype</b>	<b>4,21 ± 0,79</b>	<b>4,08 ± 0,81*</b>	<b>3,92 ± 0,23</b>	<b>4,13 ± 0,71*</b>	<b>1,81 ± 0,73</b>	<b>2,20 ± 0,13</b>

Tableau 24 : Rapports « Tumeur / Muscle controlatéral » obtenus d'après les acquisitions tomographiques (Imagerie) et d'après prélèvement des organes (bio).

\*  $p < 0,05$  vs. T/MC par imagerie du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RAD.

Les différents rapports T/MC observés par imagerie et *post mortem* sont similaires pour chacun des traceurs ( $p > 0,05$ ). En revanche, les rapports T/MC obtenus suite à l'imagerie par les traceurs possédant le motif « RGD » sont significativement supérieurs à ceux du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RAD ( $p < 0,05$ ).

## C - Ligand marqué à l'indium-111

La molécule RAFT-RGD marquée à l'yttrium-90 pourrait posséder des propriétés intéressantes lors de radiothérapie, notamment grâce au fait qu'elle puisse être marquée par deux atomes d'yttrium-90. Le marquage à l'yttrium-90, comme celui à l'indium-111, nécessite l'ajout d'un groupement DOTA ce qui peut entraîner des variations importantes de biodistribution du traceur. C'est pourquoi nous avons en préalable réalisé des études de biodistribution et d'imagerie avec la molécule marquée à l'indium-111. Ces études ont été menées sur les deux modèles de tumeurs syngéniques utilisées lors des expérimentations au technétium.

## 1 - Études sur le modèle B16F0

### 1-1 Biodistributions

Le  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD est principalement éliminé par voie rénale (Figure 99) et la clairance sanguine est très rapide ( $< 0,1$  % DI / g après 1 h). La captation hépatique est très faible ( $\approx 2,3$  % DI / g à 1 h). Hormis les reins, l'ensemble des organes et notamment le muscle capte peu le traceur. Ces caractéristiques sont très favorables à l'obtention de bons rapports tumeur vs. bruit de fond en imagerie. La captation tumorale atteint 1,81 % DI / g à 1h p.i, puis diminue vers 0,60 % à 4h, pourcentage qui varie peu jusqu'à 48h p.i. ( $p > 0,1$ ).

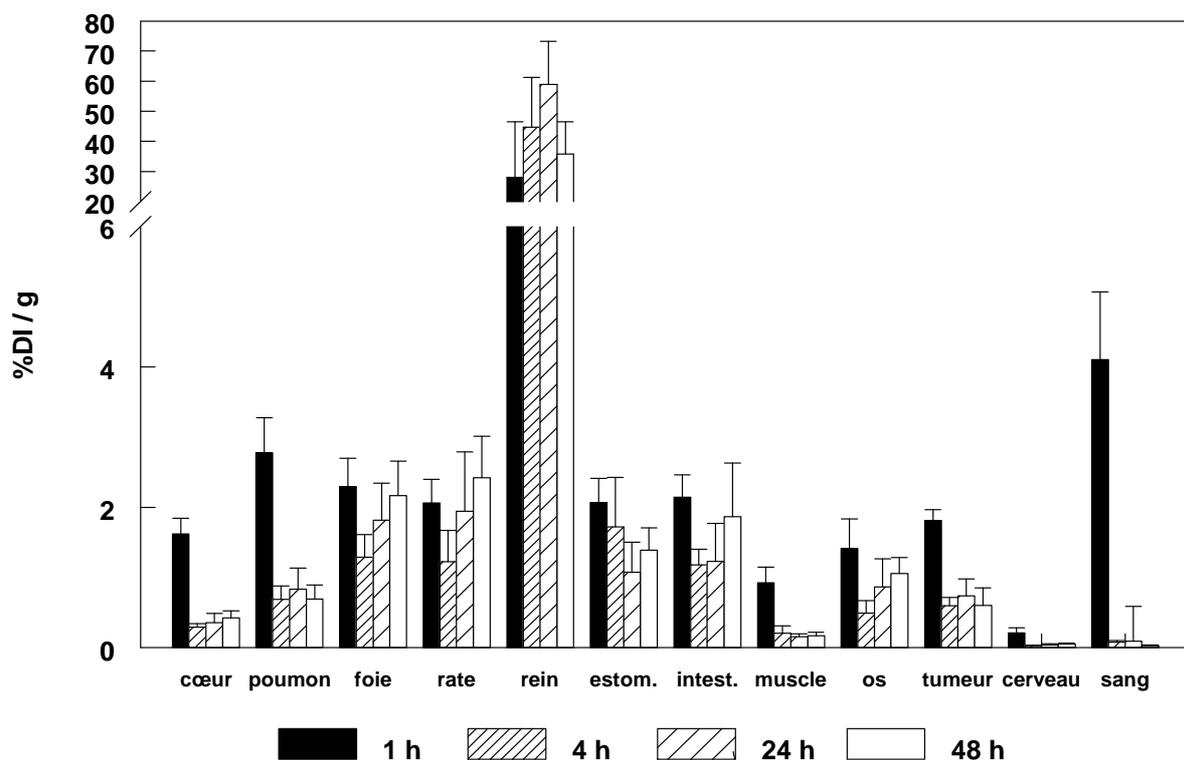


Figure 99 : Biodistribution du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0,  $n \geq 4$  / temps.

## 1-2 Comparaison avec le ligand marqué au technétium :

### a- Captation tumorale

La captation tumorale du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD diminue de manière significative ( $p < 0,0001$ ) au cours du temps de  $1,81 \pm 0,15$  à  $0,60 \pm 0,12$  % DI / g entre 1 et 4 heures respectivement (Figure 100). La différence de captation observée entre les ligands marqués au technétium et à l'indium devient significative et favorable au technétium à 4 heures ( $p < 0,0001$ ) ; on note qu'à une heure, cette différence n'est pas significative ( $p = 0,052$ ).

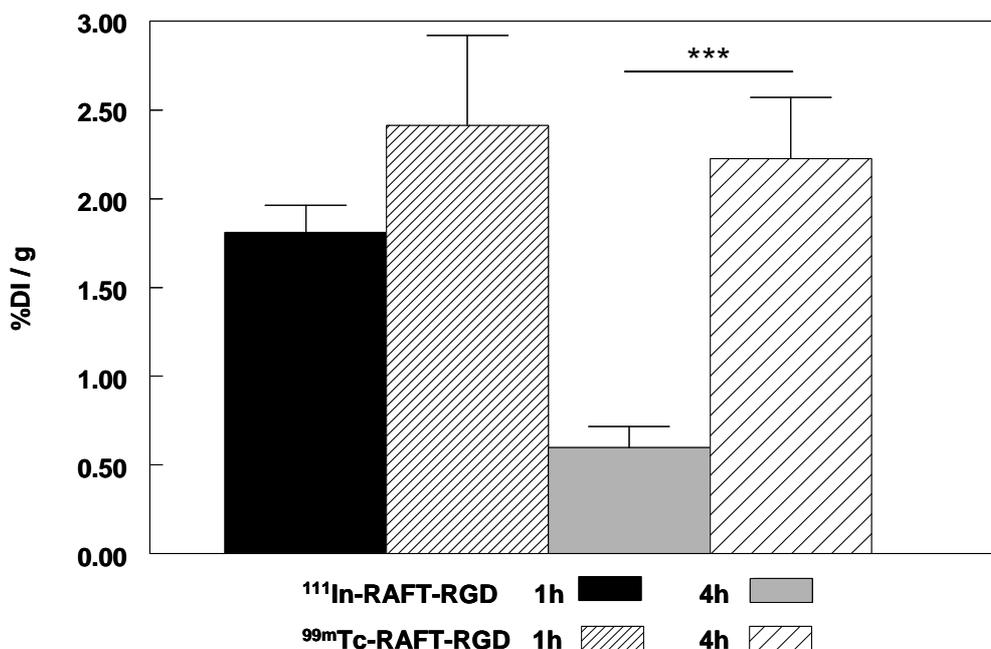


Figure 100 : Captation tumorale du RAFT-RGD sur le mélanome B16F0,

\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### b- Rapports T/MC

Les rapports T/MC obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec le radioligand technétié (Tableau 16). Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs « Technétium » vs. « Indium » ( $p > 0,1$ ). Bien que le traceur soit rapidement

éliminé il permet l'obtention d'images avec des rapports supérieurs à deux entre la tumeur et le muscle controlatéral (Tableau 25). De plus, les résultats obtenus par imagerie et ceux obtenus suite aux biodistributions sont similaires,  $p > 0,1$ .

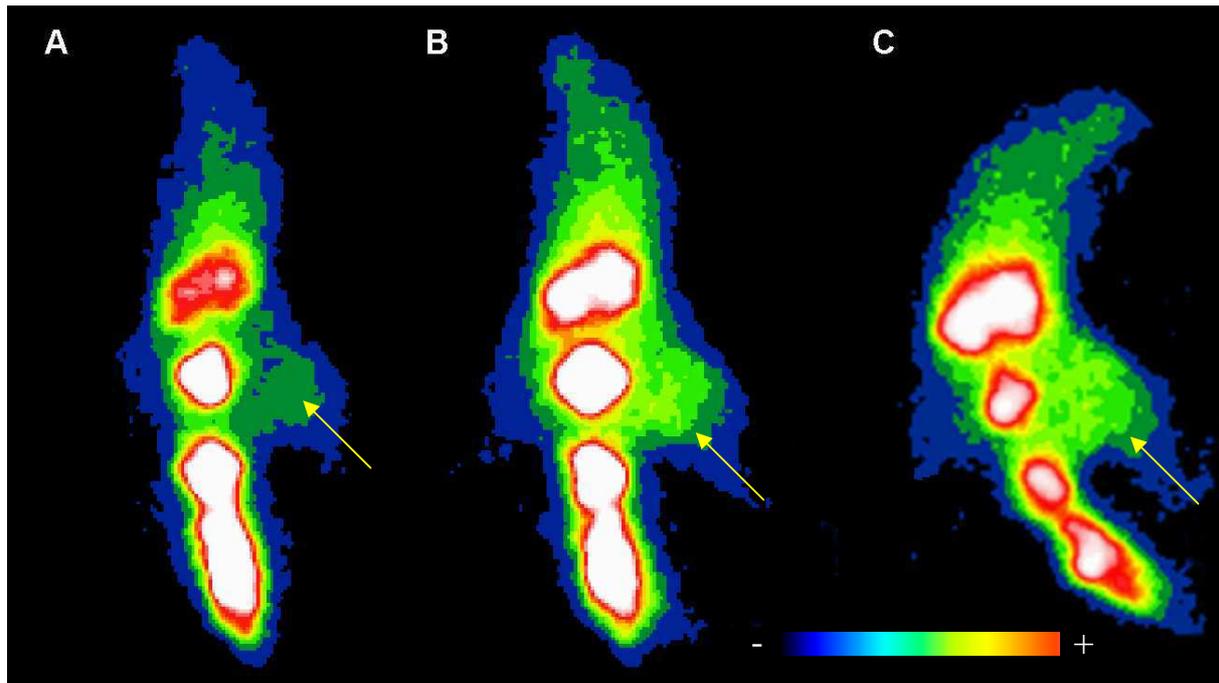
	Rapport Tumeur / Muscle Controlatéral	
Imagerie	30 minutes	2,85 ± 0,77
	60 minutes	2,57 ± 0,89
	120 minutes	2,59 ± 0,82
Biodistribution	180 minutes	2,99 ± 0,65

**Tableau 25** : Rapports Tumeur / Muscle Controlatéral observés suite à l'injection du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la souris greffée avec le mélanome B16F0.

### 1-3 Imagerie planaire

La gamma caméra dédiée au petit animal ne possède pas les collimateurs nécessaires à l'imagerie à l'indium. De plus, l'indium émet deux pics d'énergie gamma, l'un à 173 keV et le second à 247 keV. Au-delà de 220 keV, la caméra petit animal ne capte pas toute l'énergie émise. Les acquisitions planaires du ligand marqué à l'indium ne peuvent donc pas être effectuées avec la caméra petit animal. Les acquisitions présentées figure 101 ont été réalisées avec une caméra planaire dédiée à l'homme (SoftCam, DSX rectangular). Les souris sont placées face ventrale contre la caméra.

Les tumeurs sont visibles sur tous les animaux, dès les premières secondes d'acquisition, aussi bien à 30 minutes qu'à 2 heures post-injection. On observe l'accumulation rapide du traceur dans les reins et la vessie. En revanche, lors de l'expérience d'imagerie à 24 et 48 h réalisée sur d'autres animaux, les tumeurs de souche B16F0 ne se sont pas suffisamment développées pour permettre l'imagerie (masse tumorale faible et très peu vascularisée).



**Figure 101** : Exemple d'imagerie planaire du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD obtenue avec la gamma caméra humaine. Souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0, (A) 30 minutes (B) 60 minutes et (C) 120 minutes post-injection. La tumeur est sur le membre inférieur droit. T/MC (A) 3,58 ; (B) 3,99 ; (C) 2,68 et post mortem 3,26.

## 2 - Études sur le modèle TS/A-pc

### 2-1 Biodistributions

Les mêmes études ont été conduites sur le modèle TS/A-pc. La biodistribution représentée figure 102 indique une forte clairance sanguine et l'élimination du ligand par voie rénale. La captation rénale reste très importante à 48 h puisqu'elle est supérieure à 30 % DI /g. La captation tumorale diminue au cours du temps de 1,63 % DI / g à 1h à 1,26 % à 4h ( $p > 0,1$ ) puis se stabilise à 0,77 et 0,70, 24h et 48h respectivement ( $p < 0,01$  entre 4 et 24h et  $p < 0,001$  entre 4 et 48h). Les autres organes captent peu le traceur.

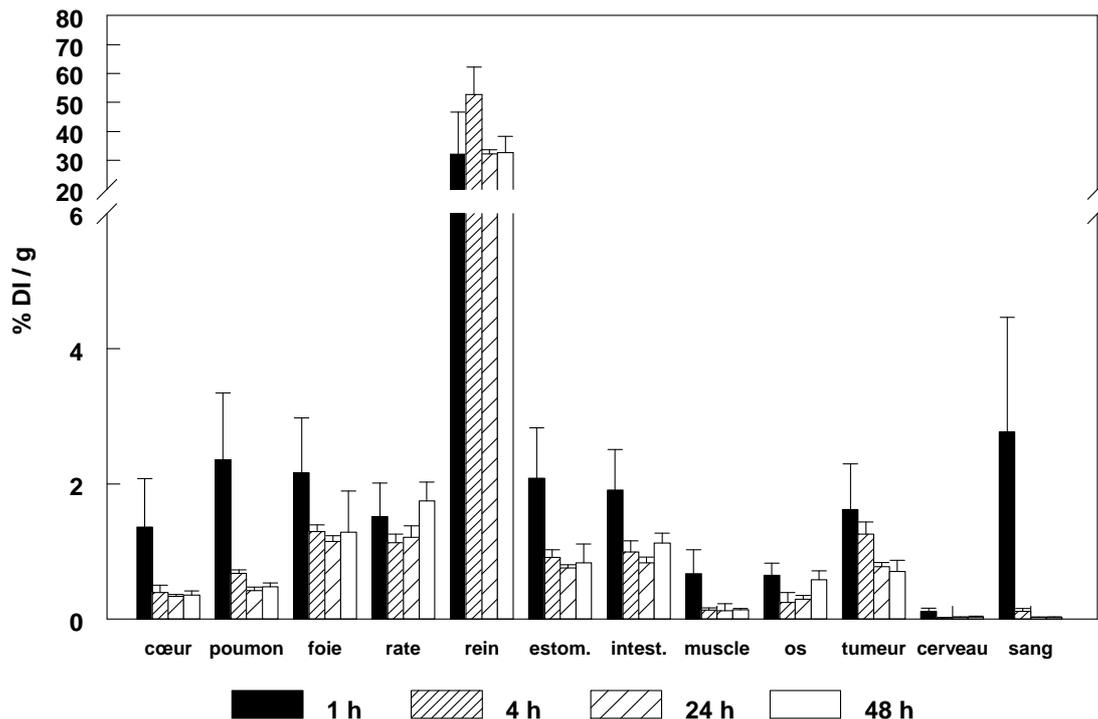


Figure 102 : Biodistribution du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc,  $3 \leq n \leq 5$ .

## 2-2 Comparaison avec le ligand marqué au technétium

### a- Captation tumorale

La figure 103 indique la captation tumorale des traceurs  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD et  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. Pour le composé marqué à l'indium-111, cette captation diminue faiblement au cours du temps de  $1,63 \pm 0,67$  à  $1,26 \pm 0,18$  % DI / g, entre 1 et 4 heures respectivement ( $p > 0,1$ ). La différence de captation observée entre les ligands marqués au technétium-99m et à l'indium-111 devient significative et favorable au technétium à 4 heures ( $p < 0,05$ ) alors que ne l'est pas à 1 heure ( $p = 0,057$ ).

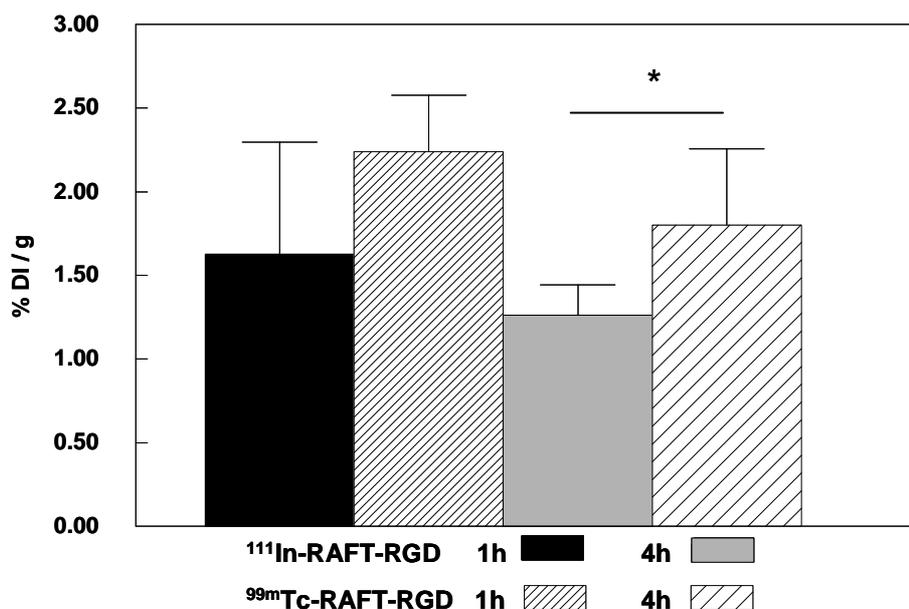


Figure 103 : Captation tumorale du RAFT-RGD sur le carcinome TS/A-pc, \*  $p < 0,05$ .

