



HAL
open science

Imagerie quantitative de bioluminescence appliquée à un modèle murin syngénique de lymphome exprimant le CD20 humain : analyses de l'influence du volume tumoral sur la réponse au traitement par un anticorps monoclonal, le rituximab, et de l'effet thérapeutique de neutrons et de nanoparticules chargées.

David Dayde

► **To cite this version:**

David Dayde. Imagerie quantitative de bioluminescence appliquée à un modèle murin syngénique de lymphome exprimant le CD20 humain : analyses de l'influence du volume tumoral sur la réponse au traitement par un anticorps monoclonal, le rituximab, et de l'effet thérapeutique de neutrons et de nanoparticules chargées.. Immunologie. Université François Rabelais - Tours, 2007. Français. NNT : . tel-00369130

HAL Id: tel-00369130

<https://theses.hal.science/tel-00369130>

Submitted on 18 Mar 2009

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.

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Technologies
UMR 6239, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer
(ex EA3853, IPGA)

THÈSE

présentée par :

David DAYDE

soutenue le : **03 octobre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la santé

Imagerie quantitative de bioluminescence appliquée à un modèle murin syngénique de lymphome exprimant le CD20 humain : analyses de l'influence du volume tumoral sur la réponse au traitement par un anticorps monoclonal, le rituximab, et de l'effet thérapeutique de neutrons et de nanoparticules chargées.

THÈSE dirigée par :

M. BARDOS Pierre

Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université François – Rabelais, Tours.

M. CARTRON Guillaume

Praticien hospitalier, Centre Hospitalier Lapeyronnie, Montpellier.

RAPPORTEURS :

M. PELEGRIN André

Directeur de recherche, Institut de Recherche en Cancérologie, Montpellier.

M. SALLES Gilles

Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université Lyon 1.

JURY :

M. BARDOS Pierre

Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université François – Rabelais, Tours.

M. CARTRON Guillaume

Praticien hospitalier, Centre Hospitalier Lapeyronnie, Montpellier.

M. LE PAPE Alain

Directeur de recherche, Centre de Distribution et d'Archivage Animal, Orléans.

M. PAINAUD Gilles

Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université François – Rabelais, Tours.

M. PELEGRIN André

Directeur de recherche, Institut de Recherche en Cancérologie, Montpellier.

M. SALLES Gilles

Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université Lyon 1.

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Technologies
UMR 6239, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer
(ex EA3853, IPGA)

THÈSE présentée par : **David DAYDE**

soutenue le : **03 octobre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la santé

Imagerie quantitative de bioluminescence appliquée à un modèle murin syngénique de lymphome exprimant le CD20 humain : analyses de l'influence du volume tumoral sur la réponse au traitement par un anticorps monoclonal, le rituximab, et de l'effet thérapeutique de neutrons et de nanoparticules chargées.

THÈSE dirigée par :

M. BARDOS Pierre Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université François – Rabelais, Tours.
M. CARTRON Guillaume Praticien hospitalier, Centre Hospitalier Lapeyronnie, Montpellier.

RAPPORTEURS :

M. PELEGRIN André Directeur de recherche, Institut de Recherche en Cancérologie, Montpellier.
M. SALLES Gilles Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université Lyon 1.

JURY :

M. BARDOS Pierre Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université François – Rabelais, Tours.
M. CARTRON Guillaume Praticien hospitalier, Centre Hospitalier Lapeyronnie, Montpellier.
M. LE PAPE Alain Directeur de recherche, Centre de Distribution et d'Archivage Animal, Orléans.
M. PAINAUD Gilles Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université François – Rabelais, Tours.
M. PELEGRIN André Directeur de recherche, Institut de Recherche en Cancérologie, Montpellier.
M. SALLES Gilles Professeur des Universités, praticien hospitalier, Université Lyon 1.

La science consiste à oublier ce qu'on croit savoir, et la sagesse à ne pas s'en soucier.

Charles Nodier, académicien et écrivain (1780-1844)

L'approche est toujours plus belle que l'arrivée.

Alain Fournier, écrivain (1886- 1914)

La médecine est une science des pannes, celles de l'organisme humain... Mais si le médecin est un dépanneur - rien de plus, rien de moins - il est le dépanneur d'une machine dont il ne possède pas les plans.

Lucien Israël, oncologue (1926)

A mes parents
avec toute ma tendresse et ma gratitude...

A Marylène, Cyril et Coraline
avec toute mon affection...

Je vous dédie ce travail de thèse.

La réalisation de cette thèse a nécessité :

- Le parcours de 706km et 840m à la souris soit la même distance que :
 - 1 287 140 marmottes à la queue leu leu
 - 157 318 voitures dans un embouteillage
 - 2 672 porte-avions en file indienne
 - 330 traversées du pont de Normandie
 - 14 traversées du tunnel sous la Manche
 - 1,2 plein de gazole en Citroën AX,

- L'utilisation de 8 372 272 touches de clavier,

- La réalisation de 6 856 648 clics de souris (6 596 782 gauches et 249 580 droits et 10 286 centres),

- L'accomplissement de 7 459 740 *scrolls* (coups de roulette de souris).

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe d'accueil « Immuno-Pharmaco-Génétique des Anticorps thérapeutiques » (IPGA, EA 3853) devenue en janvier 2008 l'équipe N°6 (Immuno-génomique et anticorps thérapeutiques) et l'équipe N°7 (Pharmacologie des anticorps thérapeutiques et investigations cliniques) de l'UMR CNRS 6239 Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer (GICC).

Le financement des trois premières années de thèse a été assuré par une bourse région Centre et celui de la 4^{ème} année par une allocation de la Société Française d'Hématologie (SFH).

Dans certaines stations du métro de Londres on peut lire cette phrase :

« A goal is a dream with a deadline », je pense que cette phrase résume bien l'expérience du doctorat.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ici toute ma gratitude à Monsieur le Docteur Guillaume Cartron, qui a codirigé mon travail au cours de ses quatre années de thèse. Je te suis particulièrement reconnaissant, non seulement pour ton aide, ta disponibilité, et la confiance que tu m'as accordée dès mon arrivée au laboratoire, mais aussi pour avoir su cultiver une atmosphère de travail particulièrement stimulante et chaleureuse : savoir se poser les bonnes questions, mettre en place les dispositifs pour y répondre, gérer les priorités, se fixer des dates limites et le plus difficile : les respecter...

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Pierre Bardos pour m'avoir accueilli au sein du service d'immunologie du Centre Hospitalier Universitaire Bretonneau de Tours et pour avoir accepté de codiriger mon travail de thèse. Vos conseils scientifiques, professionnels et même personnels avisés, votre dynamisme et votre bienveillance m'ont été particulièrement précieux pour mener ce travail à bien. J'ai particulièrement apprécié notre rencontre et nos échanges.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur Hervé Watier pour m'avoir accepté au sein de l'équipe de recherche en immunologie et m'avoir permis de mener ce travail de recherche à bien.

Je remercie respectueusement et chaleureusement Monsieur le Directeur André Pèlerin, Directeur de recherche INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Montpellier et Monsieur le Professeur Gilles Salles, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Equipe pathologie des cellules lymphoïdes de Lyon qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier Monsieur le Directeur Alain Lepape, Directeur de recherche CNRS, Centre de Distribution Typage et Archivage animal, Service d'Imagerie d'Orléans et Monsieur le Professeur Gilles Paintaud, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Pharmacologie des anticorps thérapeutiques et investigations cliniques de Tours qui ont accepté d'être membres de ce jury de thèse.

Je voudrais remercier tout particulièrement le service d'imagerie du CDTA d'Orléans qui a été en quelque sorte mon second foyer: le docteur Alain Lepape, le docteur Stéphanie Lerondel ainsi que Maryline Lemée, Stéphanie Rétif et Sabrina Pesnel.

M. Lepape vous avez été un véritable mentor pour moi, nos nombreux échanges ont été extrêmement formateurs. Votre génie scientifique n'a d'égal que votre bonne humeur, votre humour et votre sympathie. Je garderais un souvenir impérissable de notre rencontre.

Vous, les filles, "piqueuses hors pair", vous influez à votre service une excellente ambiance qui forcément se traduit sur la qualité des travaux. Votre professionnalisme et votre motivation à toute épreuve nous ont permis de mener à bien des protocoles "usines à gaz" nécessitant une réelle flexibilité. Bien que vous ayez un emploi du temps très chargé vous avez mené les protocoles à la perfection toujours dans la bonne humeur. J'ai beaucoup appris à votre contact.

Je voudrais sincèrement remercier Monsieur le Docteur Marc Ohresser pour ses conseils très précieux notamment en génétique dont il est spécialiste mais aussi dans de nombreux autres domaines scientifiques comme l'élaboration d'essais avec les contrôles adéquats. Tes conseils et remarques judicieux m'ont permis de combler certains manquements.

Je voudrais remercier Aurélie Sergent de l'IFIPS Optronique pour son aide très précieuse dans la réalisation d'une macro de traitement des images sous Matlab®.

Je voudrais aussi remercier :

- Les docteurs Gilles Paintaud et David Ternant, pour leur disponibilité cordiale et leur attention à mes données, m'ayant fait bénéficier de leur aide et de leur expertise dans la modélisation statistique de certains résultats et dans l'approche pharmacocinétique pharmacodynamique à la base de notre modèle.

- Anne-Claire Duveau, spécialiste des dosages ELISA à la conscience professionnelle irréprochable et rare. Extrêmement sympathique tu es toujours à l'écoute des besoins des autres. Merci pour tout.

- Le doctorant Jean Luc Bridot (dit docteur la poisse), le docteur Olivier Tillement et le docteur Stéphane Roux pour la richesse et le professionnalisme de notre collaboration dans le domaine des nano-particules. J'ai beaucoup apprécié ces protocoles, permettant d'ouvrir plus largement ma thématique de recherche. Je garderai aussi un excellent souvenir de notre rencontre.

- Le professeur Roland Sabatier pour la mise à disposition de faisceaux de neutrons du cyclotron orléanais jusqu'à des heures très tardives.

- Le docteur Patrick Vourc'h pour sa disponibilité et ses précieux conseils de clonages et de HPLC.

- Le docteur Isabelle Maillet et le docteur Bernhard Ryffel pour notre collaboration dans le cadre du protocole ROICIL. Ensemble nous avons pu surmonter les difficultés et mener à bien le projet. J'ai beaucoup apprécié votre expertise et votre motivation, collaborer a été un réel plaisir.

- Florentin Berthonnet, Elise Lefebvre, Aude Metzger, avec qui je souhaite vivement conserver au-delà de cette thèse la qualité de leur amitié.

- Annie Aurioux, Marie-Nöelle Marson et Patricia Vigneau pour leur soutien clairvoyant, leur aide sans faille et surtout leur très grande sympathie dont je garde une pensée très émue.

- Claude Gauthier, Michelle Pérez, Elizabeth Billant, Charlotte Magdeleine-Beuzelin, Nicolas Congy-Jolivet ainsi que toute la troupe du convivial laboratoire d'Immunologie pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

- Et enfin à toutes les autres personnes que j'aurais oublié plus ou moins volontairement.

RESUME

Ces dernières années, grâce aux progrès réalisés dans l'humanisation des anticorps monoclonaux recombinants (Acm-r), ceux-ci ont vu leur utilisation thérapeutique s'accroître, notamment dans le traitement du cancer. Parmi ces Acm-r, le rituximab (MabThera®, Rituxan®) est le premier à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis. Il s'agit d'un anticorps chimérique de type IgG1 kappa dirigé contre l'antigène de surface CD20 exprimé par plus de 95% des cellules lymphoïdes B. Le rituximab utilisé seul ou en association avec de la chimiothérapie a montré son efficacité dans le traitement des lymphomes de faible et de haute malignité. Néanmoins, lorsqu'il est utilisé en monothérapie, 30 à 50% des patients ne répondent pas au traitement. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette variabilité de réponse, parmi lesquelles l'importance de la masse tumorale, un faible niveau d'expression du CD20, la présence de formes solubles de CD20 ou encore de faibles concentrations sériques de rituximab. Ainsi, l'exposition au médicament et la masse tumorale pourraient être des facteurs de variabilité thérapeutique à prendre en compte pour optimiser individuellement le traitement des patients atteints de lymphome malin non hodgkinien.

L'objectif général de ce travail de thèse a été d'analyser les rôles respectifs du volume tumoral et des paramètres pharmacocinétiques dans la réponse au rituximab en utilisant des moyens d'imagerie adaptés aux modèles murins et à la cancérologie.

Dans une première partie de mise au point du modèle, nous avons utilisé une lignée lymphomateuse T (EL4) syngénique de souris C57B16J, transduite par le CD20 humain que nous avons transfectée avec le gène de la luciférase (EL4-huCD20-Luc). Nous avons ensuite défini les conditions expérimentales (nombre de cellules, voie d'administration, dose de luciférine de potassium, fond génétique, périodicité des examens) permettant de reproduire chez la souris le développement d'un lymphome agressif et disséminé à larges cellules B létal dans un délai de 30 à 40 jours après inoculation. Nous avons mis au point une méthode de quantification de l'intensité de bioluminescence des foyers tumoraux en prenant en compte le coefficient d'absorption de la lumière propre à la localisation anatomique de chaque tumeur lymphomateuse.

Dans une seconde partie nous avons étudié l'effet thérapeutique du rituximab sur ce lymphome. Une seule injection de rituximab à dose progressivement croissante (de 6 mg/kg à 40 mg/kg) a été réalisée 13 jours après l'inoculation des cellules lymphomateuses (temps nécessaire au développement d'un lymphome quantifiable par imagerie de bioluminescence). La concentration de rituximab circulant a été évaluée par une méthode ELISA adaptée à l'analyse de faibles volumes de plasma et à un modèle murin. Dans ce modèle, nous avons montré qu'il existait une relation entre la dose administrée et la survie des souris, la totalité des souris étant survivantes à la dose de 40 mg/kg. C'est à la dose de 20 mg/kg que nous avons retrouvé la plus grande variabilité de réponse au rituximab avec environ 23% de souris totalement guéries, 59% en réponse partielle et 18% avec une maladie en progression. Pour l'ensemble des souris recevant cette dose, nous avons déterminé précisément le volume tumoral au moment de l'injection du rituximab et évalué les concentrations de rituximab au décours du traitement. Nous

avons ainsi montré qu'il existait une relation significative entre le volume tumoral au moment de l'injection et la réponse au rituximab ; les souris présentant les plus faibles volumes tumoraux ayant une meilleure réponse et une survie prolongée. L'analyse de l'évolution des concentrations de rituximab au cours du temps nous a permis de montrer une très grande variabilité d'exposition à l'anticorps semblable à l'observation faite chez l'homme. Nous avons modélisé les concentrations de rituximab et la progression des foyers tumoraux par la construction d'un modèle concentration/effet (PK-PD) nous ayant permis de démontrer l'existence d'une relation entre l'efficacité du rituximab et le volume tumoral avant traitement.

Enfin dans un troisième volet nous avons utilisé le modèle cellulaire EL4-huCD20-Luc afin d'évaluer *in vitro* l'usage de particules d'oxydes de gadolinium ou de particules d'oxydes de gadolinium et de bore. Nous avons montré les qualités d'agents de contraste de ces particules pour l'imagerie à résonance magnétique. Nous avons aussi analysé l'important effet rayonnant de ces particules lors d'une irradiation sous un faisceau de neutrons après une étape d'internalisation des particules au sein des cellules.

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé.

Mots-clés : rituximab, CD20, bioluminescence quantitative, modèle murin, variabilité thérapeutique, lymphome non hodgkinien, volume tumoral, nano particules d'oxydes hybrides.

Laboratoire : UPRES-EA 3853 IPGA (Immuno-Pharmaco-Génétique des Anticorps thérapeutiques), Faculté de Médecine, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex, France → Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer (GICC), UMR CNRS 6239, Equipe 7 Pharmacologie des anticorps thérapeutiques et investigations cliniques, UFR Médecine, Bâtiment Vialle, BP3223, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex.

ABSTRACT

Tumor burden influence on individual response to treatment, with a monoclonal antibody: the rituximab, by quantitative bioluminescence imaging in a syngenic murine model of lymphoma expressing human CD20.

In the last years, owing to advances carried out in the humanization of recombinant monoclonal antibodies (rmAb), these have seen an increase in their therapeutic use, especially in the treatment of cancer. Among these rmAb, rituximab (Mabthera®) was the first to get an approval in Europe and in the United States. This is a chimeric antibody of the IgG1 kappa type specific for the CD20 surface antigen expressed by more than 95 percent of B cells lymphomas. Rituximab used alone or in association with chemotherapy has shown its efficiency in the treatment of low and high grade lymphomas. Nevertheless, when it was used alone in therapy, 30 to 50% of the patients didn't respond to the treatment. Several hypotheses were evoked to explain this variability in response to treatment, among which importance of the tumor burden, a low level of CD20 expression, presence of soluble forms of CD20 or weak serum concentrations of rituximab. Thus, exposure to the drug and the tumor burden value could be factors of therapeutic variability to take into account individually to optimize the treatment of the patients reached of non Hodgkin's lymphoma.

The overall objective of this work of thesis was to analyze the respective role of tumor burden and pharmacokinetic parameters in the response to the rituximab by using systems of imagery adapted to murine models and to cancerology.

In a first part of development of the model we used a T lymphoma cell line (EL4) syngenic of mouse C57Bl6J, transduced by the human CD20 and transfected with luciferase gene (EL4-huCD20-Luc). We then defined the experimental conditions (cells number, route of administration, amount of potassium salt luciferin, mice strain, examinations periodicity) allowing to reproduce in the mouse the development of an aggressive and disseminated lymphoma with larges B cells and lethal within 30 to 40 days after inoculation. We developed a quantification method of the intensity of bioluminescence of the tumoral sources by taking into account the absorption coefficient of the light depending on the anatomical localization of each lymphoma tumor.

In a second part we studied the therapeutic effect of the rituximab on this lymphoma model. Only one injection of rituximab with gradually increasing amount (6 mg/kg to 40 mg/kg) was carried out 13 days after the lymphoma cells inoculation (time necessary to the development of a quantifiable lymphoma by bioluminescence imaging). The circulating concentration of rituximab was evaluated by an ELISA method adapted to the analysis of small plasma volumes and to a murine model. In this model, we showed a relation between the administered dose and the survival of the mice; the totality of the mice being surviving to the amount of 40 mg/kg. It is with a dose of 20 mg/kg that we found the greatest variability in response to the rituximab with approximately 23% of mice in complete response, 59% in partial response and 18% with a progressive disease. For the whole of the mice receiving this amount, we precisely determined tumor burden at the time of the rituximab injection and evaluated the concentrations to the waning of the treatment. We thus showed that there was a significant relation between tumor

burden at the time of the injection and response to the rituximab; mice having lowest tumor burden having a better response and a prolonged survival. The analysis of the rituximab concentrations in the course of time enabled us to show a very important variability of exposure to the rituximab similar to the observation made for the human. We realized a model of the rituximab concentrations and of the tumors evolution, the construction of a concentration/effect (PK-PD) model allowing us to show the existence of a relation between the effectiveness of the rituximab and tumor burden before treatment.

Finally in a third part we used the cellular model EL4-huCD20-Luc in order to evaluate *in vitro* the use of gadolinium oxide particles or boron and gadolinium oxide particles. We checked the properties of contrast agents of these particles for the magnetic resonance imagery. We also showed the important radiating effect of these particles during an irradiation under a beam of neutrons after a step of insourcing of the particles within the cells. These results are very promising.

Discipline: Health and life sciences.

Keywords: rituximab, CD20, quantitative bioluminescence, murine model, therapeutic variability, non hodgkin's lymphoma, tumor burden, gadolinium oxide particles.

Laboratory: UPRES-EA 3853 IPGA (Immuno-Pharmaco-Genetics of therapeutics Antibodies), Faculté de Médecine, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex, France → Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer (GICC), UMR CNRS 6239, Team 7 Pharmacology of antibodies, clinical and therapeutic investigations directory, UFR Médecine, Bâtiment Vialle, BP3223, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex, France.

Abréviations

Â :	estimation du logarithme népérien de l'activité tumorale par le modèle
Acm-r :	anticorps monoclonal recombinant
ADCC :	antibody dependent cell cytotoxicity
ADNc :	acide désoxy ribonucléique copie
AFSSAPS :	agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Ag :	antigène
AMM :	autorisation de mise sur le marché
AMP :	adénosine mono phosphate
A-Mase :	acid sphingomyelinase
A_{nadir} :	logarithme népérien de l'activité tumorale minimale après administration de l'anticorps
ASH :	American Society of Haematology
ATP :	adénosine triphosphate
ATU :	autorisation temporaire d'utilisation
B :	bore
β2-m :	bêta 2 microglobuline
Bcl-2 :	B cell lymphoma sequence 2
BCR :	B-cell receptor
Be :	beryllium
BLI :	bioluminescence imaging
Cbp :	creb binding protein
CC :	cancer colorectal
CCD :	couple charged device
CDC :	complement dependent cytotoxicity
CDR :	complementary determining regions
CDTA :	Centre de distribution, typage et archivage animal
CHOP :	cytoxan, hydroxybicin, oncovin, prednisone
CMH I, II :	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
CoA-SH :	coenzyme A thioéthanolamine
C_{RTX} :	concentration plasmatique en rituximab
CTLA-4 :	cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4
CV :	coefficient de variation
CVP :	cyclophosphamide, etoposide (VP-16), cisplatine (platinol)
DCI :	dénomination commune internationale

DOTA :	tétra azacyclododécane tétra acétate
DSN :	dark shot noise (bruit de grenaille du courant d'obscurité)
DTPA :	diéthylène triamine penta acétate
E :	effet d'un médicament
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
E_{max} :	effet maximal susceptible d'être induit
EC₅₀ :	concentration du médicament nécessaire pour induire un effet égal à 50% de E _{max}
ERL :	enzyme de régénération de la luciférine
Fab :	fragment antigen binding
Fc :	fragment cristallisable
FcγR :	récepteur gamma au fragment Fc
FcRn :	récepteur néonatal au fragment Fc
FDA :	food and drug administration
FMNH₂ :	flavine mono nucléotidique réduite
FPN :	fixed pattern noise (bruit de motif)
g :	coefficient de Hill
Gd :	gadolinium
GFP :	green fluorescent protein
GOELAMS :	Groupe Ouest est d'Etude des Leucémies et Autres Maladies du Sang
Gy :	gray, un gray est la dose d'énergie absorbée par un milieu homogène d'une masse d'un kilogramme lorsqu'il est exposé à un rayonnement ionisant apportant une énergie d'un joule, 1 Gy = 1 J/kg.
HGL :	high grade lymphoma
HPLC :	high performance liquid chromatography
I¹³¹ :	iode 131
IFIPS :	Institut de Formation des ingénieurs Paris sud
IFN-α :	interféron α
IFX :	influximab
IgG :	immunoglobuline G
IGL :	intermediate grade lymphoma
In¹¹¹ :	indium 111
IPGA :	Immuno-pharmaco-génétique des anticorps thérapeutiques
IRM :	imagerie à résonance magnétique
JACS :	journal of the american chemical society
k₁₀ :	constante d'élimination de l'anticorps thérapeutique

Kcal :	kilocalorie
k_{drug} :	coefficient d'élimination de la tumeur par le rituximab
Km :	constante de Mickaelis Menten
k_{out} :	coefficient endogène de destruction de la tumeur
LED :	light emitting diode
LF :	lymphome folliculaire
LGL :	low grade lymphoma
LI :	lymphome indolent
LLC :	leucémie lymphoïde chronique
λ_{max} :	longueur d'onde maximale
ln :	logarithme népérien
LNH :	lymphome non hodgkinien
Log :	logarithme décimal
Luc :	luciférase
MAC :	membrane attack complex
MAPK :	mitogen activated protein kinase
MCL :	mantle cell lymphoma
Mcl-1 :	myeloid cell leukemia sequence 1
MOS :	metal oxide semiconductor (condensateur)
MS4A1 :	membrane spanning 4 domains, family A, member 1
NK :	natural killer
OG :	output gate (cellule de transfert du cumul de charges)
ORL :	oto rhino laryngologie
PBMC :	peripheral blood mononuclear cells
PBS :	phosphate buffered saline
PCL :	plasma cell lymphoma
PD :	pharmacodynamique
PK :	pharmacocinétique
QE :	quantum efficiency (efficacité quantique)
R-CHOP :	rituximab, cytoxan, hydroxybicin, oncovin, prednisone
rIL-4 :	recombinant interleukine 4
RN :	readout noise (bruit de lecture)
rpm :	rotations par minute
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
RTX :	rituximab
S :	concentration en substrat

SFH :	Société Française d'Hématologie
SG :	summing gate (cellule de cumul de charges)
Si :	silicium
SN :	shot noise (bruit de grenaille du courant d'obscurité)
SPA :	staphylococcic protein A
TEL :	transfert d'énergie linéique
TGF-α :	transforming growth factor α
TNF-β :	tumor necrosis factor β
TRC :	taux de réponse complète
TRG :	taux de réponse globale
TRP :	taux de réponse partielle
Tyr :	tyrosinase
UMR :	unité mixte de recherche
Vd :	volume de distribution
VEGF :	vascular endothelial growth factor
Vmax :	vitesse maximale d'une réaction enzymatique
XIAP :	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein
Y⁹⁰ :	yttrium 90

Table des Figures

Revue de la littérature

Figure 01 : Oxydation de la luciférine et passage par un état d'excitation.

Figure 02 : Structure chimique des principales luciférines.

Figure 03 : Bactéries bioluminescentes.

Figure 04 : Bioluminescence chez les cnidaires et les dinoflagellés.

Figure 05 : Insectes produisant deux lumières simultanément.

Figure 06 : Bioluminescence chez les lucioles.

Figure 07 : Dérivés structuraux de la luciférine.

Tableau 01 : Paramètres cinétiques de dérivés de la luciférine.

Figure 08 : Régénération de l'oxyluciférine en luciférine sous l'action de l'Enzyme de Régénération de la Luciférine.

Figure 09 : Alignement des séquences nucléotidiques et protéiques de la luciférase de *Photinus pyralis*.

Tableau 02 : Comparaison des principales caractéristiques des luciférases d'insectes.

Figure 11 : Arbre phylogénétique des principales luciférases d'insectes.

Figure 12 : Interaction du Coenzyme A avec la réaction de bioluminescence.

Figure 13 : Analyse de la structure de la luciférase de *Photinus pyralis* par cristallographie.

Figure 14 : Organisation schématique d'ensemble de la luciférase de *Photinus pyralis*.

Figure 15 : Analyse du site actif de la luciférase de *Photinus pyralis*.

Figure 16 : Spectre d'énergie des particules du rayonnement cosmique.

Figure 17 : Principe de la douche cosmique conduisant à la production de muons.

Figure 18 : Exemple de dispositif technique de mesure de la bioluminescence.

Figure 19 : Principe du transfert de charge à la base du fonctionnement du capteur CCD.

Figure 20 : Vue 3D simplifiée de l'organisation moléculaire d'un capteur CCD.

Figure 21 : Principe de cumul des charges : le binning.

Figure 22 : Différentes génération d'anticorps apparues avec l'humanisation des molécules.

Tableau 03 : Anticorps monoclonaux recombinants thérapeutiques actuellement sur le marché dans des indications de cancérologie.

Figure 23 : Structure tridimensionnelle des anticorps monoclonaux de type IgG1.

Figure 24 : Schéma de la structure du CD20.

Tableau 04 : Activité anti tumorale du rituximab en monothérapie dans des cas de lymphome non hodgkinien.

Figure 25 : Mécanismes pro-apoptotiques déclenchés par la liaison du rituximab à sa cible.

Tableau 05 : Interactions entre les différentes sous classes d'IgG humaines et les récepteurs FcγR des cellules immunitaires.

Figure 26 : La voie classique et la voie alterne d'activation du complément ; mode d'action de ces différentes protéines régulatrices.

Figure 27 : Variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement.

Figure 28 : Implication d'un polymorphisme génétique dans la variabilité de la réponse au traitement.

Figure 29 : Schéma de présentation du rôle du FcRn dans le maintien de l'homéostasie des IgG.

Figure 30 : Liaison d'une IgG à son récepteur le FcRn.

Figure 31 : Représentation des domaines CH2-CH3 de l'IgG impliqués dans la liaison au FcRn.

Figure 32 : Bilan des résidus aminés du fragment Fc des IgG impliqués dans les liaisons.

Première partie

Figure 33 : Spectre d'émission de la luciférine de potassium *in vitro* et *in vivo*.

Figure 34 : Absorption de la lumière émise par différents composés *in vivo*.

Figure 35 : Cinétiques d'apparition du signal de bioluminescence des cellules EL4-huCD20-Luc *in vitro* avec l'utilisation des différents binning.

Tableau 06 : Analyse de la modalité d'inoculation du lymphome EL4-huCD20-Luc

Figure 36 : Cinétiques d'apparition du signal de bioluminescence dans un modèle de tumeur sous cutanée : impact de la dose de luciférine et du moment de l'anesthésie.

Figure 37 : Délai entre l'inoculation des cellules tumorales et le début des examens de bioluminescence.

Figure 38 : Suivi de la domiciliation initiale des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc par bioluminescence.

Figure 39 : Suivi de la domiciliation initiale des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc par scintigraphie après marquage au Tc99m.

Figure 40 : Suivi de la domiciliation initiale des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc par fluorescence après marquage par sonde DID.

Seconde partie

Figure 41 : Mise en évidence chez l'homme de la relation entre l'exposition au traitement et la réponse des patients.

Figure 42 : Mise en évidence chez l'homme de la relation entre la concentration en rituximab dans le sérum des patients et leur volume tumoral.

Figure 43 : Relation dose - effet d'un traitement par une unique injection de rituximab, 13 jours après l'inoculation de cellules EL4-huCD20-Luc.

Figure 44 : Gammes étalons de dosage du rituximab.

Figure 45 : Gammes étalons de dosage de l'infliximab.

Tableau 07 : Paramètres de modélisation de la gamme étalon du rituximab.

Tableau 08 : Paramètres de modélisation de la gamme étalon de l'infliximab.

Tableau 09 : Paramètres de la modélisation pharmacocinétique.

Figure 46 : Pharmacocinétique de population du rituximab.

Tableau 10 : Paramètres de la modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique.

Figure 47 : Modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique.

Figure 48 : Modélisation pharmacocinétique du rituximab pour les différents profils de réponse observés.

Figure 49 : Analyse des populations cellulaires immunitaires recrutées au niveau de la tumeur lors d'un traitement par une dose de 20 mg/kg de rituximab.

Figure 50 : Modélisation PK-PD des animaux.

Troisième partie

Figure 51 : Efficacité des principaux types de rayonnement en fonction de la profondeur dans l'eau ou dans les tissus.

Figure 52 : Survie cellulaire et sensibilité à l'effet d'un rayonnement neutronique.

Figure 53 : Analyse de la toxicité immédiate des particules d'oxydes sur les cellules tumorales avant irradiation.

Figure 54 : Relation dose - effet de la concentration en particules sur l'activité métabolique cellulaire.

Figure 55 : Relation dose - effet de la dose d'irradiation sur l'activité métabolique cellulaire.

Figure 56 : Détermination des conditions de concentration en particules et d'irradiation pour l'obtention d'un effet biologique optimal.