### ***b- Rapports T/MC***

Les rapports T/MC obtenus en imagerie sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec le radioligand technétié pour les temps courts (Tableau 21). On note une différence importante entre les valeurs T/MC en imagerie et en biodistribution ( $p < 0,05$ ) (Tableau 26), en partie due à la très faible captation musculaire ( $< 0,2$  % DI / g). Les rapports T/MC restent très favorables à l'imagerie jusqu'à 48h.

		Rapport Tumeur / Muscle Controlatéral	
Imagerie	30 minutes		$1,64 \pm 0,62$
	60 minutes		$1,70 \pm 0,53$
	120 minutes		$1,64 \pm 0,38$
	24 heures		$2,12 \pm 0,65$
	48 heures		$1,95 \pm 0,59$
Biodistribution	180 minutes		$5,48 \pm 2,63$
	24 heures		$4,35 \pm 0,79$
	48 heures		$5,13 \pm 1,18$

Tableau 26 : Rapports Tumeur / Muscle Controlatéral observés suite à l'injection du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la souris greffée avec le carcinome TS/A-pc.

### 2-3 Imagerie planaire

Les acquisitions ont été effectuées grâce à une caméra planaire dédiée à l'homme. Les souris sont placées face ventrale sur la caméra. La figure 104 représente une acquisition réalisée sur temps courts sur un même animal et la figure 105 représente une acquisition réalisée sur temps longs sur un autre animal.

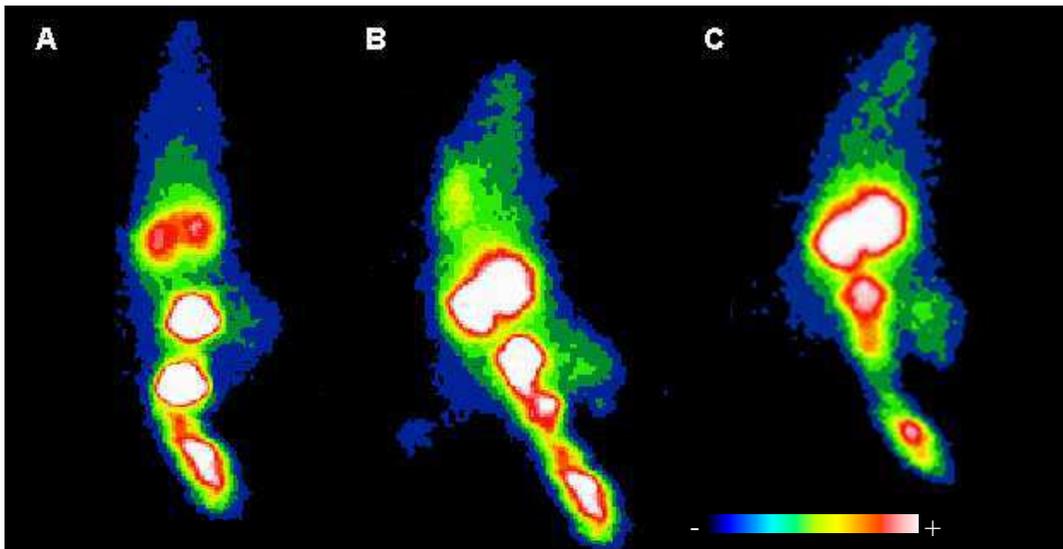


Figure 104 : Imagerie planaire du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD. Souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc, (A) 30 min (B) 60 min et (C) 120 min p.i. La tumeur est sur le membre inférieur droit. T/MC (A) 1,29 ; (B) 2,09 ; (C) 1,75 et *post-mortem* T/MC 7,89.

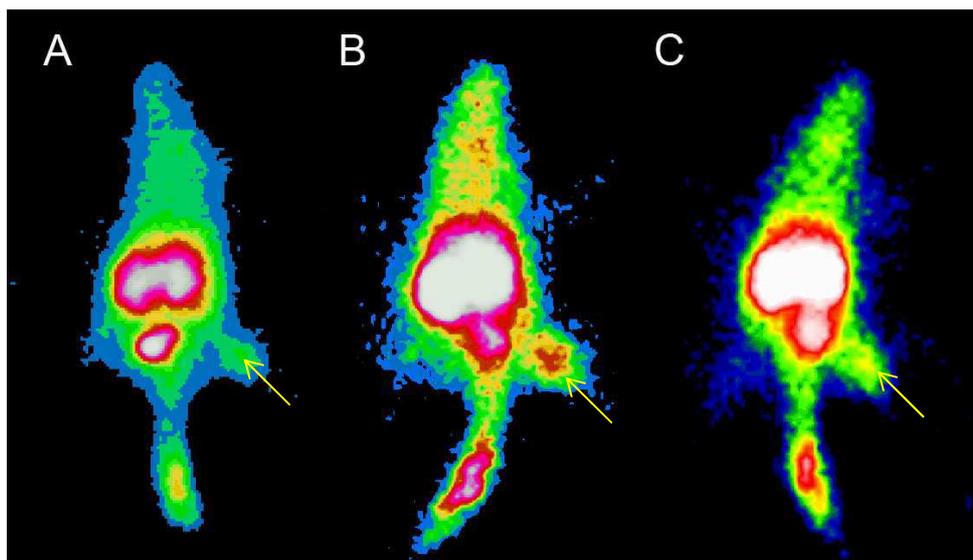


Figure 105 : Imagerie planaire du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD. Souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc, (A) 2h (B) 24h et (C) 48h post-injection. La tumeur est sur le membre inférieur droit. T/MC (A) 2,43 ; (B) 2,94; (C) 2,81 et *post-mortem* T/MC 4,11.

Les tumeurs TS/A-pc  $\alpha_v\beta_3^+$  sont visibles sur chacun des animaux, de 30 minutes à 2 heures post-injection, comme dans le modèle B16F0  $\alpha_v\beta_3^+$ . Les acquisitions tardives permettent également de visualiser les tumeurs. L'élimination rénale est lente mais continue comme l'indique la captation de la vessie.

Les principaux résultats obtenus *in vivo* sont récapitulés ci-après (Tableau 27).

Modèle Tumoral	PC-3	KB 3.1	B16F0	TS/A-pc
Expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	faible	nulle	modérée	forte
Caractère angio-génique	faible	faible	fort	fort
Marquage	Iode-125	Technétium-99m	Technétium-99m Indium-111	Technétium-99m Indium-111
<b>Biodistribution</b>	<p><b>Captation tumorale max.:</b></p> <p><math>^{125}\text{I}</math>-RAFT-RGD 2,62% DI / g</p> <p><math>^{125}\text{I}</math>-cRGD 2,15% DI / g</p> <p><b>Élimination rénale</b></p> <p><b>Bonne clairance sanguine</b></p>	<p><b>Captations tumorales</b> du <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>-RAFT-RGD et du <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>-cRGD <b>similaires</b> (&lt;1%)</p> <p>Élimination rénale et hépatique</p>	<p><b>Technétium-99m :</b> Élimination rénale et hépatique Clairance sanguine lente</p> <p><b>Captation Tumorale (~2 / 2,5 % DI/g) :</b></p> <p><b>B16F0 :</b> <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>-cRGD &lt; <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>-RAFT-RGD</p> <p><b>TS/A-pc :</b> <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>-cRGD = <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>-RAFT-RGD</p> <p><b>Indium-111 :</b> Élimination rénale Clairance sanguine rapide</p> <p><b>Captation tumorale <math>^{111}\text{In}</math>-RAFT-RGD &lt; <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>-RAFT-RGD</b></p>	
<b>Imagerie</b>	Désiodation du traceur	<p><b>Visualisation des tumeurs <math>\alpha_v\beta_3^+</math></b> de 30 min à 24 h.</p> <p><b>Pas de différence entre RAFT-RGD et cRGD</b></p>	<p><b>Visualisation des tumeurs <math>\alpha_v\beta_3^+</math></b> dès 30 min post-injection (<math>^{111}\text{In}</math> et <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cinétique rapide</li> <li>- Pas d'amélioration de la visualisation dans le temps</li> </ul> <p>RAFT-RGD fixe les néovaisseaux et les cellules tumorales <math>\alpha_v\beta_3^+</math></p> <p><b>Pas de différence entre RAFT-RGD et cRGD (<math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>)</b></p>	

**Tableau 27 :** Récapitulatif des principaux résultats et caractéristiques des modèles utilisés *in vivo*.



# **Discussion Générale**



### III - Discussion Générale

**L'angiogenèse tumorale est un paramètre fondamental du développement des cancers, actuellement considéré comme un facteur pronostique (Gasparini 1998 ; Vonlaufen 2001 ; Bello 2001 ; Felding-Habermann 2002) et une cible thérapeutique pour de nombreux traitements (Raguse 2004 ; Posey 2001 ; Pichler 2005). C'est pourquoi son ciblage en Médecine Nucléaire est un objectif important de caractérisation tumorale et de suivi thérapeutique.**

**Dans ce cadre, le couple « RGD - intégrine  $\alpha_v\beta_3$  » a été choisi comme cible de la néoangiogenèse.** En effet, les peptides contenant le motif « RGD » sont capables de lier l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (cf. Partie I : Revue Bibliographique, Études utilisant des peptides RGD). De plus, l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est forte sur les cellules endothéliales néoformées alors qu'elle est quasi absente du réseau vasculaire quiescent.

Plusieurs équipes ont ainsi publié sur ce thème en utilisant divers types de marquage par émetteurs gamma (iode-125, technétium-99m, indium-111...) et émetteurs de positons (fluor-18, cuivre-64). L'activité tumorale enregistrée est parfois très faible, avec certaines valeurs inférieures à 1 % de la dose injectée par gramme de tumeur (McQuade 2003 ; Ogawa 2003). La captation tumorale dépendante du type tumoral et du radioligand, dans sa forme et dans le type de marquage utilisé, peut cependant être améliorée. Les nombreux articles de Chen X. démontrent que le cRGD permet l'imagerie tumorale grâce à des captations parfois supérieures à 8 % DI / g. Par l'utilisation d'un dérivé de cRGD marqué au fluor-18, il a notamment obtenu des images de glioblastomes de bon contraste (Chen<sup>e</sup> 2004 ; Chen 2006).

L'équipe de Haubner R. a également obtenu des résultats intéressants avec l'utilisation de traceurs à clairance sanguine rapide et forte rétention tumorale, notamment marqués au fluor-18. Toutefois, certains résultats sont critiquables puisque leurs traceurs ne permettent pas de visualiser les tumeurs  $\alpha_v\beta_3$  négatives, malgré l'expression au niveau endothélial de l'intégrine (Haubner 2001). Cependant,

plus récemment, les **premières images chez l'homme** ont été publiées par ce groupe avec le même traceur (Haubner 2005 ; Beer 2005). Elles mettent en évidence un marquage sélectif des tumeurs, probablement corrélé à l'agressivité du cancer et / ou à la présence de l'intégrine au niveau tumoral.

Si le cRGD permet l'imagerie tumorale, **certaines études démontrent que l'utilisation de peptides bivalents ou multivalents pourrait améliorer le contraste par augmentation de la captation et de la rétention tumorales** (Janssen<sup>b</sup> 2002 ; Wu 2005). **C'est pourquoi le RAFT-RGD pourrait être un traceur prometteur de l'angiogenèse tumorale.**

**Afin de vérifier la pertinence du couple « RGD - intégrine  $\alpha_v\beta_3$  »**, la captation du peptide contrôle cRGD et du ligand original RAFT-RGD a été observée sur des lignées cellulaires exprimant ou non l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

Les modèles cellulaires tumoraux humains PC-3, KB 3.1 et endothéliaux HMVEC ont donc été caractérisés afin de connaître le statut d'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Lors de la caractérisation cellulaire, les techniques de cytométrie en flux et de western blot ont permis de mettre en évidence la présence de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  humaine sur les cellules endothéliales HMVEC et l'absence de l'intégrine sur les cellules tumorales KB 3.1. La caractérisation des cellules PC-3 s'est révélée plus complexe : cette lignée apparaît  $\alpha_v\beta_3$  négative par cytométrie et  $\alpha_v\beta_3$  positive par western blot. Ces résultats ne sont pourtant pas aberrants : d'une part, la présence de l'intégrine semble faible par western blot, et d'autre part, les publications sont en désaccord sur la présence (Chatterjee 2001 ; Zheng 1999) ou non (Shen 2003) de l'intégrine sur cette lignée. La seule publication dans laquelle la lignée PC-3 apparaît  $\alpha_v\beta_3$  positive par la technique de cytométrie en flux utilise un anticorps spécifique de la partie intracytoplasmique de  $\beta_3$ , anticorps non commercialisé (Zheng 1999). Par conséquent, bien que l'expression de l'intégrine soit faible, les cellules PC-3 expriment  $\alpha_v\beta_3$ .

Les études de captation ont montré que le RAFT-RGD, comme le cRGD, est capté par les cellules  $\alpha_v\beta_3$  positives ; la molécule de contrôle non spécifique RAFT-RAD est quant à elle peu captée par l'ensemble des cellules  $\alpha_v\beta_3$  positives ou négatives.

**Le choix d'un ligand possédant le motif peptidique RGD semble donc pertinent dans le ciblage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , comme cela est décrit dans la littérature.**

L'originalité de la molécule RAFT-RGD par rapport au cRGD est le couplage de 4 cyclo-penta-peptides -RGDfV- sur un vecteur, le RAFT, qui pourrait faciliter l'internalisation cellulaire. Ce RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template) possède par ailleurs deux faces distinctes, fonctionnalisées, qui permettent d'une part le ciblage cellulaire grâce au motif peptidique RGD et d'autre part le marquage radioactif.

**Cette construction originale RAFT-RGD s'est révélée particulièrement efficace *in vitro* : les études de captation cellulaire ont montré que le RAFT-RGD est davantage capté par les cellules  $\alpha_v\beta_3$  positives que le cRGD, et ceci de manière significative.** Toutefois, alors que les cellules endothéliales HMVEC expriment très fortement l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , la captation cellulaire du RAFT-RGD est plus importante pour le modèle tumoral PC-3 (Figure 50). Ceci semble contradictoire. Or, les cellules HMVEC proviennent d'une lignée primaire stable et les PC-3 sont des cellules cancéreuses possédant, comme l'ensemble des cellules cancéreuses, certains dysfonctionnements. On peut donc supposer que parmi les dérégulations des cellules PC-3, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , par sa synthèse, sa régulation, son fonctionnement ou son recyclage, soit altérée facilitant la captation du RAFT-RGD. Une autre hypothèse pourrait être que le RAFT-RGD soit capté via d'autres intégrines telles que  $\alpha_v\beta_5$  ou  $\alpha_{11b}\beta_3$ . Toutefois,  $\alpha_v\beta_5$  est exprimée fortement par les cellules KB 3.1 qui captent peu le radioligand : cette supposition est donc peu probable. L'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  n'est exprimée ni sur les HMVEC, ni sur les PC-3 : on peut donc écarter également cette hypothèse.

**L'effet de la concentration de RAFT-RGD sur les modèles  $\alpha_v\beta_3$  positifs a été testé.** Sur les cellules tumorales PC-3, la gamme de concentrations testées ne conduit pas à la saturation des intégrines. L'augmentation de la dose entraîne donc une augmentation de la captation du RAFT-RGD.

Sur les cellules endothéliales HMVEC, le RAFT-RGD est fortement capté puis, à mesure que la concentration augmente, il semble atteindre un plateau de captation ou saturation des intégrines, observé notamment à 30 min. Dans les faibles

concentrations, on peut donc supposer que les intégrines disponibles ne soient pas toutes liées au RAFT-RGD : elles captent alors une grande proportion de ligand. Aux plus fortes concentrations, les intégrines sont majoritairement liées au ligand RAFT-RGD et parviennent à en faire rentrer dans les cellules une quantité maximale atteignant ainsi le plateau. Sur ce modèle, **quelle que soit la concentration utilisée, la captation du RAFT-RGD est significativement supérieure à celle du cRGD ou de la molécule non spécifique RAFT-RAD.**

Enfin, des **expériences d'inhibition de la fixation** ont été réalisées sur les cellules endothéliales afin de montrer la spécificité de la liaison du RAFT-RGD sur les cellules  $\alpha_v\beta_3$  positives et de comparer l'affinité du ligand par rapport au contrôle spécifique cRGD. Lors de la co-injection  $^{125}\text{I}$ -cRGD / RAFT-RGD froid, le RAFT-RGD bloque la captation du cRGD. De plus, même en présence d'un fort excès de cRGD, le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est fortement capté. Ceci suggère que le RAFT-RGD soit rapidement fixé sur les intégrines (Figure 55) ; il pourrait dans ce cas, être internalisé sous forme de complexe intégrine / RAFT-RGD. Or, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  ont un temps de recyclage inférieur à 30 minutes (Bretscher 1989 ; Gawaz 2001) : elles sont donc à nouveau disponibles lors de l'expérience à 30 minutes. Lors de la co-injection de  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD / cRGD à 30 minutes, les intégrines recyclées en surface seraient à nouveau disponibles et en contact avec le fort excès de cRGD, inhibant significativement la captation du RAFT-RGD.

Par conséquent, deux points importants peuvent être relevés. Tout d'abord, les deux ligands se lient aux mêmes sites de fixation sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  puisque l'excès d'un ligand froid diminue significativement la captation du second ligand marqué. Deuxième point, la faible quantité de RAFT-RGD nécessaire à la diminution significative de la fixation du cRGD indique que **le RAFT-RGD**, comme d'autres molécules tétravalentes, **possède une meilleure avidité pour l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  que le cRGD** (Boturyn 2005 ; Temming 2005 ; Schraa 2002). Ceci a également été vérifié par Elisabeth Garanger lors de sa thèse (Garanger<sup>b</sup> 2005) : elle a notamment démontré que le RAFT-RGD possède une  $\text{IC}_{50}$  2,5 fois meilleure que celle du cRGD sur un test d'adhésion cellulaire.