TABLE DES MATIERES

RESUME	XI
ABSTRACT	XIII
ABREVIATIONS	XV
TABLE DES FIGURES	19
REVUE DE LA LITTERATURE.....	33
I - LA BIOLUMINESCENCE : UNE TECHNIQUE LUMINEUSE	33
A - BIOLOGIE DE LA BIOLUMINESCENCE.....	33
<u>1 - Réaction chimique conduisant à l'émission de photons</u>	<u>34</u>
<u>2 - Importante diversité des systèmes luminescents... 37</u>	<u>37</u>
a - Cas des bactéries bioluminescentes	37
b - Cas des cnidaires bioluminescents.....	39
c - Cas des dinoflagellés bioluminescents	41
d - Cas des insectes bioluminescents	43
B - LA LUCIFERINE SUBSTRAT DE LA REACTION ENZYMATIQUE	47
<u>1 - Bio distribution de la luciférine et cinétique du signal lumineux <i>in vivo</i></u>	<u>47</u>
<u>2 - Les dérivés de la luciférine.....</u>	<u>49</u>

3 -	<u>L'oxyluciférine, produit de la réaction luciférase – luciférine, peut être régénérée en luciférine par voie enzymatique</u>	52
C -	LA LUCIFERASE, ENZYME DE LA REACTION	54
1 -	<u>Analyse nucléotidique et protéique de la luciférase de <i>Photinus pyralis</i>.....</u>	56
2 -	<u>Origine et évolution moléculaire de la luciférase....</u>	59
3 -	<u>Le Coenzyme A : effecteur de la luciférase</u>	61
4 -	<u>Analyse cristallographique de la luciférase.....</u>	64
a -	Structure générale de la luciférase	64
b -	Site actif de la luciférase	68
D -	UTILISATION PRATIQUE DE LA BIOLUMINESCENCE	70
1 -	<u>Les origines structurales de la couleur dans la bioluminescence</u>	70
2 -	<u>Applications de la bioluminescence dans les biotechnologies et la recherche biomédicale</u>	71
3 -	<u>Interférence du rayonnement cosmique avec le signal de bioluminescence</u>	72
a -	Les sources du rayonnement cosmique	73
b -	La nature des rayonnements cosmiques.....	75
c -	Détection des rayonnements cosmiques	75
4 -	<u>Dispositif technique de mesure de la bioluminescence : du photon à l'électron.....</u>	78
a -	Principe de fonctionnement	78
b -	Mouvement des charges et lecture du signal	82

c - Le cumul des charges ou "binning"	82
(i) <i>Le binning de lignes</i>	84
(ii) <i>Le binning de pixels</i>	84
d - Signal de sortie et sensibilité spectrale	84
e - Les perturbations du signal : le bruit de fond	85
(i) <i>Bruit de motif (Fixed Pattern Noise FPN)</i>	85
(ii) <i>Bruit de grenaille (Shot Noise SN) ou bruit quantique</i>	86
(iii) <i>Bruit de grenaille du courant d'obscurité (Dark Shot Noise DSN)</i>	86
(iv) <i>Bruit de lecture (Readout Noise RN)</i>	86

**II - LE RITUXIMAB : UN ANTICORPS ANTI-CD20 DANS LES LYMPHO-
PROLIFERATIONS B. 87**

**A - UTILISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX RECOMBINANTS EN
CANCEROLOGIE 87**

B - LES DIFFERENTES GENERATIONS D'ANTICORPS 88

**C - APPROCHE THERAPEUTIQUE DES CANCERS PAR IMMUNOTHERAPIE
..... 90**

1 - Utilisation d'anticorps nus : immunothérapie
classique 90

2 - Utilisation d'anticorps couplés à un élément
radioactif ou à une toxine 91

**D - LE CD20 : UNE CIBLE ANTIGENIQUE DE CHOIX DANS LES
LYMPHOMES NON HODGKINIENS 94**

1 - Qualités d'une bonne cible antigénique en
immunothérapie passive 94

<u>2 -</u>	<u>Structure, fonction et signalisation du CD20</u>	<u>96</u>
<u>3 -</u>	<u>Modulation d'expression du CD20 : enjeux et</u>	
	<u>conséquences</u>	<u>99</u>
	a - Densité antigénique naturelle et cytotoxicité des	
	anticorps	99
	b - Modulation de l'expression par les cytokines	100
<u>4 -</u>	<u>Le rituximab : anticorps monoclonal anti-CD20..</u>	<u>101</u>
	a - Lymphome folliculaire non hodgkinien	101
	b - Lymphome non hodgkinien agressif diffus à grandes	
	cellules B.....	103

E - MODE D'ACTION DU RITUXIMAB SUR LES CELLULES CANCEREUSES
..... **103**

<u>1 -</u>	<u>Effets biologiques après la liaison à l'antigène.....</u>	<u>103</u>
	a - Translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques	
	103
	b - « Shaving » du CD20 par les effecteurs FcγRI+.....	104
<u>2 -</u>	<u>La liaison du rituximab sur le CD20 induit la voie de</u>	
	<u>l'apoptose</u>	<u>105</u>
<u>3 -</u>	<u>Fonctions effectrices liées à la portion Fc du</u>	
	<u>rituximab</u>	<u>107</u>
	a - CDC : la voie d'activation du Complément.....	107
	b - Recrutement d'effecteurs cellulaires	111

F - PHARMACOCINETIQUE DU RITUXIMAB ET FACTEURS DE VARIABILITE
DANS LA REPOSE CLINIQUE AU TRAITEMENT **112**

<u>1 -</u>	<u>Pharmacocinétique du rituximab</u>	<u>112</u>
------------	---	------------

2 -	<u>Facteurs influençant la pharmacocinétique du rituximab</u>	115
	a - Influence du niveau de l'expression en CD20 par les cellules tumorales	115
	b - Influence de la masse tumorale sur la réponse clinique	115
	c - Influence des polymorphismes génétiques sur la pharmacocinétique du rituximab	116
G -	LE FcRn, OU RECEPTEUR NEONATAL AU FRAGMENT Fc, RESPONSABLE DE LA DEMIE VIE DU RITUXIMAB	117
1 -	<u>Les rôles biologiques du FcRn.....</u>	119
	a - Le rôle de récepteur néonatal du FcRn	119
	b - Le rôle dans l'homéostasie des IgG	121
2 -	<u>La protéine FcRn et le gène <i>FCGRT</i></u>	121
3 -	<u>Site de liaison entre le FcRn et les IgG</u>	123
4 -	<u>Dépendance conformationnelle du site d'interaction entre FcRn et IgG.....</u>	126
5 -	<u>Rapport entre les sites d'interaction Fc/FcγRs et Fc/FcRn</u>	126
III -	CONCLUSION	128

TRAVAIL PERSONNEL	130
--------------------------------	------------

PREMIER ARTICLE : METHODE D'ANALYSE QUANTITATIVE DE LA BIOLUMINESCENCE ADAPTEE AUX ESSAIS DE BIMODALITE POUR LE SUIVI DU DEVELOPPEMENT TUMORAL DANS UN MODELE MURIN SYNGENIQUE DE LYMPHOME B EXPRIMANT LE CD20 HUMAIN.....	130
---	------------

I - INTRODUCTION.....	130
------------------------------	------------

II - POSTER DE PRESENTATION SCIENTIFIQUE	134
---	------------

III - ARTICLE.....	136
---------------------------	------------

IV - MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES A CEUX DE L'ARTICLE	173
---	------------

A - ANALYSES <i>IN VITRO</i>.....	173
--	------------

B - MISE AU POINT DES CONDITIONS D'INOCULATION DU LYMPHOME	174
---	------------

<u>1 - Choix de la modalité d'inoculation des cellules....</u>	<u>174</u>
--	------------

<u>2 - Détermination du nombre optimal de cellules � injecter.....</u>	<u>174</u>
--	------------

<u>3 - Utilisation de souris de fond génétique C57Bl6J ou C57Bl6J Tyr^{C2-J}.....</u>	<u>174</u>
---	------------

C - EXAMENS DE BIOLUMINESCENCE <i>IN VIVO</i>.....	175
---	------------

D - ANALYSE DE LA DOMICILIATION CELLULAIRE PAR FLUORESCENCE	175
--	------------

V - RESULTATS COMPLEMENTAIRES A CEUX DE L'ARTICLE.....	176
---	------------

A - VALIDATION DE L'UTILISATION D'UNE ZONE SPECIFIQUE A CHAQUE BINNING.....	176
B - MODALITE D'INOCULATION DU LYMPHOME	176
C - NOMBRE DE CELLULES INJECTEES.....	180
D - CINETIQUES DU SIGNAL DE BIOLUMINESCENCE <i>IN VIVO</i>	181
E - AGE DES ANIMAUX INOCULES	183
F - DEVELOPPEMENT TUMORAL ET FOND GENETIQUE (C57BL6J VERSUS C57BL6J TYR ^{C2-J})	183
G - DELAI ENTRE L'INOCULATION DES CELLULES EL4-HUCD20-LUC ET LE DEBUT DES EXAMENS DE BIOLUMINESCENCE	184
H - DOMICILIATION INITIALE DES CELLULES TUMORALES.....	185
VI - DISCUSSION ET CONCLUSION	189
VII - DEVELOPPEMENT DES MACROS DE TRAITEMENT DES IMAGES ET DE DELIMITATION DES REGIONS D'INTERETS.....	192
A - MACRO D'ELIMINATION DU BRUIT DE FOND ET DU RAYONNEMENT COSMIQUE.....	192
B - MACRO DE DELIMITATION DES REGIONS D'INTERET.....	193
 SECOND ARTICLE : ANALYSE DE L'INFLUENCE DU VOLUME TUMORAL AVANT TRAITEMENT SUR L'EXPOSITION ET LA REPONSE AU RITUXIMAB : APPROCHE PHARMACOCINETIQUE – PHARMACODYNAMIQUE PAR UN MODELE MURIN SYNGENIQUE BIOLUMINESCENT.	
I - INTRODUCTION	195
II - POSTER DE PRESENTATION SCIENTIFIQUE	199

III - ARTICLE	201
IV - MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES A CEUX DE L'ARTICLE	234
A - ANALYSE DE L'IMPACT DE LA TUMEUR SUR LA CONCENTRATION CIRCULANTE EN RITUXIMAB.....	234
B - TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITRONS A L'AIDE ZEVALIN MARQUE AU CUIVRE 64	234
C - RECRUTEMENT D'EFFECTEURS CELLULAIRES AU NIVEAU DE LA TUMEUR (ESSAIS ROICIL)	235
V - RESULTATS COMPLEMENTAIRES A CEUX DE L'ARTICLE.....	237
A - RELATION DOSE - EFFET DU RITUXIMAB	237
B - DOSAGE DU RITUXIMAB ET DE L'INFLIXIMAB DANS LE PLASMA ..	239
C - IMPACT DE LA TUMEUR SUR LA CONCENTRATION CIRCULANTE EN RITUXIMAB.....	240
D - MODELISATION PHARMACOCINETIQUE PHARMACODYNAMIQUE ET REPONSE AU TRAITEMENT.....	243
E - TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITRONS	245
F - RECRUTEMENT D'EFFECTEURS CELLULAIRES AU NIVEAU DE LA TUMEUR	248
VI - DISCUSSION ET CONCLUSION	250
A - MODELE PK-PD ET RELATION DOSE – CONCENTRATION - EFFET	250
1 - <u>Modélisation PK-PD</u>	<u>251</u>
2 - <u>Influence des cibles CD20 sur la PK du rituximab</u>	
	<hr/>
	252

a - Modélisation pharmacocinétique	253
(i) Pharmacocinétique de l'infliximab	253
(ii) Pharmacocinétique du rituximab chez les souris en réponse complète	253
(iii) Pharmacocinétique du rituximab chez les souris en réponse partielle	254
b - Interprétation de ces paramètres de modélisation .	254
B - BIODISTRIBUTION DE L'ANTICORPS.....	255
C - POPULATIONS CELLULAIRES IMMUNITAIRES	256
D - ETUDES CHEZ L'HOMME	257
VII - MODELISATION PHARMACOCINETIQUE PHARMACODYNAMIQUE	258

**TROISIEME ARTICLE : OPTIMISATION DE L'EFFET ANTI
TUMORAL DES NEUTRONS SUR DES CELLULES TUMORALES
VIA DES PARTICULES D'OXYDES DE GADOLINIUM..... 265**

I - INTRODUCTION	265
II - POSTER DE PRESENTATION SCIENTIFIQUE	272
III - ARTICLE	274
IV - MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES A CEUX DE L'ARTICLE	303
A - INTERNALISATION DE NANOPARTICULES HYBRIDES D'OXYDES DE GADOLINIUM ET DE BORE.....	303
B - IRRADIATION NEUTRONIQUE DES CELLULES ET DES PARTICULES. 	304
V - RESULTATS COMPLEMENTAIRES A CEUX DE L'ARTICLE.....	305

A - TOXICITE DES PARTICULES HYBRIDES D'OXYDES	305
B - RELATION DOSE - EFFET DES PARTICULES HYBRIDES BOOSTEES AU BORE SUR L'ACTIVITE METABOLIQUE CELLULAIRE	307
C - RELATION DOSE - EFFET DE L'IRRADIATION NEUTRONIQUE SUR L'ACTIVITE METABOLIQUE CELLULAIRE	309
D - DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE L'EFFET RADIO THERAPEUTIQUE DES PARTICULES BOOSTEES	311
VI - DISCUSSION ET CONCLUSION	314
CONCLUSION GENERALE	318
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	328
ANNEXES (SYSTEMES D'IMAGERIE ET MACROS D'ANALYSE D'IMAGES)	350
CURRICULUM VITAE	375

REVUE DE LA LITTÉRATURE

I - La bioluminescence : une technique lumineuse

La bioluminescence ou "lumière du vivant" est l'émission de lumière visible par des organismes vivants. Cette étonnante propriété a intrigué divers auteurs, cela depuis l'antiquité avec Aristote et Pline l'Ancien, dont les écrits rapportent le phénomène. Il s'est ainsi accumulé d'importantes observations, les cas de bioluminescence étant très abondants. Chez les animaux de très nombreuses classes d'invertébrés présentent le phénomène de bioluminescence, par contre, chez les vertébrés seuls certains poissons possèdent cette particularité. De plus, la bioluminescence est majoritairement représentée en milieu marin où, en profondeur, elle prend un caractère banalement commun puisque 95% des espèces se situant à 4000 mètres de profondeur possèdent cette capacité.

La lumière émise résulte de réactions chimiques qui activent une molécule susceptible d'émettre un photon. La découverte du premier système photochimique par Raphaël Dubois en 1887, laissait supposer l'universalité du processus. Depuis, les recherches ont fait apparaître la grande diversité des structures chimiques. Aujourd'hui plus d'une trentaine de systèmes différents ont été identifiés et décrits.

A - Biologie de la bioluminescence

Au cours de l'évolution la bioluminescence a indépendamment évolué de nombreuses fois ; ainsi les gènes responsables de la bioluminescence sont très différents d'un organisme à un autre. Chimiquement toutes les réactions de bioluminescence sont exergoniques, se réalisent en présence de dioxygène, les substrats (luciférines) et les enzymes (luciférases) sont très variés. La conséquence

de ces réactions est l'émission de photons de lumière visible (énergie d'environ 50kcal). Outre l'organisation structurale de la luciférine, de nombreux facteurs semblent influencer la couleur de la lumière émise comme l'enchaînement des acides aminés de la luciférase ou la présence de protéines accessoires (comme la GFP). Cette dernière est aujourd'hui utilisée dans les modèles de bioluminescence comme gène rapporteur en co-expression avec la luciférase. De même des facteurs comme la cinétique ou la modalité (flashes, lumière continue...) d'émission de la lumière peuvent varier d'un système à l'autre.

1 - Réaction chimique conduisant à l'émission de photons

La biologie cellulaire et la régulation de la bioluminescence varient selon les différents groupes. Tandis que les bactéries et quelques autres systèmes émettent de la lumière en continu, la plupart émettent la lumière en flashes dont la durée varie de 0,1 à 1 seconde. Cette rapidité réactionnelle nécessite un recyclage enzymatique rapide avec des réactifs mobilisés et isolés instantanément, ce qui implique une localisation de la réaction biochimique, au niveau du réticulum endoplasmique ainsi que des péroxysomes ¹.

Chaque fois qu'un photon de lumière visible est émis à la température de la pièce, par un organisme vivant, la réaction responsable du passage par un état excité, suivi de l'émission d'un photon, est un processus très exergonique. En effet, si l'on prend l'exemple, d'un photon dans la lumière verte ($\approx 500\text{nm}$) l'énergie associée correspond à 60kcal par mole. La réaction chimique que subit la luciférine est une réaction d'oxydation, ainsi elle conduit à l'obtention d'un produit : l'oxyluciférine. Cette réaction se déroule en plusieurs étapes et est caractérisée par un état de transition excité électroniquement généralement noté P^* . Il est défini par l'énergie qu'il porte et sa durée de vie qui est extrêmement courte. Cette dernière

n'est que de quelques nanosecondes et ne peut être différenciée du simple état d'excitation ² (Figure 01 A).

Dans une réaction *in vitro* luciférase / luciférine, les événements cinétiques se produisent sur une échelle de temps extrêmement brève. Ainsi pour étudier le phénomène il est commode d'utiliser le système chimique adapté à la bioluminescence le plus simple possible : la décomposition des dioxétanones (bioluminescence de l'aéqurine, isolée de certaines méduses) ³ (Figure 01 B). Cette réaction passe par des composés péroxydiques riches en énergie et se poursuit pour former du CO₂ et un composé carbonyle excité, libérant à son tour une grande énergie. Bien que cette cascade de réactions chimiques n'ait été prouvée que dans le cas de certains modèles, aujourd'hui elle reste l'hypothèse d'explication de la réaction de bioluminescence, y compris dans les cas de bioluminescence par les lucioles, les cnidaires, ou encore les bactéries, qui n'impliquent pas d'intermédiaire réactionnel de type dioxétanone ⁴.

Différentes hypothèses ont alors été émises pour expliquer cette réaction dont celle du passage de l'état d'excitation à un autre fluorophore conduisant à l'émission des photons avec une énergie plus grande (Figure 01 C). Cependant cette hypothèse ne peut être considérée comme satisfaisante, car la production de photons trouve son origine dans un produit ou un composé intermédiaire directement lié à l'enzyme. La luciférase peut elle-même influencer sur le spectre d'émission en modifiant l'environnement du chromophore et donc ses états d'excitation. Chez la luciole, la substitution de certains acides aminés de la luciférase conduit à un décalage important dans le spectre d'émission. Chez les bactéries et les cnidaires, les chromophores de protéines accessoires associées aux luciférases peuvent servir d'émetteurs alternatifs.

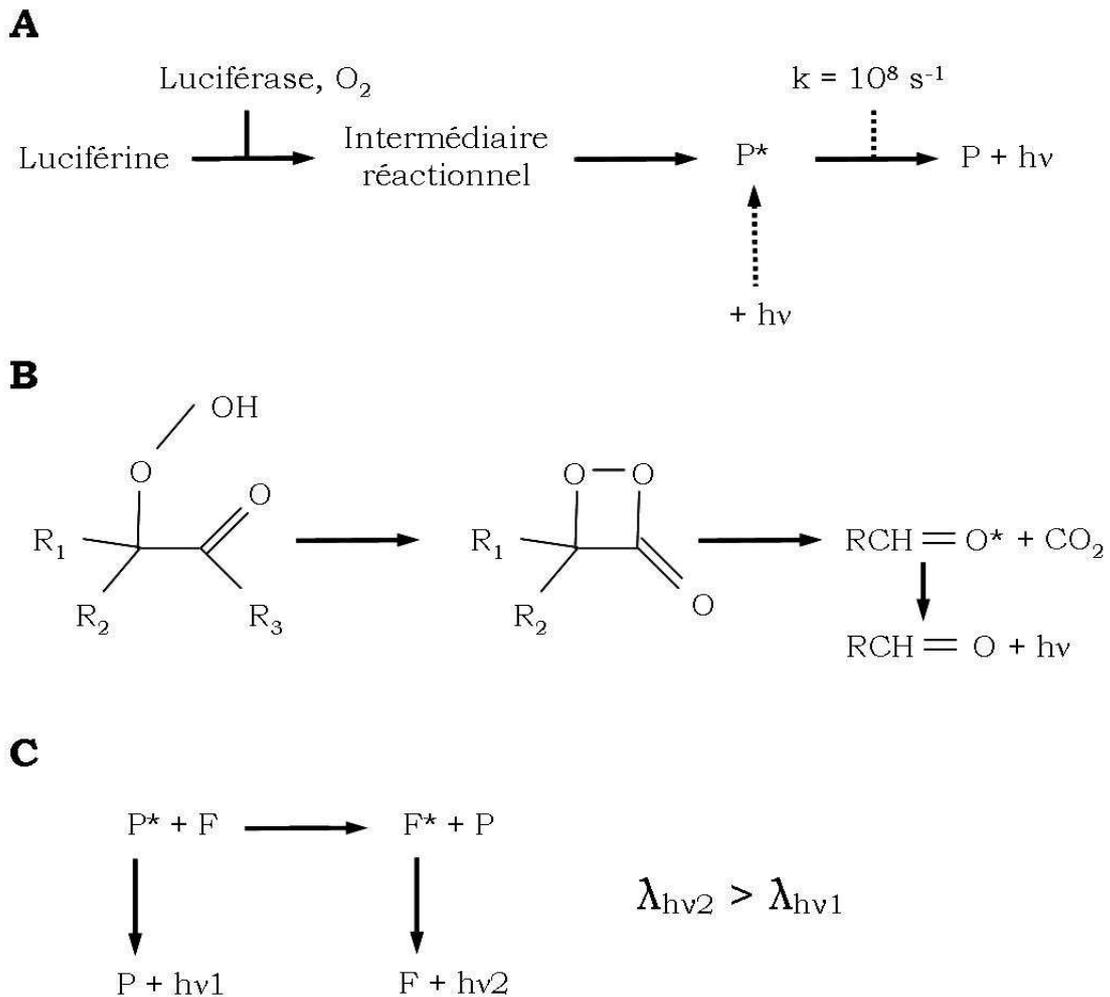


Figure O1 : Oxydation de la luciférine et passage par un état d'excitation.

A : Schéma réactionnel de l'oxydation de la luciférine par la luciférase et d'émission de lumière (hν). Le produit P passe par un état transitoire excité, noté P*, lors de l'oxydation. La vitesse de cette désexcitation est définie par la constante k.

B : Structure de l'hydroperoxyde de luciférine, de l'intermédiaire dioxétanone à 4 atomes et schéma de la dégradation en composé carbonylé. Les groupes substituants de la molécule de luciférine sont notés R₁, R₂ et R₃.

C : Transfert non radiatif d'énergie entre l'état excité du produit P et le chromophore de la GFP noté F. Ce dernier se désexcite ensuite en émettant une lumière de longueur d'onde plus élevée que celle du produit de départ.

(Figure établie d'après les travaux de Turro, 1978 et Shimomura, 1982)

2 - Importante diversité des systèmes luminescents

Dans la nature on peut trouver de très nombreux systèmes luminescents (luciférase et luciférine) ^{5,6} fonctionnant de façon complètement différente (Figure 02).

a - Cas des bactéries bioluminescentes

La bioluminescence bactérienne est un parfait exemple de réaction biochimique n'impliquant pas d'intermédiaire de type dioxétanone. La luciférase catalyse l'oxydation d'un aldéhyde à longue chaîne carbonée et d'une flavine mono nucléotidique réduite, FMNH₂ (Figure 02 A). La première étape de la réaction catalytique est la formation d'un complexe hydropéroxyde de flavine-luciférine ⁷. Lors d'une seconde étape, l'aldéhyde réagit avec ce complexe pour former un intermédiaire dont la durée de vie détermine la cinétique de la réaction. L'émetteur identifié grâce à son spectre d'émission est le complexe enzyme-(4a-hydroxyflavine). Les luciférases de toutes les bactéries bioluminescentes connues sont des hétérodimères. Elles sont codées par les gènes lux A et lux B, adjacents, dans un opéron lux ⁸. Cet opéron contient également les gènes lux C, lux D et lux E qui codent pour des protéines qui interviennent dans la synthèse de l'aldéhyde. Lux A et lux B ont été clonés et exprimés en système hétérologue afin d'être utilisés comme gènes rapporteurs. La caractérisation de ce système a permis de mettre en évidence un mode de communication intercellulaire. Les bactéries sécrètent une molécule diffusible, appelée auto-inducteur, qui agit comme une phéromone. Lorsque la concentration en auto inducteur est telle qu'elle induit l'expression des gènes de l'opéron lux, les bactéries deviennent bioluminescentes ⁹. Ainsi en détectant le niveau d'auto inducteur, les cellules sont capables d'estimer leur densité et d'initier les processus comme l'expression de la luciférase et de ses partenaires, seulement lorsqu'elles sont suffisamment nombreuses pour être vues.

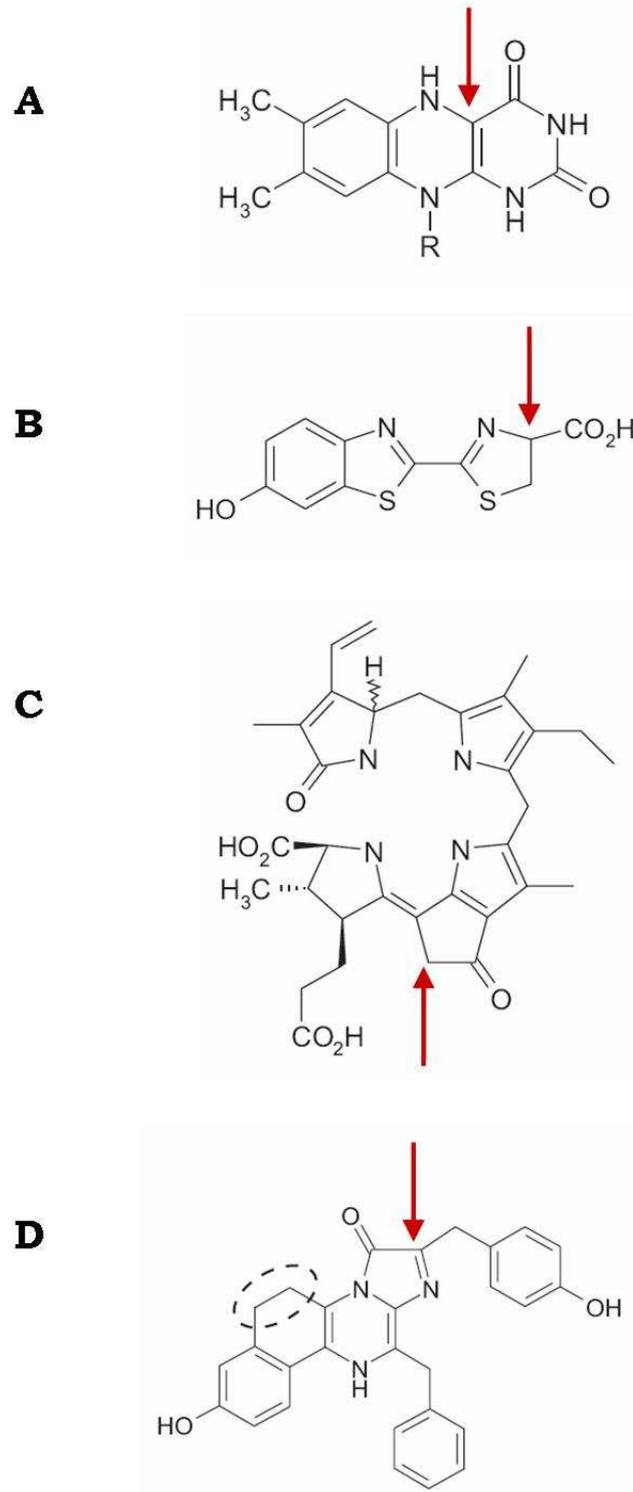


Figure 02 : Structure chimique des principales luciférines.

- A : Flavine Mononucléotidique réduite FMNH₂ (bactéries).
 B : Firefly luciférine (lucioles).
 C : Luciférine de dinoflagellés (dinoflagellés).
 D : Coelentérazine (cnidaires).

Les flèches rouges indiquent le carbone impliqué dans la réaction d'oxydation.
 (Figure établie d'après les travaux de Dunlap, 1981 ;Tark, 1999)

C'est le cas des colonies hébergées par l'organe lumineux d'un hôte comme c'est le cas pour certains poissons et calmars (Figure 03).

b - Cas des cnidaires bioluminescents

De nombreux cnidaires tels que les méduses *Renilla reniformis* et *Aequorea victoria* sont bioluminescents (Figure 04 A). Dans ces systèmes, l'émission de lumière est déclenchée par le calcium via des mécanismes cellulaires et moléculaires différents selon les espèces. Bien que les systèmes bioluminescents des anthozoaires (ex : *Renilla*) et des hydrozoaires (ex : *Aequorea*) soient assez différents, ils utilisent la même luciférine : la coelentérazine (7Himidazo[1,2-a]pyrazin-3-one, M=423 g/mol) (Figure 02 D).

Chez *Renilla*, une sulfokinase retire un groupement sulfate du précurseur de la coelentérazine ¹⁰. La coelentérazine se fixe ensuite à une protéine (luciferin-binding protein, 18,5 kDa, possédant trois sites de liaison du calcium) et est libérée en présence de calcium. Son oxydation est catalysée par la *Renilla* luciférase (35kDa), la réaction implique un intermédiaire réactionnel dioxétanone (molécule excitée et instable) qui se décompose en CO₂ et luciférine oxydée (coelentéramide). Le spectre d'émission de la lumière émise possède un pic à 480nm, soit dans le bleu-vert.

Chez *Aequorea*, la protéine qui émet la lumière, l'aéquorine, est un intermédiaire réactionnel stable de la luciférase ³. Une forme oxydée (hydropéroxyde) de la coelentérazine est déjà liée à la protéine, appelée apoaequorine. Le calcium, pour lequel la protéine possède aussi trois sites de liaison, déclenche un flash de lumière. Ce flash possède un pic d'émission à 469nm, soit dans le bleu, et il résulte de l'oxydation complète de la coelentérazine via un intermédiaire dioxétanone (Figure 04 C). Ainsi dans la biologie cellulaire et moléculaire, le calcium, au lieu de déclencher le biodisponibilité de la luciférine,

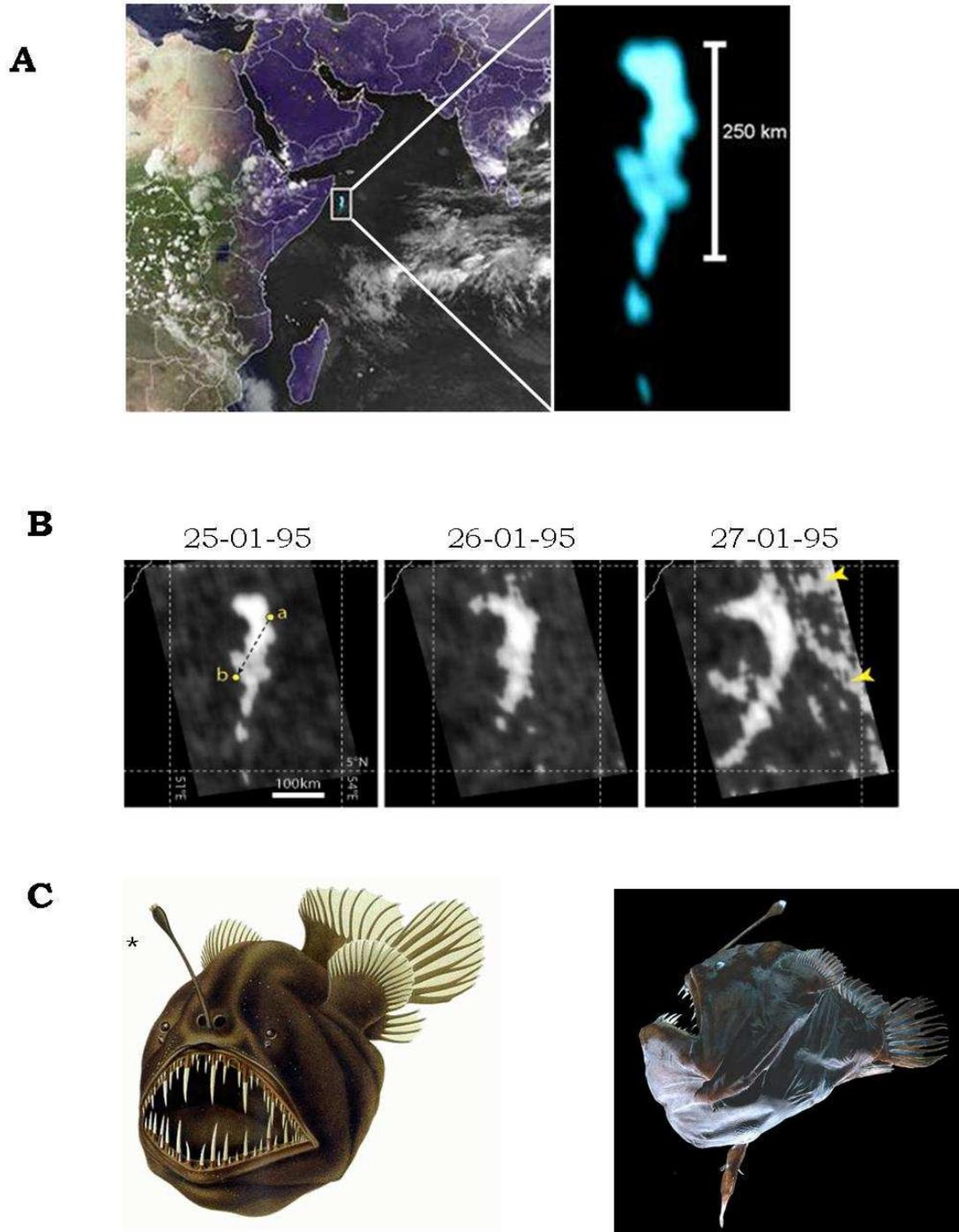


Figure 03 : Bactéries bioluminescentes.

A : Colonie de bactéries bioluminescentes identifiées par satellite en lumière visible (Miller et Haddock, 2005).

B : Observation de la même colonie les 25, 26 et 27 janvier 1995 : sous l'effet de l'auto inducteur les bactéries se regroupent (Photos : US Navy, Atlanta, USA).

C : Le "humpback angler", *Melanocetus johnsonii*, poisson des profondeurs qui possède un leurre (*), expansion frontale dans laquelle se trouve des bactéries bioluminescentes, dont il se sert pour chasser. (Photos : Deep Sea, CA, USA)

agit sur un intermédiaire réactionnel ¹¹. D'autres protéines fonctionnant comme l'aéquorine ont été découvertes et étudiées, c'est le cas de l'obéline (*Obelia longissima* et *Obelia geniculata*), de la mitrocomine (*Mitrocoma cellularia*) et de la clytine (*Clytia gregaria*). Ces protéines appartiennent à la famille des photoprotéines ^{12,13}.

Chez *Obelia*, au niveau de l'épithélium conducteur (membrane directement en contact avec le milieu extérieur), des potentiels d'action déclenchent des courants calciques dans les cellules support. Par la suite des jonctions de type gap transmettent le flux de calcium aux photocytes. C'est dans ces dernières cellules que la réaction de bioluminescence se produit ¹⁴. Les trois domaines de liaison du calcium de l'aéquorine, des photoprotéines en général ¹⁵, et de la protéine de liaison de la luciférine de *Renilla* présentent de fortes homologues avec des domaines présents dans d'autres protéines de liaison du calcium comme la calmoduline ¹⁶.

c - Cas des dinoflagellés bioluminescents

Les dinoflagellés sont des organismes unicellulaires du plancton pouvant libérer des toxines très puissantes. Parmi les nombreux organismes bioluminescents de cette famille, c'est *Gonyaulax poledra* qui a été le plus étudié. Etant donné que sa luciférine réagit avec toutes les luciférases de dinoflagellés testées jusqu'à présent, il constitue un exemple très représentatif de cette famille (Figure 04 B). La structure chimique de la luciférine de dinoflagellé, étudiée chez *Pyrocystis lunula* ¹⁷, ne présente aucune homologie avec les autres luciférines (Figure 02 C).

Cette molécule possède un noyau tétrapyrrole linéaire présentant une certaine homologie avec la molécule de chlorophylle et est très sensible à l'auto-oxydation. L'émission de lumière a seulement lieu dans le cas de la réaction enzymatique.

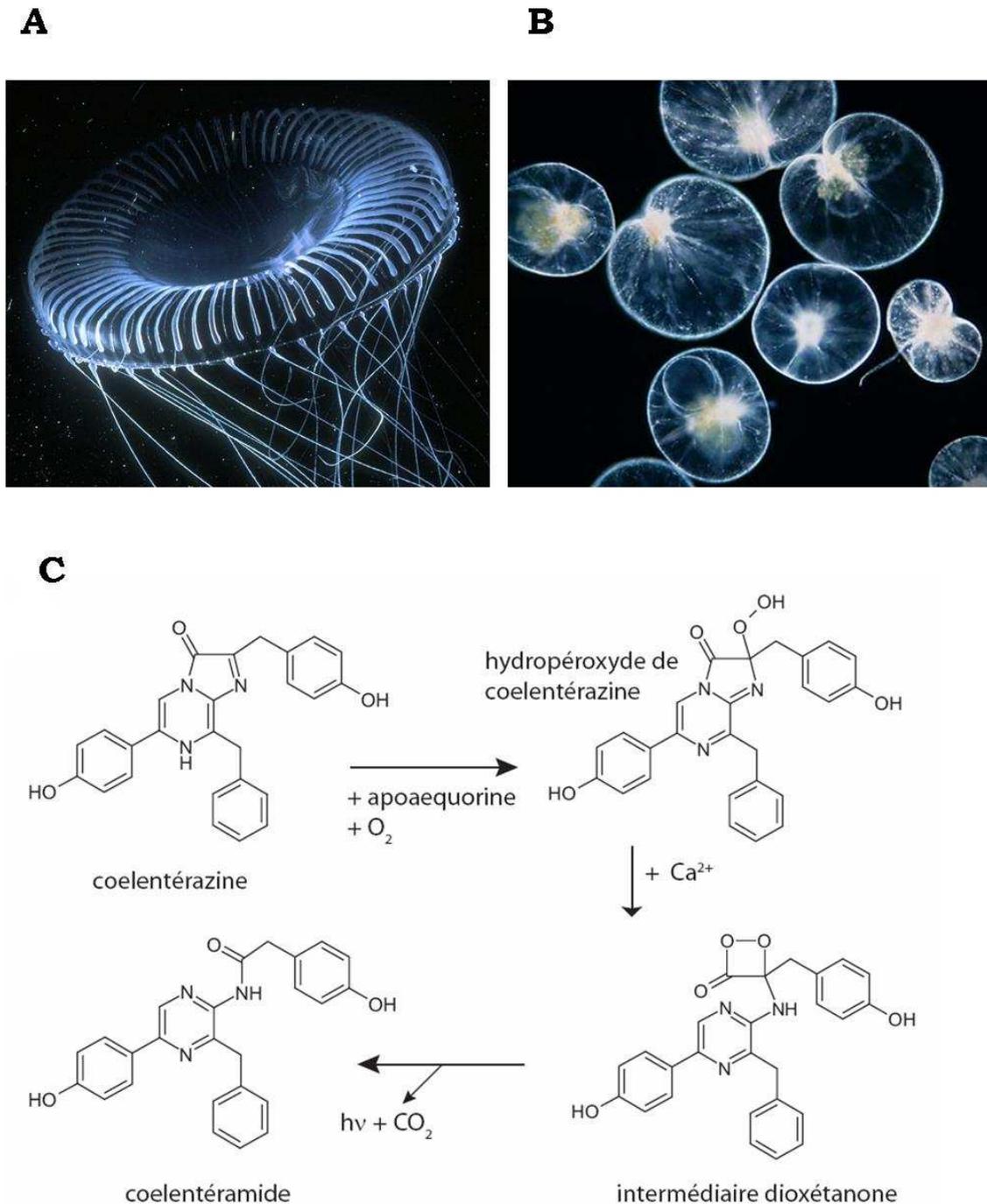


Figure 04 : Bioluminescence chez les cnidaires et les dinoflagellés.