La forte captation cellulaire du RAFT-RGD versus le cRGD pourrait être due à la tétramérisation du motif RGD : celle-ci pourrait favoriser la création de liaison à

plusieurs intégrines regroupées en clusters (Stupack 2002) en évitant les compétitions entre récepteurs et ainsi favoriser la captation cellulaire (Wu 2005 ; Liu 2001 ; Chen 2004 ; Janssen<sup>b</sup> 2002). D'après les travaux d'une équipe néerlandaise (Schraa 2002), le **mécanisme d'internalisation** semble dépendre de la taille et / ou de la capacité du ligand à lier plusieurs intégrines. La chloroquine, substance qui empêche tout transfert de la surface cellulaire à l'endosome (Schraa 2002), a été utilisée pour comparer la captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD vs.  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD. Les résultats montrent que la captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est diminuée alors que celle du  $^{125}\text{I}$ -cRGD n'est pas modifiée en présence de chloroquine. Ceci indique que le RAFT-RGD pourrait être internalisé par les cellules  $\alpha_v\beta_3$  positives, probablement après formation de clusters d'intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , sous forme de complexe intégrine / ligand, dans les endosomes. Cette hypothèse est appuyée des résultats obtenus par E. Garanger (Garanger 2005) avec la molécule RAFT-RGD couplée à un fluorochrome. Elle observe notamment une colocalisation du RAFT-RGD et des endosomes précoces. De plus, plusieurs études (Castel 2001 ; Schraa 2002) proposent que le cRGD, de petite taille, puisse être internalisé par diffusion passive. Au contraire, les molécules de plus grande taille, type anticorps et molécules multivalentes, semblent internalisées avec le récepteur  $\alpha_v\beta_3$  notamment par voie endosomale, réduisant temporairement le nombre d'intégrines en surface et activant des voies intracellulaires différentes (Kumar 2003 ; Giancotti 1999).

**Ces études préliminaires *in vitro* ont démontré que la captation du ligand tétravalent RAFT-RGD est significativement plus importante que celle du ligand monovalent cRGD et son affinité meilleure sur les cellules  $\alpha_v\beta_3$  positives. Ces résultats *in vitro* semblent très prometteurs et nous ont ainsi incité à poursuivre par les études *in vivo*.**

Les **premiers essais *in vivo*** ont été réalisés sur le modèle de xélogreffe PC-3,  $\alpha_v\beta_3$  positif, à l'aide de **traceurs iodés**. Les expériences de biodistribution réalisées après injection de  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD indiquent que le traceur est éliminé par voie rénale, comme le  $^{125}\text{I}$ -cRGD et le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD. Au niveau tumoral, le  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est capté de manière similaire au  $^{125}\text{I}$ -cRGD (Figure 68). Malgré cette captation, l'imagerie petit animal au  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD ou au  $^{125}\text{I}$ -cRGD n'a pas permis de

visualiser la tumeur PC-3  $\alpha_v\beta_3$  positive. Toutefois, celle-ci reste invisible au  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi, marqueur de perfusion connu pour se fixer dans les tumeurs. On peut donc supposer que le modèle PC-3 est peu angiogénique.

Le modèle n'étant pas pertinent, il a été remplacé dans un premier temps par le modèle de xénogreffes KB 3.1  $\alpha_v\beta_3$  négatif, carcinome O.R.L., sur souris nudes, puis par deux modèles de tumeurs syngéniques, le carcinome mammaire TS/A-pc ( $\alpha_v\beta_3$  fortement positif) greffé sur Balb/c et le mélanome B16F0 ( $\alpha_v\beta_3$  positif) greffé sur C57Bl/6J.

Ce marquage à l'iode-125 s'est rapidement révélé inadapté puisque la molécule  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD est désiodée chez la souris entraînant un fort marquage au niveau de la thyroïde. De plus, la gamma caméra est également peu adaptée à la détection de l'iode-125 en raison de sa faible énergie d'émission (35 keV).

Par conséquent, le RAFT-RGD marquable à l'iode a été remplacé par une nouvelle molécule de RAFT-RGD marquable au technétium-99m : au niveau moléculaire, la tyrosine a été remplacée par une lysine couplée à une histidine afin de permettre la chimie de complexation nécessaire au marquage au technétium (cf. Matériel et Méthode, RAFT(c[-RGDfV-])<sub>4</sub> ou RAFT-RGD)).

**Les expériences de biodistribution utilisant les traceurs iodés indiquent donc que le RAFT-RGD atteint sa cible *in vivo*, puisque la captation tumorale est de 2,62 % DI / g à 1h. Cette captation est par ailleurs similaire à celle du contrôle positif cRGD (cf. Figure 68).**

La plus grande partie des expériences *in vivo* a été réalisée à l'aide de **traceurs technétiés**. Ceux-ci sont **éliminés par les reins mais également par la voie hépatobiliaire**, contrairement aux ligands iodés majoritairement éliminés par voie rénale. Hormis dans les organes d'élimination, la captation des traceurs est faible. Leur clairance sanguine est plus lente que celle des ligands iodés. On constate d'ailleurs des différences d'activité sanguine significatives entre les composés iodés et technétiés ( $p < 0,05$  entre souches de souris nudes et  $p < 0,01$  pour les comparaisons entre souris de souche différente). Le  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD est quant à lui

très rapidement éliminé de l'ensemble des organes par les reins ; par ailleurs, l'activité rénale est et demeure supérieure à 30 % DI / g pour les deux modèles B16F0 et TS/A-pc jusqu'à 48h p.i. En revanche, les très faibles captation hépatique et musculaire et la clairance sanguine rapide sont favorables à de bons rapports tumeur vs. bruit de fond en imagerie.

Le **choix de ces modèles de tumeurs syngéniques** s'est avéré pertinent car les tumeurs B16F0 et TS/A-pc sont bien vascularisées et se développent rapidement. Dans ces deux modèles, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est exprimée au niveau endothélial et tumoral, comme l'ont indiqué les expériences de western blot. Le modèle B16F0, décrit dans la littérature comme modèle  $\alpha_v\beta_3$  positif (Cowden Dahl 2005) l'exprimant plus modérément.

La comparaison de la captation tumorale entre les modèles syngéniques B16F0 et TS/A-pc et le modèle de xélogreffe  $\alpha_v\beta_3$  positif PC-3 ne peut pas être établie car les traceurs utilisés sont marqués par deux émetteurs gamma différents. En revanche, entre les modèles B16F0 et TS/A-pc et le modèle KB 3.1, la captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est significativement supérieure pour les modèles syngéniques ( $p < 0,0001$ ) : ce résultat est d'autant plus cohérent que les cellules KB 3.1 sont  $\alpha_v\beta_3$  négatives.

La captation tumorale varie selon le modèle tumoral, le ligand, et le nombre de jours compris entre l'implant tumoral et l'étude (Haubner 1999, Chen<sup>b</sup> 2004, McQuade 2003). Sur les modèles syngéniques, on constate une **captation d'environ 2,5 % DI / g de tumeur à 1 heure post-injection avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. La captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD est par ailleurs significativement supérieure à celle du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD sur le modèle B16F0, à 1 h ( $p < 0,01$ ).** On note que pour le modèle TS/A-pc la différence est proche de la significativité avec  $p = 0,055$ .

Le traceur  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD, molécule non spécifique, est quant à lui rapidement éliminé ; la captation est diminuée dans l'ensemble des organes, tumeur et muscle compris. **La captation tumorale du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD est ainsi significativement plus faible que celle des composés contenant le motif « RGD », pour les deux modèles syngéniques étudiés ( $p < 0,01$ ).** Ceci indique que le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD n'est pas un traceur de l'angiogenèse tumorale et que la fixation du RAFT-RGD est spécifique à la présence du motif « RGD ». Lors des essais utilisant les ligands

iodés, la captation tumorale du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD s'est avérée particulièrement haute ; il faut toutefois noter que les tumeurs utilisées pour les temps de 1 et 4 heures étaient de très faible masse ; ceci accentue alors le rapport de la dose injectée ramenée à la masse tumorale et pourrait en partie expliquer ces résultats.

**Grâce au marquage au technétium-99m et à la gamma-caméra dédiée au petit animal (Biospace Mesures, France), toutes les tumeurs  $\alpha_v\beta_3$  négatives (KB 3.1) et  $\alpha_v\beta_3$  positives (B16F0 et TS/A-pc) sont visibles par imagerie planaire non invasive corps entier dès 30 minutes et au-delà de 24 heures post-injection du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD ou du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cRGD.**

Les acquisitions planaires au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD indiquent des valeurs de rapports Tumeur / Muscle Controlatéral (T/MC) similaires entre 30 minutes et 4 heures post-injection pour les deux modèles B16F0 et TS/A-pc ; la valeur optimale variant d'un animal à l'autre.

Ces rapports T/MC obtenus par imagerie planaire reflètent la captation tumorale : ils sont supérieurs à 2 pour les ligands possédant le motif « RGD » et proches de 1 pour le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RAD. Cependant, et malgré les différences de captation tumorale pour le modèle B16F0 **entre  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD et  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -cRGD, il n'existe pas de différence de contraste T/MC entre les traceurs.**

Comme certaines équipes l'ont démontré, *in vitro*, la structure du peptide joue un rôle prépondérant dans sa captation mais cet effet n'est pas systématiquement retrouvé *in vivo*. L'équipe de Boerman a, par exemple (Janssen<sup>b</sup> 2002), comparé un peptide RGD monocyclique à un peptide bivalent marqué au technétium. *In vitro*, le peptide bivalent possède une  $\text{IC}_{50}$  10 fois supérieure à celle du peptide monovalent. *In vivo*, les tumeurs (OVCAR-3, carcinome ovarien  $\alpha_v\beta_3$  positif) captent significativement plus le peptide bivalent mais du fait d'une plus lente élimination, les rapports tumeur / sang sont identiques et les rapports tumeur / rein deviennent défavorables lors de l'utilisation du peptide bivalent (Janssen<sup>b</sup> 2002). De même, l'équipe de Conti a également testé des peptides monovalent et bivalent sur un modèle de xénogreffe tumoral : bien que la captation tumorale soit améliorée en présence du composé bivalent, les activités musculaire et sanguine augmentent aussi ce qui gomme l'effet favorable du peptide bivalent (Chen 2004). Nos résultats sont donc en accord avec la littérature. Certaines équipes ont cependant mis en évidence une captation et une

réretention tumorales significativement supérieures pour des polymères « RGD » par rapport au monomère « RGD », différence retrouvée également lors de l'imagerie (Line 2005 ; Wu 2005).

Le rapport T/MC du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD est élevé en biodistribution du fait de la faible captation musculaire : en effet le RAFT-RAD est très rapidement éliminé de l'ensemble des organes (Figures 77 et 90). Bien que la tumeur capte peu le traceur, l'activité musculaire est significativement plus faible que celle des ligands possédant le motif peptidique « RGD » accentuant ainsi la valeur du rapport. En imagerie, en revanche, les tumeurs sont majoritairement non visibles (> 80 %) après injection du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD. Le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD n'est donc pas, *in vivo*, un traceur de l'angiogenèse tumorale : ceci valide l'importance du motif « RGD » pour le traceur RAFT-RGD.

Comparée au  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, la **captation tumorale** du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD est significativement plus faible, notamment à 4h p.i. dans les deux modèles tumoraux B16F0 et TS/A-pc. En revanche, les activités musculaire et sanguine sont faibles et permettent d'obtenir des rapports T/MC similaires à ceux obtenus suite à l'imagerie du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. **Avec le  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD, toutes les tumeurs  $\alpha_v\beta_3$  positives sont visibles par imagerie gamma, à l'aide d'une caméra dédiée à l'homme, dès 30 minutes et au-delà de 48 heures post-injection.** Cependant, la cinétique de fixation du RAFT-RGD est rapide et le contraste n'est pas amélioré au cours du temps. **Par conséquent, le choix du marquage au technétium-99m, de demi-vie plus courte et de plus faible pouvoir irradiant, serait préférable lors d'essais chez l'homme.**

En complément de l'imagerie planaire, l'**imagerie SPECT** des tumeurs a également été réalisée avec les différents traceurs technétiés *in vivo*. Avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, cette modalité **améliore le contraste** et permet de **mieux distinguer les limites des organes et de la tumeur**. Elle apporte donc de meilleures informations que l'imagerie planaire, dans le même temps d'acquisition. Avec ce mode d'imagerie, les tumeurs sont également visibles avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD. Le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD en revanche, ne permet pas de discriminer le membre sur lequel est greffé la tumeur du

membre contrôle. D'après les différentes acquisitions, il est possible de **déterminer de manière non invasive la captation tumorale** en pourcentage de la dose injectée **et le rapport T/MC**. Les différents rapports T/MC obtenus par imagerie SPECT et planaire sont similaires pour le modèle B16F0. Pour le modèle TS/A-pc, ces rapports sont significativement plus élevés en SPECT pour les traceurs  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD et  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD. Ceci pourrait être dû au fait que l'imagerie SPECT permette de mieux discerner les variations de captation ; la zone tumorale prise en compte dans la mesure du rapport T/MC est plus précisément distinguée des muscles adjacents et possède une activité plus élevée à l'origine de cette différence.

Dans l'optique de vérifier la spécificité de fixation du RAFT-RGD *in vivo*, des **expériences de pré-injection de ligand froid** ont été réalisées ; celles-ci n'ont pas permis de diminuer de manière significative la captation tumorale. Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer en partie ces résultats :

i) le RAFT-RGD possède une très bonne affinité pour son récepteur : le cRGD moins affin ne parviendrait pas à empêcher sa fixation *in vivo*

ii) les doses utilisées pour le radiomarquage sont faibles (4  $\mu\text{g}$  de RAFT-RGD par souris) et la quantité accumulée dans les tumeurs l'est encore plus (< 10 pmol). Nous avons peut-être ainsi sous-estimé la quantité de ligand froid nécessaire à la diminution significative de la captation tumorale, du fait de la très grande quantité d'intégrines exprimée dans les néovaisseaux.

Les deux hypothèses sont plausibles ; toutefois, les rapports « ligand radiomarqué vs. ligand froid » sont similaires à ceux utilisés par d'autres équipes (Haubner 2001 ; Chen<sup>d,e</sup> 2004). Dans leur cas, les pré-injections de ligand froid ont été effectuées comme dans notre cas à 10 minutes ou plus précocement à 1 ou 2 heures avant l'injection du traceur.

**La distribution intratumorale du traceur  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD** a été comparée à la dispersion des néovaisseaux tumoraux. Le marquage immunohistochimique au CD31, marqueur de référence des cellules endothéliales, indique une corrélation entre présence de zones riches en microvaisseaux et captation du traceur. On peut donc supposer que, malgré une rétention spécifique probable par les cellules

tumorales  $\alpha_v\beta_3$  positives, la vascularisation joue bien un rôle prépondérant dans la détection de l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Par ailleurs, le modèle TS/A-pc possède une densité microvasculaire tumorale plus importante que le modèle B16F0 : ceci pourrait en partie expliquer la plus forte captation tumorale des traceurs « RGD » dans le modèle TS/A-pc.

Outre une probable fixation sur les cellules tumorales  $\alpha_v\beta_3$  positives, les résultats des expérimentations *in vivo* nous indiquent que le  **$^{99m}\text{Tc-RAFT-RGD}$**  et le  **$^{99m}\text{Tc-cRGD}$**  **se fixent au niveau de l'endothélium néoformé** et permettent, de manière relativement similaire, de **visualiser les tumeurs par détection externe grâce à une gamma-caméra dédiée au petit animal.**

Le ciblage des néovaisseaux tumoraux se développe autour de deux axes : l'imagerie diagnostique et la **thérapeutique** anti-tumorale. Dans ce cadre, les **propriétés anti-angiogéniques du RAFT-RGD** ont été évaluées et comparées à celles du cRGD lors d'un test de blessure et lors de formation de pseudo-capillaires. Lors du test de blessure sur cellules endothéliales HMVEC ( $\alpha_v\beta_3$  positives), les ligands peuvent agir sur la migration et la prolifération cellulaire ; ici, les deux phénomènes sont évalués conjointement. La présence de RAFT-RGD ou de cRGD entraîne les mêmes effets d'inhibition sur ce test : la fermeture de la blessure est ralentie de manière significative par rapport à la condition contrôle. L'effet de la concentration n'est en revanche pas perçu dans la gamme de concentrations testées.

Le test de formation de pseudo-capillaires sur Matrigel® renseigne sur la capacité de ligands d'interférer lors de la migration et l'organisation cellulaires. Dans la gamme de concentrations testées, les deux ligands RAFT-RGD et cRGD semblent posséder des capacités d'inhibition proches, dès les temps précoces. Tous deux entraînent également le décollement cellulaire. Le RAFT-RAD, molécule non spécifique, n'interfère pas avec la mise en place du réseau de pseudo-capillaires.

Ces études *in vitro* démontrent **des propriétés d'inhibition de l'angiogenèse du RAFT-RGD** similaires à celles du cRGD, propriétés **caractéristiques des ligands liant les intégrines. Toutefois, les doses des traceurs utilisés en Médecine**

**Nucléaire ne correspondent pas aux doses ayant une activité pharmacologique ; ces résultats indiquent donc d'une part, que le choix de la cible est pertinent, et d'autre part, qu'il y a bien spécificité de reconnaissance de notre traceur pour la cible.**

Plusieurs éléments pourraient jouer en faveur du RAFT-RGD *versus* le cRGD lors d'essais de radiothérapie interne vectorisée. Tout d'abord, les biodistributions indiquent que le RAFT-RGD est, dans certaines conditions, davantage capté dans les tumeurs que le cRGD. De plus, la structure même du RAFT permet de coupler plusieurs émetteurs  $\beta^-$ , contrairement au cRGD, ce qui pourrait améliorer les capacités anti-angiogéniques et anti-tumorales de la molécule.