A : Photographie de *Renilla reniformis*, méduse bioluminescente (Photo : www.biosynth.com).

B : Photographie de *Noctiluca scintillans*, dinoflagellé bioluminescent (Photo : *Micscape Magazine*).

C : Schéma de l'oxydation de la coelentérazine par l'aéquorine chez *Aequorea* conduisant à l'émission de lumière bioluminescente (Figure établie d'après : Srikantha, 1996).

Contrairement au produit de la réaction dans le cas de la bioluminescence, la luciférine de dinoflagellé non oxydée possède des caractéristiques de fluorescence avec un spectre qui correspond à celui de la bioluminescence, en présentant notamment un pic d'émission vers 470nm ¹⁸.

Chez *Gonyaulax polyedra* deux protéines sont impliquées dans l'émission de lumière. La première est une protéine de liaison à la luciférine, c'est un dimère constitué de deux sous unités identiques de 75,5kDa. Elle séquestre la luciférine à pH physiologique, la protégeant ainsi de l'auto oxydation, elle la libère lorsque le pH descend en dessous de 6 ¹⁹. L'autre protéine est une luciférase de 137kDa, elle est inactive à pH 8 et devient active lorsque le pH descend aussi en dessous de 6. La régulation de la réaction est donc pH dépendant. Les deux protéines sont produites et concentrées dans des organelles cytoplasmiques spécifiques, appelés scintillons ²⁰. La luciférase présente trois séquences répétées et homologues de 377 acides aminés. Chacune de ces séquences code pour un peptide ayant sa propre activité catalytique ²¹. *In vivo*, la bioluminescence est émise sous forme de flashes de lumière extrêmement brefs (moins de 100 ms). Certaines hypothèses avancent l'intervention dans ce modèle de potentiels d'actions. Ces derniers seraient à l'origine de l'ouverture de canaux à protons au niveau de la membrane des scintillons, qui conduiraient à l'acidification de leur contenu et permettraient ainsi la production de lumière.

d - Cas des insectes bioluminescents

La plupart des insectes bioluminescents sont des scarabées (Coléoptères), ils appartiennent aux familles des *Elateridae* (tels que les scarabées taupins), les *Phengodidae* (tels que le "ver chemin de fer" qui a la particularité de produire en même temps une lumière rouge et une lumière verte ²², (Figure 05)) ou encore les *Lampiridae* (tels les lucioles et vers luisants). Chez ces animaux la chimie de la

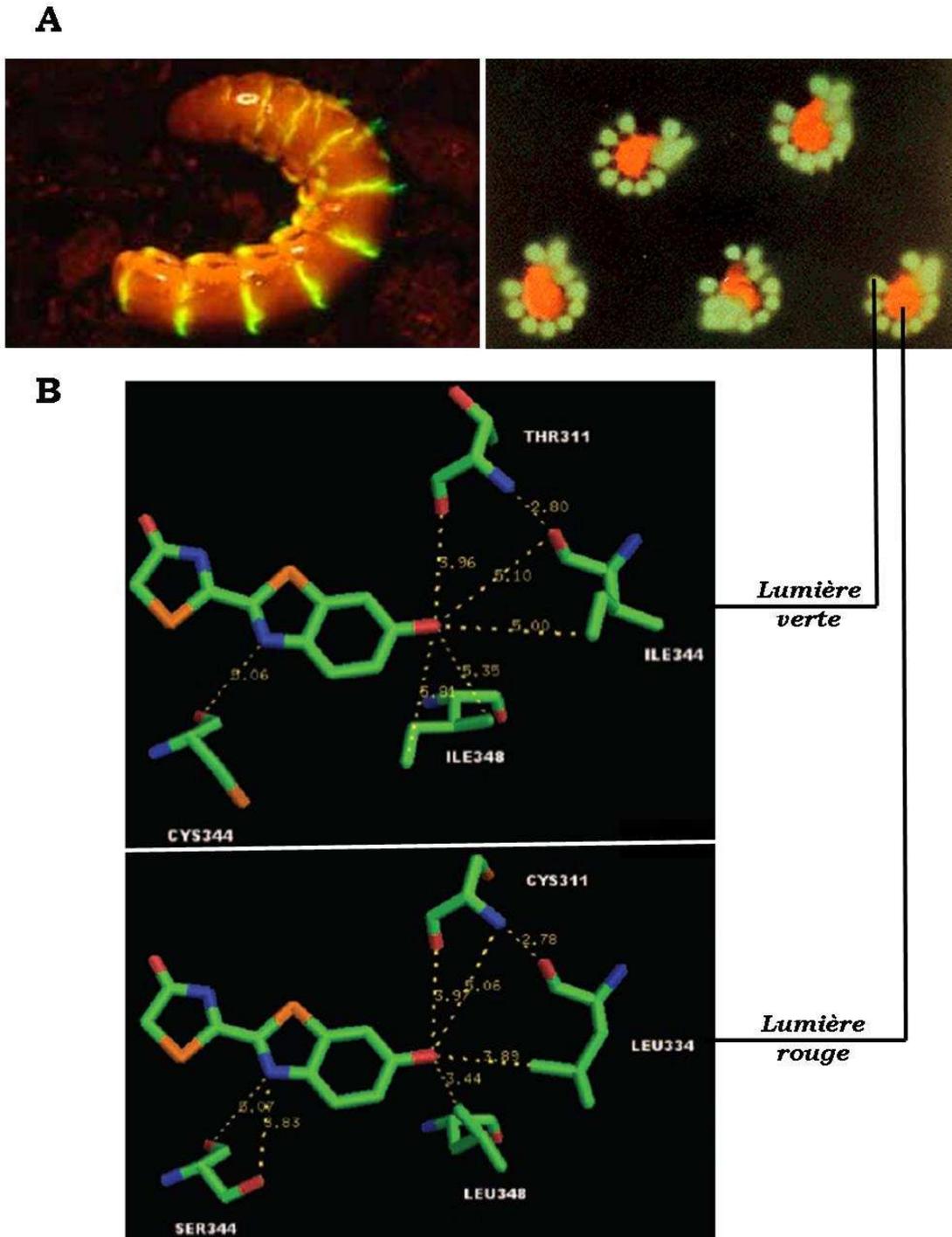


Figure 05 : Insectes produisant deux lumières simultanément.

A : Vues de femelles *Phengodes* (*Rail road worm* ou *ver chemin de fer*), les anneaux de son corps émettent une lumière verte tandis que la lumière émise par sa tête est rouge. (Photos : Hastings, Harvard, UK).

B : Modèles tridimensionnels des deux luciférases complexées avec l'AMP et l'oxyluciférine, la différence entre les deux couleurs est due à 4 acides aminés localisés au niveau du site réactionnel (Figure établie d'après les travaux de Viviani, 2007).

réaction de bioluminescence est similaire ou très proche, en effet l'ensemble des luciférasés testés à ce jour sont capables de réagir avec la luciférine de luciole (firefly luciferin) ²³ (Figure 06 A et 06 B).

La luciférine de luciole est un benzothiazol-thiazole (Figure 02 B), cette molécule est aussi très différente de l'ensemble des autres luciférines (Figure 02), cependant la réaction passe aussi par un intermédiaire instable riche en énergie, une dioxétanone. Tout d'abord, la luciférase catalyse la condensation d'une molécule de luciférine avec une molécule d'ATP en présence d'ions Mg^{2+} , puis active la réaction de l'adénylate formé avec l'oxygène conduisant à la cyclisation du peroxyde. L'énergie de l'oxydation est ainsi donnée par l'ATP qui se transforme en AMP. C'est alors la rupture de la dioxétanone (et non pas l'hydrolyse de l'adénylate) qui fournit l'énergie nécessaire (soit environ 50kcal) pour passer à l'état excité de l'oxyluciférine ²⁴. Une molécule de CO_2 est libérée. L'oxyluciférine excitée se retrouve à l'équilibre entre 2 formes : énol et kéto. Le retour à l'état normal s'accompagne de l'émission d'un photon. L'émission d'un photon à partir d'une molécule d'oxyluciférine sous forme énol se réalisera avec une énergie qui le situera dans les couleurs vert - jaune. Par contre dans le cas où la forme est kéto, le photon émis sera plutôt d'une énergie qui le situe dans la lumière rouge ²⁵ (Figure 06 C). L'efficacité de cette réaction a été rapportée comme l'émission d'un photon par molécule de luciférine oxydée. Bien que la luciférine soit identique chez tous les coléoptères bioluminescents, les pics de leurs spectres d'émissions respectifs s'étendent sur une très large gamme de longueur d'onde, allant du vert à l'orange ²⁶. Cependant la différence d'énergie entre un photon de 560nm et un photon de 630 nm n'est que de 6kcal/mol. Les différences dans l'émission dépendraient ainsi probablement de l'énergie de l'état excité de l'oxyluciférine elle-même influencée par la structure tertiaire du site catalytique impliqué dans la réaction ²⁷.

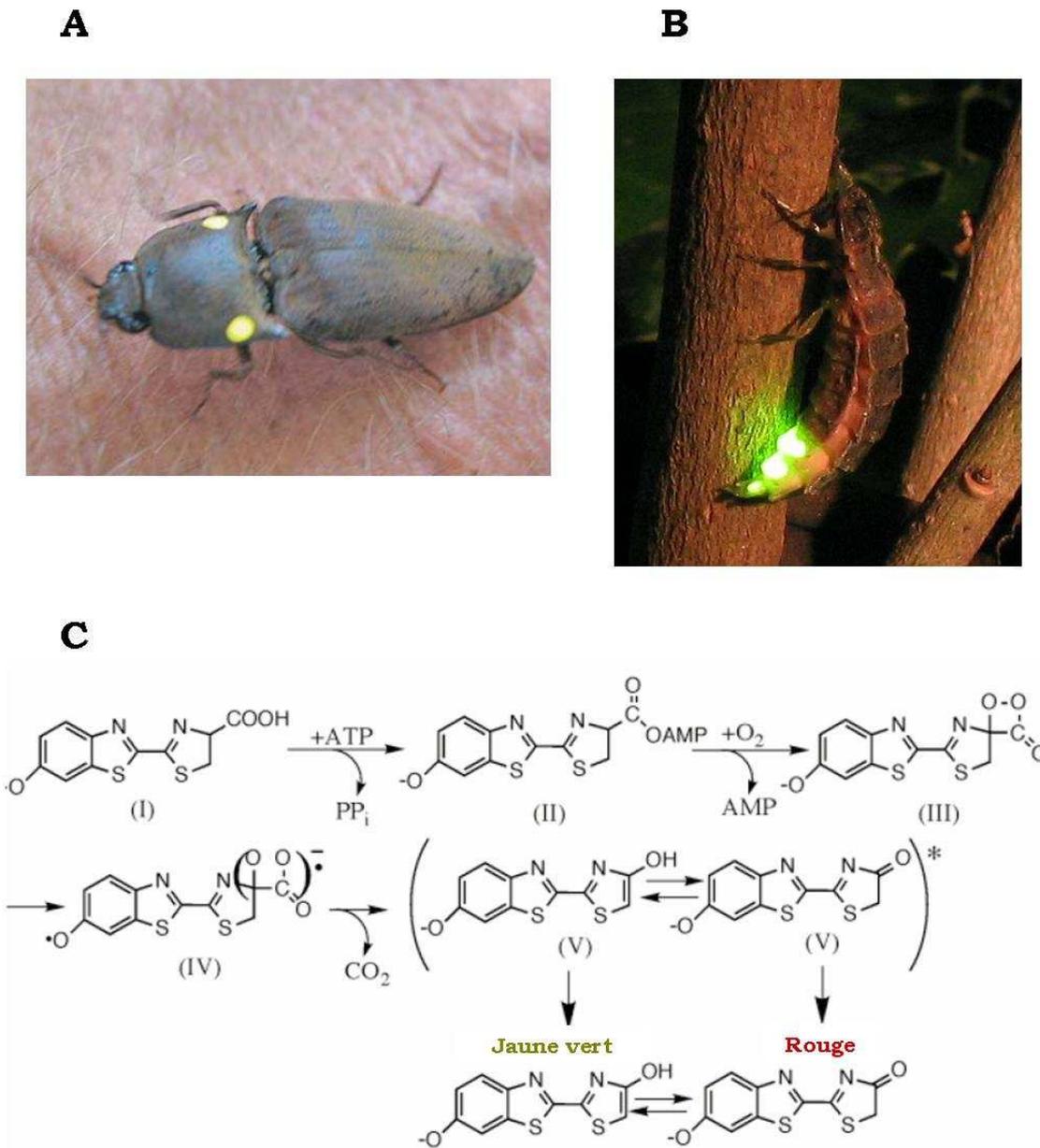


Figure 06 : Bioluminescence chez les lucioles.

A : Vue d'une femelle scarabée bioluminescente : *Pyrophorus noctilicus* (Photo : www.insectariumvirtual.com)

B : Vue d'une femelle luciole bioluminescente : *Lampyris noctiluca* (Photo : Gumenyuk VI).

C : Réaction de bioluminescence chez la luciole. Le groupement carboxylate de la luciférine de luciole (I) est activé lors de sa réaction avec une molécule d'ATP et forme l'adénylate de luciférine (II). Ce composé réagit avec une molécule d'O₂ afin de cycliser le peroxyde (III). Cette réaction libère une molécule d'AMP. La rupture du noyau dioxétanone (IV) instable libère une molécule de CO₂ et conduit à l'état excité de l'oxyluciférine (V). Cette dernière se trouvant à équilibre entre les formes énol et keto. Le retour à l'état normal s'accompagne de l'émission d'un photon dont la longueur d'onde dépend de la forme de la molécule. (Figure établie d'après Baldwin, 1996).

La luciférase de luciole est une protéine monomérique de 62kDa ne possédant pas de groupement prosthétique. Son ADNc ainsi que celui de plusieurs autres luciférases de scarabées ont été clonés et exprimés dans *Escherichia coli* ainsi que dans de nombreuses cellules eucaryotes ²⁸.

B - La luciférine substrat de la réaction enzymatique

La luciférase catalyse la transformation du substrat naturel, la D-luciférine, en présence de l'ion magnésium et d'ATP en oxyluciférine, cette réaction étant accompagnée de l'émission d'un photon. L'imagerie de bioluminescence des cellules et des animaux apporte de très gros avantages avec notamment un excellent rapport signal/bruit par rapport à la plupart des autres techniques d'imagerie, comme la fluorescence, où les cellules et les tissus n'émettent pas suffisamment de lumière par rapport au bruit de fond endogène à l'animal ou due à l'appareil de mesure ²⁹. C'est pourquoi l'étude des propriétés de l'enzyme et du substrat constitue un formidable champ d'investigation ^{30,31}. Si de nombreuses études se sont intéressées aux mesures et modifications de l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires, les cellules entières ou les animaux, très peu d'études ont porté sur le substrat : la luciférine ou ces analogues réactionnels.

1 - Bio distribution de la luciférine et cinétique du signal lumineux

in vivo

Dans la littérature on trouve la description d'un modèle permettant l'étude de l'activité de l'enzyme : cette dernière est réalisée avec l'utilisation de cellules rénales embryonnaires humaines ³¹. Ce modèle a permis de démontrer que le passage de la membrane plasmique ne constituait pas une limite à la biodistribution de la luciférine. De plus la décroissance de la concentration en luciférine se réaliserait au sein de la cellule. Cette dégradation existerait sous dépendance de protéines

chaperonnes et ainsi serait extrêmement variable d'un type cellulaire à l'autre. Certains paramètres intervenant dans la modification de la vitesse de la réaction enzymatique ont été identifiés, comme des inhibiteurs de l'activité enzymatique cellulaire (pyrophosphates) ou des composés se liant à la luciférine et interdisant son oxydation ³¹. L'utilisation de luciférine radiomarquée à l'iode 123 permet d'étudier la biodistribution du substrat chez l'animal ³². Les intensités de radioactivités mesurées dans les différents organes et tissus ne sont pas identiques ce qui révèle une biodistribution inégale du substrat ³³. L'utilisation de techniques d'imagerie de bioluminescence requiert une bonne compréhension des propriétés pharmacocinétiques pharmacodynamiques du substrat enzymatique dans le modèle étudié. Ainsi les recommandations habituelles de l'utilisation de luciférine sont 150 mg/kg de poids corporel (recommandations Xenogen®). Pour une étude chez la souris, un animal de 10-12 semaines a un poids d'approximativement 25 g ce qui correspond à une dose injectée de 3,750 mg par animal et par séance d'imagerie optique. Il est reconnu qu'à cette concentration, le substrat sature l'enzyme présente dans les cellules. La démonstration de cette saturation est réalisée en augmentant la dose de luciférine et en observant que le taux de bioluminescence n'augmente pas ³⁴. Cependant de nombreux facteurs spécifiques au modèle étudié peuvent influencer ce paramètre comme le niveau de vascularisation des cellules ou encore la taille des foyers dans le cas d'étude de tumeurs bioluminescentes ³⁵. L'intensité du signal de bioluminescence, dépend fortement du système cellulaire. Généralement le signal lumineux débute 15 minutes après l'injection de la luciférine et commence à chuter après 20 minutes ³⁴. Cependant la cinétique du signal est très variable d'un modèle à l'autre ³⁶.

Il est ainsi capital de fixer les paramètres de mesure spécifiques au modèle avant le début des essais. C'est pourquoi les "substrats luciférine" qui possèdent des temps

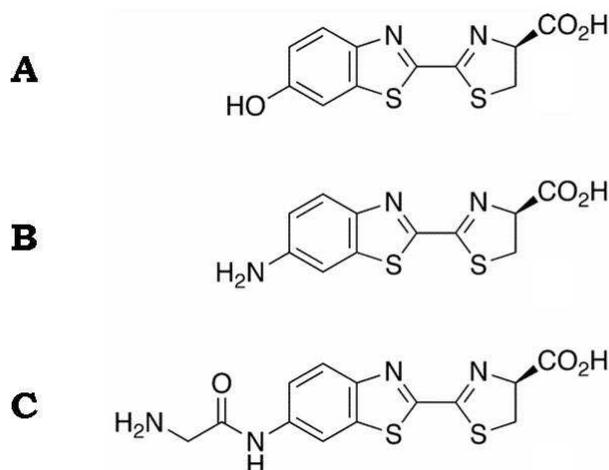
de circulation plus longs permettent l'obtention d'un signal de bioluminescence plus stable et donc plus adapté aux essais *in vivo* ³⁷.

2 - Les dérivés de la luciférine

Afin de modifier les paramètres pharmacocinétiques pharmacodynamiques ainsi que la biodistribution, divers dérivés de la luciférine peuvent être envisagés. Le noyau benzène de la luciférine semble être adapté aux modifications chimiques, en particulier son groupement alcool pouvant être remplacé par une fonction amine ou un groupement amino-glycine (Figure 07) ³⁸. La cinétique de la réaction luciférase - luciférine étant une réaction enzymatique, elle peut être exprimée par l'équation de type Mickaelis - Menten :

$$V = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S}$$

Où la vitesse de la réaction (V) est exprimée en fonction de la constante de la réaction (K_m), de la concentration en substrat soit la luciférine (S) et de la vitesse maximale de formation du produit (V_{\max}). Les paramètres de cette équation, de la même façon qu'une réaction enzymatique classique, sont influencés par les conditions de la réaction et reflètent directement l'affinité de la luciférine pour la luciférase. Dans un système cellulaire plus complexe ils sont aussi directement influencés par la pharmacocinétique pharmacodynamique et la biodistribution du substrat. Shinde *et al.* ont mesuré l'efficacité de différentes formes de la luciférine dans un système enzyme substrat purifié *in vitro* mais aussi dans des lysats cellulaires PC3M-luc (cellules humaines tumorales de prostate transfectées par le gène de la luciférase) et dans un modèle *in vivo* de cellules PC3M-luc entières. La mesure de l'émission de lumière engendrée par une gamme de concentration des différents types de luciférine permet de déterminer les paramètres de l'équation pour les différentes formes modifiées de la luciférine (Tableau 01) ³⁸. La

**Figure 07 : Dérivés structuraux de la luciférine.**

A : Forme "classique" de la molécule de D-luciférine.

B : D-Aminoluciférine : substitution de la fonction alcool par une fonction amine.

C : Glycine-D-Aminoluciférine : substitution de la fonction alcool par une fonction amino-glycine.

Paramètres cinétiques pour l'enzyme purifiée			
Substrat	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
D-luciférine	$16 \pm 1,0$	1626 ± 24	102
D-aminoluciférine	$0,62 \pm 0,05$	$169 \pm 2,6$	272
glycine-D-aminoluciférine	114 ± 12	$9,2 \pm 0,5$	0,08

Paramètres cinétiques pour des lysats cellulaires (PC3M-Luc)			
Substrat	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
D-luciférine	$34 \pm 3,0$	$120 \pm 2,0$	36
D-aminoluciférine	$0,9 \pm 0,1$	$23 \pm 0,6$	268
glycine-D-aminoluciférine	$8,7 \pm 3,2$	$6,5 \pm 0,1$	7,5

Paramètres cinétiques pour des cellules entières (PC3M-Luc)			
Substrat	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
D-luciférine	235 ± 20	2669 ± 39	113,6
D-aminoluciférine	141 ± 23	294 ± 43	20,5
glycine-D-aminoluciférine	62 ± 6	$7,4 \pm 0,6$	1,2

Tableau 01 : Paramètres cinétiques de dérivés de la luciférine.

Paramètres cinétiques de la D-luciférine, de la D-aminoluciférine et de la glycine-D-aminoluciférine pour des essais réalisés sur la luciférase purifiée, sur des lysats cellulaires (PC3M-Luc) ou des cellules entières (PC3M-Luc). K_m est exprimé en μM , V_{max} en photons. min^{-1} ($\times 10^9$) et V_{max}/K_m en photons. $\text{min}^{-1}.\mu\text{M}^{-1}$ ($\times 10^9$). (Table établie d'après les données de Shinde, 2006).

comparaison des différentes valeurs K_m permet de montrer que la substitution de la fonction alcool de la luciférine par une fonction amine permet d'obtenir une meilleure affinité pour la luciférase. Par contre la vitesse de réaction maximale est obtenue avec la forme classique de la luciférine sans substitution. L'analyse est complétée par le calcul du ratio V_{max}/K_m (dans le cas d'une réaction enzyme substrat, ce paramètre reflète directement l'activité catabolique de l'enzyme). La luciférase a une meilleure activité catabolique pour la luciférine possédant une fonction amine substituée que pour la forme classique possédant la fonction alcool. La substitution de la fonction alcool par une fonction amino-glycine entraîne une affinité et une activité catabolique de la luciférase plus basses. Que les analyses soient réalisées dans un système enzyme substrat purifié *in vitro* ou dans un modèle de lysats de cellules PC3M-luc les résultats sont les mêmes. Par contre dans le cas d'un modèle réalisé sur des cellules PC3M-luc entières, la vitesse maximale de la réaction est obtenue pour la forme non substituée de la luciférine. De même c'est cette dernière forme qui a la meilleure activité catabolique. Les différences entre les valeurs calculées pour des lysats cellulaires et pour des cellules entières sont un très bon indicateur de la sélectivité de la barrière membranaire et confirment la séquestration de l'enzyme et de la réaction de bioluminescence directement au sein de compartiments cellulaires. De tels essais permettent de révéler l'importance de la structure de la luciférine sur la réaction enzyme substrat. Bien que pouvant être modélisée par une équation de type Mickaelis - Menten, la réaction luciférase luciférine est complexe et très dépendante des l'environnement biologique. C'est pourquoi son utilisation pour le suivi d'un modèle *in vivo* demande la prise de précautions et l'établissement de conditions optimales afin de se placer dans des zones de proportionnalité entre signal émis et réaction biologique. Ces conditions ayant des répercussions sur le choix du modèle cellulaire, le choix du

modèle animal, ainsi que les conditions expérimentales afin de se placer dans une zone d'émission de lumière constante et maximale.

3 - L'oxyluciférine, produit de la réaction luciférase – luciférine, peut être régénérée en luciférine par voie enzymatique

La luciférine est un acide organique hétérocyclique : (acide 2-(6-hydroxybenzothiazol-2-yl)-2-thiazoline-4-carboxylique) (Figure 08 A).

L'oxyluciférine qui est le produit de son oxydation catalysée par la luciférase a un effet inhibiteur sur l'enzyme catalytique en entrant en compétition avec la luciférine³⁹. En injectant de la luciférine radiomarquée au carbone 14 à des lucioles vivantes, l'équipe de Suzuki a montré que, l'oxyluciférine oxydée, servait à nouveau de réactif à la réaction de bioluminescence⁴⁰. Dans un premier temps, l'oxyluciférine serait transformée en 2-cyano-6-hydroxybenzothiazole puis dans un second temps elle serait condensée avec une cystéine pour reformer la luciférine. Il semblerait que la régénération de la luciférine se fasse par deux voies, une première, enzymatique, rapide avec un rendement efficace et une seconde, non enzymatique, lente avec un rendement extrêmement faible. L'enzyme impliquée dans la régénération de la luciférine est appelée ERL (Enzyme de Régénération de Luciférine) et provient d'une fraction protéique d'un extrait de certaines lucioles (*Photinus pyralis*, *Luciola cruciata*, *Luciola lateralis*) (Figure 08 B). Les différents intermédiaires réactionnels de la régénération de la luciférine peuvent être séparés par HPLC. Afin de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu, l'activité de la ERL peut être mesurée à différents moments par ajout d'oxyluciférine et de D-cystéine et par détermination de la luciférine régénérée via l'intensité de bioluminescence⁴¹. L'ERL identifiée a une masse molaire de 38 kDa et possède un maximum d'activité lorsque le pH est compris entre 7 et 8. L'ADNc de la ERL a depuis été obtenu et cloné dans diverses souches bactériennes^{42,43}.

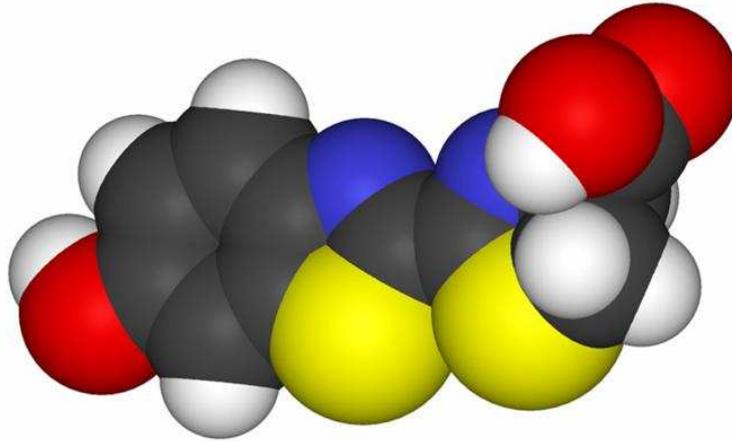
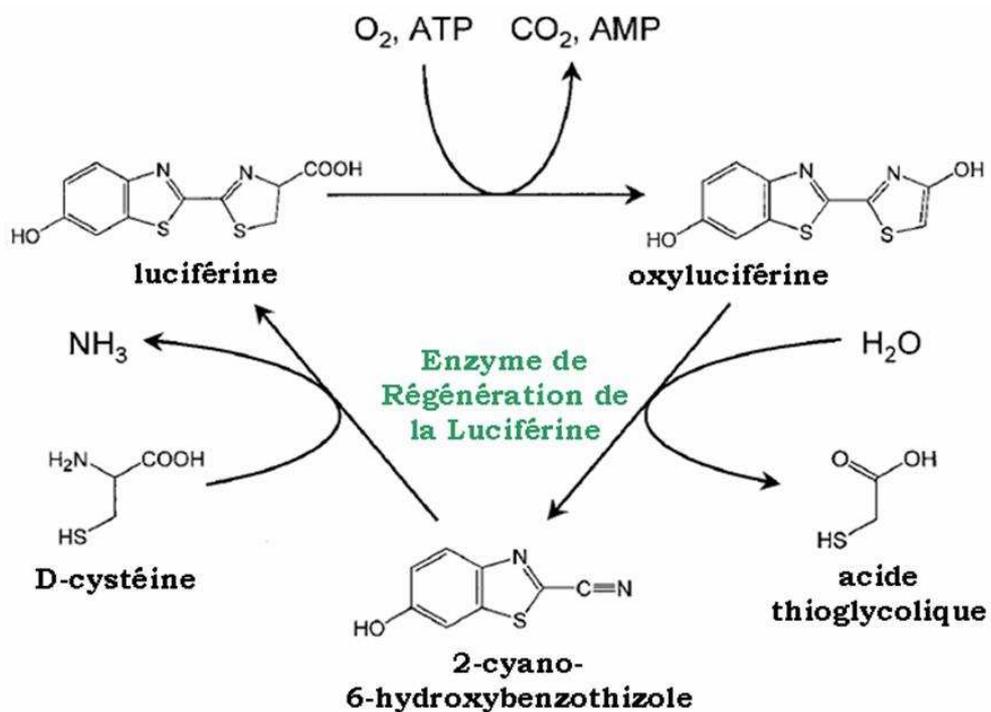
A**B**

Figure 08 : Régénération de l'oxyluciférine en luciférine sous l'action de l'Enzyme de Régénération de la Luciferine.

A : Représentation schématique en trois dimensions de la molécule de luciférine, les atomes de carbone sont représentés en noir, les oxygènes en rouge, les soufres en jaune, les azotes en vert et les hydrogènes en blanc. (*Travail personnel, logiciel PyMol*)

B : Schéma réactionnel de régénération de la luciférine sous l'action de l'ERL (*Figure établie d'après Gomi, 2001*).

De plus la comparaison et l'alignement de la séquence génétique codant pour la ERL de différentes espèces de lucioles montre quelles sont identiques, ce qui prouve l'universalité de cette enzyme. *In vitro* l'ajout de ERL augmente le rendement de production de lumière de plus de 25 fois grâce au recyclage extrêmement rapide de la luciférine, ce qui pourrait permettre l'obtention d'une cinétique d'émission de lumière extrêmement différente avec un plateau d'émission constante de lumière de plusieurs heures. De tels résultats sont intéressants pour le développement et l'amélioration de l'imagerie de bioluminescence. On pourrait envisager la transfection ou la transduction de cellules animales bioluminescentes par une construction génétique contenant l'ERL. Lors d'un essai d'imagerie on pourrait ainsi réduire fortement la quantité de luciférine injectée, qui a un effet toxique vis-à-vis des cellules tumorales ainsi que de l'animal. De plus l'obtention d'un plateau d'émission de lumière plus stable et plus long permet d'envisager plus sereinement des notions de localisation d'émission des photons dans l'espace, ou des mesures plus significativement représentatives de la quantité de lumière émise par les cellules.

C - La luciférase, enzyme de la réaction

La luciférase de luciole, *Photinus* - luciferine 4-monooxygénase (par hydrolyse d'ATP), enregistrée sous le numéro EC 1.13.12.7, catabolise la réaction de décarboxylation oxydative de la luciférine. Cette réaction enzymatique a un rendement quantique de 0,88 photon émis par molécule de luciférine oxydée ^{44 45}. La luciférase est couramment utilisée dans la quantification de l'ATP, et autres composés biochimiques ^{46,47}. Elle est aussi couramment utilisée comme gène rapporteur d'expression protéique ⁴⁸, ce qui explique qu'il s'agisse d'une des enzymes conduisant à l'émission de lumière des plus étudiées ⁴⁹. Le premier article

```

ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAG AAA GGC CCG GCG CCA TTC TAT CCT CTA GAG GAT GGA
M E D A K N I K K G P A P F Y P L E D G
ACC GCT GGA GAG CAA CTG CAT AAG GCT ATG AAG AGA TAC GCC CTG GTT CCT GGA ACA ATT
T A G E Q L H K A M K R Y A L V P G T I
GCT TTT ACA GAT GCA CAT ATC GAG GTG AAC ATC ACG TAC GCG GAA TAC TTC GAA ATG TCC
A F T D A H I E V N I T Y A E Y F E M S
GTT CGG TTG GCA GAA GCT ATG AAA CGA TAT GGG CTG AAT ACA AAT CAC AGA ATC GTC GTA
V R L A E A M K R Y G L N T N H R I V V
TGC AGT GAA AAC TCT CTT CAA TTC TTT ATG CCG GTG TTG GGC GCG TTA TTT ATC GGA GTT
C S E N S L Q F F M P V L G A L F I G V
GCA GTT GCG CCC GCG AAC GAC ATT TAT AAT GAA CGT GAA TTG CTC AAC AGT ATG AAC ATT
A V A P A N D I Y N E R E L L N S M N I
TCG CAG CCT ACC GTA TGT TTT GTT TCC AAA AAG GGG TTG CAA AAA ATT TTG AAC GTG CAA
S Q P T V F V S K K G L Q K I L N V Q
AAA AAA TTA CCA ATA ATC CAG AAA ATT ATT ATC ATG GAT TCT AAA ACG GAT TAC CAG GGA
K K L P I I Q K I I I M D S K T D Y Q G
TTT CAG TCG ATG TAC ACG TTC GTC ACA TCT CAT CTA CCT CCC GGT TTT AAT GAA TAC GAT
F Q S M Y T F V T S H L P P G F N E Y D
TTT GTA CCA GAG TCC TTT GAT CGT GAC AAA ACA ATT GCA CTG ATA ATG AAT TCC TCT GGA
F V P E S F D R D K T I A L I M N S S G
TCT ACT GGG TTA CCT AAG GGT GTG GCC CTT CCG CAT AGA ACT GCC TGC GTC AGA TTC TCG
S T G L P K G V A L P H R T A C V R F S
CAT GCC AGA GAT CCT ATT TTT GGC AAT CAA ATC ATT CCG GAT ACT GCG ATT TTA AGT GTT
H A R D P I F G N Q I I P D T A I L S V
GTT CCA TTC CAT CAC GGT TTT GGA ATG TTT ACT ACA CTC GGA TAT TTG ATA TGT GGA TTT
V P F H H G F G M F T T L G Y L I C G F
CGA GTC GTC TTA ATG TAT AGA TTT GAA GAA GAG CTG TTT TTA CGA TCC CTT CAG GAT TAC
R V V L M Y R F E E E L F L R S L Q D Y
AAA ATT CAA AGT GCT TTG CTA GTA CCA ACC CTA TTT TCA TTC TTC GCC AAA AGC ACT CTG
K I Q S A L L V P T L F S F F A K S T L
ATT GAC AAA TAC GAT TTA TCT AAT TTA CAC GAA ATT GCT TCT GGG GGC GCA CCT CTT TCG
I D K Y D L S N L H E I A S G G A P L S
AAA GAA GTC GGG GAA GCG GTT GCA AAA CCG TTC CAT CTT CCA GGG ATA CGA CAA GGA TAT
K E V G E A V A K R F H L P G I R Q G Y
GGG CTC ACT GAG ACT ACA TCA GCT ATT CTG ATT ACA CCC GAG GGG GAT GAT AAA CCG GGC
G L T E T T S A I L I T P E G D D K P G
GCG GTC GGT AAA GTT GTT CCA TTT TTT GAA GCG AAG GTT TGT GAT CTG GAT ACC GGG AAA
A V G K V V P F F E A K V V D L D T G K
ACG CTG GGC GTT AAT CAG AGA GGC GAA TTA TGT GTC AGA GGA CCT ATG ATT ATG TCC GGT
T L G V N Q R G E L C V R G P M I M S G
TAT GTA AAC AAT CCG GAA GCG ACC AAC GCC TTG ATT GAC AAC GAT GGA TGG CTA CAT TCT
Y V N N P E A T N A L I D K D G W L H S
GGA GAC ATA GCT TAC TGG GAC GAA GAC GAA CAC TTC TTC ATA GTT GAC CGC TTG AAG TCT
G D I A Y W D E D E H F F I V D R L K S
TTA ATT AAA TAC AAA GGA TAT CAG GTG GCC CCC GCT GAA TTG GAA TCG ATA TTG TTA CAA
L I K Y K G Y Q V A P A E L E S I L L Q
CAC CCC AAC ATC TTC GAC GCG GGC GTG GCA GGT CTT CCC GAC GAT GAC GCC GGT GAA CTT
H P N I F D A G V A G L P D D D A G E L
CCC GCC GCC GTT GTT GTT TTG GAG CAC GGA AAG ACG ATG ACG GAA AAA GAG ATC GTG GAT
P A A V V V L E H G K T M T E K E I V D
TAC GTC GCC AGT CAA GTA ACA ACC GCG AAA AAG TTG CCG GGA GGA GTT GTG TTT GTG GAC
Y V A S Q V T A A K L R G G V V F V D
GAA GTA CCG AAA GGT CTT ACC GGA AAA CTC GAC GCA AGA AAA ATC AGA GAG ATC CTC ATA
E V P K G L T G K L D A R K I R E I L I
AAG GCC AAG AAG GGC GGA AAG TCC AAA TTG TAA
K A K K G G K S K L ***

```

Figure 09 : Alignement des séquences nucléotidiques et protéiques de la luciférase de *Photinus pyralis*.