L'étude réalisée avec le  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD est également préliminaire à la radiothérapie puisqu'un groupement DOTA est nécessaire au marquage du RAFT-RGD à l'indium-111, émetteur  $\gamma$ , ainsi qu'à l'yttrium-90, émetteur  $\beta^-$ . Les biodistributions du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD ont soulevé un problème d'importance : la forte captation rénale (Figures 99 et 102) pourrait entraîner d'importants effets secondaires lors d'essais radiothérapeutiques. Des modifications du RAFT-RGD, sans doute nécessaires, pourraient permettre de limiter l'activité rénale du composé et d'augmenter sa rétention tumorale. Dans le groupe de R. Haubner, qui a produit des images de peptides dérivés du RGD (Haubner 2001 ; Haubner 2004), leur traceur a été couplé à un sucre (galactose) augmentant ainsi son caractère hydrophile et facilitant par là même son élimination (et le marquage de la molécule au fluor). Cette opération est bénéfique dans leur cas puisque la clairance sanguine est accélérée et la rétention rénale très faible chez l'homme (Beer 2005 ; Haubner 2005). L'administration d'agents diurétiques ou le blocage rénal par administration préalable de peptides pourrait également faciliter l'élimination rénale du radioligand et limiter ainsi l'irradiation de l'organe. Enfin, dans le cadre de radiothérapies internes vectorisées, le RAFT-RGD pourrait être modifié et adapté au modèle de pré-ciblage des anticorps afin de réduire l'irradiation rénale et d'augmenter la captation tumorale : le RAFT-RGD injecté en premier serait modifié au niveau de la partie réservée au marquage, partie alors couplée à un motif spécifique « A » non marqué. Lors d'une seconde injection, une molécule « B » radiomarkée, reconnaissant spécifiquement la partie « A » permettrait le radiomarquage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Goldenberg 2006).

**Conclusions et**

**Perspectives**



## Conclusions et perspectives

Les études cellulaires ont permis de valider le RAFT-RGD comme ligand de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Ses propriétés de captation sont significativement supérieures à celles du cRGD, molécule de référence actuellement développée en phase clinique lors de thérapies anti-angiogéniques sous le nom de cilengitide®. Le RAFT-RGD possède lui-même des capacités d'inhibition de l'angiogenèse similaires à celles du cRGD.

*In vivo*, le RAFT-RGD a été utilisé comme traceur de l'angiogenèse tumorale. Sa captation tumorale varie selon le modèle tumoral et le type de marquage utilisé. Dans certains cas, la captation tumorale du RAFT-RGD est significativement supérieure à celle du cRGD. Marqué par différents émetteurs gamma, technétium-99m et indium-111, le RAFT-RGD permet la visualisation de tumeurs  $\alpha_v\beta_3$  positives (TS/A-pc et B16F0) et négatives (KB 3.1) tant par imagerie planaire que SPECT. De plus, le RAFT-RGD par sa structure possède une souplesse de marquage et de modifications qui pourraient permettre d'améliorer ses propriétés en tant que traceur ou lors d'essais de radiothérapies internes vectorisées. L'étude préliminaire aux essais de radiothérapie effectuée par le RAFT-RGD marqué à l'indium-111 pointe cependant une difficulté probable : la très forte rétention rénale pourrait engendrer des insuffisances rénales importantes.

De plus amples études sont donc nécessaires afin de préciser la sensibilité du traceur RAFT-RGD dans l'évaluation de l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  *in vivo*. La forte rétention rénale du composé marqué au technétium-99m ou à l'indium-111 pourrait être un facteur limitant lors de l'imagerie non-invasive des tumeurs solides dans les services de médecine nucléaire : des dérivés de la molécule permettraient peut-être d'accélérer l'élimination du composé, condition sans doute nécessaire lors d'approches radiothérapeutiques.



**Références**

**Bibliographiques**



## Références Bibliographiques

### Sites internet :

[www.ligue-cancer.net](http://www.ligue-cancer.net)

[www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport\\_cancer\\_2003/](http://www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport_cancer_2003/)

[http://edumed.unige.ch/apprentissage/module1/cvc/apprentissage/probleme/pb1\\_resume/angionenese.html](http://edumed.unige.ch/apprentissage/module1/cvc/apprentissage/probleme/pb1_resume/angionenese.html)

<http://www.nci.nih.gov/clinicaltrials>

**Abedi H.** and Zachary I. "Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells." J Biol Chem **1997**, 272(24): 15442-51.

**Albelda S. M.,** Mette S. A., Elder, D. E., Stewart R., Damjanovich L., Herlyn M., Buck C. A. "Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression." Cancer Res **1990**, 50(20): 6757-64.

**Asahara T.,** Bauters C., Zheng L. P., Takeshita S., Bunting S., Ferrara N., Symes J. F., Isner J. M. "Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo." Circulation **1995**, 92(9 Suppl): II365-71.

**Bamias A.** and Dimopoulos M. A. "Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy." Eur J Intern Med **2003**, 14(8): 459-469.

**Bayless K. J.,** Salazar R., Davis G. E. "RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins." Am J Pathol **2000**, 156(5): 1673-83.

**Beer A. J.,** Haubner R., Goebel M., Luderschmidt S., Spilker M. E., Wester H-J., Weber W. A., Schwaiger M. "Biodistribution and pharmacokinetics of the alphavbeta3-selective tracer 18F-galacto-RGD in cancer patients." J Nucl Med **2005**; 46(8): 1333-41.

**Beerepoot L. V.,** Mehra N., Vermaat J. S., Zonnenberg B. A., Gebbink M. F., Voest E. E. "Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients." Ann Oncol **2004**, 15(1): 139-45.

## Références Bibliographiques

**Bello** L., Francolini M., Marthyn P., Zhang J., Carroll R. S., Nikas D. C., Strasser J. F., Villani R., Cheresch D. A., Black P. M. "Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery." Neurosurgery **2001**, 49(2): 380-9; discussion 390.

**Benjamin** L. E., Hemo I Keshet E. "A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF." Development **1998**, 125(9): 1591-8.

**Bhattacharya** S., Fu C., Bhattacharya J., Greenberg S. "Soluble ligands of the alpha v beta 3 integrin mediate enhanced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in adherent bovine pulmonary artery endothelial cells." J Biol Chem **1995**, 270(28): 16781-7.

**Bocci** G., Francia G., Man S., Lawler J., Kerbel R. S. "Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A **2003**, 100(22): 12917-22.

**Boehm** T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M. "Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance." Nature **1997**, 390(6658): 404-7.

**Boturyn** D., Coll J. L., Garanger E., Favrot M. C., Dumy P. "Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis." J Am Chem Soc **2004**, 126(18): 5730-9.

**Bredow** S., Lewin M., Hofmann B., Marecos E., Weissleder R. "Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin." Eur J Cancer **2000**, 36(5): 675-81.

**Bremer** C., Tung C. H., Weissleder R. "In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition." Nat Med **2001**, 7(6): 743-8.

**Bretscher** M. S. "Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells." EMBO J **1989**, 8(5): 1341-8.

**Bretscher** M. S. "Moving membrane up to the front of migrating cells." Cell **1996**, 85(4): 465-7.

**Brock** C. S. and Lee S. M. "Anti-angiogenic strategies and vascular targeting in the treatment of lung cancer." Eur Respir J **2002**, 19(3): 557-70.

**Brooks** P. C., Clark R. A., Cheresch D. A. "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." Science **1994**, 264(5158): 569-71.

**Brooks<sup>b</sup>** P. C., Montgomery A. M., Rosenfeld M., Reisfeld R. A., Hu T., Klier G., Cheresch D. A. "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." Cell **1994**, 79(7): 1157-64.

## Références Bibliographiques

**Brooks P. C.**, Stromblad S., Klemke R., Visscher D., Sarkar F. H., Cheresch D. A. "Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin." J Clin Invest **1995**, 96(4): 1815-22.

**Brooks P. C.** "Role of integrins in angiogenesis." Eur J Cancer **1996**, 32A(14): 2423-9.

**Burke P. A.**, DeNardo S. J., Miers L. A., Lamborn K. R., Matzku S., DeNardo, G. L. "Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts." Cancer Res **2002**, 62(15): 4263-72.

**Carmeliet P.**, Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compernelle V., De Mol M., Wu Y., Bono F., Devy L., Beck H., Scholz D., Acker T., DiPalma T., Dewerchin M., Noel A., Stalmans I., Barra A., Blacher S., Vandendriessche T., Ponten A., Eriksson U., Plate K. H., Foidart J. M., Schaper W., Charnock-Jones D. S., Hicklin D. J., Herbert J. M., Collen D., Persico M. G. "Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions." Nat Med **2001**, 7(5): 575-83.

**Carmeliet P.** "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **2003**, 9(6): 653-60.

**Castel S.**, Pagan R., Garcia R., Casaroli-Marano R. P., Reina M., Mitjans F., Piulats J., Vilaro S. "Alpha v integrin antagonists induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells." Eur J Cell Biol **2000**, 79(7): 502-12.

**Castel S.**, Pagan R., Mitjans F., Piulats J., Goodman S., Jonczyk A., Huber F., Vilaro S., Reina M. "RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of alpha(v)-integrin, enter the cells by independent endocytic pathways." Lab Invest **2001**, 81(12): 1615-26.

**Chang Z.**, Choon A., Friedl A. "Endostatin binds to blood vessels in situ independent of heparan sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2 binding." Am J Pathol **1999**, 155(1): 71-6.

**Chatterjee S.**, Brite K. H., Matsumura A. "Induction of apoptosis of integrin-expressing human prostate cancer cells by cyclic Arg-Gly-Asp peptides." Clin Cancer Res **2001**, 7(10): 3006-11.

**Chattopadhyay N.**, Mitra A., Frei E., Chatterjee A. "Human cervical tumor cell (SiHa) surface alphavbeta3 integrin receptor has associated matrix metalloproteinase (MMP-2) activity." J Cancer Res Clin Oncol **2001**, 127(11): 653-8.

**Chattopadhyay<sup>b</sup> N.** and Chatterjee A. "Studies on the expression of alpha(v)beta3 integrin receptors in non-malignant and malignant human cervical tumor tissues." J Exp Clin Cancer Res **2001**, 20(2): 269-75.

**Chen Y. X.**, Xu X. M., Hong S. G., Chen J. G., Liu N. F., Underhill C. B., Creswell K., Zhang L. R. "RGD-tachyplesin inhibits tumor growth." Cancer Res **2001**, 61(6): 2434-2438.

## Références Bibliographiques

**Chen X.**, Tohme M., Park R., Hou Y., Bading J. R., Conti P. S. "Micro-PET imaging of alphavbeta3-integrin expression with 18F-labeled dimeric RGD peptide." Mol Imaging **2004**, 3(2): 96-104.

**Chen<sup>b</sup> X.**, Park R., Hou Y., Khankaldyyan V., Gonzales-Gomez I., Tohme M., Bading J. R., Laug W. E., Conti P. S. "MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with 18F-labeled PEGylated RGD peptide." Eur J Nucl Med Mol Imaging **2004**, 31(8): 1081-9.

**Chen<sup>c</sup> X.**, Park R., Shahinian A. H., Bading J. R., Conti P. S. "Pharmacokinetics and tumor retention of (125)I-labeled RGD peptide are improved by PEGylation." Nucl Med Biol **2004**, 31(1): 11-9.

**Chen<sup>d</sup> X.**, Park R., Tohme M., Shahinian A. H., Bading J. R., Conti P. S. "MicroPET and Autoradiographic Imaging of Breast Cancer alpha(v)-Integrin Expression Using (18)F- and (64)Cu-Labeled RGD Peptide." Bioconjug Chem **2004**, 15(1): 41-9.

**Chen<sup>e</sup> X.**, Park R., Shahinian A. H., Tohme M., Khankaldyyan V., Bozorgzadeh M. H., Bading J. R., Moats R., Laug W. E., Conti P. S. "18F-labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis." Nucl Med Biol **2004**, 31(2): 179-89.

**Chen X.**, Sievers E., Hou Y., Park R., Tohme M., Bart R., Bremner R., Bading J. R., Conti P. S. "Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer." Neoplasia **2005**, 7(3): 271-9.

**Chen X.**, Park R., Khankaldyyan V., Gonzales-Gomez I., Tohme M., Moats R. A., Bading J. R., Laug W. E., Conti P. S. "Longitudinal MicroPET Imaging of Brain Tumor Growth with F-18-labeled RGD Peptide." Mol Imaging Biol **2006**, 8(1): 9-15.

**Cheresh D. A.**, Pytela R., Pierschbacher M. D., Klier F. G., Ruoslahti E., Reisfeld R. A. "An Arg-Gly-Asp-directed receptor on the surface of human melanoma cells exists in a divalent cation-dependent functional complex with the disialoganglioside GD2." J Cell Biol **1987**, 105(3): 1163-73.

**Cheresh D. A.** "Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion." Clin Lab Med **1992**, 12(2): 217-36.

**Citrin D.**, Scott T., Sproull M., Menard C., Tofilon P. J., Camphausen K. "In vivo tumor imaging using a near-infrared-labeled endostatin molecule." Int J Radiat Oncol Biol Phys **2004**, 58(2): 536-41.

**Clark E. A.** and Brugge J. S. "Integrins and signal transduction pathways: the road taken." Science **1995**, 268(5208): 233-9.

**Clezardin P.** "Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis." Cell Mol Life Sci **1998**, 54(6): 541-8.

**Conforti G.**, Dominguez-Jimenez C., Zanetti A., Gimbrone M. A., Jr., Cremona O., Marchisio P. C., Dejana E. "Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane." Blood **1992**, 80(2): 437-46.

## Références Bibliographiques

**Costouros** N. G., Diehn F. E., Libutti S. K. "Molecular imaging of tumor angiogenesis." J Cell Biochem Suppl **2002**, 39: 72-8.

**Cowden Dahl** K. D., Robertson S. E., Weaver V. M., Simon M. C. "Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression." Mol Biol Cell **2005**, 16(4): 1901-12.

**Cox** D., Aoki T., Seki J., Motoyama Y., Yoshida K. "The pharmacology of the integrins." Med Res Rev **1994**, 14(2): 195-228.

**Cristofanilli** M., Charnsangavej C., Hortobagyi G. N. "Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches." Nat Rev Drug Discov **2002**, 1(6): 415-26.

**Dafni** H., Israely T., Bhujwala Z. M., Benjamin L. E., Neeman M. "Overexpression of vascular endothelial growth factor 165 drives peritumor interstitial convection and induces lymphatic drain: magnetic resonance imaging, confocal microscopy, and histological tracking of triple-labeled albumin." Cancer Res **2002**, 62(22): 6731-9.

**Dejana** E. "Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis." J Clin Invest **1996**, 98(9): 1949-53.

**Dhanabal** M., Ramchandran R., Volk R., Stillman I. E., Lombardo M., Iruela-Arispe M. L., Simons M., Sukhatme V. P. "Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma." Cancer Res **1999**, 59(1): 189-97.

**Dono** R., Texido G., Dussel R., Ehmke H., Zeller R. "Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice." Embo J **1998**, 17(15): 4213-25.

**Drake** C. J. "Embryonic and adult vasculogenesis." Birth Defects Res C Embryo Today **2003**, 69(1): 73-82.

**Eliceiri** B. P. and Cheresh D. A. "Role of alpha v integrins during angiogenesis." Cancer J **2000**, 6 Suppl 3: S245-9.

**Eliceiri** B. P. "Integrin and growth factor receptor crosstalk." Circ Res **2001**, 89(12): 1104-10.

**Eliceiri**<sup>b</sup> B. P. and Cheresh D. A. "Adhesion events in angiogenesis." Curr Opin Cell Biol **2001**, 13(5): 563-8.

**Engleman** V. W., Nickols G. A., Ross F. P., Horton M. A., Griggs D. W., Settle S. L., Ruminski P. G., Teitelbaum S. L. "A peptidomimetic antagonist of the alpha(v)beta3 integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo." J Clin Invest **1997**, 99(9): 2284-92.

**Eskens** F. A., Dumez H., Hoekstra R., Perschl A., Brindley C., Bottcher S., Wynendaele W., Dreys J., Verweij J., van Oosterom A. T. "Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of

## Références Bibliographiques

Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 in patients with advanced solid tumours." Eur J Cancer **2003**, 39(7): 917-26.

**Eskens F. A.** "Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going?" Br J Cancer **2004**, 90(1): 1-7.

**Evan G. I.** and Vousden K. H. "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer." Nature **2001**, 411(6835): 342-8.

**Fani M.**, Psimadas D., Zikos C., Xanthopoulos S., Loudos G. K., Bouziotis P., Varvarigou A. D. "Comparative evaluation of linear and cyclic 99mTc-RGD peptides for targeting of integrins in tumor angiogenesis." Anticancer Res **2006**, 26(1A): 431-4.

**Feige J. J.** and Bailly S. "[Molecular bases of angiogenesis]." Bull Acad Natl Med **2000**, 184(3): 537-44; discussion 544-5.

**Felding-Habermann B.**, Mueller B. M., Romerdahl C. A., Cheresch D. A. "Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity." J Clin Invest **1992**, 89(6): 2018-22.

**Felding-Habermann B.**, Fransvea E., O'Toole T. E., Manzuk L., Faha B., Hensler M. "Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells." Clin Exp Metastasis **2002**, 19(5): 427-36.

**Ferrara N.** and Henzel W. J. "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **1989**, 161(2): 851-8.

**Ferrara N.**, Gerber H. P., LeCouter J. "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **2003**, 9(6): 669-76.

**Fleming J. B.** and Brekken R. A. "Functional imaging of angiogenesis in an orthotopic model of pancreatic cancer." J Cell Biochem **2003**, 90(3): 492-501.

**Folkman J.** "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **1971**, 285(21): 1182-6.

**Folkman J.** "What is the role of endothelial cells in angiogenesis?" Lab Invest **1984**, 51(6): 601-4.

**Folkman J.** "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?" J Natl Cancer Inst **1990**, 82(1): 4-6.

**Folkman J.** "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1995**, 1(1): 27-31.

**Fons P.**, Malavaud B., Venat L., Plouet J. "[Anti-angiogenesis strategies in cancer]." Bull Acad Natl Med **2000**, 184(3): 579-86; discussion 586-7.

## Références Bibliographiques

**Fonsatti E.**, Jekunen A.P., Kairemo K. J., Coral S., Snellman M., Nicotra M. R., Natali P. G., Altomonte M., Maio M. "Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model." Clin Cancer Res **2000**, 6(5): 2037-43.

**Friedlander M.**, Brooks P. C., Shaffer R. W., Kincaid C. M., Varner J. A., Cheresh D. A. "Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins." Science **1995**, 270(5241): 1500-2.

**Gao B.**, Saba T. M., Tsan M. F. "Role of alpha(v) beta(3)-integrin in TNF-alpha-induced endothelial cell migration." Am J Physiol Cell Physiol **2002**, 283(4):C1196-205.

**Garanger E.**, Boturyn D., Jin Z., Dumy P., Favrot M. C., Coll J. L. "New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors." Mol Ther **2005**, 12(6): 1168-75.

**Garanger<sup>b</sup> E.** "Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie" Thèse présentée à l'université Joseph Fourier, Grenoble I, **2005**.