Séquence nucléotidique de la luciférase de *Photinus pyralis* dans le sens 5' – 3' (*GenBank* : M15077) alignée avec la séquence protéique de la luciférase (*GenBank* : AAA29795.1) dont les acides aminés sont annotés conformément au code international.

faisant état de son extraction et de sa purification date de 1978⁵⁰. Elle possède un poids moléculaire apparent de 62kDa. *In vitro* quand le substrat est ajouté en excès la réaction produit un flash de lumière qui est proportionnel à la quantité de luciférase présente⁵¹. Le pic d'émission apparaît rapidement et son intensité décroît d'environ 10% toute les minutes. Chez *Photinus pyralis* la luciférase a un maximum d'efficacité lorsque le pH est compris entre 7,5 et 8,5 et les photons émis ont une longueur d'onde maximale de 560nm (jaune - vert)⁴⁴.

1 - Analyse nucléotidique et protéique de la luciférase de *Photinus pyralis*

L'équipe de DeLuca *et al.* a été pionnière dans le clonage et le séquençage de la luciférase de certaines espèces dont *Photinus pyralis*⁴⁸ (Figure 09).

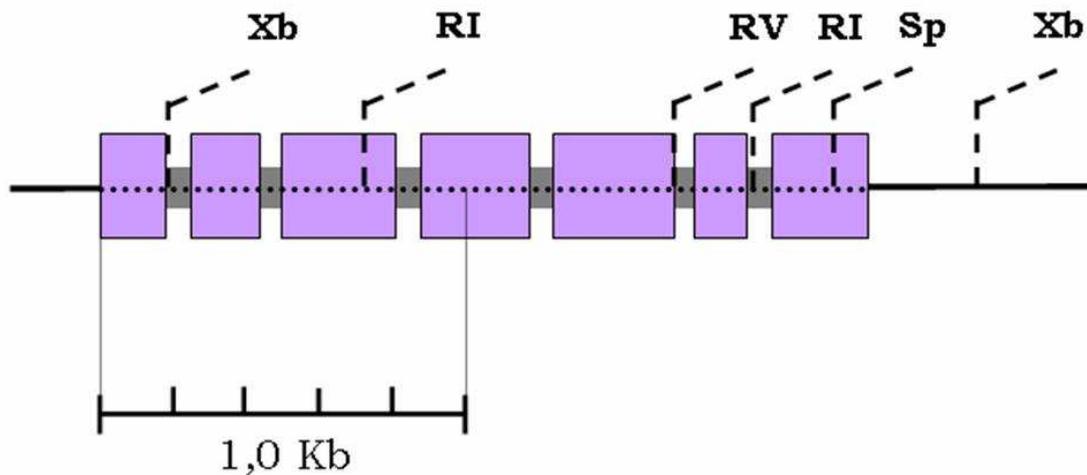


Figure 10 : Organisation du gène codant pour la luciférase de *Photinus pyralis* (Etablie d'après GenBank : M15077)

Le gène de la luciférase de *Photinus pyralis* n'est présent qu'en une seule copie. Il est composé de 7 exons, représentés sur la figure par les rectangles violets, séparés par de très courts introns, représentés sur la figure par les rectangles gris, dont la taille varie entre 43 et 58 bases de long. L'analyse de son profil de restriction révèle qu'il peut être coupé par de nombreuses enzymes comme Xb, RI,

RV ou Sp. En analysant la séquence génétique une structure de type TATA box est trouvée à 20 bases du site d'initiation de la transcription. On la retrouve à l'identique chez de nombreuses protéines synthétisées chez les insectes. Par comparaison aux autres insectes, l'organisation du gène de la luciférase de *Photinus pyralis*, indique que cette protéine est produite dans différents tissus. La connaissance de ce gène depuis de nombreuses années, a conduit à la réalisation de nombreuses constructions génétiques avec le promoteur adéquat afin de le faire s'exprimer en cellule bactérienne ou animale ⁵²⁻⁵⁴. Ainsi les plasmides, ou constructions génétiques commerciales proposées par différents fournisseurs, permettant l'expression de luciférase sont construits à partir de la séquence de *Photinus pyralis*.

Depuis, les gènes de la luciférase de la plupart des insectes bioluminescents connus ont été isolés et analysés ⁵⁵⁻⁵⁷. La plupart des luciférases d'insectes ont un nombre d'acides aminés compris entre 542 et 550. Le pourcentage d'homologie entre ces différentes protéines est très élevé, cependant la mesure de leur spectre d'émission révèle des différences significatives. Ainsi la longueur d'onde d'émission maximale peut varier de 538nm à 623nm (Tableau 02). Enfin compte tenu de leur séquence protéique différente, ces composés présentent une grande variabilité dans leur point isoélectrique. Ce dernier point révèle des pH optimum de catalysation de la réaction différents, ce qui constitue un avantage certain pour les différents essais de bioluminescence au niveau moléculaire, cellulaire et sur les animaux. Les insectes sont ainsi le groupe le plus riche et le plus varié des êtres émettant de la bioluminescence ^{58,59}. Sauf pour l'acétylation de la première méthionine, aucune autre modification post transcriptionnelle n'est observée sur la plupart des luciférases de luciole ⁶⁰. A l'exception des luciférases de lucioles, toutes les luciférases de scarabées possèdent un peptide signal C-terminal constitué des trois acides aminés : Sérine – Lysine – Leucine qui va diriger les protéines produites vers

Année	Luciférase	Nombre d'acides aminés	% avec <i>Photinus pyralis</i>	pI	λ_{\max} (nm)	GenBank
Sensible au pH						
<i>Lampiridae</i> (lucioles)						
1987	<i>Photinus pyralis</i>	550	100	6,4	562	M15077
1995	<i>Pyrocoella miyako</i>	548	82	6,1	550	L39928
1995	<i>Hotaria parvula</i>	548	68	6,3	568	L39929
1993	<i>Luciola mingrelica</i>	548	67	6,2	570	S61961
1989	<i>Luciola cruciata</i>	548	67	7,1	562	M26194
1992	<i>Luciola lateralis</i>	548	67	6,5	552	X66919
1995	<i>Lampyrus noctiluca</i>	547	83	6,1	550	X89479
1994	<i>Photuris pennsylvanica</i>	545	58	8,4	538	U31240
Insensible au pH						
<i>Phengodidae</i> (vers chemin de fer)						
	<i>Phengodes</i>	546	54		546	
	<i>Phrixothrix vivianii</i>	545	55	6,3	548	S29353
	<i>Phrixothrix hirtus</i>	546	47	7	623	S29355
	<i>Ragophthalmus ohbai</i>	543	53		555	
<i>Elateridae</i> (scarabées)						
<i>Pyrophorus plagiophtalamus</i>						
1989	- Vert	543	47	6,5	546	AF139644
1989	- Jaune-vert	543	46	6,5	560	AF139645
1989	- Jaune	543	47	6,5	578	***
1989	- Orange	542	46	6,4	593	***

Tableau 02 : Comparaison des principales caractéristiques des luciférases d'insectes.

Date de découverte et de séquençage des différentes luciférases d'insectes, nom complet de l'espèce, nombre d'acides aminés de la protéine, pourcentage d'homologie de séquence avec celle de *Photinus pyralis*, point isolélectrique, longueur d'onde maximale du spectre d'émission de la luciférase et référence de la GenBank correspondante (Source : travail bibliographique personnel).

les péroxysomes. L'analyse des isoenzymes produites par *Pyrophorus plagiophtalamus* (Tableau 02), montre une homologie de séquence de 95 à 99%. Néanmoins les longueurs d'ondes maximales d'émission de ces isoenzymes sont assez différentes ce qui révèle l'implication de seulement quelques acides aminés dans l'énergie portée par les photons émis lors de la réaction enzymatique ⁶¹. De telles protéines constituent des outils moléculaires de choix pour les progrès futurs de la bioluminescence.

2 - Origine et évolution moléculaire de la luciférase

Une des questions les plus intrigantes sur la bioluminescence concerne l'apparition et l'évolution d'un tel processus au cours de l'évolution. C'est en s'intéressant à l'origine et à l'évolution de la luciférase et au travers d'elle de la bioluminescence que nous pourrions comprendre de façon plus efficace les systèmes mis en jeu lors de la réaction conduisant à l'émission de lumière. L'établissement et l'analyse d'arbres phylogénétiques à partir des séquences nucléotidiques des luciférases d'insectes, révèlent que la bioluminescence a été développée de façon indépendante une trentaine de fois ¹⁸ (Figure 11).

Certaines théories proposent que la bioluminescence soit apparue comme un processus accidentel de détoxification de l'oxygène lorsque les systèmes photosynthétiques ont commencé à augmenter dans l'atmosphère ⁴⁴. Ainsi les luciférases seraient considérées comme des oxygénases luminescentes, impliquées dans l'élimination de l'oxygène toxique. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer l'implication systématique de cycles aromatiques dans l'ensemble des réactions de bioluminescence. L'apparition d'un phénotype luminescent conférant ainsi aux animaux le possédant un avantage dans la sélection ¹⁸. Une recherche de similitude des luciférases d'insectes plus poussée avec l'ensemble des protéines identifiées à ce jour révèle une co-évolution de ces protéines avec la ligase Acyl-

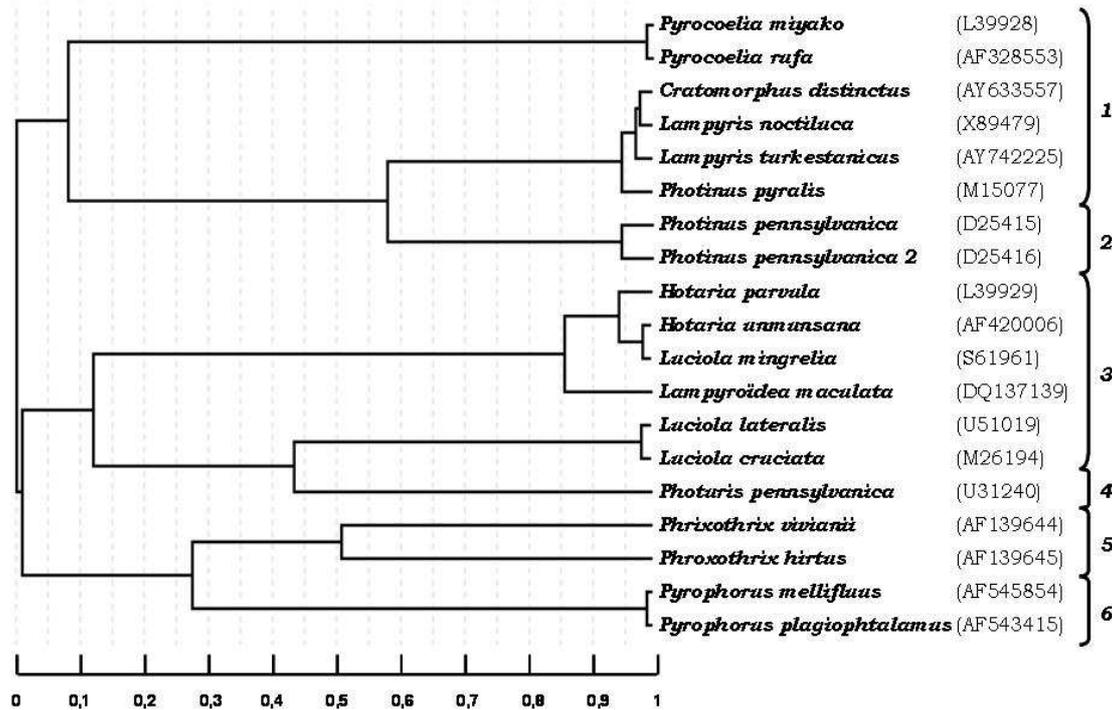


Figure 11 : Arbre phylogénétique des principales luciférases d'insectes.

Phylogramme des différentes luciférases d'insectes établi sous « Tree Top - Phylogenetic tree prediction ; <http://www.genebee.msu.su/genebee.html> ».

Les séquences des protéines proviennent de différentes GenBank (*identifiant entre parenthèses*), la longueur des branches est proportionnelle à la distance génétique. En (1) famille des *Lampyridae*, en (2) et en (4) famille des *Photurinae*, en (3) famille des *Luciolinae*, en (5) famille des *Elateridae* et en 6 famille des *Phengodidae*.

Coenzyme A. Cette protéine possédant une fonction complètement différente mais étant à l'origine de l'apparition de la bioluminescence chez les insectes par duplication du gène ⁶². Cette hypothèse se trouve confirmée par l'analyse des réactions chimiques catalysées par les différentes enzymes, la réaction d'adénylation par les luciférases d'insectes et la réaction d'activation des acides gras par les Acyl-Coenzyme A ligases étant identiques sur un point de vue chimique. Des protéines, au fonctionnement similaire, découvertes chez les bactéries et les champignons ont une implication dans le métabolisme des lipides ou dans une autre voie de biosynthèse.

3 - Le Coenzyme A : effecteur de la luciférase

Les luciférases présentent de grandes homologies de séquence avec les acyl-Coenzyme A ligases. De plus les kits commerciaux de dosage de l'ATP par bioluminescence contiennent, en plus de l'enzyme et du substrat, du coenzyme A. Ce dernier est ajouté pour modifier la cinétique d'apparition du signal lumineux : il permettrait d'obtenir, à la place d'un flash lumineux bref et intense, un signal plus modéré mais stable et prolongé dans le temps, plus adéquat pour la réalisation de mesures ⁶². Le coenzyme A est un coenzyme de transfert de groupements acyle intervenant dans de très nombreuses voies du métabolisme (cycle de Krebs, bêta oxydation...). Il dérive d'une vitamine : l'acide pantothénique (vitamine B5). C'est un coenzyme libre. Sa partie réactive est la fonction thiol (-SH) (Figure 12 A) de la thioéthanolamine et est symbolisée par HS-CoA (ou CoA-SH). Ainsi les relations entre le Co-enzyme A et la luciférase ont été étudiées depuis de nombreuses années. Dès 1958 l'équipe de Airth *et al.* a suggéré que le coenzyme A intervenait au niveau de la liaison entre la luciférase et la luciférine ⁶³. Ainsi, la réaction avec un acide carboxylique forme une liaison acylthioester riche en énergie. Il serait capable de décrocher le composé oxyluciféryl-adénylate du site actif de l'enzyme pour former

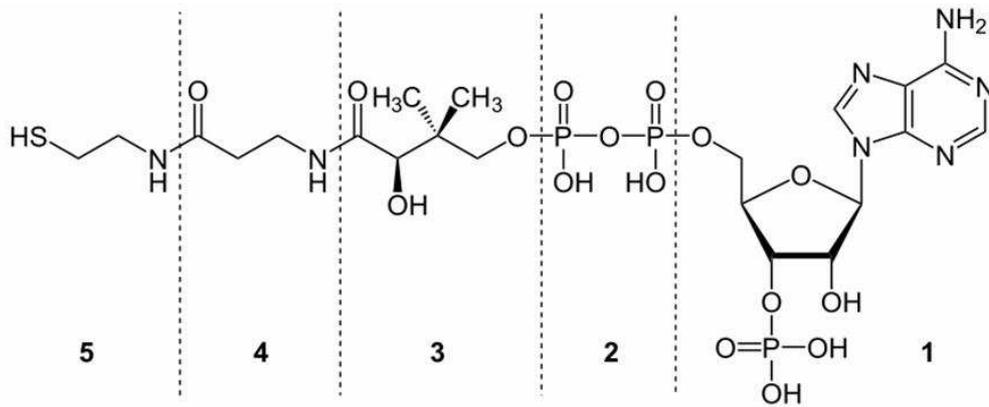
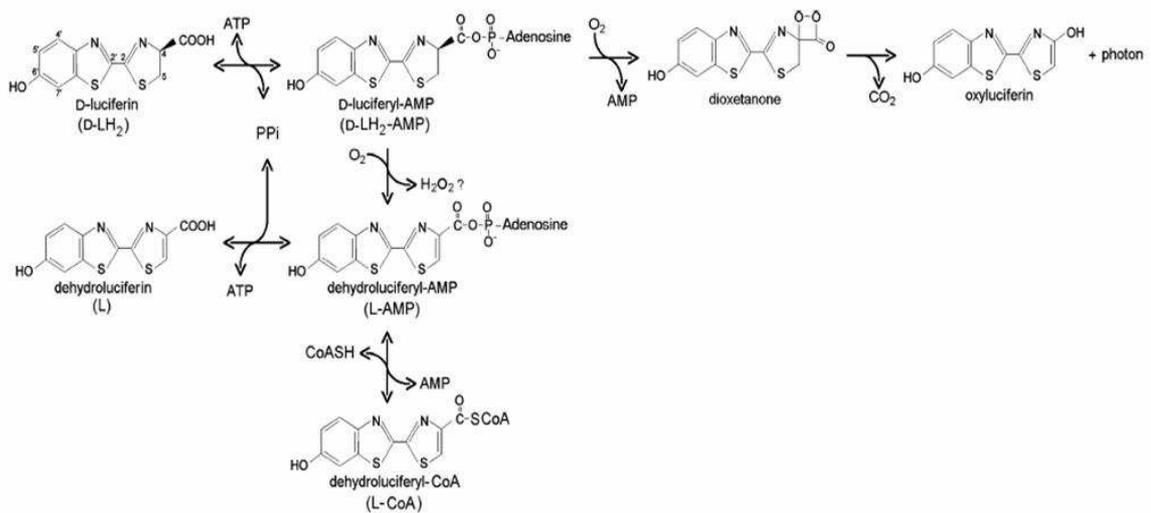
A**B**

Figure 12 : Interaction du Coenzyme A avec la réaction de bioluminescence.

A : Structure chimique du coenzyme A 1: Adénine 2: β-D-ribofuranose 3: Phosphate 4: Acide pantothénique 5: Thioéthanolamine. C'est cette dernière partie qui confère sa grande réactivité à la molécule.

B : La luciférase catalyse la réaction de bioluminescence. En présence d'ATP, la luciférine est activée en luciféryl-AMP. Cette molécule peut interagir avec la fonction thiol d'une molécule CoA pour donner une molécule de déhydro-luciféryl-CoA. Cette réaction étant parfaitement réversible (*Figure établie d'après DeLuca, 1976*)

de l'oxyluciféryl-coenzyme A. L'oxyluciféryl-adénylate avait été identifié comme un produit et un inhibiteur de la réaction de bioluminescence. Cependant si l'on regarde la structure chimique de ces composés l'oxyluciféryl-adénylate correspond en réalité à la déhydrolyciféryl-adénylate (composé intermédiaire de la réaction de bioluminescence, composé II figure 06C). C'est en s'intéressant à la réactivité chimique de ce composé que l'on comprend l'implication potentielle du coenzyme A. En effet ce composé, intermédiaire réactionnel, très instable, est capable de restituer son énergie à une molécule de CoA lors d'une réaction thiolytique (Figure 12 B) ^{49,50}. Cette réaction parfaitement réversible serait à l'origine de la stabilisation du signal lumineux. Le CoA agirait aussi à la façon d'un effecteur allostérique, en se fixant à la luciférase sur un autre site que celui impliqué dans la réaction de bioluminescence. Il modifierait la structure tridimensionnelle de la protéine ce qui influencerait sur le rendement de la réaction ⁶⁴. Aujourd'hui le mécanisme d'interaction entre le CoA et la luciférase n'est pas parfaitement identifié. Bien que la réaction thiolytique se produise et bien qu'un changement dans la conformation de la luciférase a été démontré lors de son interaction avec le CoA, l'importance de l'un ou de l'autre de ces mécanismes n'a pas été clarifié. La réaction catalytique de la luciférase sur la déhydrolyciféryl-AMP ne peut expliquer à elle seule l'obtention d'un flash lumineux lors de la réaction de bioluminescence ⁶⁵. De plus certains travaux semblent montrer que, lorsque la concentration en luciférine est faible et lorsque l'ATP est utilisé, la fraction de luciféryl-AMP oxydée en déhydrolyciféryl-AMP est très faible. De même, lors de la phase de décroissance de la lumière émise la proportion de produits de la luciféryl-AMP non inhibés (oxyluciférine par rapport à déhydrolyciféryl-CoA) semble plus importante. Il s'agirait donc d'un véritable mécanisme de contrôle propre à l'enzyme visant à produire, le plus efficacement possible, la lumière en fonction de la quantité de luciférine et d'ATP disponibles. La compréhension de ces mécanismes est capitale avant d'envisager toute étude

cellulaire ou animale car *in vitro* et *in vivo* la présence et la disponibilité de composés, tel le CoA, vont avoir une influence capitale sur la modalité d'émission de lumière, sur son intensité et sa cinétique. Il convient ainsi, avant d'utiliser une méthode d'imagerie de bioluminescence, de valider ces points et de se placer dans des conditions normalisées, faute de quoi les différents essais ne se trouveraient plus comparables et reproductibles.

4 - Analyse cristallographique de la luciférase

Bien que la chimie de la réaction enzymatique entre la luciférase de luciole et la luciférine soit connue depuis de nombreuses années ce n'est qu'en 1995 que l'équipe de Fisher *et al.* a établie la première structure cristallographique d'une luciférase ⁶⁶. Il s'agit d'une luciférase bactérienne, celle de *Vibrio harveyi*. Ce n'est qu'un an plus tard que la première structure cristallographique de la luciférase de *Photinus pyralis* fut établie, par l'équipe de Conti *et al.* avec une résolution de 2Å ^{67,68} (Figure 13).

a - Structure générale de la luciférase

La molécule de luciférase de *Photinus pyralis* est constituée de deux domaines distincts. La plus grande fraction de la structure, l'extrémité N-terminal, qui comprend les résidus 4 à 436, est relativement compacte et est constituée de 2 feuillets β , d'un cylindre β antiparallèle qui sont encadrés de chaque côté par des hélices α . L'extrémité C-terminal de la protéine, qui contient les résidus 440 à 544, forme un petit domaine α, β séparé du reste de la protéine (Figure 13). L'analyse de la structure tridimensionnelle de l'acyl-CoA thiolase montre l'existence d'une structure similaire ⁶⁹. Les 2 feuillets β du domaine de la large sous unité N-terminal sont liés entre eux par l'intermédiaire d'hélices α pour former la structure tertiaire $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ce qui confie à l'ensemble son aspect compact. Ces deux feuillets possèdent une topologie identique : chacun de ces feuillets est constitué de 8 brins. Le premier

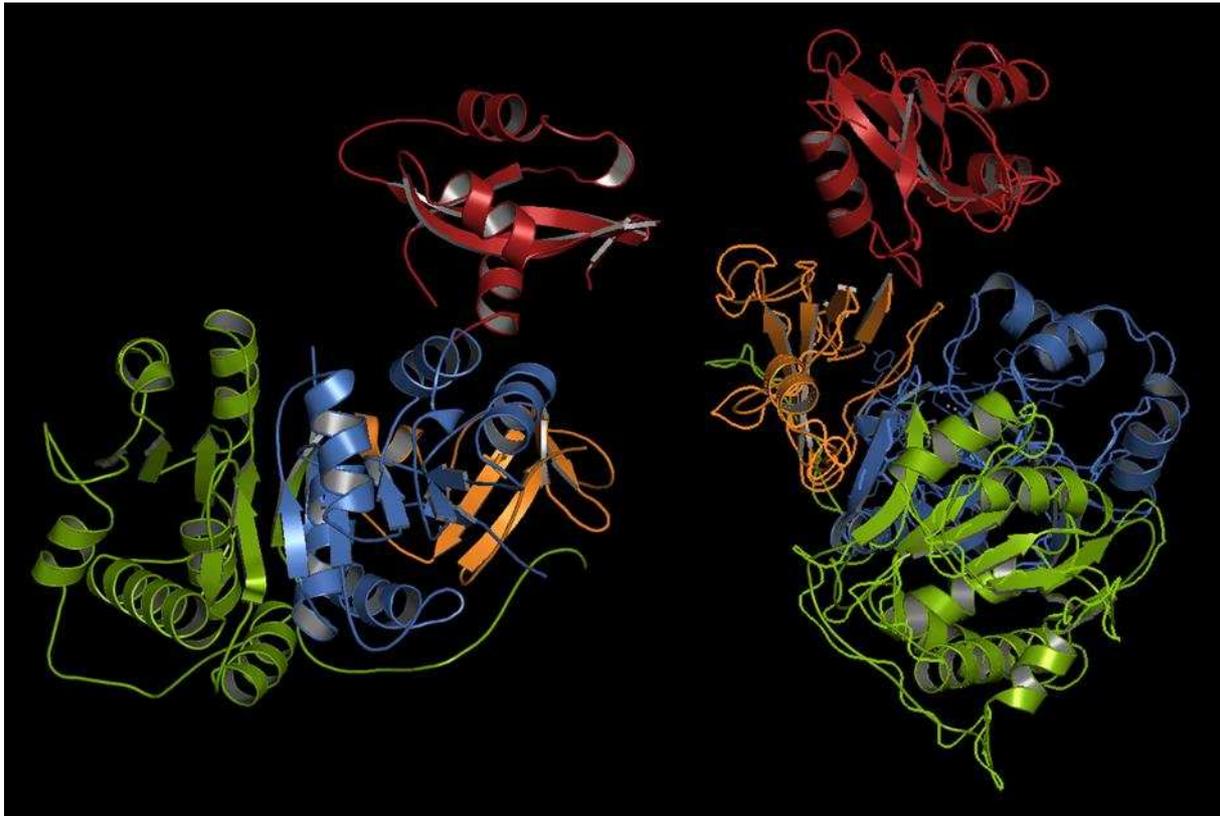


Figure 13 : Analyse de la structure de la luciférase de *Photinus pyralis* par cristallographie.

Représentations ruban de la structure de la luciférase de *Photinus pyralis* en 2 vues orthogonales. Les trois sous domaines du grand domaine N-terminal sont représentés en vert pour le feuillet β - A, bleu pour le feuillet β - B et orange pour le cylindre β . Le petit domaine C-terminal est quand à lui représenté en rouge. (Image personnelle, séquence protéique *pdb*, GenBank : 1LCI, représentation graphique réalisée sous PyMol, DeLano Scientific, CA, USA).

des deux : le feuillet β -A est composé de 5 brins parallèles et de 3 brins antiparallèles associés à 6 hélices α et correspond aux résidus 77 à 222 de la chaîne peptidique ; le second : le feuillet β -B est composé de 6 brins parallèles et de 2 brins antiparallèles associés à 6 hélices α et correspond aux résidus 22 à 70 et 236 à 351 de la chaîne peptidique. L'association des 2 feuillets β dans l'espace donne naissance à une large gorge formée par l'extrémité C-terminal des différents brins ainsi que par les extrémités N-terminal des hélices α qui lient les feuillets. Cette gorge est fermée d'un coté par l'intermédiaire du cylindre β antiparallèle. Ce dernier est constitué de trois faces distinctes, les 2 premières sont formées par 3 brins antiparallèles de feuillets β , alors que la dernière face est formée par l'association de 2 brins du feuillet β -B. L'ensemble de ces feuillets et de ces hélices forme, dans l'espace, une gorge et deux creux. Il donne à l'ensemble une allure proche de celle observée pour d'autres protéines comme l'acyl-CoA thiolase ou l'inositol monophosphatase ⁶⁹.

Cet imposant domaine est séparé du domaine C-terminal par une large fente, ainsi il se place au dessus du cylindre β de l'extrémité N-terminale. La charnière qui se situe entre les 2 domaines se retrouve désorganisée lors de la cristallisation de la molécule, mais l'analyse des résidus impliqués laisse présumer d'une grande flexibilité. Le domaine C-terminal est constitué de 2 petits brins β antiparallèles et de trois autres brins α β (Figure 14). L'analyse des acides aminés de la protéine révèle un tripeptide sérine – lysine – leucine dans la partie C-terminale. Le rôle de cette séquence a déjà été identifié dans l'adressage des protéines dans les péroxysomes ⁷⁰. Les protéines des péroxysomes sont généralement synthétisées au niveau du cytosol et transportées dans les organelles après l'étape de transcription par un système de reconnaissance de séquence cible. Dans la structure tridimensionnelle de la luciférase cette séquence est en désordre et se trouve sur un site exposé au solvant, ce qui laisse présumer de l'interaction entre la protéine et un

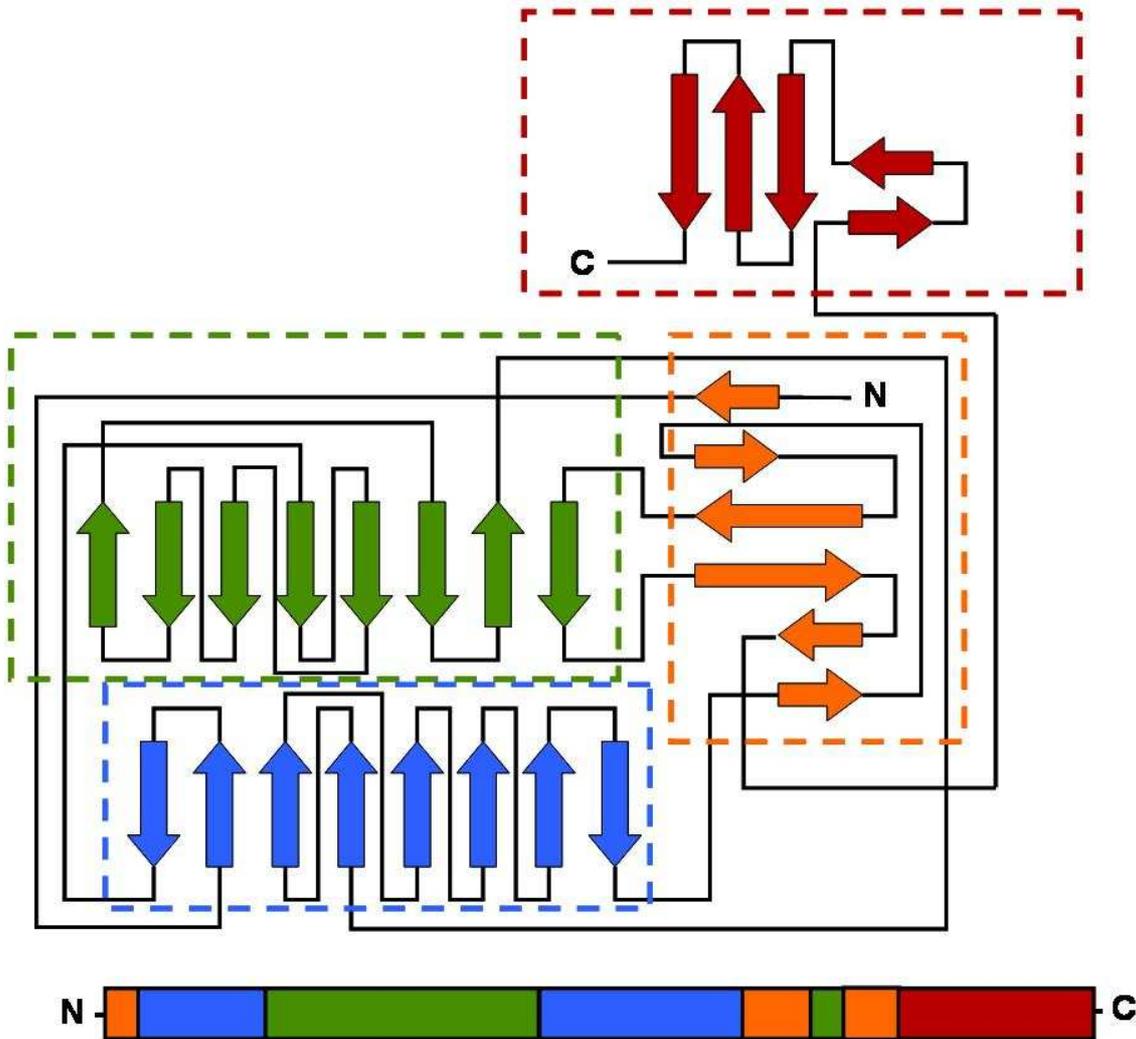


Figure 14 : Organisation schématique d'ensemble de la luciférase de *Photinus pyralis*.

Diagramme des différents éléments protéiques constituant la luciférase de *Photinus pyralis*. Les trois sous domaines du grand domaine N-terminal sont représentés en vert pour le feuillet β - A, bleu pour le feuillet β - B et orange pour le cylindre β . Le petit domaine C-terminal est quand à lui représenté en rouge. Les feuillets sont représentés par des flèches qui indiquent si ils sont parallèles ou antiparallèles. Ils sont reliés par des traits noirs : les hélices α .

Ces mêmes éléments sont reportés sur la séquence génétique en utilisant un code couleur identique et en commençant par l'extrémité N-terminale pour terminer par l'extrémité C-terminale. (Figure inspirée des travaux de Conti et al, 1996)

récepteur d'adressage. Un système identique d'adressage peptidique est observée dans la structure de l'acyl-CoA thiolase ⁶⁹.

b - Site actif de la luciférase

La localisation du site actif dans la structure de la luciférase peut être identifiée par la position des résidus aminés qui sont hautement conservés dans les enzymes proches dans l'arbre phylogénétique. Ainsi la structure de la luciférase de *Photinus pyralis* a été non seulement comparée à celle de la plupart des autres luciférases mais aussi à celle des acyl-CoA ligases ou des peptides synthétases. La plupart des acides aminés conservés entre ces différentes molécules se trouvent dans la partie C-terminale de la séquence protéique, c'est-à-dire entre le centre du cylindre constitué par les brins des feuillettes β et le petit domaine C-terminal de la structure tridimensionnelle. Ceci localiserait donc la réaction chimique de bioluminescence au niveau de la large gorge de la protéine (Figure 15 A). La sérine en position 198 qui se trouve sur la chaîne latérale de la protéine est liée par une liaison hydrogène au groupement carboxylique de la glutamine en position 344, cette liaison entraîne une rotation de la tyrosine en position 401. Cette tyrosine se trouve ainsi exposée et a été identifiée comme pouvant se lier à une molécule d'ATP via le noyau adénosine ⁷¹ (Figure 15 B). Un autre motif est aussi retrouvé pour la plupart des protéines : l'acide aspartique en position 422 qui se trouve exposé au solvant via sa fonction carboxylique et qui interagit avec la tyrosine en position 340. Ces interactions entraînent une rotation dans l'espace de la sérine en position 420 qui peut, à son tour, interagir avec la glycine en position 421. Cet ensemble de forces d'attraction impose un certain nombre de contraintes à la protéine, contraintes qui sont à l'origine de la réaction enzymatique. Enfin la nature des acides aminés impliqués au sein de ce site actif permet l'exclusion de toute

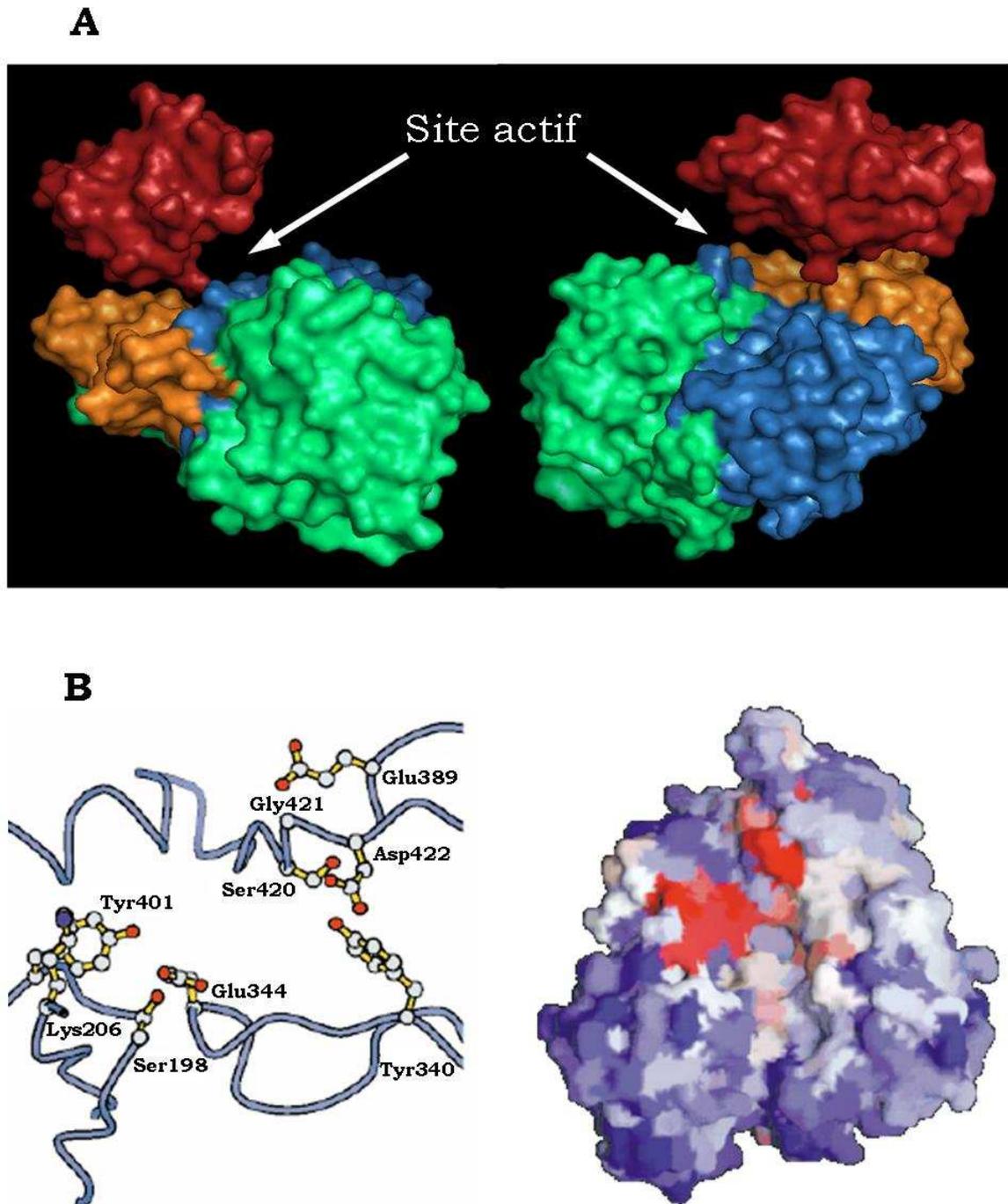


Figure 15 : Analyse du site actif de la luciférase de *Photinus pyralis*.

A : Modèle tridimensionnel de la luciférase de *Photinus pyralis*. Sur deux vues différentes le site actif est localisé au sein de la gorge formée entre les 2 domaines de la protéine. Représentation des atomes en surface, le code de couleur des différents domaines est le même que celui des figures précédentes (*Travail personnel, séquence LLC1, PyMol*).

B : Stéréoreprésentation du site actif et des résidus directement impliqués dans la réaction enzymatique (*Figure établie d'après Conti et al., 1996*).

molécule d'eau, le passage à l'état excité de la molécule de luciférine peut ainsi se réaliser.

D - Utilisation pratique de la bioluminescence

Parmi toutes les luciférases, celles des insectes sont sûrement les plus surprenantes car ce sont les seules à produire une telle gamme de couleurs allant du vert au rouge. La plupart des autres organismes bioluminescents produisent différentes couleurs par l'intermédiaire de protéines accessoires fluorescentes ce qui n'est jamais le cas des insectes ². Chez ces derniers les différences de couleurs émises dépendent essentiellement de la structure primaire de la protéine et finalement des résidus environnants du site actif.

1 - Les origines structurales de la couleur dans la bioluminescence

A ce jour trois mécanismes ont été proposés pour tenter d'expliquer l'origine des couleurs en bioluminescence : la polarisation du site actif enzymatique ⁵¹, la présence d'acides aminés basiques facilitant l'une ou l'autre des formes tautomères (kéto, énol) de l'oxyluciférine excitée ⁷² (Figure 15) et la géométrie rotationnelle du site actif par rapport aux noyaux thiazoline de l'oxyluciférine ²⁷. L'hypothèse de polarité est basée sur le fait que le spectre d'émission de la luciférine et de ses analogues, tout comme les composés fluorescents, peut être décalé de plus de 40nm en fonction du solvant dans lequel ils se trouvent. Dans un solvant non polaire il se décale vers le bleu alors que dans un solvant polaire il se déplace vers le rouge. L'hypothèse de tautomérisation est basée sur le fait que lors d'une décroissance de pH la lumière émise lors d'une réaction de bioluminescence passe du vert au rouge. Les 2 formes énol (émission dans le jaune - vert) et kéto (émission dans le rouge) seraient alors en équilibre et le pH ferait pencher vers la formation de l'une ou de l'autre des 2 formes. Enfin la dernière hypothèse, de géométrie

rotationnelle permettrait d'expliquer l'importante gamme de spectres d'émission observés chez les différents insectes. Selon cette hypothèse, l'oxyluciférine excitée est dans le niveau d'énergie le plus bas lorsque elle se trouve dans un plan à 90° par rapport à celui du plateau de la protéine, l'énergie des photons émis les situerait dans le rouge. Par contre lorsque l'oxyluciférine excitée se trouve dans le même plan que celui de la protéine, son énergie serait maximale et les photons émis se situeraient dans le vert. Enfin des couleurs intermédiaires seraient obtenues pour des situations entre les deux extrêmes. Il semblerait que ces trois hypothèses puissent se révéler exactes, ainsi le phénomène biologique conduisant à l'émission de lumière serait assez complexe et les paramètres, conduisant à l'émission de photons d'énergie différente, nombreux.

Quoi qu'il en soit, dans les essais de bioluminescence, c'est généralement la luciférase de *Photinus pyralis* qui est utilisée. Cette enzyme est sensible au pH, à pH acide vers pH = 6 son spectre d'émission de lumière est maximal vers 617 nm alors que vers pH = 8 son spectre d'émission est maximal vers 565 nm. Cette sensibilité résulte d'une flexibilité du site actif par l'intermédiaire de résidus basiques comme présenté dans la partie précédente.

2 - Applications de la bioluminescence dans les biotechnologies et la recherche biomédicale

Au cours des 50 dernières années, la luciférase d'insecte a beaucoup été utilisée pour des études nécessitant une importante sensibilité comme les dosages d'ATP présent, ou comme indicateur de la croissance de biomasse, ou comme indicateur de contamination microbienne de fluides, pour mesurer la viabilité cellulaire ou encore pour des essais enzymatiques entraînant la production ou la dégradation de l'ATP ⁷³. Un grand nombre de ces techniques de bioluminescence sont désormais utilisées en routine dans l'industrie ou la recherche. Le clonage et le

séquençage de la luciférase d'insecte ont permis l'apparition d'un ensemble de méthodes faisant appel à la réaction luciférase/luciférine. L'originalité du signal et l'absence de bruit de fond endogène, font de l'expression du gène de la luciférase une des méthodes les plus sensibles que ce soit dans le cadre d'études d'activité transcriptionnelle, d'efficacité de transformation ou de transduction et que les études portent sur des cellules, des tissus ou des animaux ^{74,75}. Ce n'est qu'avec le progrès technologique qui est apparu dans le domaine des caméras CCD que le système luciférase et luciférine a connu ses plus grandes avancées. Au cours des 10 dernières années, dans le domaine des caméras CCD, de grandes évolutions ont été réalisées en matière de sensibilité et de reproductibilité des mesures, ce qui a permis le développement de méthodologies faisant appel à des cellules ou des animaux vivants, à différents stades de développement, dans des conditions normales ou pathologiques. Le champ d'investigation de telles méthodes est devenu très important au cours de ces dernières années. Les exemples d'utilisation de la bioluminescence comme méthodologie d'étude sont très nombreux comme l'étude de la progression et de la régression de maladies bactériennes ou virales, ou l'accès non invasif à la mesure de l'expression de gènes ou encore le suivi de l'évolution de tumeurs dans les modèles animaux ^{34,76,77}. De tels outils sont extrêmement pertinents pour l'étude, la mise au point, le screening et la comparaison de divers composés de l'industrie pharmaceutique.

3 - Interférence du rayonnement cosmique avec le signal de bioluminescence

Les rayonnements cosmiques sont des particules énergétiques provenant de l'espace qui bombardent et traversent l'atmosphère terrestre. Près de 90% des particules entrantes de ce rayonnement cosmique sont des protons, environ 9% sont des noyaux d'hélium (particules alpha) et environ 1% sont des électrons libres

⁷⁸. Le terme « rayon » est un terme mal approprié, car les particules du rayonnement cosmique arrivent individuellement, et non sous la forme d'un rayon ou d'un faisceau de particules. Les énergies cinétiques des particules de rayon cosmique s'étalent sur quatorze ordres de grandeur, le flux des rayonnements tombant sur la surface de la terre étant approximativement l'inverse du cube de l'énergie propre à chaque rayon. La grande variété d'énergies des particules reflète la grande diversité des sources (Figure 16). Les rayonnements proviennent des processus énergétiques solaires. Ils peuvent avoir des énergies de plus de 10^{20} eV, alors que les particules produites par des accélérateurs de particules n'ont une énergie qui se situe qu'aux alentours de 10^{12} eV ⁷⁹.

a - Les sources du rayonnement cosmique

La plupart des rayonnements proviennent de sources extrasolaires à notre propre galaxie telles que les supernovas et les trous noirs. Cependant, le fait que quelques rayonnements aient des énergies extrêmement élevées implique que certains d'entre eux sont d'origine extragalactique ; le champ magnétique galactique local ne pourrait pas contenir des particules avec des énergies aussi élevées ⁸⁰.

Des observations ont prouvé que des rayonnements avec une énergie supérieure à 10 GeV (10^{10} eV) approchent la surface terrestre de façon isotropique (de façon égale à partir de toutes les directions); il semblerait que cela soit dû aux champs magnétiques galactiques qui feraient voyager les particules dans des spirales. Ceci rend impossible la prévision de leur localisation spatiale. Lorsque les particules ont une énergie inférieure à 10 GeV leur direction est en relation avec le champ magnétique terrestre et leur charge propre à la nature du rayonnement. De plus l'intensité des rayonnements d'origine solaire est proportionnelle à l'activité de ce dernier ⁸¹ (Figure 16).

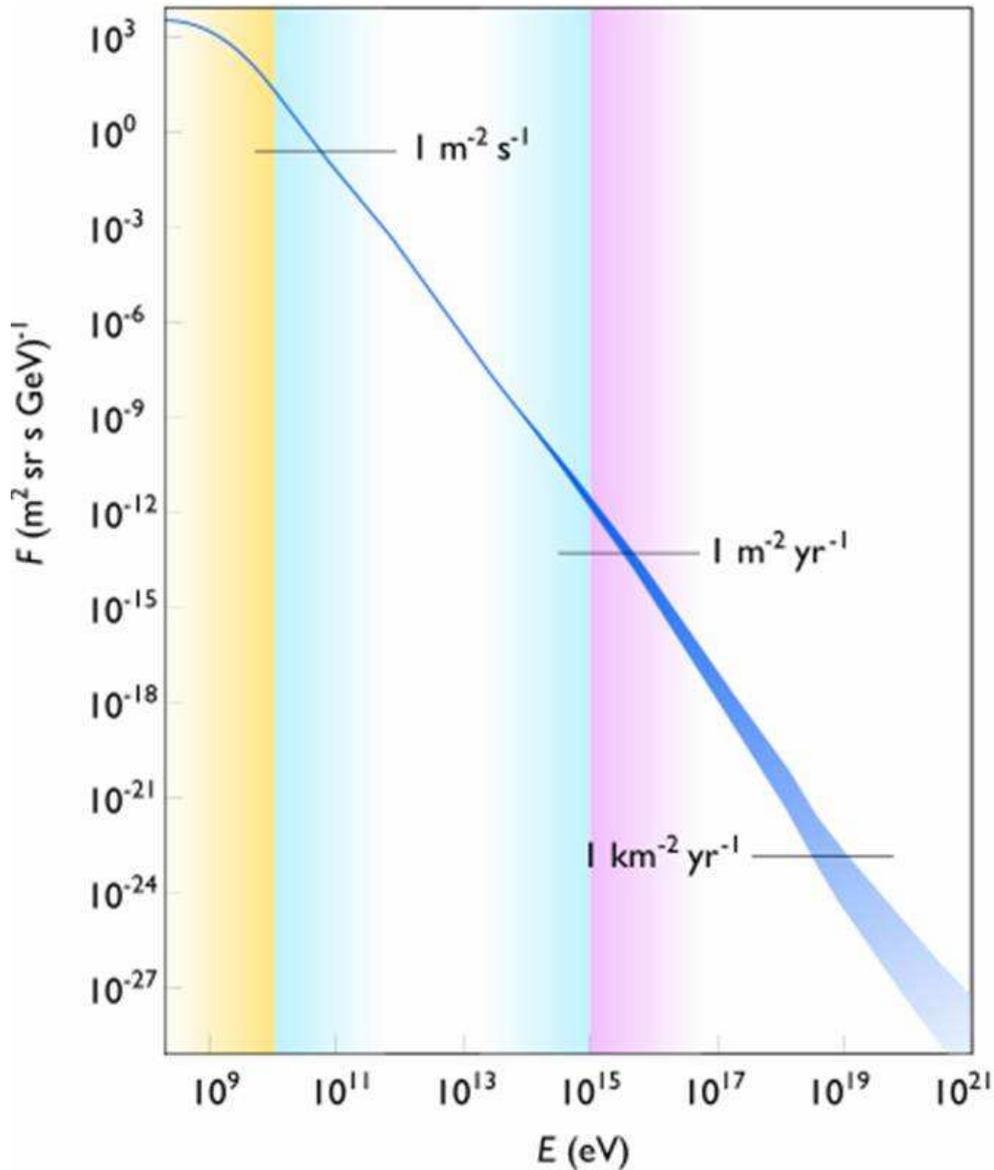


Figure 16 : Spectre d'énergie des particules du rayonnement cosmique.

Le flux des particules constituant le rayonnement cosmique a une fonction importante dans leur énergie. Le flux des particules de plus basse énergie (zone jaune du graphe) est essentiellement attribué au rayonnement cosmique d'origine solaire, les particules possédant une énergie intermédiaire (zone bleue du graphe) correspondent au rayonnement galactique et les particules de plus haute énergie (zone violette du graphe) rassemblent les rayonnements d'origine extragalactique.

(Figure inspirée des travaux de Swordy, 2001)

b - La nature des rayonnements cosmiques

Les rayonnements peuvent être divisés en deux catégories, primaire et secondaire. Les rayonnements qui ont une origine astrophysique extrasolaire sont des rayonnements primaires ; ils interagissent avec la matière interstellaire pour créer des rayonnements secondaires d'énergie plus basse. Le soleil émet également des rayonnements à énergie réduite liés aux éruptions chromosphériques ⁷⁸. La composition des rayonnements primaires, en dehors de l'atmosphère de la terre, dépend de la partie du spectre d'énergies observée. Les rayonnements secondaires, sont essentiellement composés d'atomes lourds comme le lithium, le béryllium et le bore ⁷⁸. Le flux du rayonnement cosmique incident sur l'atmosphère terrestre est modulé par deux processus : le vent solaire et le champ magnétique de la terre. Le vent solaire ralenti les particules entrantes. La quantité de vent solaire n'est pas constante et est fonction des changements de l'activité solaire. Par conséquent le niveau de la modulation change avec l'activité solaire. Le champ magnétique de la terre guide certains des rayonnements, ainsi l'intensité du rayonnement cosmique dépend de la latitude et de la longitude ⁸². L'intensité du rayon cosmique à l'équateur est inférieure à celle aux pôles. Ceci peut être expliqué par le fait que les particules chargées tendent à se déplacer dans la direction des lignes du champ magnétique terrestre. Ces particules entrant dans l'atmosphère, freinées et guidées par le champ magnétique forment les aurores boréales ⁸³.

c - Détection des rayonnements cosmiques

Les noyaux qui composent les rayonnements peuvent voyager de leurs sources éloignées à la terre en raison de la faible densité de la matière dans l'espace ⁸². Les noyaux agissent les uns sur les autres ainsi qu'avec les noyaux des gaz atmosphériques ⁸⁴. Ces collisions, dans un processus connu sous le nom de douche, ont comme conséquence la production de nombreuses particules instables

appelées muons (Figure 17) ⁸⁵. Le muon est, selon le modèle standard de physique des particules, le nom donné à deux particules élémentaires de charge positive et négative ⁸⁶. Les muons ont une masse 207 fois plus grande que celle de l'électron (105,6 MeV) et possèdent un spin 1/2. Les muons, tout comme les électrons, appartiennent à la famille de fermions, les leptons. Les muons sont notés μ^- ou μ^+ en fonction de leur charge électrique. Une certaine proportion de ces muons peut atteindre la surface de la terre. Les muons possèdent une radiation ionisante, et peuvent facilement être détectés par beaucoup de types de détecteurs de particules tels que des chambres de bulle ou des détecteurs de scintillation ⁸⁷. Mais ils peuvent aussi interférer avec des détecteurs ultra sensibles comme ceux des caméras CCD utilisées en bioluminescence ⁸⁸⁻⁹⁰. Ils contribuent ainsi à l'augmentation du bruit de fond des images. Certains constructeurs de caméra CCD dédiées à la bioluminescence ont pris en compte cette interaction entre les rayonnements cosmiques et les détecteurs. Ainsi ils proposent des solutions pour enlever ces perturbations de l'image afin de ne pas fausser la quantification. C'est le cas de la société Xenogen® (Annexe : Documentation Xenogen® IVIS Lumina) qui propose sur l'ensemble de ses appareils une solution logicielle qui effectue des mesures de bruit de fond en dehors des heures de mesures (par exemple la nuit). Par l'intermédiaire de ces mesures, le bruit de fond moyen intrinsèque à l'appareil et du au rayonnement cosmique, est défini et soustrait ensuite de façon systématique aux images réalisées. L'avantage de cette méthode est une grande simplicité pour l'utilisateur, un gain de temps lors des essais et une automatisation de la correction. Les inconvénients sont un manque de lisibilité pour l'utilisateur qui n'a pas accès à ces mesures. Ces dernières étant réalisées en dehors des périodes d'essai une faible modification de l'activité cosmique vient fausser les mesures. Enfin le rayonnement n'étant pas prévisible, certains pixels corrigés vont avoir une intensité négative.

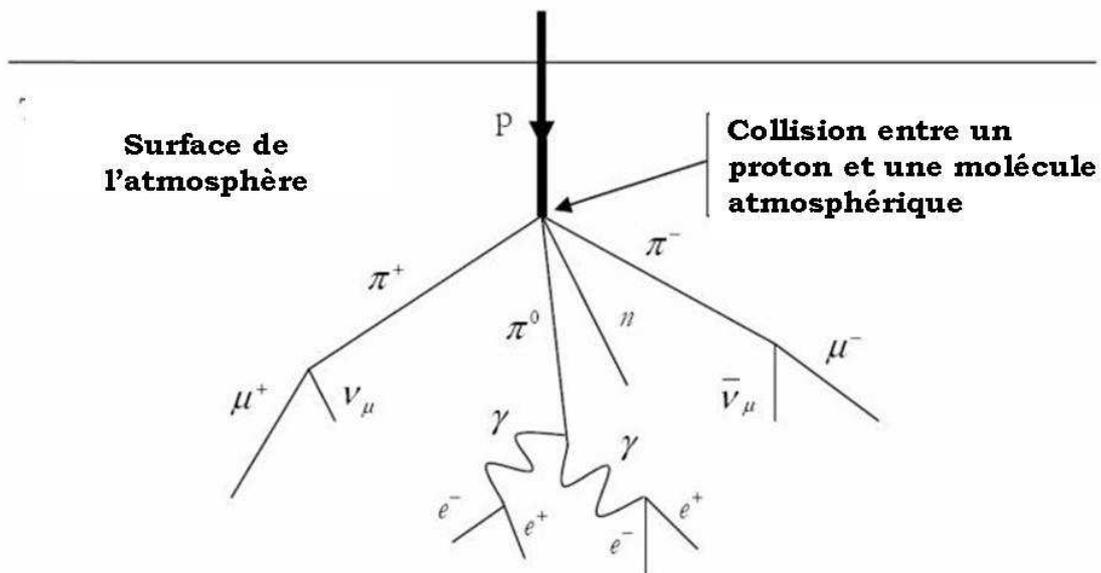


Figure 17 : Principe de la douche cosmique conduisant à la production de muons.

Entrée en collision d'un proton riche en énergie provenant d'un rayonnement cosmique et d'une molécule atmosphérique terrestre. Lors de l'impact différentes espèces peuvent être formées comme les mésons notés π sur le schéma. Ces espèces très instables agissent entre elles pour donner différentes espèces dont les muons notés μ^- et μ^+ selon leur charge. Ce sont ces particules qui en venant frapper la surface du capteur CCD vont entraîner l'apparition d'un bruit de fond. Il est aussi intéressant de noter la production de nombreuses autres espèces comme les électrons, les photons et autres rayonnements. (Figure inspirée d'un manuel de physique et d'astronomie)

4 - Dispositif technique de mesure de la bioluminescence : du photon à l'électron

Les appareils de mesure de bioluminescence sont constitués d'une chambre noire dans laquelle se trouve la caméra CCD (Figure 18). Ce dispositif de détection des photons émis est ensuite relié à un système analogique de récupération numérique des données. C'est donc le capteur d'images de la caméra CCD (*Couple Charged Device*) qui va définir les véritables caractéristiques de l'appareillage : limite de détection, proportionnalité du signal, sensibilité au bruit de fond, résolution et enfin sensibilité à la radioactivité⁹¹⁻⁹³ (Annexes Documentation Xenogen® IVIS Lumina, Documentation ORCA 2-BTL Hamamatsu Electronics®).

a - Principe de fonctionnement

On rencontre des capteurs d'images dans une multitude de domaines industriels, scientifiques et professionnels où la performance est une nécessité absolue (astronomie, microscopie, biologie, radiographie, spectrométrie, physique nucléaire, reconnaissance de formes, contrôle dimensionnel, photographie...). Les capteurs d'image CCD ou rétine CCD (analogie avec l'œil) furent inventés par Boyle et Smith en 1970. Le terme CCD vient de la façon dont les charges accumulées dans une zone de semi-conducteur sont transférées (couplées) à une zone adjacente. Ces zones d'accumulation des charges électriques sont appelées puits de potentiel, et sont créées lorsque l'on applique un champ électrique dans le semi-conducteur (Figure 19). La structure de base d'un capteur CCD est un condensateur MOS (Metal Oxide Semiconductor)^{94,95}. Les électrodes (Grille ou Gate), de quelques microns d'épaisseur, sont réalisées en matériau fortement conducteur : métal (aluminium) ou silicium poly cristallin. La couche isolante, de quelques microns d'épaisseur, est réalisée en dioxyde de silicium (SiO₂). Enfin le substrat (support), dans lequel se formera un canal où se déplaceront les charges

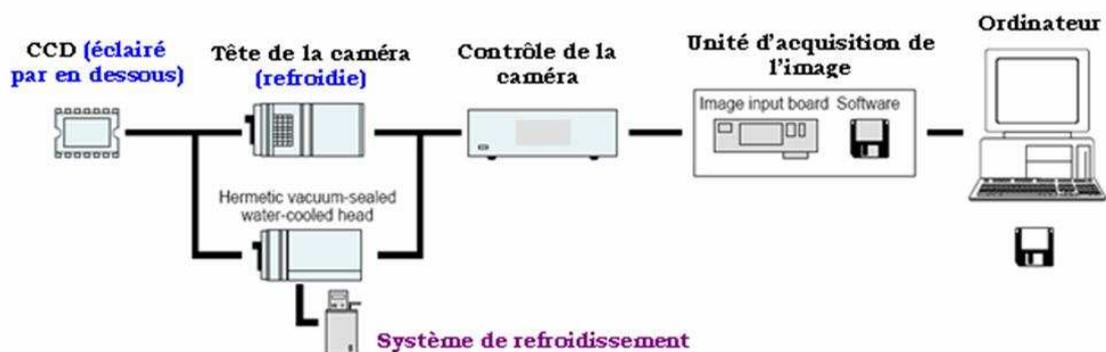
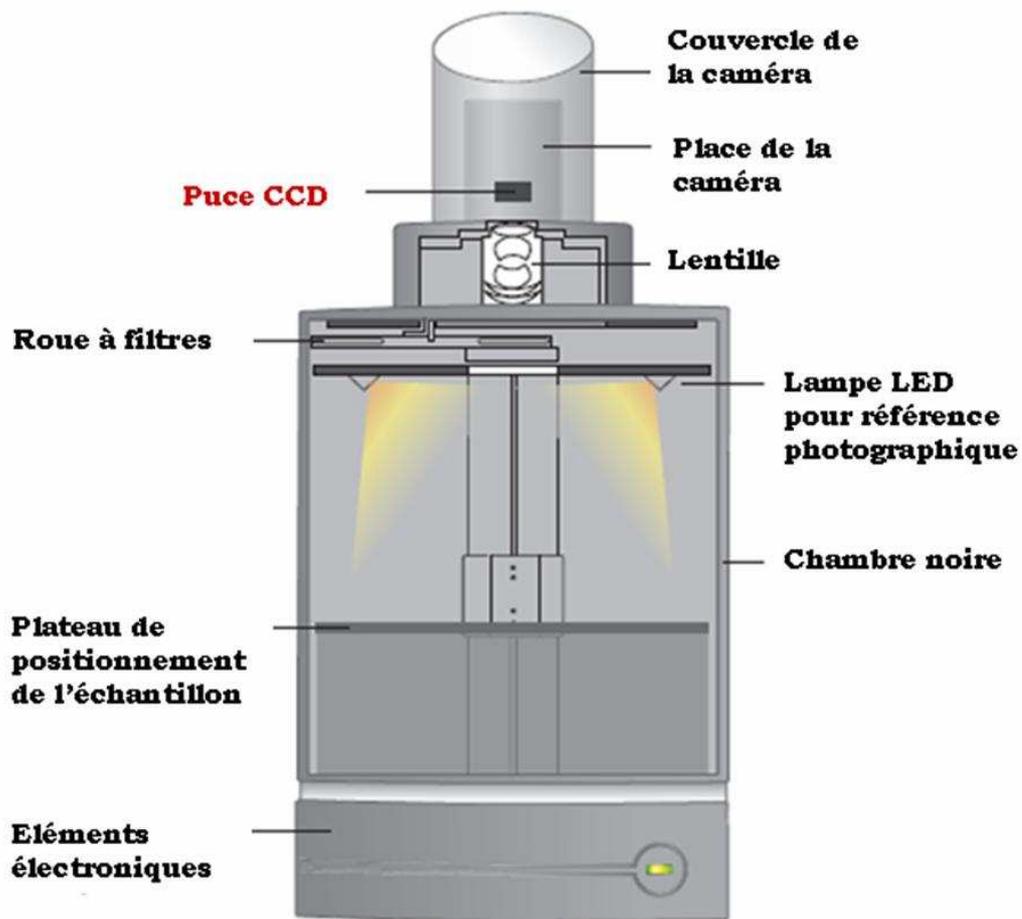


Figure 18 : Exemple de dispositif technique de mesure de la bioluminescence.

Dans la partie supérieure de la figure, vue en coupe du système de détection de la lumière de bioluminescence IVIS (*Xenogen*®). En bas de la figure, configuration complète d'un système de bioluminescence avec le système numérique d'acquisition (*Hamamatsu Electronics*®).

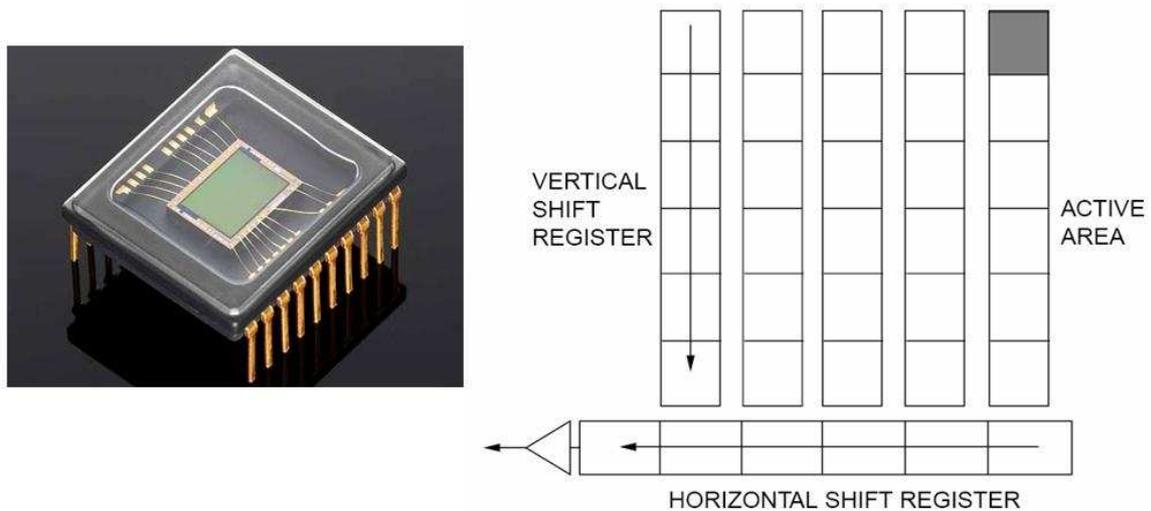


Figure 19 : Principe du transfert de charge à la base du fonctionnement du capteur CCD.

Photographie d'une puce CCD retrouvée dans de nombreux systèmes électroniques. Exemple du principe de transfert de charge pour un capteur CCD de type "full-frame". L'activité lumineuse vient exciter chaque pixel du capteur, l'intensité électrique transférée est mesurée dans la matrice ou registre. (Source : Hamamatsu Electronics ®).

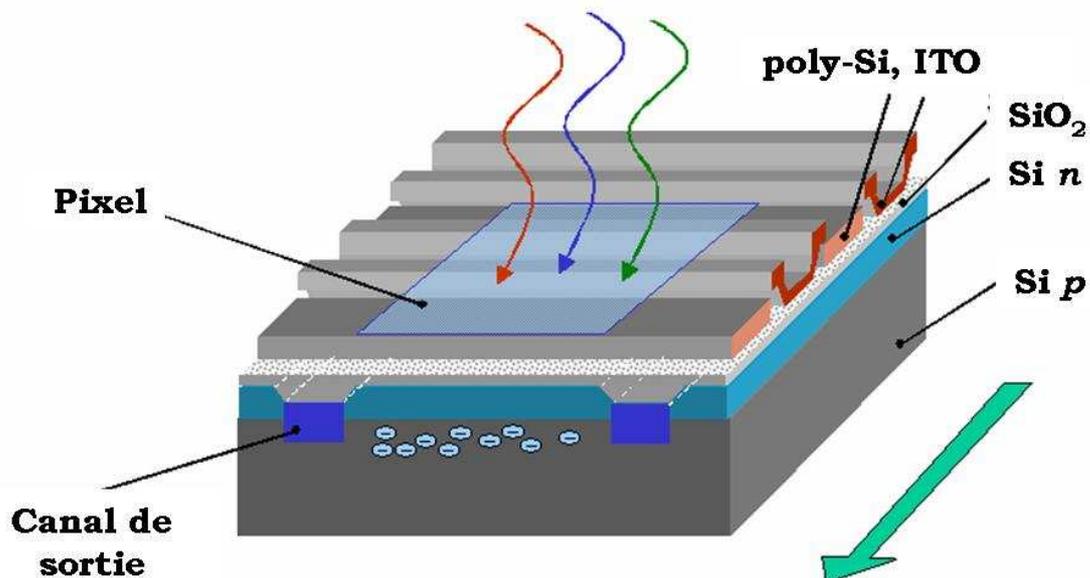


Figure 20 : Vue 3D simplifiée de l'organisation moléculaire d'un capteur CCD.

Des photons de longueur d'onde différente (symbolisées par des flèches rouge, bleue et verte) viennent taper sur la surface d'un pixel du capteur et rencontrent des atomes de silicium. Par la suite les électrons produits sont collectés (sens de la large flèche verte) (Source : manuel d'électronique et d'astronomie).