**Gasparini G.**, Brooks P. C., Biganzoli E., Vermeulen P. B., Bonoldi E., Dirix L. Y., Ranieri G., Miceli R., Cheresh D. A. "Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer." Clin Cancer Res **1998**, 4(11): 2625-34.

**Gasparini G.** "Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer." Oncologist **2000**, 5 Suppl 1: 37-44.

**Gawaz M.**, Besta F., Ylanne J., Knorr T., Dierks H, Bohm T., Kolanus W. " The NITY motif of the beta-chain cytoplasmic domain is involved in stimulated internalization of the beta3 integrin A isoform." J Cell Sci **2001**, 114(Pt 6): 1101-13.

**Gehlsen K. R.**, Argraves W. S., Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. "Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides." J Cell Biol **1988**, 106(3): 925-30.

**George E. L.**, Georges-Labouesse E. N., Patel-King R. S., Rayburn H., Hynes R. O. "Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin." Development **1993**, 119(4): 1079-91.

**Giancotti F. G.** and Ruoslahti E. "Integrin signaling." Science **1999**, 285(5430): 1028-32.

**Gloe T.**, Sohn H. Y., Meininger G. A., Pohl U. "Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3." J Biol Chem **2002**, 277(26): 23453-8.

**Goldenberg D. M.**, Sharkey R. M., Paganelli G., Barbet J., Chatal J. F. "Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy." J Clin Oncol **2006**, 24(5): 823-34.

## Références Bibliographiques

**Guo W.** and Giancotti F. G. "Integrin signalling during tumour progression." Nat Rev Mol Cell Biol **2004**, 5(10): 816-26.

**Gutheil J. C.**, Campbell T. N., Pierce P. R., Watkins J. D., Huse W. D., Bodkin D. J., Cheresch D. A. "Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3." Clin Cancer Res **2000**, 6(8): 3056-61.

**Hanahan D.** and Folkman J. "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **1996**, 86(3): 353-64.

**Hanahan D.** and Weinberg R. A. "The hallmarks of cancer." Cell **2000**, 100(1): 57-70.

**Harris T. D.**, 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 Biother Radiopharm **2003**, 18(4): 627-41.

**Hasan J.**, Byers R., Jayson G. C. "Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours." Br J Cancer **2002**, 86(10): 1566-77.

**Hata K.** and Miyazaki K. "Color Doppler imaging and angiogenesis in ovarian tumors." Med Electron Microsc **2003**, 36(3): 127-30.

**Haubner R.**, Wester H. J., Reuning U., Senekowitsch-Schmidtke R., Diefenbach B., Kessler H., Stocklin G., Schwaiger M. "Radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin antagonists: A new class of tracers for tumor targeting." J Nucl Med **1999**, 40(6): 1061-1071.

**Haubner R.**, Wester H. J., Weber W. A., Mang C., Ziegler S. I., Goodman S. L., Senekowitsch-Schmidtke R., Kessler H., Schwaiger M. "Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography." Cancer Res **2001**, 61(5): 1781-5.

**Haubner R.**, Bruchertseifer F., Bock M., Kessler H., Schwaiger M., Wester H. J. "Synthesis and biological evaluation of a (99m)Tc-labelled cyclic RGD peptide for imaging the alphavbeta3 expression." Nuklearmedizin **2004**, 43(1): 26-32.

**Haubner R.**, Weber W. A., Beer A. J., Vabuliene E., Reim D., Sarbia M., Becker K. F., Goebel M., Hein R., Wester H. J., Kessler H., Schwaiger M. "Noninvasive visualization of the activated alphavbeta3 integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F]Galacto-RGD." PLoS Med **2005**, 2(3): e70.

**Hayman E. G.**, Pierschbacher M. D., Ruoslahti E. "Detachment of cells from culture substrate by soluble fibronectin peptides." J Cell Biol **1985**, 100(6): 1948-54.

**Holash J.**, Wiegand S. J., Yancopoulos G. D. "New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF." Oncogene **1999**, 18(38): 5356-62.

## Références Bibliographiques

**Hood** J. D., Bednarski M., Frausto R., Guccione S., Reifeld R. A., Xiang R., Cheresch, D. A. "Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature." Science **2002**, 296(5577): 2404-7.

**Humphries** M. J. "Insights into integrin-ligand binding and activation from the first crystal structure." Arthritis Res **2002**, 4 Suppl 3: S69-78.

**Hurwitz** H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F. "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **2004**, 350(23): 2335-42.

**Hynes** R. O. "A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis." Nat Med **2002**, 8(9): 918-21.

**Iivanainen** E., Kahari V. M., Heino J., Elenius K. "Endothelial cell-matrix interactions." Microsc Res Tech **2003**, 60(1): 13-22.

**Inai** T., Mancuso M., Hashizume H., Baffert F., Haskell A., Baluk P., Hu-Lowe D. D., Shalinsky D. R., Thurston G., Yancopoulos G. D., McDonald D. M. "Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts." Am J Pathol **2004**, 165(1): 35-52.

**Ingber** D., Fujita T., Kishimoto S., Sudo K., Kanamaru T., Brem H., Folkman J. "Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth." Nature **1990**, 348(6301): 555-7.

**Iordanescu** I., Becker C., Zetter B., Dunning P., Taylor G. A. "Tumor vascularity: evaluation in a murine model with contrast-enhanced color Doppler US effect of angiogenesis inhibitors." Radiology **2002**, 222(2): 460-7.

**Jain** R. K. and Munn L. L. "Leaky vessels? Call Ang1!" Nat Med **2000**, 6(2): 131-2.

**Jain** R. K. "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **2003**, 9(6): 685-93.

**Janssen** M. L., Oyen W. J., Dijkgraaf I., Massuger L. F., Frielink C., Edwards D. S., Rajopadhye M., Boonstra H., Corstens F. H., Boerman O. C. "Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model." Cancer Res **2002**, 62(21): 6146-51.

**Janssen**<sup>b</sup> M., Oyen W. J., Massuger L. F., Frielink C., Dijkgraaf I., Edwards D. S., Radjopadhye M., Corstens F. H., Boerman O. C. "Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting." Cancer Biother Radiopharm **2002**, 17(6): 641-6.

**Jayson** G. C., Zweit J., Jackson A., Mulatero C., Julyan P., Ranson M., Broughton L., Wagstaff J., Hakansson L., Groenewegen G., Bailey J., Smith N., Hastings D., Lawrance J., Haroon H., Ward T., McGown A. T., Tang M., Levitt D., Marreaud S., Lehmann F. F., Herold M., Zwierzina H. "Molecular imaging and biological evaluation

## Références Bibliographiques

of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies." J Natl Cancer Inst **2002**, 94(19): 1484-93.

**Jekunen A.** and Kairemo K. "Inhibition of angiogenesis at endothelial cell level." Microsc Res Tech **2003**, 60(1): 85-97.

**Jin H.** and Varner J. "Integrins: roles in cancer development and as treatment targets." Br J Cancer **2004**, 90(3): 561-5.

**Joensuu H.** and Dimitrijevic S. "Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours." Ann Med **2001**, 33(7): 451-5.

**John A.** and Tuszynski G. "The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis." Pathol Oncol Res **2001**, 7(1): 14-23.

**Jouanneau E.** and Bachelot T. "[Cerebral tumors and neoangiogenesis]." Neurochirurgie **1999**, 45(4): 293-300.

**Kawaguchi M.,** Hosotani R., Ohishi S., Fujii N., Tulachan S. S., Koizumi M., Toyoda E., Masui T., Nakajima S., Tsuji S., Ida J., Fujimoto K., Wada M., Doi R., Imamura M. "A novel synthetic Arg-Gly-Asp-containing peptide cyclo(-RGDf==V-) is the potent inhibitor of angiogenesis." Biochem Biophys Res Commun **2001**, 288(3): 711-7.

**Kerr J. S.,** Slee A. M., Mousa S. A. "Small molecule alpha(v) integrin antagonists: novel anticancer agents." Expert Opin Investig Drugs **2000**, 9(6): 1271-9.

**Kerbel R.** and Folkman J. "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." Nat Rev Cancer **2002**, 2(10): 727-39.

**Kiessling F.,** Greschus S., Lichy M. P., Bock M., Fink C., Vosseler S., Moll J., Mueller M. M., Fusenig N. E., Traupe H., Semmler W. "Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for noninvasive, high-resolution monitoring of tumor angiogenesis." Nat Med **2004**, 10(10): 1133-8.

**Kilic T.,** Alberta J. A., Zdunek P. R., Acar M., Iannarelli P., O'Reilly T., Buchdunger E., Black P. M., Stiles C. D. "Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class." Cancer Res **2000**, 60(18): 5143-50.

**Kim K. J.,** Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H. S., Ferrara N. "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo." Nature **1993**, 362(6423): 841-4.

**Knighton D. R.,** Phillips G. D., Fiegel V. D. "Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by basic fibroblast growth factor." J Trauma **1990**, 30(12 Suppl): S134-44.

**Koizumi K.,** Tsutsumi Y., Kamada H., Yoshioka Y., Watanabe M., Yamamoto Y., Okamoto T., Mukai Y., Nakagawa S., Tani Y., Mayumi T. "Incorporation of adult organ-derived endothelial cells into tumor blood vessel." Biochem Biophys Res Commun **2003**, 306(1): 219-24.

## Références Bibliographiques

**Kumar C. C.** "Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis." Curr Drug Targets **2003**, 4(2): 123-31.

**Laird A. D., Vajkoczy P., Shawver L. K., Thurnher A., Liang C., Mohammadi M., Schlessinger J., Ullrich A., Hubbard S. R., Blake R. A., Fong T. A., Strawn L. M., Sun L., Tang C., Hawtin R., Tang F., Shenoy N., Hirth K. P., McMahon G., Cherrington** "SU6668 is a potent antiangiogenic and anti-tumor agent that induces regression of established tumors." Cancer Res **2000**, 60(15): 4152-60.

**Lauffenburger D. A. and Horwitz A. F.** "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **1996**, 84(3): 359-69.

**Lee K. H., Jung K. H., Song S. H., Kim D. H., Lee B. C., Sung H. J., Han Y. M., Choe Y. S., Chi D. Y., Kim B. T.** "Radiolabeled RGD uptake and alphav integrin expression is enhanced in ischemic murine hindlimbs." J Nucl Med **2005**, 46(3): 472-8.

**Lelongt B., Ronco P., Piedagnel R.** "Métalloprotéases matricielles : infidélités à la matrice extracellulaire." Med Sciences **2002**, 18(5): 519-21.

**Li X., Regezi J., Ross F. P., Blystone S., Ilic D., Leong S. P., Ramos D. M.** "Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro." J Cell Sci **2001**, 114(Pt 14): 2665-72.

**Li S., Peck-Radosavljevic M., Kienast O., Preitfellner J., Havlik E., Schima W., Traub-Weidinger T., Graf S., Beheshti M., Schmid M., Angelberger P., Dudczak R.** "Iodine-123-vascular endothelial growth factor-165 (123I-VEGF165). Biodistribution, safety and radiation dosimetry in patients with pancreatic carcinoma." Q J Nucl Med Mol Imaging **2004**, 48(3): 198-206.

**Liekens S., De Clercq E., Neyts J.** "Angiogenesis: regulators and clinical applications." Biochem Pharmacol **2001**, 61(3): 253-70.

**Line B. R., Mitra A., Nan A., Ghandehari H.** "Targeting tumor angiogenesis: comparison of peptide and polymer-peptide conjugates." J Nucl Med **2005**, 46(9): 1552-60.

**Liu Z. J., Snyder R., Soma A., Shirakawa T., Ziober B. L., Fairman R. M., Herlyn M., Velazquez O. C.** "VEGF-A and alphaVbeta3 integrin synergistically rescue angiogenesis via N-Ras and PI3-K signaling in human microvascular endothelial cells." Faseb J **2003**, 17(13): 1931-3.

**Maehara N.** "Experimental microcomputed tomography study of the 3D microangioarchitecture of tumors." Eur Radiol **2003**, 13(7): 1559-65.

**Massia S. P. and Hubbell J. A.** "An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation." J Cell Biol **1991**, 114(5): 1089-100.

**Mattot V. and Vandebunder B.** "[New inhibitors of tumor angiogenesis]." Bull Cancer **1997**, 84(4): 447-50.

## Références Bibliographiques

**Mauro M. J.** and **Druker B. J.** "STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML." Oncologist **2001**, 6(3): 233-8.

**Max R.**, **Gerritsen R. R.**, **Nooijen P. T.**, **Goodman S. L.**, **Sutter A.**, **Keilholz U.**, **Ruiter D. J.**, **De Waal R. M.** "Immunohistochemical analysis of integrin alphav beta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas." Int J Cancer **1997**, 71(3): 320-4.

**McHugh K. P.**, **Hodivala-Dilke K.**, **Zheng M. H.**, **Namba N.**, **Lam J.**, **Novack D.**, **Feng X.**, **Ross F. P.**, **Hynes R. O.**, **Teitelbaum S. L.** "Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts." J Clin Invest **2000**, 105(4): 433-40.

**McQuade P.** and **Knight L. C.** "Radiopharmaceuticals for targeting the angiogenesis marker alpha(v)beta(3)." Q J Nucl Med **2003**, 47(3): 209-20.

**Meitar D.**, **Crawford S. E.**, **Rademaker A. W.**, **Cohn S. L.** "Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma." J Clin Oncol **1996**, 14(2): 405-14.

**Mitjans F.**, **Meyer T.**, **Fittschen C.**, **Goodman S.**, **Jonczyk A.**, **Marshall J. F.**, **Reyes G.**, **Piulats J.** "In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins." Int J Cancer **2000**, 87(5): 716-23.

**Mitra A.**, **Mulholland J.**, **Nan A.**, **McNeill E.**, **Ghandehari H.**, **Line B. R.** "Targeting tumor angiogenic vasculature using polymer-RGD conjugates." J Control Release **2005**, 102(1): 191-201.

**Miyamoto S.**, **Akiyama S. K.**, **Yamada K. M.** "Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function." Science **1995**, 267(5199): 883-5.

**Moeller B. J.**, **Cao Y.**, **Vujaskovic Z.**, **Li C. Y.**, **Haroon Z. A.**, **Dewhirst M. W.** "The relationship between hypoxia and angiogenesis." Semin Radiat Oncol **2004**, 14(3): 215-21.

**Montgomery A. M.**, **Reisfeld R. A.**, **Cheresh D. A.** "Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen." Proc Natl Acad Sci U S A **1994**, 91(19): 8856-60.

**Natali P. G.**, **Hamby C. V.**, **Felding-Habermann B.**, **Liang B.**, **Nicotra M. R.**, **Di Filippo F.**, **Giannarelli D.**, **Temponi M.**, **Ferrone S.** "Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions." Cancer Res **1997**, 57(8): 1554-60.

**Nemerow G. R.** and **Stewart P. L.** "Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery." Microbiol Mol Biol Rev **1999**, 63(3): 725-34.

**Nicosia R. F.** and **Bonanno E.** "Inhibition of angiogenesis in vitro by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptide." Am J Pathol **1991**, 138(4): 829-33.

## Références Bibliographiques

**Nip J.**, Shibata H., Loskutoff D. J., Cheresch D. A., Brodt P. "Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin alpha v beta 3 to adhere to lymph node vitronectin." J Clin Invest **1992**, 90(4): 1406-13.

**Ogawa M.**, Hatano K., Oishi S., Kawasumi Y., Fujii N., Kawaguchi M., Doi R., Imamura M., Yamamoto M., Ajito K., Mukai T., Saji H., Ito K. "Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo alpha(v)beta3 integrin related tumor imaging." Nucl Med Biol **2003**, 30(1): 1-9.

**Okroj M.**, Dobrzanska-Paprocka Z., Rolka K., Bigda J. "In vitro and in vivo analyses of the biological activity of RGD peptides towards Ab Bomirski melanoma." Cell Mol Biol Lett **2003**, 8(4): 873-84.

**O'Reilly M. S.**, Holmgren L., Chen C., Folkman J. "Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice." Nat Med **1996**, 2(6): 689-92.

**O'Reilly M. S.**, Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W. S., Flynn E., Birkhead J. R., Olsen, B. R., Folkman J. "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." Cell **1997**, 88(2): 277-85.

**Panetti T. S.** and McKeown-Longo P. J. "The alpha v beta 5 integrin receptor regulates receptor-mediated endocytosis of vitronectin." J Biol Chem **1993**, 268(16): 11492-5.

**Pardanaud L.**, Moyon D., Eichmann A. "L'embryologie des vaisseaux." Med Sciences **2001**, 17(5): 543-51.

**Paul S** and Regulier E. "[Molecular basis of oncogenesis]" Ann Biol Clin **2001**, 59(4):393-402.

**Pavlov N.** and Badet J. "[Angiogenin: involvement in angiogenesis and tumour growth]." Bull Cancer **2001**, 88(8): 725-32.

**Petitclerc E.**, Stromblad S., von Schalscha T. L., Mitjans F., Piulats J., Montgomery A. M., Cheresch D. A., Brooks P. C. "Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival." Cancer Res **1999**, 59(11): 2724-30.

**Pichler B. J.**, Kneilling M., Haubner R., Braumuller H., Schwaiger M., Rocken M., Weber W. A. "Imaging of delayed-type hypersensitivity reaction by PET and 18F-galacto-RGD." J Nucl Med **2005**, 46(1): 184-9.

**Pierschbacher M.**, Hayman E. G., Ruoslahti E. "Synthetic peptide with cell attachment activity of fibronectin." Proc Natl Acad Sci U S A **1983**, 80(5): 1224-7.

**Pierschbacher M. D.** and Ruoslahti E. "Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity." Proc Natl Acad Sci U S A **1984**, 81(19): 5985-8.

## Références Bibliographiques

**Posey** J. A., Khazaeli M. B., DelGrosso A., Saleh M. N., Lin C. Y., Huse W., LoBuglio A. F. "A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer." Cancer Biother Radiopharm **2001**, 16(2): 125-32.

**Pugh** C. W. and Ratcliffe P. J. "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system." Nat Med **2003**, 9(6): 677-84.

**Rafii** S., Lyden D., Benezra R., Hattori K., Heissig B. "Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?" Nat Rev Cancer **2002**, 2(11): 826-35.

**Raguse** J-D., Gath H. J., Bier J., Riess H., Oettle H. "Cilengitide (EMD 121974) arrests the growth of a heavily pretreated highly vascularised head and neck tumour." Oral Oncol **2004**, 40(2): 228-30.