électriques, est en semi conducteur dopé P (P-Silicium par exemple) ⁹⁶⁻⁹⁸ (Figure 20). La première opération réalisée dans le capteur est la conversion de l'énergie lumineuse (photons d'énergie $h\nu$) en énergie électrique (électrons). Lorsqu'une lumière incidente atteint la surface active, elle traverse les couches métalliques et d'oxydes pour se dissiper dans le semi-conducteur. Si l'énergie d'un photon est suffisante, elle va être transmise à un électron d'un atome de silicium qui va devenir un électron libre, laissant à sa place une charge (e^+) ou trou lié à l'atome dans lequel il a été créé. Les photons de faible énergie (grande longueur d'onde) sont moins facilement détectés et tendent à traverser l'intégralité du cristal de silicium sans générer de paire "électron/trou". A l'inverse les photons de forte énergie (courte longueur d'onde) sont absorbés très près de la surface et n'atteignent donc pas la zone active ne produisant pas de paire "électron/trou" ⁹⁹⁻¹⁰¹. Un capteur CCD possède donc une bande passante à l'intérieur de laquelle celui-ci transforme les rayonnements lumineux en charges électriques. La nature et l'épaisseur des matériaux des grilles et de l'isolant déterminent les fréquences haute et basse (ou les longueurs d'onde basse et haute) de la sensibilité spectrale (de $0,4\mu\text{m}$ à $1\mu\text{m}$, en général centrée sur le spectre visible) caractéristique propre au capteur CCD utilisé ⁹⁹. Le nombre d'électrons générés par photon est nommé "efficacité quantique" (QE : Quantum Efficiency); elle varie de 40% à 60% couramment et atteint 90% pour les CCD spéciaux tels les refroidis) ¹⁰²⁻¹⁰⁵. Les électrons peuvent être séparés des trous du réseau en appliquant une tension positive à une grille. Ceci crée un puits de potentiel dans lequel vont être attirés et confinés les électrons produits (phase de collecte ou d'intégration). Ces électrons, attirés par le potentiel positif, vont venir se regrouper sous l'électrode active à proximité de l'interface Si-P et SiO₂, sans toutefois pouvoir traverser cette dernière.

b - Mouvement des charges et lecture du signal

En associant plusieurs pixels les uns à la suite des autres, on constitue une ligne CCD ; plusieurs lignes verticales vont pouvoir réaliser une matrice CCD capable de capter une image. La succession des phases des tensions appliquées aux grilles va déplacer les puits de potentiel et faire se déverser de proche en proche, les charges de chaque pixel. Les charges de chaque pixel transférées dans le registre sont finalement converties en tension par un condensateur ^{91,106}.

c - Le cumul des charges ou "binning"

Le "binning" est une opération spécifique aux capteurs CCD qui se décompose en 2 possibilités :

- Le binning de lignes (vertical).
- Le binning de pixels (horizontal).

Lors du fonctionnement d'un capteur CCD, pendant le temps d'intégration, les charges électriques s'accumulent dans le puits de potentiel de chaque pixel. Lorsque les quantités de lumière sont extrêmement faibles (exemple de débuts de développement de tumeurs bioluminescentes) la charge contenue dans chaque pixel n'est pas suffisante pour être exploitée facilement. Le binning consiste à accumuler les charges de plusieurs pixels adjacents afin d'obtenir plus de signal utile. Par exemple, un binning de 2x2 groupe les charges de 4 pixels. Cela s'accompagne bien sûr d'une réduction de la résolution spatiale de l'image finale qui possède alors une surface 4 fois moins grande. Ainsi le choix d'un binning par rapport à un autre constitue un véritable compromis entre résolution et sensibilité ¹⁰⁷ (Figure 21).

Remarque : Comme tous les autres traitements, le binning de l'image peut aussi s'opérer de façon logicielle, mais il conduit en général à une augmentation globale du bruit du signal : le binning interne est toujours préférable.

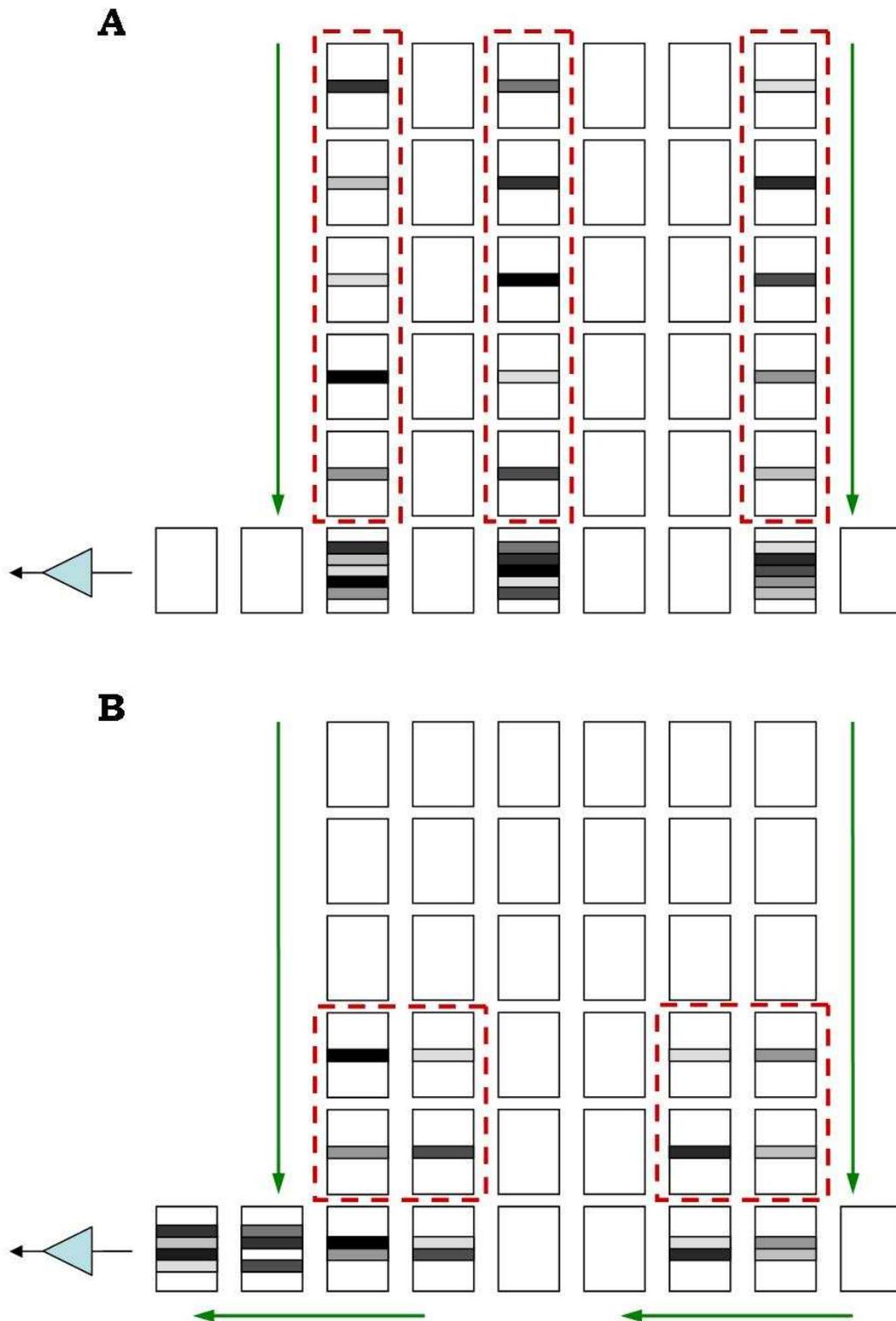


Figure 21 : Principe de cumul des charges : le binning.

Présentation des 2 types de binning au niveau de l'acquisition de l'image et non au du traitement. L'intensité lumineuse de chaque pixel est représentée en niveaux de gris. En A principe du binning de ligne et en B principe du binning de pixel. Ce dernier est le plus souvent utilisé lors de la conception des systèmes de mesure de bioluminescence. (Source image personnelle inspirée d'Hamamatsu Electronics®)

(i) Le binning de lignes.

En appliquant un nombre donné d'impulsions d'horloge verticale, alors que l'horloge horizontale est stoppée, la charge contenue dans chaque pixel vertical est séquentiellement transférée et ajoutée dans chacun des pixels du registre horizontal. Dès la fin du cumul du $n^{\text{ième}}$ élément, les horloges horizontales sont redémarrées et le signal est dirigé vers la sortie. Cette méthode, qui permet d'accumuler les charges de n pixels verticaux, trouve son application dans les spectromètres où toute une rangée verticale reçoit le même rayonnement. Le fait d'accumuler n pixels, multiplie par n la sensibilité de l'appareil ¹⁰⁷.

(ii) Le binning de pixels.

Cette méthode consiste à regrouper (à accumuler) dans la cellule «SG» (Summing Gate), les charges contenues dans un carré de $n \times n$ pixels. Par exemple, dans le cas du binning 2×2 , 2 pixels de tous les registres verticaux sont additionnés dans tous les pixels du registre horizontal. Pour ce faire, pendant l'arrêt des horloges horizontales, les horloges verticales délivrent 2 impulsions. Dès la remise en marche de l'horloge horizontale, l'horloge verticale est stoppée, tous les pixels horizontaux se déplacent, deux pixels horizontaux vont se déverser dans le registre « SG » qui ne sortira son contenu vers l'amplificateur de sortie que tous les 2 coups d'horloge horizontale, lors de l'impulsion appliquée à la porte de transfert «OG» (Output Gate) ¹⁰⁷.

d - Signal de sortie et sensibilité spectrale

La quantité de charges de chaque pixel est représentative de l'intensité lumineuse de chaque point de l'image captée (en général la linéarité est supérieure à 99%) ¹⁰⁸. Elle est représentée par 2 limites : la limite haute (niveau du blanc) due à la saturation des cellules qui ne peuvent accueillir qu'un nombre limité d'électrons et la limite basse (niveau du noir) imposée par le bruit thermique. Le

bruit thermique correspond à la production de paires "électrons/trous" sous l'effet de l'agitation thermique du cristal. Ces électrons, séparés des trous, s'ajoutent aux électrons photoniques et viennent perturber le signal utile ¹⁰⁹. Dans les applications scientifiques, comme la bioluminescence, la détection de lumière faible est un objectif premier, il est donc nécessaire de refroidir le capteur. Ceci est en général réalisé simplement à l'aide d'un module Peltier thermiquement relié au capteur et dont on évacue la chaleur extraite par un dissipateur thermique associé à un ventilateur. Ce module Peltier nécessite une circulation de courant importante pour obtenir un refroidissement pouvant aller jusqu'à 70°C. La sensibilité spectrale représente l'évolution de l'efficacité quantique (QE) en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente. Elle dépend vers les grandes longueurs d'onde de la nature du semi-conducteur du substrat et de son dopage, et vers les faibles longueurs d'onde de la géométrie des structures des pixels. Le spectre couvert va de 200nm environ à 1200nm environ. La plupart des CCD utilisés en bioluminescence présentent un maximum dans le bleu-vert (QE = 70% à 90% entre 550 et 650nm) ¹⁰³.

e - Les perturbations du signal : le bruit de fond

De nombreuses sources de bruit affectent les capteurs CCD, tels les bruits de recombinaisons des porteurs de charges dans les semi-conducteurs ou les rayonnements cosmiques. Si on ne considère que les bruits intrinsèques aux CCD, on peut les regrouper en 4 catégories :

(i) Bruit de motif (Fixed Pattern Noise FPN).

Ce bruit correspond à la variation de la photosensibilité de pixels voisins. Ces différences de sensibilité proviennent des variations géométriques et physico-chimiques apparues lors du procédé de fabrication. Le bruit de motif croît proportionnellement à l'amplitude du signal ¹¹⁰.

(ii) Bruit de grenaille (Shot Noise SN) ou bruit quantique.

Le bruit de grenaille est produit par les variations statistiques du nombre de photons incidents qui atteignent la zone photosensible. Tous les semi-conducteurs sont affectés par ce type de bruit. Ce bruit est proportionnel à la racine carrée de l'amplitude de l'intensité lumineuse qui atteint le capteur ¹¹¹⁻¹¹³.

(iii) Bruit de grenaille du courant d'obscurité (Dark Shot Noise DSN).

Le courant d'obscurité est également affecté d'un bruit de grenaille. Les recombinaisons d'électrons et de trous dans la zone de déplétion produisent un bruit de grenaille du courant d'obscurité, proportionnel à la racine carrée du nombre d'électrons générés dans l'obscurité par l'agitation thermique.

(iv) Bruit de lecture (Readout Noise RN).

C'est un bruit thermique provenant de la structure de l'amplificateur de sortie (MOS). Il est constant, indépendant du nombre de photons incidents et ne peut-être réduit que par un refroidissement de cette structure. Le signal d'obscurité est quasiment négligeable dès que l'on atteint une température de -40°C ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

II - Le rituximab : un anticorps anti-CD20 dans les lymphoproliférations B.

A - Utilisation des anticorps monoclonaux recombinants en cancérologie

La production d'anticorps monoclonaux *in vitro* a longtemps été rendue difficile en raison de la faible durée de vie des cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes. Les anticorps étaient alors obtenus *in vivo* en injectant chez l'animal un antigène donné et en recueillant les anticorps dans le sang. Cette méthode était très coûteuse, donnait des anticorps en faibles quantités et pollués par de nombreuses impuretés. Une avancée majeure a été faite à la fin des années 1970 par César Milstein et Georges Köhler avec le développement de la technique des hybridomes. L'antigène est injecté chez l'animal, et des cellules de rate (splénocytes) sont prélevées au bout de quelques semaines. Parmi ces cellules se trouvent des plasmocytes sécrétant des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène choisi. Les plasmocytes sont alors fusionnés *in vitro* avec des cellules myélomateuses ayant la propriété de se multiplier indéfiniment. Les cellules ainsi obtenues sont appelées hybridomes et, après sélection et multiplication, produisent des anticorps monoclonaux, très purs et en quantités importantes. Plus de 25 ans après leur découverte, les anticorps monoclonaux sont parmi les produits pharmaceutiques qui se développent le plus rapidement en cancérologie. Les immenses progrès réalisés en biotechnologie et en particulier avec les techniques de recombinaison génétique en sont les responsables. Il est maintenant possible d'obtenir des anticorps monoclonaux murins, chimériques, humanisés, primatisés, de plus en plus proches des anticorps monoclonaux humains ainsi que des anticorps entièrement humains par banques combinatoires à l'aide de la technique du phage display ou directement chez des souris transgéniques. Au moins 400 anticorps

monoclonaux sont en phase d'essai clinique déjà avancée, en cancérologie, pour la transplantation d'organes et pour les maladies auto-immunes ou infectieuses ¹¹⁷. Des progrès énormes ont été réalisés aussi bien dans la conception d'anticorps de plus en plus spécifiques d'un antigène donné, sous forme de fragments conjugués ou non avec des produits ou des composés radioactifs, que pour leur production à l'échelle industrielle dans différents systèmes d'expression (bactéries, levures, cellules de mammifères, plantes et animaux transgéniques). De nombreuses stratégies, visant à encore améliorer l'affinité et la stabilité de ces anticorps pour leur cible ainsi que le rendement de leur taux de production, devraient réduire leur prix de revient et en faire, dans un futur proche, des outils efficaces et utilisables à grande échelle pour traiter de nombreuses pathologies.

B - Les différentes générations d'anticorps

Ce véritable engouement pour les anticorps est dû pour beaucoup aux résultats thérapeutiques encourageants obtenus par l'injection d'anticorps recombinants en grande partie humanisés, tel que le rituximab, anti-CD20, dans les lymphomes B folliculaires et tel que l'herceptine, anti-ErbB2, dans les carcinomes du sein. Grâce à l'ingénierie génétique, il est possible de greffer les régions variables ou hypervariables des anticorps murins sur des molécules d'IgG humaines, ou même d'obtenir des anticorps entièrement humains, soit chez des souris transgéniques pour une grande partie du répertoire des IgG humaines, soit par sélection de domaines variables humains exprimés sur des phages ¹¹⁸ (Figure 22). Le marquage des anticorps par des radio-isotopes a également joué un rôle important dans la démonstration de la spécificité de l'immunociblage tumoral et reste intéressant pour le diagnostic par immuno-scintigraphie ainsi que pour la radio-immunothérapie de certains cancers ¹¹⁹. Les premiers anticorps monoclonaux développés étaient entièrement murins. Cela limite leur utilisation pour

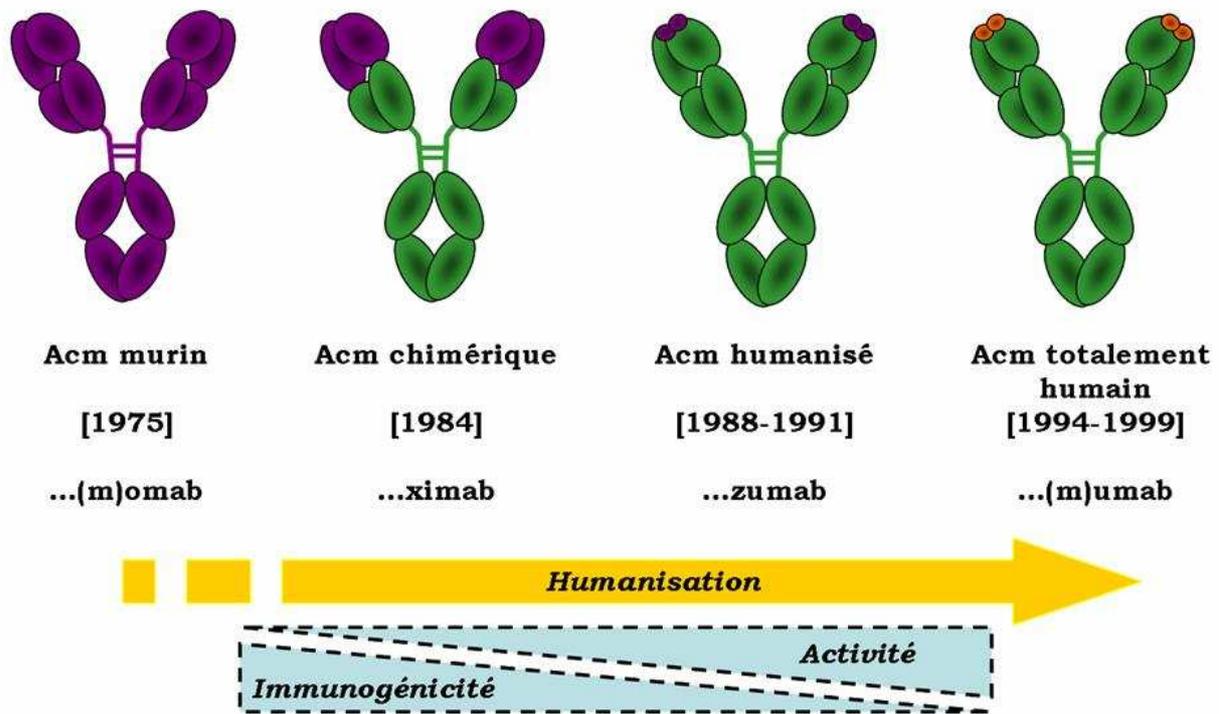


Figure 22 : Différentes génération d'anticorps apparues avec l'humanisation des molécules.

Représentation des différentes générations d'anticorps. Les premiers anticorps monoclonaux développés étaient complètement murins, leur nom se termine par ...**(m)omab**. Puis sont apparus les anticorps chimériques dont le suffixe est ...**ximab**. L'humanisation des anticorps s'est poursuivie avec l'apparition des anticorps humanisés dont le suffixe est ...**zumab**. Enfin les anticorps totalement humains ont été développés, leur suffixe est ... **(m)umab**. Avec l'humanisation des anticorps, leur immunogénicité a été fortement réduite et leur activité nettement augmentée. En effet du fait de la présence des structures humaines, les interactions avec les molécules et cellules du système immunitaire sont nettement améliorées (*Figure personnelle inspirée de Cartron et al. 2002*).

l'immunociblage chez l'homme. L'anticorps injecté peut entraîner une réponse immune du patient contre cette protéine étrangère. Cette réponse, limite le nombre d'injections que l'on peut réaliser chez un même patient et réduit par la même l'efficacité thérapeutique du traitement ¹²⁰. La connaissance de la structure des anticorps et les techniques actuelles d'ingénierie des protéines ont permis de créer dans un premier temps des anticorps dits chimériques dans lesquels seuls les domaines variables sont murins ¹²¹. L'ensemble des domaines constants de ces anticorps est humain. Les anticorps chimériques comportent donc une partie de protéine murine (33 %) et ils conservent la même affinité pour l'antigène que l'anticorps murin parental. Ensuite sont apparus les anticorps humanisés pour lesquels on ne conserve que les régions de l'anticorps murin correspondant aux zones d'interaction avec l'antigène (CDR : Complementarity Determining Regions). Dans ce cas, la fraction de protéine murine est très réduite (10 %), dans la plupart des cas l'affinité de l'anticorps humanisé n'est pas aussi élevée que celle de l'anticorps murin parent Ceci est dû à la contribution des zones de charpentes de l'anticorps. Ces zones n'interviennent pas directement dans l'interaction avec l'antigène, mais elles permettent le positionnement des zones hypervariables de manière optimale vis-à-vis de l'antigène ¹²² (Figure 22). Les anticorps monoclonaux (Acm) totalement humanisés sont, comme leur dénomination le suggère, complètement humains même si il est possible d'avoir des variations (< 25%) par rapport aux séquences humaines de référence.

C - Approche thérapeutique des cancers par immunothérapie

1 - Utilisation d'anticorps nus : immunothérapie classique

La plupart des anticorps monoclonaux recombinants sur le marché, approuvés par les agences internationales, sont conçus sur le format des IgG1 humaines et sont "nus" (naked antibodies), c'est-à-dire non couplés à un agent

anti-mitotique, à un radio-isotope ou à une toxine (Tableau 03). L'effet thérapeutique résulte donc des propriétés de l'anticorps lui-même, associant des fonctions liées à la reconnaissance de l'antigène et des fonctions liées à la portion Fc (Fragment cristallisable) de l'IgG1. Ce sont les premières qui dominent quand il s'agit de cibler des antigènes solubles, tandis que les deux types de fonctions interviennent le plus souvent lors du ciblage d'antigènes exprimés à la surface de cellules cancéreuses ^{123,124}.

Dans le domaine de la cancérologie, quelques exemples majeurs d'anticorps ont permis l'établissement de nombreux modèles moléculaires, cellulaires et animaux afin d'appréhender leurs mécanismes d'action, d'analyser leur efficacité ou encore de suivre leur distribution et leur pharmacocinétique. On peut citer un anticorps anti-CD20 pour le traitement de lymphomes B non hodgkiniens (LNH-B) : le rituximab (MabThera®), un anticorps anti-ErbB-2 indiqué dans le cancer du sein métastatique : le trastuzumab (Herceptin®) ou encore un anticorps anti CD52 indiqué dans les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC-CLL) : l'alemtuzumab (Campath®) (Tableau 03).

2 - Utilisation d'anticorps couplés à un élément radioactif ou à une toxine

L'hétérogénéité de l'expression de certains antigènes cibles ainsi que la difficulté de pénétration des anticorps au sein de foyers tumoraux de taille importante tend à limiter l'efficacité des anticorps nus. C'est pourquoi se sont développés des anticorps monoclonaux couplés à une toxine ou à un élément radioactif afin qu'ils soient plus efficaces. Bien qu'elle soit encore discutée, l'efficacité de la radio-immunothérapie a été démontrée dans certaines situations comme le cas de LNH, de bas grades et de grades intermédiaires, récidivants et résistants à la chimiothérapie ^{125,126}. Dans cette situation favorable de tumeurs

Spécificité	Nom initial de l'Acmr	Nom commercial	DCI	Indications actuelles
Anti-CD20	IDEC-C2B8 R105	MabThera® Rituxan®	rituximab	Lymphomes
Anti-CD52	LDP-03 Campath-1H	MabCampath®	alemtuzumab	Leucémie lymphoïde chronique
Anti-erbB2	Hu4D5 R597	Herceptin®	trastuzumab	Cancer du sein
Anti-erbB1	IMC-C225	Erbitux®	cétuximab	Cancers ORL et colorectaux
Anti-erbB1	RhuMab-EGFr ABX-EGF	Vectibix®	panitumumab	Cancer colorectal
Anti-VEGF	RhuMab-VEGF/huA.4.6.1/R435	Avastin®	bévacizumab	Cancer colorectal
Anti-CD20 couplé à l' ¹³¹ I	¹³¹ I-B1	Bexxar®	tositumomab	Lymphomes B
Anti-CD20 couplé à l' ⁹⁰ Y	Y2B8	Zevalin®	ibritumomab tiuxétan	Lymphomes B
Anti-CD33 couplé à la calichéamycine	CMA676 HP67.6	Mylotarg®	gemtuzumab ozogamicin	Leucémies aiguës myéloblastiques
Anti-CD20	-	HumaxCD20®	ofatumomab	Lymphomes B
Anti-CTLA-4	MDX-010	-	ipilimumab	Mélanome
Anti-CTLA-4	CP-675206	-	ticlimumab = tremelimumab	Mélanome
Anti-EGF-R	-	TheraLoc®	nimotuzumab	Cancer du poumon

Tableau 03 : Principaux anticorps monoclonaux thérapeutiques actuellement sur le marché dans des indications de cancérologie.

Liste des anticorps approuvés par les agences de contrôle Américaine et Européenne actuellement utilisés en cancérologie. Pour chacun d'entre eux sont indiqués la cible antigénique contre laquelle ils ont été développés, le nom initial lors de leur production, le ou les noms commerciaux, leur dénomination commune internationale (DCI) ainsi que les indications thérapeutiques majeures actuelles bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Le panitumumab (anti EGF-R, cancer colorectal) à la dose de 20 mg/mL, l'ipilimumab (anti CTLA-4, mélanome) à la dose de 5mg/mL, le ticlimumab (anti CTLA-4, mélanome) à la dose de 5 mg/mL et le nimotuzumab (anti EGF-R, cancer du poumon) à la dose de 5 mg/mL n'ont pas encore reçu d'AMM mais bénéficient d'une ATU (autorisation temporaire d'utilisation) obtenue au cours de l'année 2007. De très nombreux autres anticorps monoclonaux à visée thérapeutique en cancérologie sont en cours de développement (*Travail bibliographique personnel*).

radiosensibles, la radio-immunothérapie permet d'améliorer les résultats thérapeutiques obtenus avec les anticorps anti-CD20 nus dans les LNH-B (Tableau 03) ¹²⁷. Des résultats encourageants ont été également obtenus dans le traitement de plusieurs formes de leucémies, en particulier les leucémies myéloïdes, où la radio-immunothérapie, fondée sur l'utilisation d'anticorps marqués à l'iode 131, a été associée à une chimiothérapie et/ou une irradiation corporelle totale dans le cadre d'un traitement combiné intensif préparatoire à une greffe de moëlle ¹²⁸. La radio-immunothérapie est également évaluée en clinique dans le traitement des tumeurs solides ¹²⁸⁻¹³¹.

Si les radio-isotopes émetteurs bêta utilisés actuellement en radio-immunothérapie sont bien adaptés à des tumeurs de quelques millimètres de diamètre, cela n'est plus le cas pour les nodules tumoraux constitués de quelques cellules seulement. En effet, le rayonnement des particules de type bêta a un parcours limité, il est de l'ordre du millimètre pour l'iode 131 (moyenne énergie) et du centimètre pour l'yttrium 90 (forte énergie). Avec ce type de rayonnement et pour une cible tumorale de 1 mm de diamètre, fixant de façon homogène le radio-immunoconjugué, on a démontré que 20 % seulement de l'énergie émise sont répartis à l'intérieur de la cible et que 70 % sont disséminés à l'extérieur ^{132,133}. Les particules alpha ont la caractéristique d'avoir un TEL (transfert linéique d'énergie) 100 fois plus élevé que celui des rayonnements particuliers bêta. Elles ont, en conséquence, une cytotoxicité beaucoup plus élevée que celle des particules bêta. Cependant, en pratique, les applications médicales sont limitées par les caractéristiques radiophysiques des radionucléides émetteurs alpha disponibles qui possèdent une faible durée de demie vie.

Selon le même principe, l'autre approche consiste à coupler à l'anticorps une toxine (diphthérique, ricine, pseudomonas, etc.) ou un agent de chimiothérapie, provoquant la mort de la cellule après internalisation de la toxine. Le couplage au

gemtuzumab (anti-CD33) de l'ozogamicin est un conjugué (Mylotarg®) utilisé actuellement pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës exprimant le CD33.

Ces traitements d'immunoradiothérapie ou d'immunochimiothérapie, dits «ciblés» ne sont cependant pas dépourvus de toxicité systémique. Soit, par exemple, l'irradiation des cellules souches hématopoïétiques saines, si la moelle osseuse est fortement infiltrée par les cellules tumorales (ceci est d'ailleurs une contre-indication), soit l'expression de la cible sur d'autres tissus que les tissus malades ou encore une captation inadéquate, non spécifique, dans le système réticulo-endothélial.

D - Le CD20 : une cible antigénique de choix dans les lymphomes non hodgkiniens

Les caractéristiques antigéniques sont des critères incontournables en immunothérapie passive car, pour être efficaces, les anticorps monoclonaux recombinants (Acm-r) doivent reconnaître une cible antigénique présentant des propriétés particulières (Figure 23).

1 - Qualités d'une bonne cible antigénique en immunothérapie passive

Les critères les mieux exploités dans le choix d'un antigène cible sont la physiologie et la fonctionnalité ¹³⁴. A titre d'exemple, la conception et le développement d'Acm-r agonistes ou antagonistes s'inspirent des propriétés connues de certains récepteurs et d'antigènes solubles, dans le but de neutraliser ou de favoriser leurs effets. Cependant, il est aussi possible qu'un anticorps prenne pour cible un antigène dépourvu de fonction connue, et se révèle efficace par l'induction de mécanismes pro-apoptotiques dépendants de son fragment Fab (Fragment antigen binding), ou par le recrutement d'effecteurs cellulaires

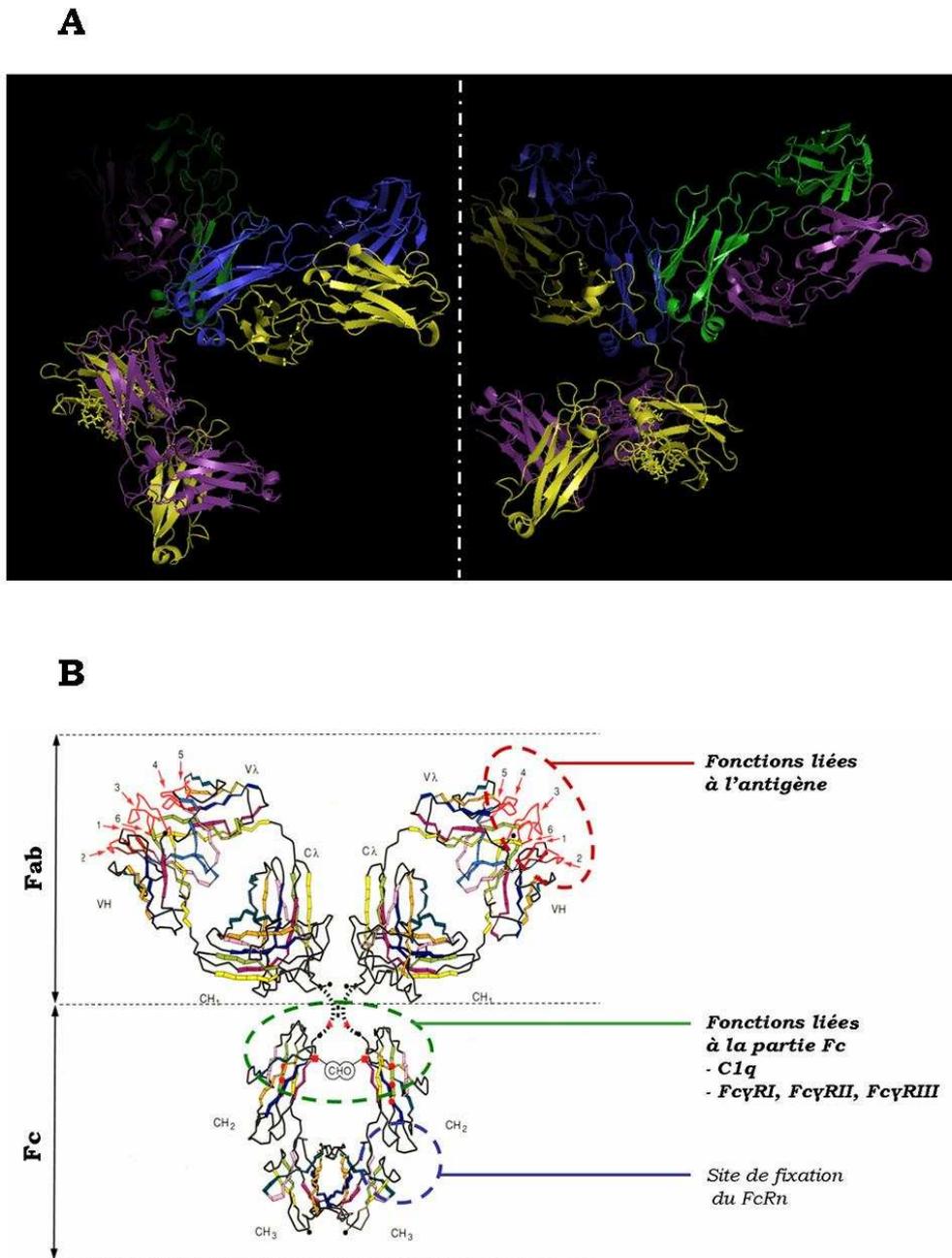


Figure 23 : Structure tridimensionnelle des anticorps monoclonaux de type IgG1.

A : Représentation des différentes chaînes d'une molécule IgG1. Les chaînes légères sont bleue et verte tandis que les chaînes lourdes sont jaune et violettes (*Image personnelle, établie sous PyMol, séquence PDB : 1IGY*).

B : Autre représentation tridimensionnelle d'une molécule d'IgG1. On peut noter les deux fragments de l'anticorps : Fab et Fc. La région charnière extrêmement flexible confère de nombreuses propriétés à la molécule. On peut aussi noter le site de liaison de l'anticorps à sa cible antigénique mais aussi le site de fixation des molécules du complément ou des récepteurs FcγR. Enfin une dernière région permet la liaison de l'anticorps à une molécule de FcRn permettant ainsi son recyclage.

dépendants de sa région Fc comme la voie CDC (Complement Dependent Cytotoxicity) ou l'ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) ¹³⁵ (Figure 23). C'est notamment le cas du rituximab ou de l'alemtuzumab ^{134,136,137}. Il est par ailleurs intéressant de noter que c'est essentiellement le succès clinique du rituximab qui a conduit à s'intéresser à la fonction du CD20. Récemment son rôle de canal calcique a été démontré permettant d'expliquer l'apoptose induite après fixation du rituximab ^{138,139}. D'autres facteurs sont à prendre en considération, comme le niveau et le siège d'expression cellulaire de l'antigène ainsi que son degré de spécificité pour les cellules tumorales. L'expression massive d'un antigène et bien souvent sa concentration dans des structures membranaires telles que les radeaux lipidiques, augmente ses probabilités d'interaction avec l'Ac et potentialise ses effets neutralisants ou cytolytiques ¹³⁴. Lorsque l'antigène possède une structure ou un ancrage membranaire empêchant sa sécrétion et/ou son internalisation, les effets de l'Ac peuvent être persistants dans le temps tout en évitant une interférence pharmacocinétique provoquée par les formes solubles du récepteur. Enfin, la fréquence de l'expression d'un marqueur sur les tumeurs est une variable à prendre en compte lors du développement d'un Acm-r. Cependant, la forte expression d'un antigène est rarement associée à une spécificité d'expression tumorale élevée, mais un manque de spécificité peut être mis à profit pour destiner certains Acm-r à un plus grand panel de cellules tumorales ^{134,140,141} (Figure 23).

2 - Structure, fonction et signalisation du CD20

Le CD20 humain est une phosphoprotéine non glycosylée de 33-35 kDa, constituée de quatre domaines transmembranaires et deux extrémités domaines N- et C- terminales intracytoplasmiques. Une deuxième boucle d'environ 43 acides aminés détermine le seul réel domaine extracellulaire ¹⁴² qui concentre les épitopes reconnus par les Ac anti-CD20 ¹⁴³ (Figure 24). Son gène (*MS4A1*) est situé sur le

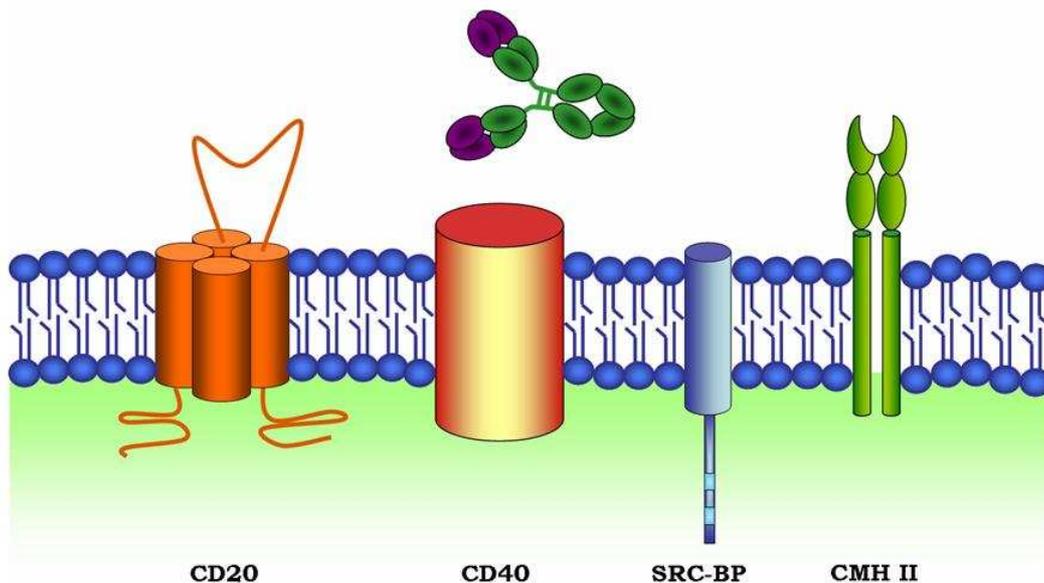
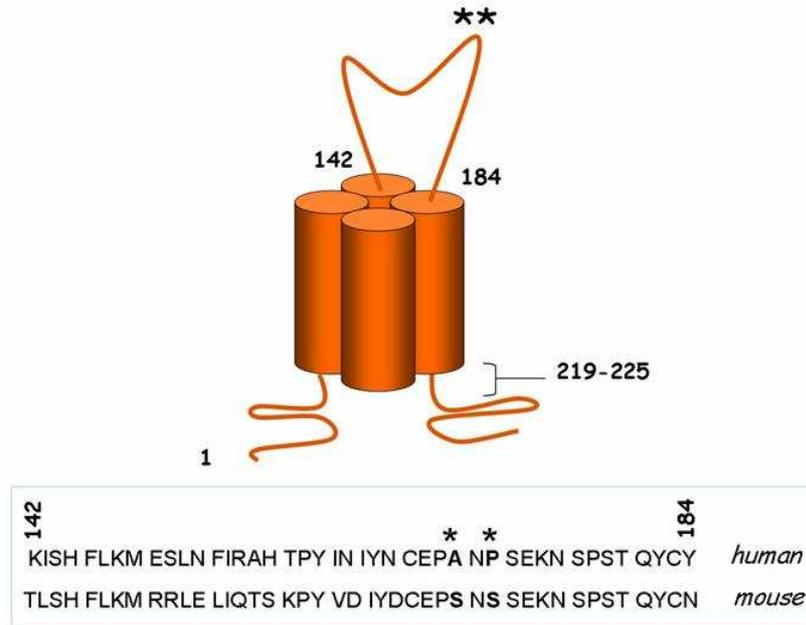


Figure 24 : Schéma de la structure du CD20.

Le CD20 est schématisé avec ses domaines amino et carboxy terminaux cytoplasmiques, ses quatre domaines transmembranaires ainsi que son domaine extracellulaire (résidus 142 - 184). La séquence de ce dernier domaine est indiquée et regroupe la plupart des épitopes reconnus par un panel d'anti-CD20. Les résidus A170 et P172 (*) sont d'ailleurs essentiels à cette reconnaissance. Le domaine cytoplasmique critique à la redistribution du CD20 dans les radeaux lipidiques est indiqué par une accolade (résidus 219 - 225). Au sein de la membrane plasmique, le CD20 est exprimé sous la forme de complexes multimériques et plusieurs molécules CD20 sont associées avec d'autres molécules comme le CD40, les molécules du type SRC-BP (binding protéin), les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Cette structure oligomérique joue aussi un rôle déterminant dans la définition épitopique (Figure inspirée d'après Cartron et al., 2004).

chromosome 11^{142,144}, et fait partie d'un groupe de gènes "MS4A" (Membrane Spanning 4A) codant des protéines à quatre domaines transmembranaires¹⁴⁵.

Le CD20 est un marqueur retrouvé spécifiquement à la surface des lymphocytes B normaux et néoplasiques, depuis leur stade "pré-B" jusqu'au stade précédant leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps¹⁴⁶. De plus, ce marqueur est exprimé sur les cellules tumorales B^{147,148}. Après la fixation d'un Ac, le CD20 ne peut être internalisé que temporairement et dans certaines conditions¹⁴⁹. En outre, les formes solubles de CD20 trouvées dans le sang périphérique résultent de la libération de microvésicules membranaires et non d'un décapage de l'antigène par des protéases ou de la synthèse d'une forme soluble¹⁵⁰. Un gène orthologue du CD20 a été retrouvé chez la souris¹⁵¹. Au niveau du domaine extracellulaire il y a une divergence de 16 des 43 acides aminés (Figure 24), il semble aussi exister des différences conformationnelles significatives et majeures. Ces dernières sont responsables de l'absence de réactivité croisée entre des anticorps anti-CD20 (humain ou murin) pour le CD20 orthologue¹⁴³. A ce jour, la fonction physiologique précise du CD20 n'a pu être déterminée, et les souris déficientes en CD20 ne présentent pas d'anomalies immunologiques particulières^{134,152}. En absence de ligand naturel connu, la stimulation du CD20 s'obtient artificiellement par des Ac, reconnaissant spécifiquement son domaine extracellulaire. La technique de référence de mise en évidence de l'activation du CD20 est basée sur l'utilisation d'Acm-r agonistes anti-CD20. Ces études, ont permis de montrer que les Acm-r anti-CD20 régulent le cycle cellulaire et induisent également une grande variété de réponses biologiques. Les phénomènes biologiques induits *in vitro* par les Ac anti-CD20 sont nombreux et regroupent la diminution d'expression du BCR (B-cell receptor)¹⁵³, le décapage du CD23 (désigné aussi sous le nom de FcεRII)^{154,155}, l'augmentation de l'expression de molécules du CMH-II (Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II)¹⁵⁶, ainsi que l'absence totale ou,

a contrario, l'induction plus ou moins importante de l'apoptose ^{157,158}. De plus, cette molécule participerait à la régulation des flux calciques ¹⁵⁹. Un rôle dans l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules B est ainsi attribué à la molécule CD20, sans que l'on puisse en évaluer réellement la pertinence biologique et scientifique ¹³⁴ (Figure 24).

3 - Modulation d'expression du CD20 : enjeux et conséquences

a - Densité antigénique naturelle et cytotoxicité des anticorps

L'expression antigénique est un facteur bien connu, influençant l'activité cytolytique des anticorps en présence de complément. En comparant la sensibilité à la lyse par le complément de cellules provenant de lymphomes du manteau (MCL, mantle cell lymphoma), de leucémie lymphoïde chronique (CLL, chronic lymphoid leukemia), et de leucémie plasmocytaire (PCL, plasma cell leukemia), une relation a été montrée entre cette sensibilité et le niveau d'expression du CD20 ¹⁶⁰. En revanche, au sein des échantillons de CLL, aucun lien n'a pu être établie entre l'expression du CD20 et l'intensité de la lyse par le complément ¹⁶¹. L'expression du CD20 est moins importante sur des cellules de CLL que sur des cellules de lymphomes non hodgkiniens ¹⁴⁸. D'autres travaux ont par contre montré un lien important entre le niveau d'expression en CD20 et l'activité CDC au sein de lymphomes folliculaires ¹⁶². Ainsi l'influence du niveau d'expression en CD20 peut être différente en fonction du mécanisme d'action considéré, et reste un aspect discuté ¹⁴⁷.

L'impact de l'expression antigénique dans l'efficacité des anticorps est en réalité très peu documenté. Actuellement, le fait qu'une densité élevée en antigène erbB2 soit un facteur essentiel dans la réponse clinique au trastuzumab (Herceptin®) demeure le seul réel argument clinique, de telles données n'existent pas pour le rituximab. Sur le plan expérimental, les données sont rares et

récemment deux études ont montré une absence de relation entre la sensibilité de cibles à l'ADCC provoquée par le rituximab et le degré d'expression en antigène cible ^{134,162,163}. La corrélation linéaire entre l'expression d'un marqueur du myélome multiple, HM1.24, avec la cytotoxicité d'un Acm-r humanisé en présence de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) demeure actuellement le seul cas concret de l'impact de l'expression antigénique sur l'ADCC ¹⁶⁴.

b - Modulation de l'expression par les cytokines

De nombreuses études se sont focalisées sur la modulation d'expression du CD20 par les cytokines, en particulier à la surface de cellules tumorales où l'expression antigénique peut être amoindrie, dans le but d'améliorer ou de restaurer l'activité cytolytique des Acm-r anti-CD20 ¹⁶⁵. Par exemple, l'interleukine-4 recombinante (rIL-4) entraîne une diminution de l'expression membranaire du CD20 à la surface de lymphocytes B normaux ou leucémiques, tandis que l'IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, l'IFN- α (Interféron), l'IFN- γ , le GM-CSF (facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages), le TGF- α (transforming growth factor) et le TNF- β n'ont pas d'effet. L'IL-4 n'agit pas sur la quantité de messagers du CD20 mais modifierait probablement la conformation de la protéine ¹⁶⁶. Ces résultats sont en contradiction avec les travaux de plusieurs équipes, démontrant d'une part que l'IL-4 mais aussi le TNF- α et le GM-CSF ¹⁶⁷, et d'autre part que l'IFN- α ¹⁶⁸ augmentent l'expression du CD20 à la surface de cellules de LLC. Enfin, l'IFN- γ entraînerait vraisemblablement une augmentation du CD20 sur des cellules myélomateuses humaines ¹⁶⁹. De tels résultats encouragent l'utilisation combinée de cytokines et de l'immunothérapie conventionnelle, cette approche ayant par ailleurs fait ses preuves dans la potentialisation d'effecteurs cytotoxiques ¹⁷⁰.

4 - Le rituximab : anticorps monoclonal anti-CD20

Depuis l'obtention de son AMM (autorisation de mise sur le marché) en juin 1998, le rituximab est le premier anticorps monoclonal à visée thérapeutique utilisé en hématologie. Il s'agit un anticorps monoclonal chimérique obtenu par génie génétique ; c'est une immunoglobuline glycosylée associant d'une part les régions constantes d'une IgG1 humaine et d'autre part les régions variables des chaînes légères et lourdes d'origine murine. Cet anticorps est produit par des cellules de mammifères (ovaires de hamster chinois) et est purifié par chromatographie d'affinité et échange d'ions, comportant des procédés d'inactivation et d'élimination virales spécifiques ^{171,172} (Figure 23).

Le rituximab est indiqué pour le traitement de patients atteints de lymphomes folliculaires (LF) seul ou en association avec une chimiothérapie ^{173,174}. Il est indiqué en association avec une chimiothérapie CHOP (Cytosan, Hydroxyrubicin (Adriamycin), Oncovin (Vincristine), Prednisone) ^{172,175,176} pour le traitement de patients présentant un lymphome non hodgkinien agressif diffus à grandes cellules B, CD20 positif ^{177,178}. La solution de rituximab est administrée en perfusion intraveineuse par une voie spécifique.

a - Lymphome folliculaire non hodgkinien

En monothérapie chez l'adulte, la posologie recommandée du rituximab est de 375 mg/m² de surface corporelle, administrée en perfusion intraveineuse une fois par semaine pendant quatre semaines. En association avec une chimiothérapie, la posologie recommandée est de 375 mg/m² de surface corporelle, 1 cure tous les 21 jours, administrée le premier jour de chaque cure de chimiothérapie et ceci après administration de corticoïdes du protocole (Tableau 04).

Référence de l'étude	Nombre de patients	Indications	Schéma d'administration	Réponse en %		
				TRG	TRC	TRP
<i>Maloney et al.</i> [1997]	20	- LNH LG, rechute - LNH (IG, HG), rechute	- 4 x 125mg/m ² - 4 x 250mg/m ² - 4 x 375mg/m ²	33	-	-
<i>Maloney et al.</i> [1997]	37	- F.LNH LG, rechute	- 4 x 375mg/m ²	46	8	38
<i>McLaughlin et al.</i> [1998]	166	- F.LNH LG, rechute [Réanalyse]	- 4 x 375mg/m ²	48 62	6 32	42 30
<i>Ghielmini et al.</i> [2000]	76	- F.LNH non traités	- 4 x 375mg/m ²	52	6	46
<i>Feuring et al.</i> [2000]	38	- F.LNH LG, rechute	- 4 x 375mg/m ²	47	17	30
<i>Davis et al.</i> [1999]	31	- F.LNH LG, rechute [Important volume tumoral]	- 4 x 375mg/m ²	43	4	39
<i>Colombat et al.</i> [2001]	50	- F.LNH LG [Faible volume tumoral]	- 4 x 375mg/m ²	73	26	47
<i>Hainsworth et al.</i> [2002]	62	- I.LNH non traités	- 4 x 375mg/m ² [tous les 6 mois]	65	27	38
<i>Firo et al.</i> [1999]	35	- F.LNH LG, rechute	- 8 x 375mg/m ²	60	14	46
<i>Davis et al.</i> [2000]	58	- F.LNH LG [rechute après 1ère immuno.]	- 4 x 375mg/m ²	38	10	28

Tableau 04 : Activité anti tumorale du rituximab en monothérapie dans des cas de lymphome non hodgkinien.

Tableau bilan des principaux essais que l'on trouve dans la littérature. Pour tous les essais le rituximab a été injecté en monothérapie. Le rituximab constitue l'une des premières thérapeutiques ciblées utilisées en pratique clinique. Néanmoins, lorsque l'on regarde l'activité thérapeutique du rituximab en monothérapie, celui-ci permet d'obtenir des taux de réponse complète de l'ordre de 10% en situation de rechute et de l'ordre de 20% en première ligne.

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

F : Lymphome Folliculaire

I : Lymphome Indolent

LG: Lymphome de bas grade

TRG: Taux de Réponse Globale

TRC: Taux de Réponse complète

TRP: Taux de Réponse Partielle

b - Lymphome non hodgkinien agressif diffus à grandes cellules B

Le rituximab est utilisé en association avec une chimiothérapie, le plus souvent de type CHOP ¹⁷². La posologie recommandée est de 375 mg/m² de surface corporelle, administré le premier jour de chaque cure de chimiothérapie, après administration intraveineuse des corticoïdes ¹⁷⁹.

E - Mode d'action du rituximab sur les cellules cancéreuses

1 - Effets biologiques après la liaison à l'antigène

a - Translocation du CD20 dans les radeaux lipidiques

Au sein de la membrane plasmique existent des structures membranaires "flottantes", appelées radeaux lipidiques, capables de confluer les unes vers les autres afin de permettre l'agrégation de molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. La présence de molécules régulatrices du complément dans ces structures leur confère une résistance à l'action du complément par rapport au reste de la membrane plasmique. Cependant, la concentration des molécules antigéniques dans les radeaux, médiée par l'anticorps, augmente la densité en IgG et facilite ainsi la liaison du C1q (molécule de la cascade du complément).

En effet, le C1q est connu pour se fixer à une molécule d'IgM (pentamérique) ou à deux IgG monomériques proches. Le rituximab induit une translocation de l'antigène CD20 dans les radeaux lipidiques et y active ainsi le complément (CDC) de façon plus efficace ^{134,180}. La capacité d'un anticorps à induire une CDC dépend donc de la capacité d'un anticorps anti CD20 à transloquer sa cible au sein des radeaux lipidiques. Le cluster CD20 regroupe un panel d'anticorps monoclonaux (anti-CD20) qui diffèrent essentiellement par leur épitope. La plupart des anticorps anti CD20, à l'exception du clone B1, sont capables de redistribuer l'antigène dans les radeaux lipidiques ¹⁴³. Ils sont dit de type I comme le rituximab et le HuMax-

CD20 (ofatumumab®, GenMAb, en cours de développement). D'autres anticorps comme le tositumomab (Bexxar®, IgG2 murine porteur d'iode 131) et le GA101 (GlycArt-Roche, IgG1 humanisée dont la glycosylation a été optimisée) ne sont pas capables de redistribuer le CD20 dans les radeaux lipidiques, et n'exercent pas ou peu d'activation du complément, ils sont dit de type II.

b - « Shaving » du CD20 par les effecteurs FcγRI+

Quelques minutes après l'injection de rituximab, un phénomène de perte d'expression du CD20 a récemment été mis en évidence, sur des cellules de LLC ¹⁸¹, alors qu'un nombre croissant d'études suggère que le complexe rituximab-CD20 ne peut être ni internalisé par les cellules cibles, ni décapé de la surface cellulaire. En utilisant des monocytes différenciés *in vitro* en macrophages, les mêmes auteurs ont mis en évidence le rasage ou « shaving » du CD20 ¹⁴⁹, un phénomène unidirectionnel où les macrophages capturent activement des fragments de membrane de la cellule cible, à la surface desquels se trouvent les complexes CD20-rituximab, avant de les internaliser. La rapidité de cette capture ainsi que l'absence d'effet d'inhibiteurs des voies de signalisation de la phagocytose ¹⁴⁹ suggèrent que cet événement s'apparente à une trogocytose (du grec trogos : manger, ronger). En effet, la trogocytose est un phénomène habituellement réalisé par les lymphocytes T, et par lequel des fragments cellulaires sont transmis, via une synapse immunologique, depuis la cellule présentatrice d'antigène jusqu'au lymphocyte T. De plus, ce phénomène n'affecte pas la viabilité cellulaire et semble d'autant plus important que le rapport effecteur/cible est élevé. Par ailleurs, l'implication du FcγRI est fortement suspectée dans ce mécanisme, malgré la présence d'IgG endogènes qui saturent ce récepteur et que les complexes immuns ne sont pas capables de déplacer. Ceci pourrait malgré tout intervenir à de très fortes concentrations d'anticorps ; le rituximab, représentant alors une fraction non

négligeable des IgG circulantes, serait capable d'armer suffisamment les macrophages spléniques, par liaison au FcγRI. A l'issue d'un protocole sur des patients atteints de LLC où la dose standard de rituximab de 375 mg/m² était substituée par une dose plus faible et itérative, cette possible saturation du système phagocytaire semble évitée, préservant le CD20 membranaire et permettant ainsi une meilleure clairance des cibles ¹⁸². Ce rasage du CD20 pourrait rendre les cellules tumorales résistantes aux injections ultérieures de rituximab par suite de la perte d'expression de son antigène cible. Il est encore trop tôt pour savoir si le phénomène de "shaving" peut être étendu à d'autres Acm-r que le rituximab et à d'autres modèles de pathologies B (lymphomes). Néanmoins, ces travaux apparaissent tout à fait pertinents dans l'étude de la relation concentration – effet du rituximab dans les différentes pathologies lymphoïdes B, et soulèvent ainsi la nécessité d'adapter réellement les schémas d'administration des Acm-r, ce qui risque d'être d'autant plus nécessaire qu'apparaissent de nouvelles molécules aux effets cytolytiques accrus, certaines étant administrées à de très fortes concentrations.

2 - La liaison du rituximab sur le CD20 induit la voie de l'apoptose

Des essais *in vitro* semblent suggérer que le rituximab induit une apoptose après fixation au CD20 ¹⁸³. Ces phénomènes ont principalement été observés *in vitro*, et sont extrêmement dépendants des conditions expérimentales : concentration de l'Ac, degré de pontage antigénique (Ac seul, ou Ac secondairement reconnu par un autre anticorps anti-Fc de l'IgG), lignée cellulaire considérée ^{172,184,185}. Plusieurs voies de signalisation induites par la liaison du rituximab au CD20 sont capables de provoquer l'apoptose des cibles (Figure 25) alors même que les fonctions biologiques du CD20 restent très mal connues. L'implication *in vivo* des mécanismes apoptotiques après induction par le rituximab restent très peu

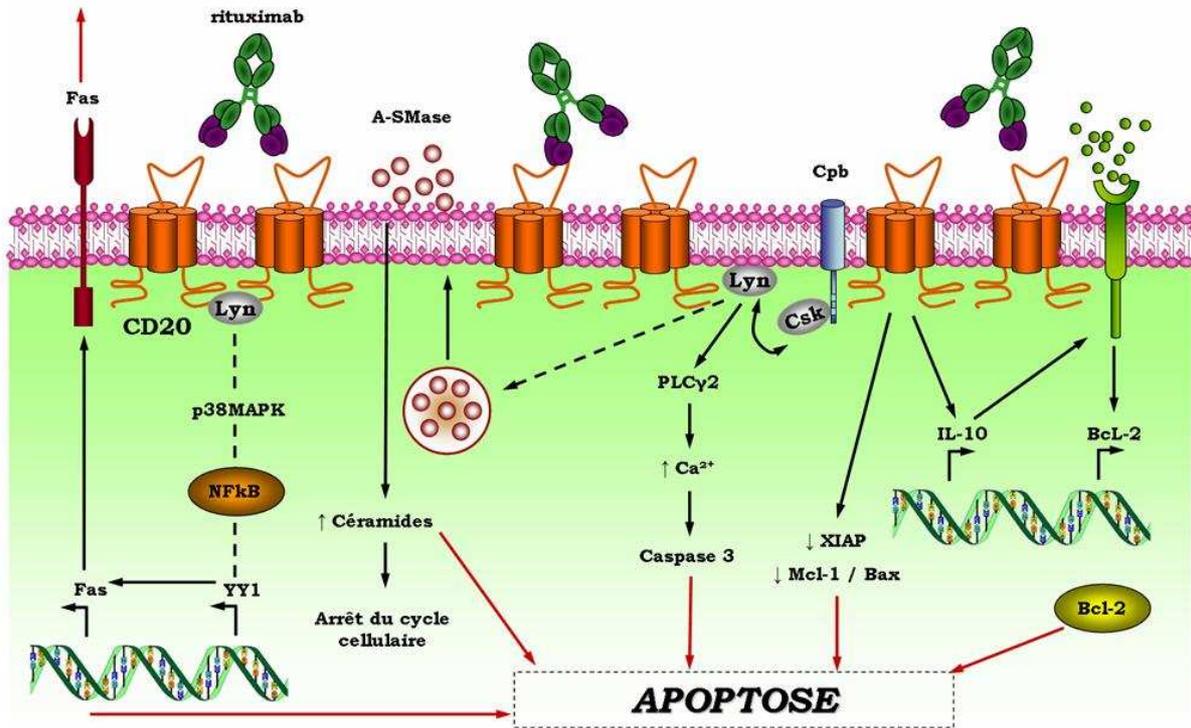


Figure 25 : Mécanismes pro-apoptotiques déclenchés par la liaison du rituximab à sa cible.

Suite à une sensibilisation de cellules cibles par le rituximab, l'antigène CD20 est redistribué dans les radeaux lipidiques où l'inhibition des Src kinases entraîne l'inhibition de la voie de signalisation passant par la p38 MAPK et l'activité du NF- κ B. Le répresseur transcriptionnel YY1 n'empêche plus l'expression du récepteur Fas, participant ainsi à la sensibilité de la cellule cible à l'apoptose dépendante de Fas. Le rituximab entraîne également la translocation de la sphingomyélinase acide (A-SMase) vers le feuillet externe de la membrane où elle hydrolyse les sphingolipides membranaires en phosphocholine et céramides. Les céramides sont capables de signaux apoptotiques ou inhibiteurs sur le cycle cellulaire via p27. Parallèlement, la présence de la protéine Cbp au voisinage du CD20 permet une concentration des kinases Lyn, Fyn et Lck. Ces dernières assurent l'augmentation de la concentration d'ions calcium cytoplasmiques via la phosphorylation de la phospholipase C (PLC γ 2). Le rituximab peut notamment inactiver une boucle autocrine d'inhibition de l'apoptose médiée par l'IL-10 qui régule positivement la synthèse de Bcl-2 ; voire même entraîner directement une diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques XIAP, Mcl-1 et Bcl-2. (Figure inspirée d'après Cartron et al., 2004).

connus ¹⁷² et peu d'arguments sont actuellement apportés en faveur de l'importance de ce mécanisme de destruction des cellules tumorales chez les patients. (Figure 25).

3 - Fonctions effectrices liées à la portion Fc du rituximab

Pour augmenter les potentialités cytolytiques des Ac qu'elles développent, les firmes pharmaceutiques choisissent le plus souvent des IgG1 (chaîne lourde γ 1). Il s'agit de la sous-classe d'IgG combinant à la fois la meilleure demi-vie et les meilleures activités cytolytiques. C'est en effet la portion Fc, différente d'un isotype de chaîne lourde à l'autre, qui permet à l'Ac d'interagir avec les récepteurs Fc γ R exprimés à la surface des effecteurs cellulaires de l'immunité (Tableau 05), mais aussi d'activer la voie classique du complément. Il en résulte respectivement les voies d'ADCC et de CDC. Lors du développement du rituximab, une version IgG4 de l'Ac a été produite et testée chez le macaque ¹⁸⁶. Seule la version IgG1 a été capable d'induire une lymphopénie B, ce résultat souligne la nécessité de recruter les effecteurs de l'immunité pour obtenir un effet cytolytique *in vivo* et constitue un argument pour minorer le rôle de l'apoptose *in vivo*.

a - CDC : la voie d'activation du Complément

Parmi les trois voies permettant l'activation du système du complément et aboutissant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (MAC, membrane attack complex) responsable de la CDC, seule la voie classique peut être initiée par les IgG en général, et les IgG1 en particulier (Figure 26). Par ailleurs, le recrutement du complément (Ct) a été démontré *in vitro* pour le rituximab ¹⁸⁶. La capacité des anticorps IgG1 à se lier au C1q et à activer la voie classique du Ct est également liée à la nature de l'antigène cible et à la cible elle-même. L'antigène CD20 possède quatre domaines trans-membranaires. L'épitope reconnu par le rituximab, situé sur la boucle extracellulaire, n'est que très peu éloigné de la membrane plasmique

Sous-classe d'IgG		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Récepteur	Expression cellulaire				
FcγRI	Monocytes, macrophages	+++	-	++++	++
FcγRIIa	Monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, mastocytes, plaquettes	+	+*	++	-
FcγRIIb	Lymphocytes B, monocytes, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes	++	-	++	+
FcγRIIc**	Lymphocytes NK	++	-	++	+
FcγRIIIa	Lymphocytes NK, monocytes, macrophages, cellules dendritiques	++/++++*	-	++/++++*	+*
FcγRIIIb	Polynucléaires neutrophiles	++	-	++	-

Tableau 05 : Interactions entre les différentes sous classes d'IgG humaines et les récepteurs FcγR des cellules immunitaires.

* variable selon les individus

** n'est exprimé que chez certains individus

(Travail bibliographique personne)

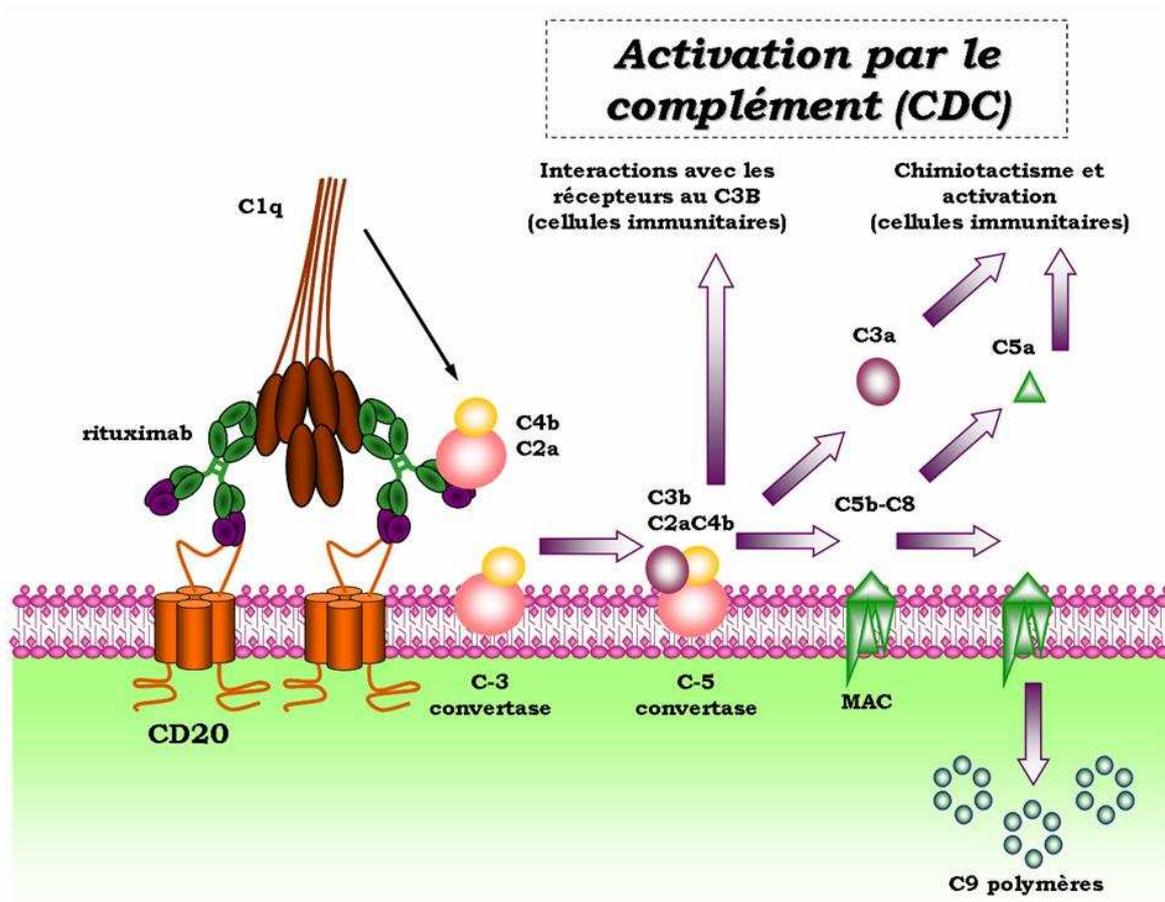


Figure 26 : La voie classique et la voie alterne d'activation du complément ; le mode d'action de ces différentes protéines régulatrices.

La voie classique est initiée par la liaison du C1q au complexe antigène - anticorps, tandis que la voie alterne est initiée par la liaison du C3b aux surfaces activatrices. Ces voies génèrent des C3 convertases, et des C5 convertases responsables de la formation de C3b et C5b, respectivement. Par sa propriété à engendrer une C3 convertase, le C3b alimente une étape amplificatrice du C3. Le C5b lié à la cible est converti en un complexe d'attaque membranaire (MAC) par une séquence de réactions terminales. L'activation du complément est régulée à deux niveaux par des protéines régulatrices. L'activation du C3 est contrôlée par le CD55, lequel accélère la dissociation des C3 et C5 convertases, tandis que le CD46 participe en tant que cofacteur à la dégradation des C3b et C4b par le facteur I. La régulation se joue également au niveau de l'assemblage du MAC par le CD59 qui inhibe la polymérisation de molécules C9 catalysée par le complexe C5b-8. Toutes ces étapes concourent au chimiotactisme et à l'activation des cellules immunitaires. (Figure reproduite d'après les travaux de Cartron. et al, 2004)

(Figure 26). Ces observations semblent confirmer l'hypothèse que l'activité de CDC est inversement proportionnelle à la distance qui sépare l'épitope de la membrane plasmique. De même, le niveau d'expression antigénique est un facteur connu pour influencer la CDC car la fixation du C1q requiert deux molécules d'IgG1 suffisamment proches (distance maximale de 40nm). En réalité, si l'on compare différents types de tumeurs, il est assez difficile de trouver une relation directe entre sensibilité à la CDC et niveau d'expression du CD20. En revanche, la fixation du rituximab sur le CD20 induit une redistribution du CD20 dans les radeaux lipidiques, ce qui a pour effet de concentrer localement les molécules d'IgG1 et de favoriser la fixation du C1q ¹⁷². Plusieurs études menées sur des patients traités par rituximab ont montré une augmentation des concentrations sériques des produits d'activation C3a, C3b/c et C4b/c ainsi qu'une diminution du CH50 dans les premières heures suivant l'injection. L'importance de ces phénomènes est liée au nombre de lymphocytes B circulants et est corrélée à la gravité des effets indésirables ¹⁸⁷. On sait aussi que le C3bi est détecté sur les lymphocytes B circulants quelques minutes après l'injection de rituximab chez le singe ¹⁸¹. L'ensemble de ces éléments sont en faveur de l'activation du complément par le rituximab *in vivo*, cependant, le fait que des souris déficientes en C1q ne soient plus capables de détruire une tumeur syngénique exprimant le CD20 humain après une administration de rituximab ¹⁸⁸ reste actuellement le seul argument en faveur d'une association entre l'activation du Ct et l'effet thérapeutique. Par ailleurs, l'efficacité des Acm-r dirigés contre les antigènes membranaires a été démontrée *in vitro* sur des cellules cibles en suspension, ce qui ne peut présager de la réelle implication du Ct dans la lyse des masses tumorales. Peu d'études ont encore abordé ce point. La seule étude actuellement publiée semble d'ailleurs contredire le fait que les mécanismes dépendants du Ct soient moins efficaces dans les tissus. En effet, chez la souris, la déplétion par le rituximab de cellules tumorales séquestrées dans les

organes lymphoïdes secondaires est conditionnée par l'activation du Ct, tandis que les cellules B tissulaires qui regagnent les territoires vasculaires sont préférentiellement lysées par des mécanismes dépendants des FcγR¹⁸⁹ (Figure 26).

b - Recrutement d'effecteurs cellulaires

L'incapacité des souris, déficientes pour la chaîne gamma associée aux FcγR activateurs, à répondre au rituximab¹⁹⁰ suggère l'implication de cellules effectrices exprimant ces FcγR activateurs dans la réponse au traitement. A contrario, les souris déficientes pour le FcγRIIb (récepteur inhibiteur) présentent une meilleure réponse thérapeutique après administration de rituximab¹⁹⁰. Bien que ces données illustrent parfaitement le rôle complexe des FcγR, le nombre de ces derniers, leur expression cellulaire et leurs fonctions diffèrent énormément entre l'homme et la souris, rendant ces résultats difficilement transposables en clinique¹⁹¹. Néanmoins, de nombreuses données *in vitro* suggèrent que les FcγR jouent, chez l'homme, en présence d'anticorps, un rôle central dans la lyse de cibles cellulaires par les lymphocytes NK, les monocytes voire même les polynucléaires neutrophiles. Le rituximab¹⁹² est l'anticorps pour lequel les mécanismes d'ADCC ont été les mieux décrits. La plupart de ces expériences mettent en lumière le rôle des lymphocytes NK et de l'un des FcγRs qu'ils expriment : le FcγRIIIa. Par une approche de pharmacogénétique, l'équipe IPGA EA 3853 a été la première à montrer que le polymorphisme du gène *FCGR3A* (codant le récepteur FcγRIIIa), entraînant le remplacement d'une Phénylalanine (F) en Valine (V) en position 158 de la protéine mature, était associé à la réponse au rituximab dans les lymphomes malins non hodgkiniens de type folliculaire¹³⁷. Il a été montré que l'acide aminé en position 158 du récepteur se situe dans la zone d'interaction avec le fragment Fc de l'anticorps. De plus le fragment Fc possède une meilleure affinité pour l'allotype V étant à l'origine d'une variabilité dans la réponse au traitement¹⁹². Ces données ont depuis

été confirmées par d'autres équipes, y compris dans d'autres pathologies, mais aussi pour d'autres anticorps ¹⁹³. Toutes les études s'accordent pour associer l'allotype V du FcγRIIIa qui a la meilleure affinité pour les IgG1 humaines ¹⁹² avec la meilleure réponse thérapeutique ¹⁹³. De plus, cette relation génotype/phénotype, observée *in vivo*, a pu être retrouvée *in vitro* ¹⁹² suggérant fortement l'implication de cellules exprimant le FcγRIIIa dans l'effet thérapeutique du rituximab. L'ensemble de ces travaux d'affinité sont le support scientifique au développement de nouveaux Acm-r possédant une affinité accrue pour FcγRIII soit par mutagenèse dirigée du fragment Fc soit par modification de l'oligosaccharide situé sur l'acide aminé en position 297 (afucosylation).