**Retta** S. F., Cassara G., D'Amato M., Alessandro R., Pellegrino M., Degani S., De Leo G., Silengo L., Tarone G. "Cross talk between beta(1) and alpha(V) integrins: beta(1) affects beta(3) mRNA stability." Mol Biol Cell **2001**, 12(10): 3126-38.

**Reynolds** L. E., Wyder L., Lively J. C., Taverna D., Robinson S. D., Huang X., Sheppard D., Hynes R. O., Hodivala-Dilke K. M. "Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins." Nat Med **2002**, 8(1): 27-34.

**Ribatti** D. "The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis." J Cell Mol Med **2004**, 8(3): 294-300.

**Risau** W. and Flamme I. "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **1995**, 11: 73-91.

**Risau** W. "Mechanisms of angiogenesis." Nature **1997**, 386(6626): 671-4.

**Roberts** R. L. and Lin P. C. "Structural and functional optical imaging of angiogenesis in animal models." Methods Enzymol **2004**, 386: 105-22.

**Robinson** S. D., Reynolds L. E., Wyder L., Hicklin D. J., Hodivala-Dilke K. M. "Beta3-integrin regulates vascular endothelial growth factor-A-dependent permeability." Arterioscler Thromb Vasc Biol **2004**, 24(11): 2108-14.

**Romanov** V. I. and Goligorsky M. S. "RGD-recognizing integrins mediate interactions of human prostate carcinoma cells with endothelial cells in vitro." Prostate **1999**, 39(2): 108-18.

**Rovensky** Y. A. "Cellular and molecular mechanisms of tumor invasion." Biochemistry (Mosc) **1998**, 63(9): 1029-43.

**Rüegg** C. "Une nouvelle cible pour la thérapeutique anticancéreuse : la vascularisation tumorale." Forum Med Suisse **2002**, 14: 317-323.

## Références Bibliographiques

**Rüegg C.** and Mariotti A. "Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis." Cell Mol Life Sci **2003**, 60(6): 1135-57.

**Ruoslahti E.**, Noble N. A., Kagami S., Border W. A. "Integrins." Kidney International **1994**, 45(Suppl 44): S17-S22.

**Ruoslahti E.** "Fibronectin and its integrin receptors in cancer." Adv Cancer Res **1999**, 76: 1-20.

**Rupp P. A.**, Czirok A., Little C. D. "alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> integrin-dependent endothelial cell dynamics in vivo." Development **2004**, 131(12): 2887-97.

**Sablina A. A.**, Chumakov P. M., Levine A. J., Kopnin B. P. "p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling." Oncogene **2001**, 20(8): 899-909.

**Santimaria M.**, Moscatelli G., Viale G. L., Giovannoni L., Neri G., Viti F., Leprini A., Borsi L., Castellani P., Zardi L., Neri D., Riva P. "Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer." Clin Cancer Res **2003**, 9(2): 571-9.

**Savona C.**, Javerzat S., Perollet C., Bikfalvi A. "[Angiogenesis and neoangiogenesis]." Rev Prat **1997**, 47(20): 2239-43.

**Scappaticci F. A.** "Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies." J Clin Oncol **2002**, 20(18): 3906-27.

**Scatena M.** and Giachelli C. "The alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis." Trends Cardiovasc Med **2002**, 12(2): 83-8.

**Schirner M.**, Menrad A., Stephens A., Frenzel T., Hauff P., Licha K. "Molecular imaging of tumor angiogenesis." Ann N Y Acad Sci **2004**, 1014: 67-75.

**Schoenwaelder S. M.** and Burridge K. "Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins." Curr Opin Cell Biol **1999**, 11(2): 274-86.

**Schraa A. J.**, Kok R. J., Berendsen A. D., Moorlag H. E., Bos E. J., Meijer D. K., de Leij L. F., Molema G. "Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting." J Control Release **2002**, 83(2): 241-51.

**Schwartz M. A.** and Assoian R. K. "Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways." J Cell Sci **2001**, 114(Pt 14): 2553-60.

**Shaheen R. M.**, Davis D. W., Liu W., Zebrowski B. K., Wilson M. R., Bucana C. D., McConkey D. J., McMahon G., Ellis L. M. "Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the

## Références Bibliographiques

growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis." Cancer Res **1999**, 59(21): 5412-6.

**Shattil** S. J. "Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology." Thromb Haemost **1995**, 74(1): 149-55.

**Shen** X., Falzon M. "Parathyroid hormone-related protein upregulates integrin expression via an intracrine pathway in PC-3 prostate cancer cells" Regul peptides **2003**, 113(1-3): 17-29.

**Shimaoka** M. and Springer T. A. "Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function." Nat Rev Drug Discov **2003**, 2(9): 703-16.

**Sipkins** D. A., Cheresh D. A., Kazemi M. R., Nevin L. M., Bednarski M. D., Li K. C. "Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging." Nat Med **1998**, 4(5): 623-6.

**Stacker** S. A., Achen M. G., Jussila L., Baldwin M. E., Alitalo K. "Lymphangiogenesis and cancer metastasis." Nat Rev Cancer **2002**, 2(8): 573-83.

**Stopeck** A., Sheldon M., Vahedian M., Cropp G., Gosalia R., Hannah A. "Results of a Phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies." Clin Cancer Res **2002**, 8(9): 2798-805.

**Stromblad** S., Becker J. C., Yebra M., Brooks P. C., Cheresh D. A. "Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis." J Clin Invest **1996**, 98(2): 426-33.

**Stupack** D. G., Puente X. S., Boutsaboualoy S., Storgard C. M., Cheresh D. A. "Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins." J Cell Biol **2001**, 155(3): 459-70.

**Stupack** D. G. and Cheresh D. A. "Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival." J Cell Science **2002**, 155(19): 3729-38.

**Stupack** D. G. and Cheresh D. A. "Integrins and angiogenesis." Curr Top Dev Biol **2004**, 64: 207-38.

**Takagi** J. "Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins." Biochem Soc Trans **2004**, 32(Pt3): 403-6.

**Takebayashi** Y., Aklyama S., Yamada K., Akiba S., Aikou T. "Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma." Cancer **1996**, 78(2): 226-31.

**Tarui** T., Miles L. A., Takada Y. "Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells." J Biol Chem **2001**, 276(43): 39562-8.

## Références Bibliographiques

**Temming** K., Schiffelers R. M., Molema G., Kok R. J. "RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature." Drug Resist Updat **2005**, in press.

**Tucker** G. C. "Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy." Curr Opin Investig Drugs **2003**, 4(6): 722-31.

**Valesky** M., Spang A. J., Fisher G. W., Farkas D. L., Becker D. "Noninvasive dynamic fluorescence imaging of human melanomas reveals that targeted inhibition of bFGF or FGFR-1 in melanoma cells blocks tumor growth by apoptosis." Mol Med **2002**, 8(2): 103-12.

**van Leeuwen** R. L., Yoshinaga I. G., Akasaka T., Dekker S. K., Vermeer B. J., Byers H. R. "Attachment, spreading and migration of melanoma cells on vitronectin. The role of alpha V beta 3 and alpha V beta 5 integrins." Exp Dermatol **1996**, 5(6): 308-15.

**van Nieuw Amerongen** G. P., Koolwijk P., Versteilen A., van Hinsbergh V. W. "Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro." Arterioscler Thromb Vasc Biol **2003**, 23(2): 211-7.

**Vavere** A. L. and Lewis J. S. "Imaging the effects of anti-angiogenic treatments." Q J Nucl Med **2003**, 47(3): 163-70.

**Vicaut** E. "[Principal characteristics of tumor microcirculation revealed by experimental techniques in vivo]." Therapie **2001**, 56(5): 483-94.

**Vonlaufen** A., Wiedle G., Borisch B., Birrer S., Luder P., Imhof B. A. "Integrin alpha(v)beta(3) expression in colon carcinoma correlates with survival." Mod Pathol **2001**, 14(11): 1126-32.

**Weidner** N., Semple J. P., Welch W. R., Folkman J. "Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma." N Engl J Med **1991**, 324(1): 1-8.

**Wickström** S. A., Alitalo K., Keski-Oja J. "Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down-regulation of RhoA activity." J Biol Chem **2003**, 278(39): 37895-901.

**Wickström** S. A., Alitalo K., Keski-Oja J. "An endostatin-derived peptide interacts with integrins and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells." J Biol Chem **2004**, 279(19): 20178-85.

**Williams** C. H., Kajander T., Hyypia T., Jackson T., Sheppard D., Stanway G. "Integrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9." J Virol **2004**, 78(13): 6967-73.

## Références Bibliographiques

**Wittekindt** C., Bottger M., Holtje H. D., Schafer-Korting M., Cartier R., Haberland A. "Integrin specificity of the cyclic Arg-Gly-Asp motif and its role in integrin-targeted gene transfer." Biotechnol Appl Biochem **2004**, 40(Pt 3): 281-90.

**Wu** Y., Zhang X., Xiong Z., Cheng Z., Fisher D. R., Liu S., Gambhir S. S., Chen X. "microPET imaging of glioma integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression using (64)Cu-labeled tetrameric RGD peptide." J Nucl Med **2005**, 46(10): 1707-18.

**Xiong** J. P., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S. L., Arnaout M. A. "Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." Science **2002**, 296(5565): 151-5.

**Yang** J. T., Rayburn H., Hynes R. O. "Embryonic mesodermal defects in  $\alpha_5$  integrin-deficient mice." Development **1993**, 119(4): 1093-105.

**Zagzag** D., Hooper A., Friedlander D. R., Chan W., Holash J., Wiegand S. J., Yancopoulos G. D., Grumet M. "In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis." Exp Neurol **1999**, 159(2): 391-400.

**Zanetti** A., Conforti G., Hess S., Martin-Padura I., Ghibaudi E., Preissner K. T., Dejana E. "Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane." Blood **1994**, 84(4): 1116-23.

**Zheng** D. Q., Woodard A. S., Fornaro M., Tallini G., Languino L. R. "Prostatic carcinoma cell migration via  $\alpha_v\beta_3$  integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway." Cancer Res **1999**, 59(7): 1655-64.

**Zgodzinski** W., Wallner G., Dabrowski A. "Angiogenesis inhibitors. New anticancer strategy." Pol J Pharmacol **1999**, 51(6): 455-62.

# **Annexes**



## Annexes

### I - Études cellulaires

#### B - Cinétiques de captation

##### - Captation du $^{125}\text{I}$ -cRGD

Temps	fmol captées / mg de protéine / nmol injectées $\pm$ SEM (Moyenne)		
	PC-3	KB 3.1	HMVEC
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1	207,10 $\pm$ 16,76	172,34 $\pm$ 14,02	2054,02 $\pm$ 241,71
2	437,73 $\pm$ 76,55	941,51 $\pm$ 360,76	
3	203,51 $\pm$ 44,58	1344,53 $\pm$ 364,70	
5	1254,55 $\pm$ 212,92	652,74 $\pm$ 100,74	2643,87 $\pm$ 364,93
10	1495,33 $\pm$ 226,36	572,82 $\pm$ 67,50	4510,05 $\pm$ 471,67
15	1390,90 $\pm$ 100,89	607,69 $\pm$ 19,34	5497,78 $\pm$ 284,53
22			4822,70 $\pm$ 565,67
30	1421,13 $\pm$ 36,93	471,89 $\pm$ 30,28	4816,40 $\pm$ 642,53

Tableau 28 : Cinétique de captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD sur 3 lignées cellulaires.

##### - Captation du $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD

Temps	fmol captées / mg de protéine / nmol injectées $\pm$ SEM (Moyenne)		
	PC-3	KB 3.1	HMVEC
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1	3886,45 $\pm$ 550,79	677,51 $\pm$ 148,80	6787,55 $\pm$ 702,00
2	5150,83 $\pm$ 736,93	420,50 $\pm$ 49,76	
3	11418,37 $\pm$ 1579,07	1385,91 $\pm$ 396,00	
5	13390,79 $\pm$ 850,57	1333,65 $\pm$ 668,56	6759,13 $\pm$ 612,25
10	14833,95 $\pm$ 1550,08	892,67 $\pm$ 115,69	8138,48 $\pm$ 474,06
15	23704,4 $\pm$ 4581,650	929,58 $\pm$ 119,36	8700,97 $\pm$ 772,06
22			10641,09 $\pm$ 968,04
30	3886,45 $\pm$ 3071,22	1304,89 $\pm$ 149,55	14622,40 $\pm$ 891,07

**Tableau 29** : Cinétique de captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD sur 3 lignées cellulaires.**- Captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD**

Temps	fmol captées / mg de protéine / nmol injectées $\pm$ SEM (Moyenne)		
	PC-3	KB 3.1	HMVEC
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
1	2492,76 $\pm$ 641,08	3061,00 $\pm$ 617,20	5389,91 $\pm$ 660,77
2	2023,02 $\pm$ 829,13	7722,16 $\pm$ 3300,04	
3	1314,71 $\pm$ 313,27	3220,88 $\pm$ 760,54	
5	2439,22 $\pm$ 498,69	5845,57 $\pm$ 2451,57	3275,94 $\pm$ 321,74
10	1860,00 $\pm$ 230,41	6831,49 $\pm$ 2122,05	4619,30 $\pm$ 406,92
15	1232,92 $\pm$ 233,51	3652,02 $\pm$ 1949,36	3921,29 $\pm$ 345,06
22			3979,93 $\pm$ 431,14
30	1813,29 $\pm$ 401,48	922,03 $\pm$ 90,59	5247,62 $\pm$ 267,89

**Tableau 30** : Cinétique de captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD sur 3 lignées cellulaires.**C - Effet de la concentration****1 - Captation sur PC-3**

Temps	$^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD 0,2 nmol	$^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD 0,8 nmol	$^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD 2,2 nmol
	fmol/mg/nmol $\pm$ SEM	fmol/mg/nmol $\pm$ SEM	fmol/mg/nmol $\pm$ SEM
1	13996,01 $\pm$ 1787,78	6725,51 $\pm$ 826,64	6655,18 $\pm$ 1221,79
5	26200,15 $\pm$ 3509,06	12599,93 $\pm$ 1671,67	24886,58 $\pm$ 3981,14
10	16653,43 $\pm$ 2233,14	17449,20 $\pm$ 2799,45	41380,36 $\pm$ 3384,54
15	29455,96 $\pm$ 2666,92	17690,30 $\pm$ 1528,06	66445,68 $\pm$ 11049,42
22	33454,66 $\pm$ 4565,02	35346,73 $\pm$ 2145,70	67343,25 $\pm$ 11756,85
30	35953,84 $\pm$ 3071,21	54078,31 $\pm$ 6088,50	109955,98 $\pm$ 8504,18

fmol/mg/nmol  $\pm$  SEM : Moyenne des fmol captées / mg de protéine / nmol injectées  $\pm$  SEM.**Tableau 31** : Cinétique de captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD sur PC-3.

## 2 - Captation sur HMVEC

### - Á 30 minutes

<sup>125</sup> I-cRGD		<sup>125</sup> I-RAFT-RGD		<sup>125</sup> I-RAFT-RAD	
nmol inj.	fmol/mg/nmol ± SEM	nmol inj.	fmol/mg/nmol ± SEM	nmol inj.	fmol/mg/nmol ± SEM
0,571	12963,54 ± 6931,49	1,943	57697,68 ± 11349,91		
5,706	5921,64 ± 283,38	3,886	41016,70 ± 3753,88	3,334	14284,88 ± 1930,84
11,412	8225,94 ± 1386,68	7,772	33441,21 ± 3282,09	6,668	10699,87 ± 1399,06
22,824	10217,65 ± 591,37	19,430	27914,28 ± 1571,15	16,67	10077,67 ± 2666,33
57,060	7619,94 ± 947,42	38,860	26177,97 ± 1588,77	33,34	9706,14 ± 1091,82

fmol/mg/nmol ± SEM : Moyenne des fmol captées / mg de protéine / nmol injectées ± SEM.

**Tableau 32** : Captation des radioligands à 30 minutes sur HMVEC.

### - Á 60 minutes

<sup>125</sup> I-cRGD		<sup>125</sup> I-RAFT-RGD		<sup>125</sup> I-RAFT-RAD	
nmol inj.	fmol/mg/nmol ± SEM	nmol inj.	fmol/mg/nmol ± SEM	nmol inj.	fmol/mg/nmol ± SEM
0,571	27131,59 ± 8766,59	1,943	53237,03 ± 6016,71	1,667	8938,82 ± 869,19
5,706	6689,02 ± 198,16	3,886	46921,96 ± 4088,99	3,334	16320,41 ± 3434,43
11,412	4582,39 ± 393,74			6,668	10668,09 ± 2145,69
22,824	4561,93 ± 171,36	19,430	38101,34 ± 1283,62	16,67	8507,99 ± 907,93
57,060	5264,03 ± 145,76	38,860	32103,93 ± 1705,92	33,34	10378,24 ± 750,77

fmol/mg/nmol ± SEM : Moyenne des fmol captées / mg de protéine / nmol injectées ± SEM.

**Tableau 33** : Captation des radioligands à 60 minutes sur HMVEC.

**D – Inhibition de la fixation**

Temps	À 15 minutes	À 30 minutes
Captation	fmol/mg/nmol $\pm$ SEM	fmol/mg/nmol $\pm$ SEM
$^{125}\text{I}$ -cRGD seul	17099,56 $\pm$ 999,34	24421,57 $\pm$ 1500,25
$^{125}\text{I}$ -cRGD +RAFT-RGD	9162,55 $\pm$ 1011,08	11855,16 $\pm$ 1912,19
$^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD seul	26103,98 $\pm$ 2021,87	51047,72 $\pm$ 7849,34
$^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD + cRGD	22114,71 $\pm$ 1965,47	20405,64 $\pm$ 1002,87

fmol/mg/nmol  $\pm$  SEM : Moyenne des fmoI captées / mg de protéine / nmol injectées  $\pm$  SEM.

**Tableau 34** : Captation des radioligands sur HMVEC.

**E- Étude du mécanisme d'internalisation****- Captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD**

Condition Temps	Contrôle	Chloroquine
	% de captation $\pm$ SEM	% de captation / contrôle $\pm$ SEM
1	100,00 $\pm$ 14,78	153,55 $\pm$ 32,99
15	100,00 $\pm$ 11,91	148,43 $\pm$ 38,17
30	100,00 $\pm$ 1,88	104,46 $\pm$ 9,64
60	100,00 $\pm$ 2,42	123,65 $\pm$ 29,22
120	100,00 $\pm$ 5,98	90,07 $\pm$ 15,32

**Tableau 35** : Captation du  $^{125}\text{I}$ -cRGD sur HMVEC en présence ou non de chloroquine.

### - Captation du $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD

Condition Temps	Contrôle	Chloroquine
	% de captation $\pm$ SEM	% de captation / contrôle $\pm$ SEM
1	100,00 $\pm$ 19,08	90,69 $\pm$ 32,68
15	100,00 $\pm$ 14,37	36,39 $\pm$ 13,11
30	100,00 $\pm$ 15,08	121,18 $\pm$ 24,25
60	100,00 $\pm$ 4,84	65,19 $\pm$ 13,04
120	100,00 $\pm$ 11,87	42,73 $\pm$ 8,50

Tableau 36 : Captation du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD sur HMVEC en présence ou non de chloroquine.

## F - Propriétés d'inhibition de l'angiogenèse

### 2 - Test de blessure

Condition	t = 0	t = 6 heures	t = 12 heures
Contrôle	100 $\pm$ 5,95	63,01 $\pm$ 9,06	26,55 $\pm$ 15,66
RAFT-RGD 1 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 8,11	82,32 $\pm$ 4,51	51,14 $\pm$ 7,14
RAFT-RGD 4 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 0,06	75,03 $\pm$ 0 04	53,27 $\pm$ 6,20
RAFT-RGD 8 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 8,85	71,09 $\pm$ 9,68	52,68 $\pm$ 4,37
cRGD 1 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 4,39	75,20 $\pm$ 6,44	51,92 $\pm$ 7,84
cRGD 4 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 2,56	73,42 $\pm$ 3,64	53,46 $\pm$ 3,93
cRGD 8 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 0,74	70,33 $\pm$ 6,36	50,26 $\pm$ 18,29

Tableau 37 : Test de blessure. Résultats exprimés en pourcentage de l'aire de la blessure par rapport au temps t = 0  $\pm$  SEM.

### 3 - Réseau de pseudo-capillaires

Condition \ Temps	3 heures % de l'aire du réseau ± écartype	6 heures % de l'aire du réseau ± écartype	9 heures % de l'aire du réseau ± écartype
Contrôle	100,00 ± 32,98	100,00 ± 23,25	100,00 ± 26,03
cRGD 1µM	28,89 ± 12,28	39,68 ± 23,00	41,51 ± 29,61
cRGD 4µM	24,85 ± 15,51	40,15 ± 30,85	45,04 ± 38,61
cRGD 16µM	16,70 ± 13,36	23,66 ± 15,32	32,70 ± 26,57
cRGD 32µM	24,00 ± 13,08	35,81 ± 22,25	30,06 ± 19,48
RAFT-RGD 1µM	30,15 ± 9,35	41,85 ± 12,23	46,17 ± 16,29
RAFT-RGD 4µM	27,11 ± 4,91	35,53 ± 5,39	36,12 ± 9,51
RAFT-RGD 8µM	48,12 ± 22,93	49,33 ± 29,07	36,71 ± 10,33
RAFT-RAD 1µM	99,69 ± 24,91	86,87 ± 25,38	83,63 ± 6,76
RAFT-RAD 4µM	113,0 ± 28,644	107,96 ± 20,45	116,73 ± 10,72
RAFT-RAD 8µM	111,14 ± 25,76	117,90 ± 41,35	111,15 ± 30,87

**Tableau 38** : Réseau de pseudo-capillaires. Résultats exprimés en pourcentage de l'aire occupé par le réseau de pseudo-capillaires par rapport au contrôle ± écartype.

## II – Études *In vivo*

### A - Ligands iodés

#### 1- <sup>125</sup>I-cRGD

Organes	1 h (moyenne ± écartype)	2 h (moyenne ± écartype)	4 h (moyenne ± écartype)	24 h
Cœur	0,80 ± 0,27	1,29 ± 0,44	0,26 ± 0,06	0,016
Poumon	1,65 ± 0,60	2,21 ± 0,39	0,58 ± 0,18	0,046
Foie	0,72 ± 0,22	1,13 ± 0,16	0,33 ± 0,12	0,020
Rate	0,93 ± 0,32	1,54 ± 0,43	0,36 ± 0,14	0,647
Rein	19,67 ± 6,49	27,96 ± 11,63	5,40 ± 3,46	0,017
<b>Tumeur</b>	<b>1,58 ± 0,55</b>	<b>2,15 ± 0,71</b>	<b>0,65 ± 0,26</b>	<b>0,017</b>
Os	0,85 ± 0,34	0,97 ± 0,27	0,29 ± 0,11	0,010
Cerveau	0,11 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,002
Sang	2,13 ± 0,85	3,18 ± 0,70	0,74 ± 0,26	0,030
n =	6	6	6	1

% DI / g d'organe

Tableau 39 : Biodistribution du <sup>125</sup>I-cRGD chez la nude greffée avec PC-3.

#### 2- <sup>125</sup>I-RAFT-RGD

Organes	1 h (moyenne ± écartype)	4 h (moyenne ± écartype)	6 h (moyenne ± écartype)	18 h (moyenne ± écartype)
Cœur	1,18 ± 0,54	0,47 ± 0,14	0,56 ± 0,27	0,05 ± 0,01
Poumon	2,23 ± 0,94	1,45 ± 1,61	1,26 ± 0,56	0,81 ± 1,09
Foie	1,34 ± 0,54	0,70 ± 0,33	0,76 ± 0,30	0,40 ± 0,52
Rate	1,64 ± 0,67	0,81 ± 0,28	0,96 ± 0,42	0,59 ± 0,86
Rein	23,35 ± 12,61	5,45 ± 2,98	3,21 ± 1,36	0,48 ± 0,06
<b>Tumeur</b>	<b>2,62 ± 1,20</b>	<b>1,06 ± 0,67</b>	<b>1,20 ± 0,49</b>	<b>0,07 ± 0,01</b>
Os	0,86 ± 0,54	0,64 ± 0,18	0,69 ± 0,34	0,07 ± 0,03
Cerveau	0,14 ± 0,07	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,05	0,01 ± 0,004
Sang	2,25 ± 1,38	2,26 ± 0,37	1,84 ± 0,78	0,14 ± 0,07
n =	6	6	5	5

% DI / g d'organe

Tableau 40 : Biodistribution du <sup>125</sup>I-RAFT-RGD chez la nude greffée avec PC-3.

3-  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD

Organes	1 h (moyenne $\pm$ écartype)	4 h (moyenne $\pm$ écartype)	18 h (moyenne $\pm$ écartype)
Cœur	1,53 $\pm$ 0,20	0,26 $\pm$ 0,13	0,03 $\pm$ 0,01
Poumon	3,19 $\pm$ 0,41	0,61 $\pm$ 0,23	0,07 $\pm$ 0,01
Foie	1,49 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,14	0,05 $\pm$ 0,01
Rate	1,54 $\pm$ 0,79	0,42 $\pm$ 0,17	0,03 $\pm$ 0,01
Rein	31,97 $\pm$ 16,77	5,44 $\pm$ 2,54	1,34 $\pm$ 0,31
<b>Tumeur</b>	<b>3,01 <math>\pm</math> 0,51</b>	<b>0,56 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,01</b>
Cerveau	0,24 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,04	0,007 $\pm$ 0,003
Sang	4,31 $\pm$ 0,56	0,81 $\pm$ 0,35	0,07 $\pm$ 0,02
n =	5	4	5

% DI / g d'organe

Tableau 41 : Biodistribution du  $^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD chez la nude greffée avec PC-3.

## 4- Comparaison des biodistributions des ligands iodés

Tumeur	1 h (moyenne $\pm$ écartype)	4 h (moyenne $\pm$ écartype)	18 h / 24 h (moyenne $\pm$ écartype)
$^{125}\text{I}$ -cRGD	1,58 $\pm$ 0,55	0,65 $\pm$ 0,26	0,02
$^{125}\text{I}$ -RAFT-RGD	2,62 $\pm$ 1,20	1,06 $\pm$ 0,67	0,07 $\pm$ 0,01
$^{125}\text{I}$ -RAFT-RAD	3,01 $\pm$ 0,51	0,56 $\pm$ 0,12	0,04 $\pm$ 0,01

Tableau 42 : Captation tumorale des ligands marqués à l'iode 125 au cours du temps, chez la nude greffée avec PC-3.

**B - Ligands technétiés****1- Études sur le modèle KB 3.1 greffé sur souris nudes****- <sup>99m</sup>Tc-cRGD**

	4 heures (moyenne ± écartype)	24 heures (moyenne ± écartype)
cœur	0,56 ± 0,06	0,49 ± 0,04
poumons	1,10 ± 0,06	0,84 ± 0,09
foie	14,14 ± 1,38	7,14 ± 1,02
rate	0,79 ± 0,03	0,60 ± 0,08
rein	6,29 ± 0,69	4,42 ± 1,49
estomac	1,46 ± 0,34	0,64 ± 0,06
intestin	0,94 ± 0,13	0,54 ± 0,07
muscle	0,30 ± 0,07	0,23 ± 0,01
os	0,38 ± 0,15	0,41 ± 0,04
<b>tumeur</b>	<b>0,73 ± 0,11</b>	<b>0,71 ± 0,07</b>
cerveau	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01
sang	1,38 ± 0,17	1,13 ± 0,18
	n = 6	n = 3

Tableau 43 : Biodistribution du <sup>99m</sup>Tc-cRGD, modèle KB 3.1.**- <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD**

	4 heures (moyenne ± écartype)	24 heures (moyenne ± écartype)
cœur	0,99 ± 0,35	0,60 ± 0,09
poumons	1,82 ± 0,72	1,00 ± 0,17
foie	8,35 ± 3,55	4,98 ± 0,54
rate	1,43 ± 0,46	0,79 ± 0,18
rein	17,15 ± 3,50	9,39 ± 2,86
estomac	4,62 ± 1,68	1,00 ± 0,24
intestin	1,50 ± 0,29	0,72 ± 0,21
muscle	0,39 ± 0,13	0,21 ± 0,01
os	0,82 ± 0,26	0,49 ± 0,10
<b>tumeur</b>	<b>0,913 ± 0,227</b>	<b>0,851 ± 0,183</b>
cerveau	0,12 ± 0,04	0,05 ± 0,01
sang	2,99 ± 1,04	1,25 ± 0,20
	n = 6	n = 3

Tableau 44 : Biodistribution du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD, modèle KB 3.1.

**- Imagerie planaire sur les souris nude greffées avec KB 3.1**

Heure	Valeurs T/MC du <sup>99m</sup> Tc-cRGD					Moyenne ± écartype
0,5	1,71	1,96	1,70	2,00	2,06	1,92 ± 0,17
1	1,81	1,42	1,77	1,24	2,37	1,72 ± 0,43
2	1,83	1,72	1,74	1,71	1,92	1,79 ± 0,09
4	1,61	1,85	1,75	1,88	1,87	1,79 ± 0,11
<i>Biodistribution 4 h</i>	2,23	2,00	3,11	3,26	2,03	2,53 ± 0,611
24	3,88		2,42		2,51	2,94 ± 0,82
<i>Biodistribution 24 h</i>	3,65		3,12		2,67	3,15 ± 0,49

Tableau 45 : Valeurs des rapports T/MC obtenus par imagerie et *biodistribution* avec le <sup>99m</sup>Tc-cRGD, modèle KB 3.1.

Heure	Valeurs T/MC du <sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD					Moyenne ± écartype	
0,5	1,56	1,84	1,41	1,64	0,96	1,72	1,52 ± 0,31
1	1,60	1,85	1,34	1,68	1,36	1,30	1,52 ± 0,22
2	1,79	2,03	1,40	1,66	1,49	1,59	1,66 ± 0,23
4	1,59	2,27	1,33	1,80	1,44	2,25	1,78 ± 0,40
<i>Biodistribution 4 h</i>	2,19	2,19	3,35	1,75	2,63	2,35	2,41 ± 0,54
24	2,74		1,71		3,07		2,51 ± 0,71
<i>Biodistribution 24 h</i>	4,19		4,49		3,17		3,95 ± 0,69

Tableau 46 : Rapports T/MC obtenus par imagerie et *biodistribution* avec le <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD, modèle KB 3.1.

## 2- Mélanome B16F0, chez la C57BI/6J

-  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD

Organes	1 h (moyenne $\pm$ écartype)
Cœur	1,88 $\pm$ 0,49
Poumon	3,38 $\pm$ 1,07
Foie	20,81 $\pm$ 2,10
Rate	2,81 $\pm$ 0,78
Rein	20,04 $\pm$ 17,63
Estomac	3,63 $\pm$ 1,64
Intestin	3,83 $\pm$ 3,48
Muscle	0,72 $\pm$ 0,33
Os	1,02 $\pm$ 0,14
<b>Tumeur</b>	<b>1,60 <math>\pm</math> 0,36</b>
Cerveau	0,20 $\pm$ 0,07
Sang	5,79 $\pm$ 1,59
n =	6

Tableau 47 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD à 1h, chez la souris C57BI/6J greffée avec le mélanome B16F0.

-  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD

	1 heure (moyenne $\pm$ écartype)	4 heures (moyenne $\pm$ écartype)
cœur	2,02 $\pm$ 0,21	2,14 $\pm$ 0,18
poumons	3,98 $\pm$ 0,61	4,87 $\pm$ 0,40
foie	9,79 $\pm$ 1,79	21,47 $\pm$ 3,57
rate	3,68 $\pm$ 1,36	5,61 $\pm$ 1,73
rein	44,00 $\pm$ 5,89	49,13 $\pm$ 3,35
estomac	4,07 $\pm$ 0,51	3,32 $\pm$ 0,76
intestin	3,30 $\pm$ 0,34	9,38 $\pm$ 2,30
muscle	0,72 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,18
os	1,61 $\pm$ 0,29	1,89 $\pm$ 0,29
<b>tumeur</b>	<b>2,41 <math>\pm</math> 0,51</b>	<b>2,23 <math>\pm</math> 0,35</b>
cerveau	0,24 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,10
sang	6,12 $\pm$ 1,00	9,67 $\pm$ 0,81
	n = 6	n = 4

Tableau 48 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, chez la souris C57BI/6J greffée avec le mélanome B16F0.

- <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RAD

	1 heure (moyenne ± écartype)	4 heures (moyenne ± écartype)
cœur	0,99 ± 0,23	0,49 ± 0,06
poumons	1,76 ± 0,34	0,90 ± 0,09
foie	3,85 ± 0,50	3,36 ± 0,23
rate	1,18 ± 0,28	0,68 ± 0,12
rein	45,83 ± 5,11	35,12 ± 3,21
estomac	1,71 ± 0,20	0,93 ± 0,08
intestin	1,37 ± 0,31	0,78 ± 0,14
muscle	0,41 ± 0,08	0,18 ± 0,03
os	0,75 ± 0,18	0,40 ± 0,02
<b>tumeur</b>	<b>0,98 ± 0,14</b>	<b>0,68 ± 0,07</b>
cerveau	0,14 ± 0,07	0,04 ± 0,002
sang	3,21 ± 0,62	1,50 ± 0,13
	n = 5	n = 4

Tableau 49 : Biodistribution du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RAD, chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0.

## - Imagerie planaire des ligands marqués au technétium 99m

*a- Ligands technétiés à 1h post-injection*

Condition Moyenne ± écartype	T/MC : Biodistribution	T/MC : Imagerie
<sup>99m</sup> Tc-cRGD, 1h	3,26	1,52
	1,61	2,36
	2,26	2,04
	2,28	2,64
	2,46	2,60
	2,28	3,77
	2,36 ± 0,53	2,49 ± 0,75

Condition Moyenne $\pm$ écartype	T/MC : Biodistribution	T/MC : Imagerie
$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, 1h	2,68	2,13
	2,84	2,11
	3,56	3,12
	3,10	1,60
	3,23	2,01
	4,56	2,04
	3,33 $\pm$ 0,67	2,17 $\pm$ 0,51
$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, 4h	2,30	1,19
	2,61	2,14
	2,10	1,29
	2,24	2,21
	0,84	2,96
	2,11	3,09
	2,04 $\pm$ 0,61	2,15 $\pm$ 0,80
$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD, 1h	1,57	1,00
	2,26	1,53
	2,92	1,70
	3,02	0,96
	2,56	0,96
	2,47 $\pm$ 0,58	1,23 $\pm$ 0,36

**Tableau 50** : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus par biodistribution et imagerie, modèle B16F0.

***b- Évolution au cours du temps***

Heure	Valeurs T/MC du $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD						Moyenne $\pm$ écartype
0,5	4,12	2,59	2,06	1,18	1,84	1,51	2,22 $\pm$ 1,05
1	4,07	3,09	1,98	1,24	1,69	1,20	2,21 $\pm$ 1,14
2	3,26	3,00	2,20	1,36	1,97	1,42	2,20 $\pm$ 0,80
4	2,96	3,09	2,21	1,19	2,14	1,29	2,15 $\pm$ 0,80

**Tableau 51** : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus par imagerie, modèle B16F0.

## - Pré-injection de ligand froid

### a- Biodistribution et captation tumorale

Organe	<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD		RAFT-RGD + <sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD		cRGD + <sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD	
	Moyenne % DI / g	Écartype	Moyenne % DI / g	Écartype	Moyenne % DI / g	Écartype
cœur	2,14	0,18	2,24	0,47	2,56	0,45
poumons	4,88	0,40	6,49	2,28	5,56	2,22
foie	21,47	3,57	18,98	6,45	21,66	4,11
rate	5,62	1,73	2,90	2,27	4,81	0,69
rein	49,13	3,35	37,03	10,51	60,24	6,55
estomac	3,32	0,76	2,59	1,18	3,58	1,03
intestin	9,38	2,30	3,37	1,71	6,16	0,78
pancréas	2,43	0,92	2,72	1,27	2,32	1,10
muscle	0,97	0,18	0,82	0,39	1,12	0,18
os	1,90	0,29	1,94	0,96	2,15	0,32
tumeur	2,23	0,35	2,02	0,69	2,31	0,49
cerveau	0,33	0,10	0,24	0,09	0,37	0,10
peau	2,01	0,14	0,56	0,72	2,12	0,44
sang	9,67	0,81	8,86	11,33	11,11	2,77
	n = 4		n = 4		n = 5	

**Tableau 52** : Biodistribution du <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD avec ou sans pré-injection de ligands non marqués, chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0.

### b- Rapports T/MC

Condition	Heure	Valeurs T/MC du <sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD +/- pré-injection				Moyenne ± écartype
<sup>99m</sup> Tc-RAFT- RGD	0,5	1,18	1,84	1,51	2,06	1,65 ± 0,38
	1	1,24	1,69	1,20	1,98	1,53 ± 0,38
	2	1,36	1,97	1,42	2,20	1,74 ± 0,41
	4	1,19	2,14	1,29	2,21	1,71 ± 0,54
	<i>Biodis. 4 h</i>	1,14	2,30	2,10	2,24	1,95 ± 0,54

Condition	Heure	Valeurs T/MC du $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD +/- pré-injection						Moyenne $\pm$ écartype
RAFT-RGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT- RGD	0,5	1,32	1,43	3,56	3,55			2,47 $\pm$ 0,13
	1	1,27	1,59	3,25	2,85			2,24 $\pm$ 0,95
	2	1,49	1,46	3,99	2,85			2,45 $\pm$ 1,22
	4	1,30	1,39	3,77	3,23			2,42 $\pm$ 1,27
	<i>Biodis. 4 h</i>	1,02	2,44	2,10	2,54			2,63 $\pm$ 0,47
cRGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT- RGD	0,5	2,67	1,85	1,22	1,23	1,25	1,18	1,57 $\pm$ 0,59
	1	2,66	1,90	1,17	1,31	1,33	1,16	1,59 $\pm$ 0,59
	2	2,46	1,46	1,21	1,49	1,28	1,12	1,50 $\pm$ 0,49
	4	2,70	1,58	1,13	1,21	1,55		1,63 $\pm$ 0,63
	<i>Biodis. 4 h</i>	2,06	2,71	2,68	1,56	2,56		2,06 $\pm$ 0,36

Tableau 53 : Rapports T/MC obtenus par imagerie et *biodistribution* avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD avec ou sans pré-injection de ligands non marqués, modèle B16F0.

### 3- Carcinome TS/A-pc, chez la Balb/c

#### - $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD

Organes	1 h (moyenne $\pm$ écartype)
Cœur	1,59 $\pm$ 0,46
Poumon	3,18 $\pm$ 0,88
Foie	16,94 $\pm$ 2,26
Rate	2,45 $\pm$ 0,91
Rein	12,19 $\pm$ 3,05
Estomac	1,65 $\pm$ 0,26
Intestin	14,88 $\pm$ 12,09
Muscle	0,63 $\pm$ 0,22
Os	0,72 $\pm$ 0,19
<b>Tumeur</b>	<b>1,91 <math>\pm</math> 0,39</b>
Cerveau	0,14 $\pm$ 0,05
Sang	5,33 $\pm$ 1,84
n =	6

Tableau 54 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -cRGD à 1h, chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc ; n=6.

-  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD

	1 heure (moyenne $\pm$ écartype)	4 heures (moyenne $\pm$ écartype)
cœur	2,55 $\pm$ 0,61	1,95 $\pm$ 0,60
poumons	5,08 $\pm$ 1,97	4,51 $\pm$ 0,83
foie	14,33 $\pm$ 4,16	16,85 $\pm$ 2,90
rate	3,88 $\pm$ 1,36	3,47 $\pm$ 1,00
rein	28,55 $\pm$ 13,55	29,79 $\pm$ 13,21
estomac	3,00 $\pm$ 1,30	4,95 $\pm$ 1,78
intestin	4,07 $\pm$ 1,14	3,98 $\pm$ 1,65
muscle	1,00 $\pm$ 0,35	1,01 $\pm$ 0,45
os	1,52 $\pm$ 0,64	1,49 $\pm$ 0,34
<b>tumeur</b>	<b>2,67 <math>\pm</math> 0,76</b>	<b>1,80 <math>\pm</math> 0,46</b>
cerveau	0,23 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,09
sang	8,21 $\pm$ 2,61	4,11 $\pm$ 5,15
	n = 6	n = 5

Tableau 55 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD, chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc.

-  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD

	1 heure (moyenne $\pm$ écartype)	4 heures (moyenne $\pm$ écartype)
cœur	0,54 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,09
poumons	1,13 $\pm$ 0,14	0,82 $\pm$ 0,25
foie	3,54 $\pm$ 0,74	4,96 $\pm$ 2,14
rate	0,74 $\pm$ 0,18	0,64 $\pm$ 0,26
rein	40,86 $\pm$ 2,71	24,57 $\pm$ 6,58
estomac	1,00 $\pm$ 0,41	0,78 $\pm$ 0,19
intestin	0,92 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,13
muscle	0,22 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,05
os	0,38 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,09
<b>tumeur</b>	<b>0,68 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>0,58 <math>\pm</math> 0,14</b>
cerveau	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01
sang	2,17 $\pm$ 0,16	0,93 $\pm$ 0,71
	n = 6	n = 5

Tableau 56 : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RAD, chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc.

**- Imagerie planaire des ligands marqués au technétium 99m**

Condition Moyenne ± écartype	T/MC : Biodistribution	T/MC : Imagerie
<sup>99m</sup> Tc-cRGD, 1h	3,43	2,78
	4,35	3,41
	1,89	2,64
	3,32	1,99
	2,82	2,97
	3,48	2,77
	3,22 ± 0,81	2,76 ± 0,46
<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD, 1h	2,60	2,69
	2,61	2,15
	2,64	2,31
	2,78	2,85
	2,49	3,52
	3,25	2,42
	2,73 ± 0,27	2,66 ± 0,49
<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RGD, 4h	2,32	1,75
	0,84	2,57
	3,81	3,18
	2,09	3,75
	1,66	2,88
	2,14 ± 1,09	2,83 ± 0,74
	<sup>99m</sup> Tc-RAFT-RAD, 1h	3,53
2,86		1,68
3,44		1,32
2,85		1,28
3,06		0,97
3,15 ± 0,32		1,38 ± 0,30

Tableau 57 : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus par biodistribution et imagerie, modèle TS/A-pc.

Heure	Valeurs T/MC du $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD					Moyenne $\pm$ écartype
0,5	2,04	2,36	3,19	2,95	1,81	2,47 $\pm$ 0,59
1	1,63	2,61	3,18	2,75	1,95	2,43 $\pm$ 0,63
2	1,34	2,55	3,27	3,11	2,89	2,63 $\pm$ 0,77
4	1,75	2,57	3,18	3,75	2,88	2,83 $\pm$ 0,74

**Tableau 58** : Rapports « Tumeur / Muscle Controlatéral » obtenus par imagerie, modèle TS/A-pc.

### 3- Pré-injection de ligand froid

#### *c- Biodistribution et captation tumorale*

Organe	$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD		RAFT-RGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD		cRGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD	
	Moyenne % DI / g	Ecartype	Moyenne % DI / g	Ecartype	Moyenne % DI / g	Ecartype
cœur	1,95	0,60	1,51	0,28	2,03	0,58
poumons	4,51	0,83	3,99	1,23	4,14	1,35
foie	16,85	2,90	12,65	3,41	17,484	7,12
rate	3,47	1,00	3,07	0,41	3,56	0,84
rein	29,79	13,21	15,72	2,12	33,45	16,97
estomac	4,95	1,78	2,63	0,84	3,32	1,25
intestin	3,98	1,65	4,65	1,29	3,66	1,60
pancréas	2,81	1,39	2,00	0,61	1,91	0,35
muscle	1,01	0,45	0,59	0,10	0,81	0,21
os	1,49	0,34	1,24	0,48	1,38	0,54
tumeur	1,80	0,46	1,42	0,41	1,38	0,39
cerveau	0,19	0,09	0,13	0,01	0,27	0,10
peau	2,53	0,23	1,38	0,21	1,70	0,41
sang	4,11	5,15	2,20	1,60	7,54	3,87
	n = 5		n = 5		n = 6	

**Tableau 59** : Biodistribution du  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD avec ou sans pré-injection de ligands non marqués, chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc.

**d- Rapports T/MC**

Condition	Heure	Valeurs T/MC du $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD +/- pré-injection					Moyenne $\pm$ écartype	
$^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD	0,5	2,04	2,36	3,19	2,95	1,81	2,47 $\pm$ 0,58	
	1	1,63	2,61	3,18	2,75	1,95	2,43 $\pm$ 0,63	
	2	1,34	2,55	3,27	3,11	2,89	2,63 $\pm$ 0,77	
	4	1,75	2,57	3,18	3,75	2,88	2,83 $\pm$ 0,74	
	<i>Biodis. 4 h</i>	2,32	0,84	3,81	2,09	1,66	2,14 $\pm$ 1,09	
RAFT-RGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD	0,5	2,59	2,42	2,15	2,88	3,02	2,61 $\pm$ 0,35	
	1	2,75	2,05	2,16	3,09	2,93	2,59 $\pm$ 0,46	
	2	2,74	2,34	2,24	3,36	3,33	2,80 $\pm$ 0,53	
	4	2,86	2,54	2,37	3,48	3,01	2,86 $\pm$ 0,43	
	<i>Biodis. 4 h</i>	2,42	2,82	1,89	2,34	2,43	2,38 $\pm$ 0,33	
CRGD + $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD	0,5	1,53	1,16	2,15	2,52	2,23	2,03	1,94 $\pm$ 0,50
	1	1,93	1,68	1,90	1,80	2,52	2,43	2,04 $\pm$ 0,35
	2	1,76	1,71	2,08	1,88	2,36	2,25	2,01 $\pm$ 0,26
	4	1,72	1,68	1,61	2,04	2,09	2,84	2,00 $\pm$ 0,46
	<i>Biodis. 4 h</i>	1,52	1,40	1,88	1,62	1,87	2,11	1,73 $\pm$ 0,27

Tableau 60 : Valeurs des rapports T/MC obtenus par imagerie et *biodistribution* avec le  $^{99m}\text{Tc}$ -RAFT-RGD avec ou sans pré-injection de ligands non marqués, modèle TS/A-pc.

**C - RAFT-RGD marqué à l'indium 111****1- Études sur le modèle B16F0**

	1 heure	4 heures	24 heures	48 heures
	Moyenne % DI / g ± Écartype			
cœur	1,63 ± 0,22	0,29 ± 0,05	0,35 ± 0,13	0,43 ± 0,10
poumons	2,78 ± 0,50	0,69 ± 0,20	0,84 ± 0,30	0,69 ± 0,20
foie	2,30 ± 0,40	1,29 ± 0,33	1,82 ± 0,53	2,17 ± 0,49
rate	2,06 ± 0,34	1,23 ± 0,45	1,95 ± 0,85	2,42 ± 0,59
rein	28,10 ± 18,39	44,79 ± 16,54	58,92 ± 14,35	35,77 ± 10,72
estomac	2,07 ± 0,35	1,72 ± 0,71	1,08 ± 0,43	1,39 ± 0,32
intestin	2,15 ± 0,32	1,18 ± 0,22	1,23 ± 0,54	1,87 ± 0,77
muscle	0,93 ± 0,22	0,21 ± 0,11	0,15 ± 0,05	0,17 ± 0,05
os	1,42 ± 0,42	0,49 ± 0,18	0,87 ± 0,41	1,06 ± 0,23
<b>tumeur</b>	<b>1,81 ± 0,15</b>	<b>0,60 ± 0,12</b>	<b>0,74 ± 0,25</b>	<b>0,61 ± 0,25</b>
cerveau	0,21 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01
sang	4,10 ± 0,97	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,05	0,03 ± 0,01
n =	4	4	4	6

**Tableau 61** : Biodistribution du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la souris C57Bl/6J greffée avec le mélanome B16F0.

Heure	Valeurs T/MC du $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD					Moyenne ± écartype
0,5	3,58	2,99	3,26	2,85	1,57	2,85 ± 0,77
1	3,99	2,32	2,25	2,72	1,58	2,57 ± 0,89
2	2,68	1,93	3,82	2,76	1,76	2,59 ± 0,82
<i>Biodis. 3 h</i>	3,25	2,06	3,65	2,61	3,39	2,99 ± 0,65

**Tableau 62** : Valeurs des rapports T/MC obtenus par imagerie et *biodistribution* avec le  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la C57Bl/6 greffée avec le mélanome B16F0.

## 2 - Études sur le modèle TS/A-pc

	1 heure	4 heures	24 heures	48 heures
	Moyenne % DI / g ± Écartype			
cœur	1,37 ± 0,72	0,39 ± 0,11	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,06
poumons	2,36 ± 0,99	0,68 ± 0,04	0,42 ± 0,06	0,48 ± 0,06
foie	2,16 ± 0,81	1,30 ± 0,10	1,15 ± 0,08	1,29 ± 0,61
rate	1,52 ± 0,49	1,13 ± 0,13	1,21 ± 0,17	1,75 ± 0,28
rein	32,08 ± 14,59	52,73 ± 9,44	32,18 ± 1,58	32,69 ± 5,56
estomac	2,09 ± 0,75	0,91 ± 0,12	0,76 ± 0,05	0,83 ± 0,28
intestin	1,91 ± 0,60	1,00 ± 0,17	0,83 ± 0,09	1,13 ± 0,15
muscle	0,68 ± 0,35	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,10	0,14 ± 0,02
os	0,65 ± 0,18	0,25 ± 0,15	0,30 ± 0,06	0,58 ± 0,14
<b>tumeur</b>	<b>1,63 ± 0,67</b>	<b>1,26 ± 0,18</b>	<b>0,77 ± 0,07</b>	<b>0,71 ± 0,17</b>
cerveau	0,12 ± 0,05	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
sang	2,77 ± 1,70	0,12 ± 0,05	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,01
n =	4	5	3	5

Tableau 63 : Biodistribution du  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la souris Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc.

Heure	Valeurs T/MC du $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD					Moyenne ± écartype
0,5	2,55	1,47	1,23	1,29		1,64 ± 0,62
1	0,96	1,70	2,06	2,09		1,70 ± 0,53
2	1,85	1,08	1,89	1,75		1,64 ± 0,38
24	1,39	2,94	2,60	2,08	1,60	2,12 ± 0,65
48	1,93	2,81	1,55	2,20	1,29	1,95 ± 0,59
<i>Biodis. 3 h</i>	<i>2,40</i>	<i>4,21</i>	<i>7,44</i>	<i>7,90</i>		<i>5,49 ± 2,63</i>
<i>Biodis. 48 h</i>	<i>6,07</i>	<i>4,11</i>	<i>6,04</i>	<i>5,82</i>	<i>3,60</i>	<i>5,13 ± 1,18</i>

Tableau 64 : Valeurs des rapports T/MC obtenus par imagerie et *biodistribution* avec le  $^{111}\text{In}$ -RAFT-RGD chez la Balb/c greffée avec le carcinome TS/A-pc.





## **ÉVALUATION D'UN RADIOLIGAND DE L'INTÉGRINE $\alpha_v\beta_3$ , LE RAFT-RGD, POUR L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE L'ANGIOGÈNE TUMORALE.**

**Résumé :** Le ciblage de la néoangiogenèse tumorale est une voie actuelle de recherche pour le diagnostic et pour le traitement des tumeurs solides. Les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux surexpriment certains marqueurs spécifiques tels que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , qui reconnaît spécifiquement les peptides possédant le motif « RGD » (-Arg-Gly-Asp-). Nous avons étudié le potentiel d'un nouveau radiotracer - le RAFT-RGD - en vue d'imagerie moléculaire nucléaire des néovaisseaux.

*In vitro*, le couplage de 4 c(RGDfK) au RAFT augmente la captation du traceur par les cellules  $\alpha_v\beta_3$  positives, par rapport au c(RGDfK). De plus, le RAFT-RGD possède une meilleure affinité que le c(RGDfK) et des propriétés d'inhibition de l'angiogenèse similaires.

*In vivo*, l'ensemble des tumeurs,  $\alpha_v\beta_3$  positives et négatives, est visible par imagerie planaire non invasive corps entier, comme en SPECT, dès 30 min post-injection et au-delà de 24 h, grâce à une gamma caméra dédiée au petit animal.

Le RAFT-RGD, malgré l'absence d'amélioration du contraste par rapport au cRGD, semble être un traceur prometteur de l'angiogenèse tumorale : il pourrait renseigner sur l'évolution de la pathologie et le suivi de l'efficacité des traitements des tumeurs dans les services de Médecine Nucléaire. De plus, par sa structure chimique, le RAFT-RGD apporte de multiples possibilités de marquage (émetteurs  $\gamma$  et  $\beta^-$ ), ce qui permet d'envisager des applications intéressantes notamment dans le domaine thérapeutique (radiothérapie interne vectorisée).

**Mots clés :** RAFT-RGD, intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , néoangiogenèse tumorale, radiopharmaceutique.

## **MOLECULAR NUCLEAR IMAGING OF TUMORAL ANGIOGENESIS USING A RGD-CONTAINING TRACER, RAFT-RGD, TARGETED AT THE NEOVESSEL-SPECIFIC INTEGRIN $\alpha_v\beta_3$ .**

**Abstract:** Tumoral neoangiogenesis targeting is currently a major field of research for the diagnostic and treatment of solid tumors. Endothelial cells from neovessels overexpress several specific markers such as the  $\alpha_v\beta_3$  integrin, which binds RGD (-Arg-Gly-Asp)-containing peptides. We evaluated the potential of a novel radiotracer – RAFT-RGD – for the molecular nuclear imaging of neovessels.

*In vitro*, the coupling of 4 c(RGDfK) to the RAFT platform resulted in an increased cellular uptake of the tracer by  $\alpha_v\beta_3$  positive cells when compared to c(RGDfK). Furthermore, RAFT-RGD has a higher affinity than c(RGDfK) and similar properties for angiogenesis inhibition.

*In vivo*, both  $\alpha_v\beta_3$  positive and negative tumors were visible by non invasive whole body planar and tomographic imaging from 30 min to 24 h post-injection, using a gamma camera dedicated to small animal imaging.

Despite a lack of significant contrast improvement compare with c(RGDfK), RAFT-RGD could represent a promising tracer for tumoral angiogenesis since it could provide invaluable information about tumor development and treatment efficacy in Nuclear Medicine departments. Furthermore, thanks to its chemical structure, RAFT-RGD can be labelled with a variety of radioisotopes including  $\gamma$  and  $\beta^-$  emitters, allowing interesting therapeutical applications such as internal targeted radiotherapy.

**Key words:** RAFT-RGD,  $\alpha_v\beta_3$  integrin, tumoral neoangiogenesis, radiopharmaceutical.

**Thèse préparée au sein de l'équipe INSERM E0340 – Radiopharmaceutiques Biocliniques – Faculté de Médecine de Grenoble – UJF – Grenoble I**