F - Pharmacocinétique du rituximab et facteurs de variabilité dans la réponse clinique au traitement

1 - Pharmacocinétique du rituximab

Les études de pharmacocinétique, réalisées au cours d'une étude de phase I incluant des patients atteints d'un lymphome B récidivant et recevant des doses uniques de rituximab de 10, 50, 100 ou 500 mg/m², ont montré que la concentration sérique et la demi-vie du rituximab étaient proportionnelles à la dose injectée ¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. Dans l'étude pivotale de Berinstein *et al.* où les patients recevaient 4 injections hebdomadaires de 375 mg/m², la demi-vie sérique moyenne a été de 76,3 heures (valeurs extrêmes : 31,5 à 152,6 heures) après la première perfusion et de 205,8 heures (valeurs extrêmes : 83,9 à 407,0 heures) après la quatrième perfusion ¹⁹⁸. Néanmoins, une importante variabilité des taux sériques a été observée. Les concentrations du rituximab étaient significativement plus élevées chez les patients répondeurs par rapport aux patients non répondeurs au traitement, juste avant et après la quatrième perfusion ainsi qu'après le traitement ¹⁷⁹ (Figure 27).

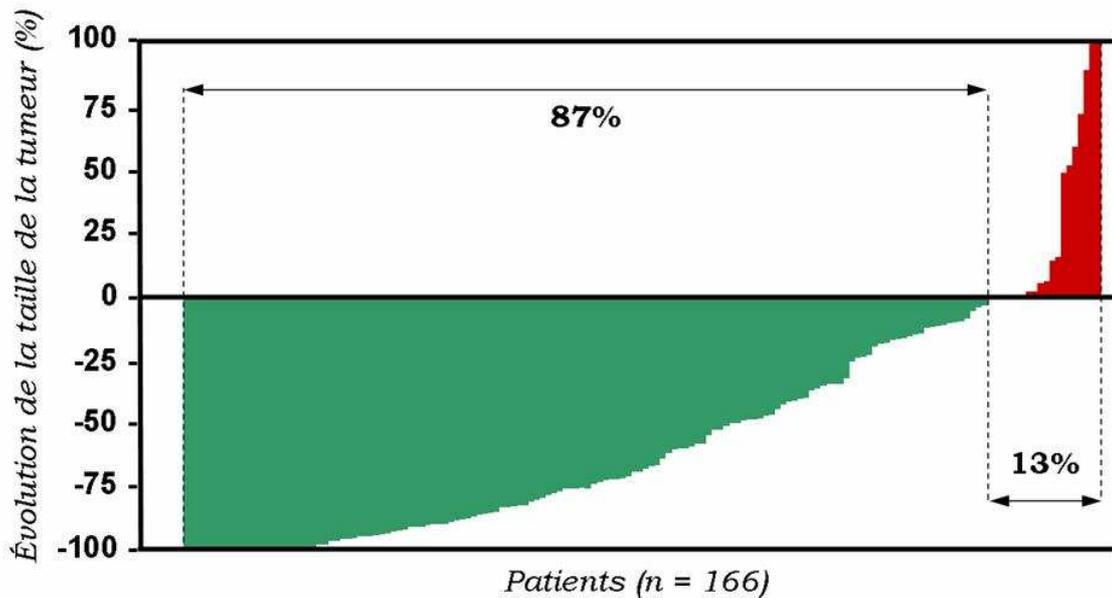


Figure 27 : Variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement.

Résultats de l'essai de l'étude pivotale du rituximab. 166 patients atteints de lymphomes non hodgkiniens diffus à cellules B indolents ou folliculaires et étant en rechute, ont été traité en monothérapie par 4 injections (délais de 1 semaine) de 375 mg/m² de rituximab par perfusion. L'évolution de la taille de la tumeur a été mesurée par radiographie dans deux directions de l'espace et par la multiplication des diamètres perpendiculaires. Le pourcentage d'évolution des tumeurs après traitement a été ainsi mesuré. Chez 87% des patients une réduction quantifiable de la tumeur a pu être mesurée. Pour 13% des patients la tumeur n'évolue pas ou progresse. Cependant cette mesure ne correspond que au maximum du changement mesuré. Ainsi des patients étant en réponse momentanée vont être à nouveau en rechute on retrouve ainsi des données de réponse indiquées dans le tableau 04. Enfin on peut observer l'importante variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement. De nombreux facteurs en sont à l'origine. (Figure établie d'après les données de Mc Laughlin et al, 2003)

Dans un autre essai, où les patients ont reçu 4 perfusions de rituximab, les C_{max} moyennes après la première et la quatrième perfusion ont été respectivement de 205,6 µg/ml ± 59,9 et de 464,7 µg/ml ± 119,0¹⁹⁹⁻²⁰¹. Le rituximab reste décelable dans le sérum pendant 3 à 6 mois²⁰². Compte tenu de l'allure de sa courbe de distribution et d'élimination, le modèle le plus adapté à la description de sa pharmacocinétique est un modèle à deux compartiments²⁰³.

D'autre part une étude réalisée à l'aide de rituximab marqué à l'iode 131 a permis de montrer une diffusion du rituximab dans la plupart des organes (reins, foie, poumons, cœur et rate). Il semblerait aussi que le rituximab radiomarqué, chez les patients, ne puisse franchir la barrière du système nerveux central, ce qui reste peu étonnant compte tenu de son importante taille^{204,205}. Peu de choses sont aujourd'hui connues sur les mécanismes impliqués dans le métabolisme et l'élimination du rituximab. Il peut être dégradé par le catabolisme des protéines, au même titre que toute autre protéine, au niveau d'organes protéolytiques comme le foie et éliminé via les voies rénales²⁰⁶. Finalement, l'élimination et la distribution n'ont pas été étudiées de façon approfondie chez des patients atteints de lymphome non hodgkinien agressif diffus à grandes cellules B, mais les données disponibles indiquent que les concentrations sériques du rituximab chez ces patients sont comparables à celles obtenues chez des patients atteints de lymphome folliculaire non hodgkinien après traitement et à des doses similaires²⁰⁷.

Il apparaît qu'un certain nombre de facteurs semblent influencer la pharmacocinétique du rituximab :

- Le niveau d'expression du CD20 par les cellules tumorales.
- La masse antigénique ou masse tumorale.
- Les polymorphismes génétiques.

2 - Facteurs influençant la pharmacocinétique du rituximab

a - Influence du niveau de l'expression en CD20 par les cellules tumorales

Les patients atteints de LNH-B montrent d'une manière générale une exposition au rituximab plus faible que les patients atteints d'autres types de lymphomes. Or, bien que les cellules tumorales de ces différents types de lymphomes soient assez similaires, les cellules de lymphome non hodgkinien à cellules B expriment plus de CD20 que l'ensemble des autres types de lymphomes¹⁴⁷. Les concentrations sériques en rituximab semblent être inversement proportionnelles à la masse tumorale et à la valeur initiale du nombre de lymphocytes B circulants¹⁹⁸. Ainsi l'augmentation de ces paramètres pharmacocinétiques, entre la première et la quatrième perfusion, pourrait être due à une déplétion des cellules B CD20 positives sous l'action du rituximab²⁰⁶. Si cette hypothèse se révélait exacte, cela signifierait qu'il pourrait exister des différences substantielles et significatives entre des groupes d'individus possédant des nombres de cibles antigéniques différents. L'ensemble de ces éléments vont dans le sens d'un piégeage du rituximab par les cellules tumorales. Le CD20 circulant pourrait aussi jouer un rôle supplémentaire dans la "résistance au rituximab" observée notamment dans les cas de lymphomes non hodgkinien à larges cellules B²⁰⁸.

b - Influence de la masse tumorale sur la réponse clinique

La masse tumorale détermine le nombre de cibles antigéniques et peut ainsi influencer la concentration en rituximab. Dans une étude où les patients n'ont reçu qu'une seule injection de rituximab, la pharmacocinétique de ce dernier semble être linéaire et l'augmentation du pic de concentration (C_{max}) est proportionnelle à la dose d'anticorps injectée¹⁹⁴. Néanmoins cette étude a permis de révéler pour un patient l'existence d'un profil pharmacocinétique tout à fait anormal. Ce patient qui,

par rapport aux autres personnes de l'étude, possédait une masse tumorale importante, a eu lors du traitement une phase de décroissance de la concentration en rituximab très rapide. Cette observation semble être confirmée par certains travaux ayant montré l'existence d'une relation entre le volume tumoral et la réponse au traitement. Les travaux de l'équipe de Regazzi *et al.* ce sont intéressés à l'étude de la pharmacocinétique du rituximab sur des groupes de patients présentant des masses tumorales différentes et ont montré l'impact de ce paramètre²⁰⁹. Cependant ces éléments sont contredits par différents travaux ayant montré l'absence d'influence de la masse tumorale sur la pharmacocinétique du rituximab dans diverses pathologies lymphomateuses^{198,210,211}. L'équipe de Mangel, *et al.*, sur un groupe d'individus traités par 4 perfusions de rituximab, n'ont pas trouvé de lien entre l'importance de la masse tumorale de patients et les paramètres pharmacocinétiques²¹⁰. Une autre étude mettant en œuvre du rituximab radiomarqué, n'a pas trouvé de différence significative dans la phase d'élimination finale entre les individus possédant une masse tumorale mesurable et ceux dont les sites tumoraux ne pouvaient pas être définis et mesurés²¹².

Finalement, bien que probable, l'influence de la masse tumorale sur l'exposition clinique au rituximab n'est pas encore prouvée en clinique et reste assez incertaine (Tableau 4).

c - Influence des polymorphismes génétiques sur la pharmacocinétique du rituximab

Les études *in vitro* réalisées suggèrent que le rituximab induit la lyse de cellules lymphomateuses par les mécanismes d'ADCC, de CDC, d'apoptose et de phagocytose¹⁷². Or l'ADCC et la phagocytose nécessitent l'interaction entre la portion Fc de l'anticorps et les récepteurs membranaires (FcγR). Comme indiqué précédemment notre équipe a été la première à identifier un polymorphisme sur le

récepteur FcγRIIIa en relation avec la réponse clinique au rituximab ¹³⁷. Cette variabilité dans la réponse et l'exposition au traitement a depuis été confirmée par différents groupes de recherche qui ont montré une meilleure activité cytolytique des anticorps de type IgG1 chez les patients de phénotype VV (FcγRIIIa-158VV) ²¹³⁻²¹⁵. De plus la forme 158V semble avoir une meilleure affinité que la forme 158F pour les IgG humaines. Ces éléments semblent indiquer que le génotype du gène *FCGR3A* peut être à l'origine de modifications dans la relation concentration - effet du rituximab ²¹⁶ (Figure 28).

G - Le FcRn, ou récepteur néonatal au fragment Fc, responsable de la demie vie du rituximab

Les concentrations sériques des deux protéines solubles les plus abondantes du corps, l'albumine et les IgG qui ensemble représentent plus de 70% des protéines plasmatiques, sont maintenues constantes grâce à un équilibre entre deux processus opposés de production et de dégradation ^{217,218}. Il a récemment été montré que le processus de dégradation de ces deux protéines était similaire et passait par un récepteur commun. Nous savons aujourd'hui que le récepteur néonatal au fragment Fc (FcRn, également connu sous le nom de récepteur de Brambell), lie non seulement les IgG mais également l'albumine, les protégeant de la dégradation intracellulaire en les recyclant hors de la cellule, prolongeant de ce fait leurs demi-vies respectives ^{219,220}. Historiquement la première fonction du FcRn à avoir été découverte est le transport des IgG maternelles au nouveau né. Ce processus se réalisant soit avant la naissance par le passage transplacentaire des IgG soit après la naissance par le passage des IgG du sang maternel au lait puis, une fois ingéré, du lait au sang du nouveau né. La proportion entre ces deux voies étant très variable d'une espèce à l'autre. Cette implication dans le transfert de l'immunité entre la mère et le nouveau né lui a valu ce nom de récepteur néonatal.

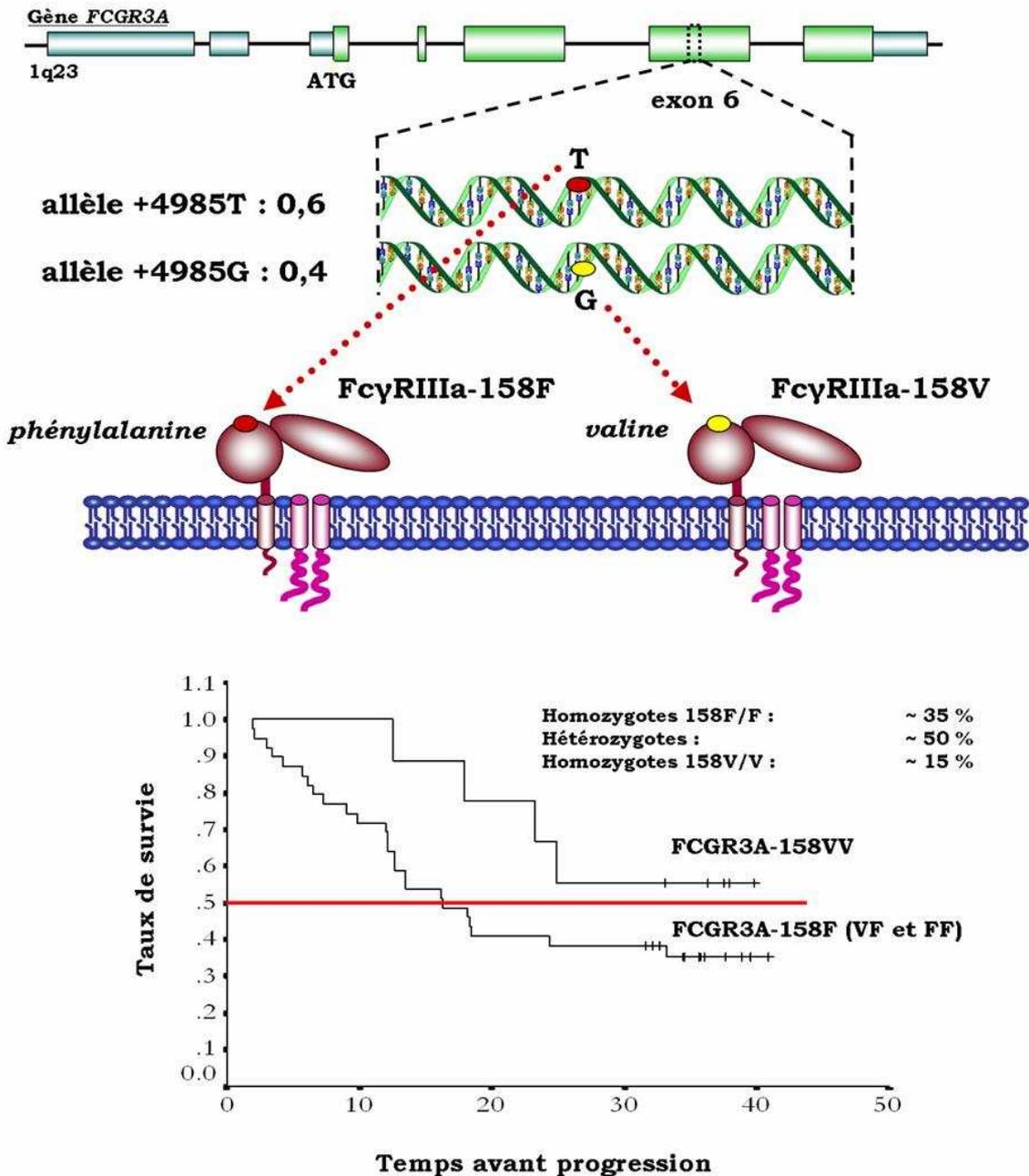


Figure 28 : Implication d'un polymorphisme génétique dans la variabilité de la réponse au traitement.

Polymorphisme du gène FCGR3A codant pour le récepteur FcyRIIIa impliqué dans la réponse au traitement. Dans la population un polymorphisme nucléotidique existe en position 4985 (T ou G, proportions données pour une population d'origine caucasienne). Ce polymorphisme se retrouve au niveau de la séquence protéique où en position 158 on trouve une phénylalanine ou une valine. Ce polymorphisme se retrouve dans la réponse au traitement dans le graphe inférieur. Une courbe de survie de patients traités par le rituximab avant progression tumorale est réalisée. Les patients porteurs des allèles VV ont une meilleure réponse au traitement que les autres individus. Les patients VF et FF ont été regroupés. (Figure établie d'après les travaux de Cartron G., et al., 2002).

Aujourd'hui nous lui connaissons, chez l'adulte, une implication importante dans le métabolisme des IgG, en assurant leur recyclage de l'espace intracellulaire vers le sang.

1 - Les rôles biologiques du FcRn

a - Le rôle de récepteur néonatal du FcRn

Le FcRn a été identifié comme le récepteur responsable du transfert des IgG maternels vers le fœtus. Chez les rongeurs, les IgG sont essentiellement transférés via le lait en passant la membrane épithéliale intestinale, tandis que, chez l'homme, les IgG sont essentiellement transférés à travers le placenta durant le dernier tiers de la grossesse ²²¹. Plusieurs observations indiquent que le FcRn est le seul transporteur d'IgG impliqué dans la livraison d'IgG maternelles. Des études ont démontré que l'interaction entre FcRn et IgG se produit au niveau des vésicules apicales. L'IgG liée est alors transportée à travers la cellule et délivrée sur la surface basolatérale, où elle est libérée grâce au pH légèrement basique. Le transfert maternofoetal d'IgG chez l'homme montre une certaine spécificité dans la mesure où il y a un transport préférentiel d'isotypes par rapport aux autres. Ainsi les principales caractéristiques sont sa saturabilité ainsi que sa dépendance structurelle au pH, ce sont d'elles que dépendent les fonctions de la protéine connues à ce jour. Chez l'homme, l'organisation des membranes fœtales a pour conséquence le transfert d'IgG à travers le syncytiotrophoblaste du placenta. Les efficacités relatives de transfert des IgGs humaines à travers le placenta demeurent une question controversée, quelques études indiquent un faible transport des isotypes IgG2 alors que d'autres montrent un passage équivalent quel que soit la sous-classe ^{222,223} (Figure 29).

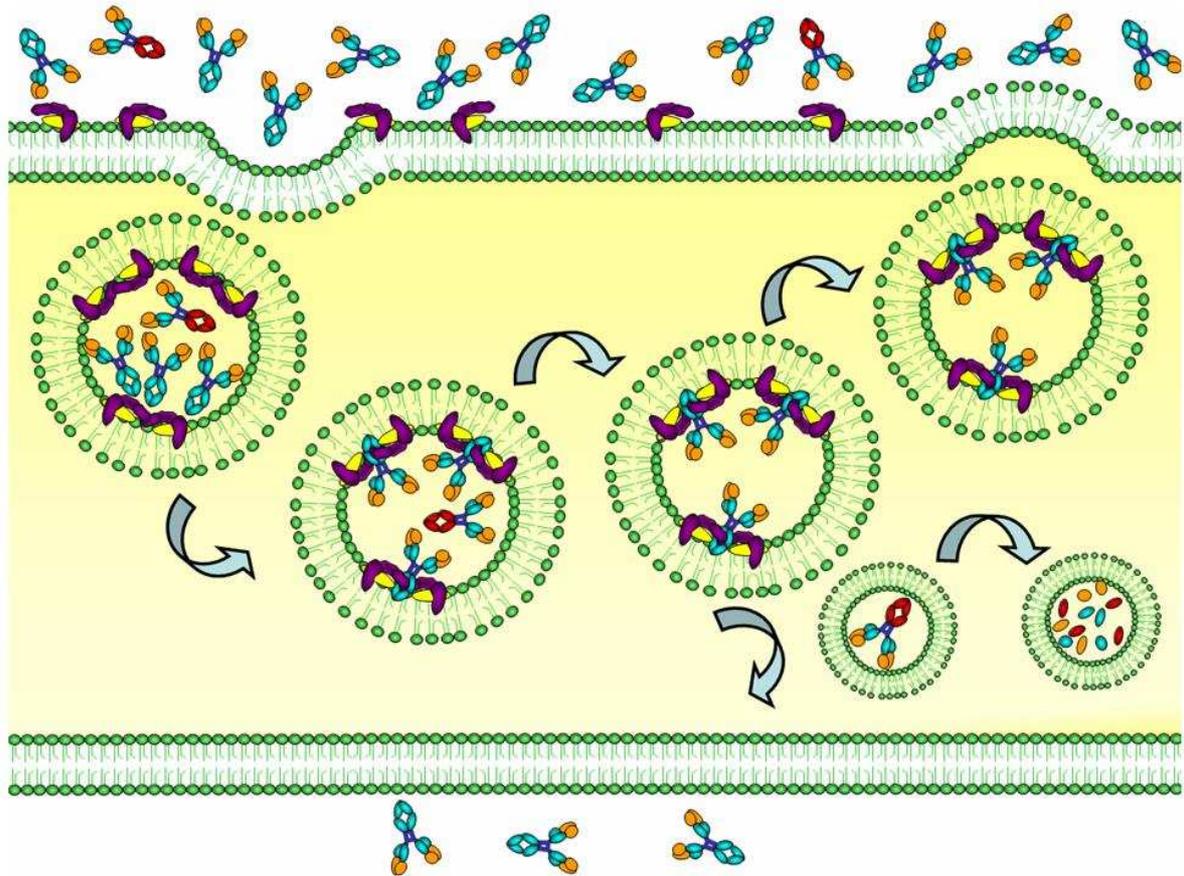


Figure 29 : Schéma de présentation du rôle du FcRn dans le maintien de l'homéostasie des IgG.

Dans ce schéma les 2 pôles d'une cellule sont représentés. Au pôle apical de nombreux anticorps sont présents, ils viennent se fixer sur 2 molécules de FcRn. Une vésicule d'endocytose se forme. Au sein de cette dernière certains anticorps se sont liés au FcRn et d'autres non. Les IgG liées au FcRn sont sauvées de la dégradation. La vésicule se dirige à nouveau vers la membrane et libère les IgG : ces dernières ont été sauvées de la dégradation et ont été recyclées. Le FcRn a joué son rôle dans le maintien de l'homéostasie. L'autre anticorps, avec un fragment Fc rouge, n'est pas reconnu par le FcRn : la vésicule d'endocytose est hydrolysée. L'ensemble des actions de liaison et de libération des IgG est essentiellement dépendant du pH. Enfin l'IgG fixée par le FcRn peut aussi être libérée au pôle basal : dans ce cas le FcRn a contribué au transport des IgG. (*Figure personnelle*)

b - Le rôle dans l'homéostasie des IgG

Il y a plus de 30 ans, l'équipe de Brambell *et al.* a émis l'hypothèse que les récepteurs impliqués dans le transfert d'IgG maternelles pourraient être les mêmes que ceux qui régulent la demi-vie des IgG dans le sérum chez l'adulte ^{224,225}. Ils ont émis l'hypothèse que ces récepteurs se lient aux IgG pour les protéger de la dégradation lysosomale. Cette hypothèse a depuis été vérifiée dans un premier temps chez la souris puis dans un second temps chez l'homme en analysant la demi-vie d'IgG mutées. Comme précédemment les mêmes acides aminés ont été identifiés comme impliqués dans la liaison. Diverses analyses ont porté sur les demi-vies dans le sérum de fragments murins d'IgG1 et d'IgG1-mutées chez des souris déficientes pour la microglobuline ($\beta 2m^{-/-}$) ^{226,227}. Ces souris n'expriment pas les molécules ou les homologues fonctionnels du CMH de classe I dont le FcRn. Les demi-vies des IgG étant anormalement faibles chez ces souris ce qui confirme le rôle du FcRn dans l'homéostasie des IgG (Figure 29). Dans la plupart des études, on a pu observer une bonne corrélation entre l'affinité pour la liaison au FcRn et la demi-vie dans le sérum des mutants de fragments Fc ou des variants d'IgG ²²⁸.

2 - La protéine FcRn et le gène FCGRT

Le gène codant le FcRn de rat a été isolé pour la première fois par l'équipe de Simister *et al.* en 1989 ²²⁹. Chez les rongeurs le gène de la chaîne lourde du FcRn, appelé *FCGRT*, se trouve sur le chromosome 7. Chez l'homme, par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes on a montré que le gène humain, *FCGRT*, se trouvait sur le chromosome 19 à la position 19q13.3 ²³⁰. La protéine FcRn est un hétérodimère constitué d'une sous unité β -2 microglobuline ($\beta 2-m$) et d'une protéine de 53 KDa dont la structure de la chaîne lourde présente de fortes homologies avec les molécules de CMH de classe I. Le clonage et le séquençage du gène de la chaîne lourde du FcRn ont confirmé cette potentialité et étendu la

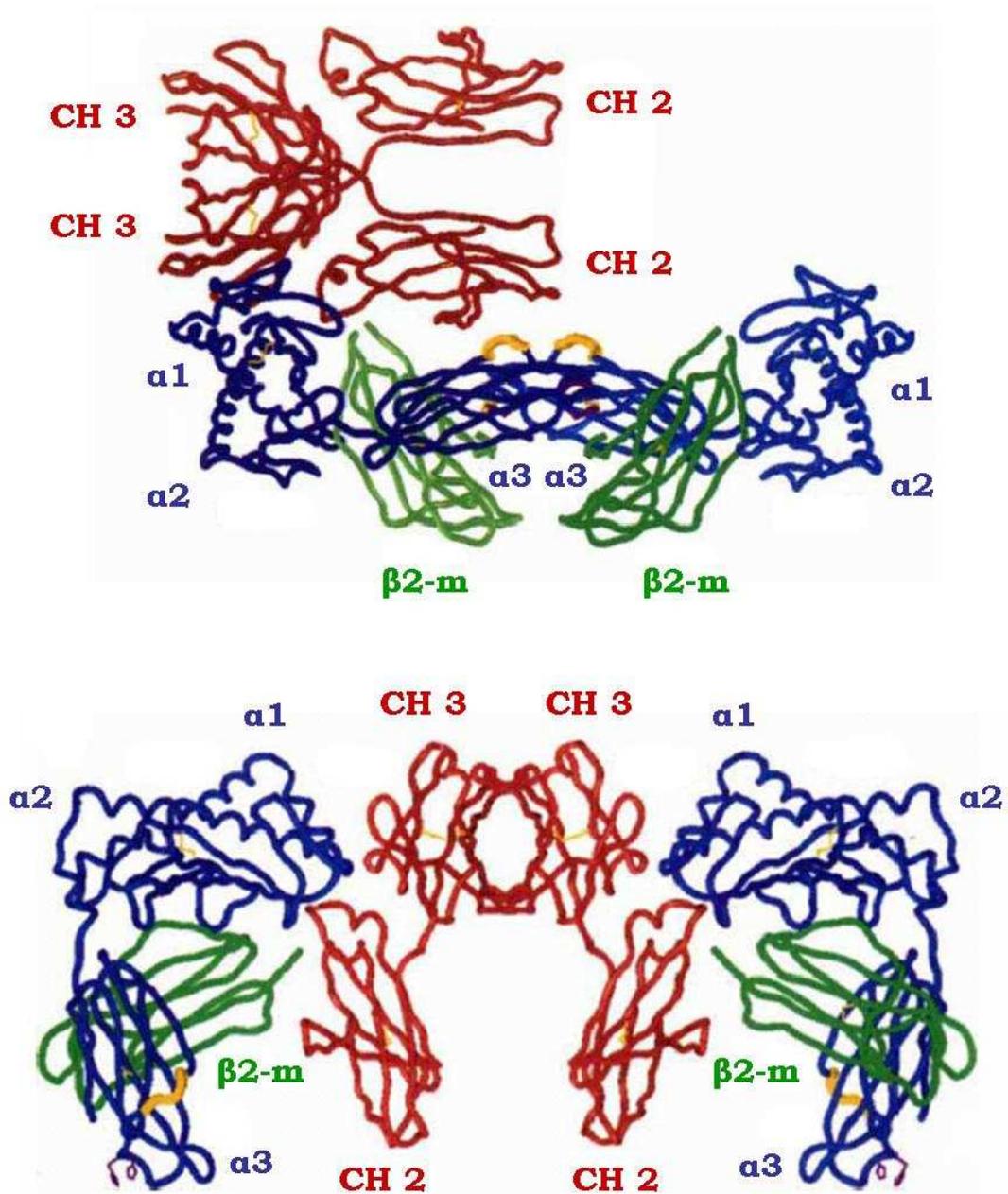


Figure 30 : Liaison d'une IgG à son récepteur le FcRn.

Analyse cristallographique. Dans un premier temps, figure du haut, un fragment Fc d'une IgG (représenté en rouge) vient se fixer sur deux récepteurs FcRn. Ce récepteur est constitué d'une sous unité β -2 microglobuline représentée en vert et d'une sous unité α représentée en bleu. Les trois domaines de cette sous unité sont aussi figurés. La liaison d'un fragment Fc requiert la présence de deux molécules de FcRn prenant place face à face (représenté sur la figure du bas) et venant prendre l'IgG dans un véritable étau.

(Figure personnelle inspirée de Burmeister *et al.*, 1998)

fonction de cette classe de molécules au delà de leur rôle connu dans la présentation d'antigène ²³¹.

Chacun des trois domaines extracellulaires et transmembranaires du FcRn présentent une forte homologie avec les régions correspondantes des molécules de CMH de classe I. La divergence dans les régions cytoplasmiques est liée aux différentes activités fonctionnelles des deux types de protéines. La structure cristallographique des domaines extracellulaires du FcRn a confirmé qu'il était structurellement semblable aux molécules CMH de classe I. Plus récemment les gènes codant les chaînes alpha du FcRn de souris et d'humain ont été identifiés et comparés. Les gènes de rongeur et d'humain partagent beaucoup d'homologie. Le clonage et le séquençage du FcRn humain ont fourni un lien important entre les études de FcRn chez les rongeurs et les humains ²³² (Figure 30).

3 - Site de liaison entre le FcRn et les IgG

Une combinaison d'approches a été employée pour localiser le site d'interaction entre le FcRn et les IgG. Les études *in vivo* comme l'analyse des fragments d'IgG ou de fragments Fc, en utilisant des analyses dans lesquelles le FcRn est connu pour jouer un rôle, à savoir le transfert au travers de l'intestin néonatal ou le transfert maternofoetal, utilisent comme critère principal la détermination de demi-vie dans le sérum ²³³. Ces études ont permis l'identification de plusieurs acides aminés conservés situés à l'interface du domaine CH2-CH3 et jouant un rôle capital dans l'interaction des IgG avec le FcRn du rat, de la souris ou de l'homme. L'isoleucine en position 253 et l'histidine en position 310 de la protéine sont les acteurs principaux de l'interaction. Ces résidus sont fortement conservés à travers les espèces. L'histidine en position 436 joue un rôle mineur mais significatif dans l'interaction entre le FcRn et les IgG ²³⁴. Le manque de conservation de cet

acide aminé à travers les espèces est lié à une participation plus limitée dans le site de fixation (Figure 31).

Dans des études fonctionnelles chez les souris, la mutation de l'histidine en position 433 en alanine n'affecte pas l'activité de la protéine. En revanche, la mutation de l'histidine 435 en alanine a comme conséquence une perte dramatique de fonction ²¹⁸. Les données disponibles démontrent sans équivoque la participation des histidines des IgG dans la liaison avec le FcRn, les expositions de ces histidines sont fortement conservées chez la souris, le rat et l'homme. Ceci fournit une explication pour la dépendance stricte au pH (liaison à pH 6-6,5 ; liaison très faible ou indétectable à pH 7,2) que possède l'interaction entre le FcRn et les IgG. Ce mécanisme, de fixation – libération dépendant du pH, dans les gammes de pH physiologiquement appropriées évite la nécessité de passer par des changements conformationnels comme c'est le cas pour de nombreuses autres protéines impliquées dans le transport ou la liaison de composés. En effet, l'analyse cristallographique du FcRn à pH 6,5 et à pH 8 ne montre aucune différence de conformation entre les deux formes. D'autres analyses de l'activité d'IgG dans des fonctions de liaison au FcRn ont montré un rôle dans le rapprochement entre FcRn et IgG pour plusieurs résidus additionnels situés à l'interface du domaine CH2-CH3 ²³⁵. Notamment celui en position 257 et, à un moindre degré, ceux des positions 307 et 309. Cependant, des variations dans ces acides aminés peuvent expliquer les différentes affinités des sous-classes d'IgG pour le FcRn [affinités décroissantes dans l'ordre : IgG2a > IgG1 > IgG2c > IgG2b] ²³⁶. En outre, le fragment B de la protéine de staphylococcique A (SPA), qui a une structure tridimensionnelle proche de celle d'un complexe Fc humain, est connu pour se lier aux acides aminés à cette interface, en entrant en concurrence avec les IgG. Des études ont indiqué que le blocage du site d'interaction du FcRn et des IgG par SPA a comme conséquence une réduction dramatique de la demi-vie des anticorps dans le sérum ²³⁷.

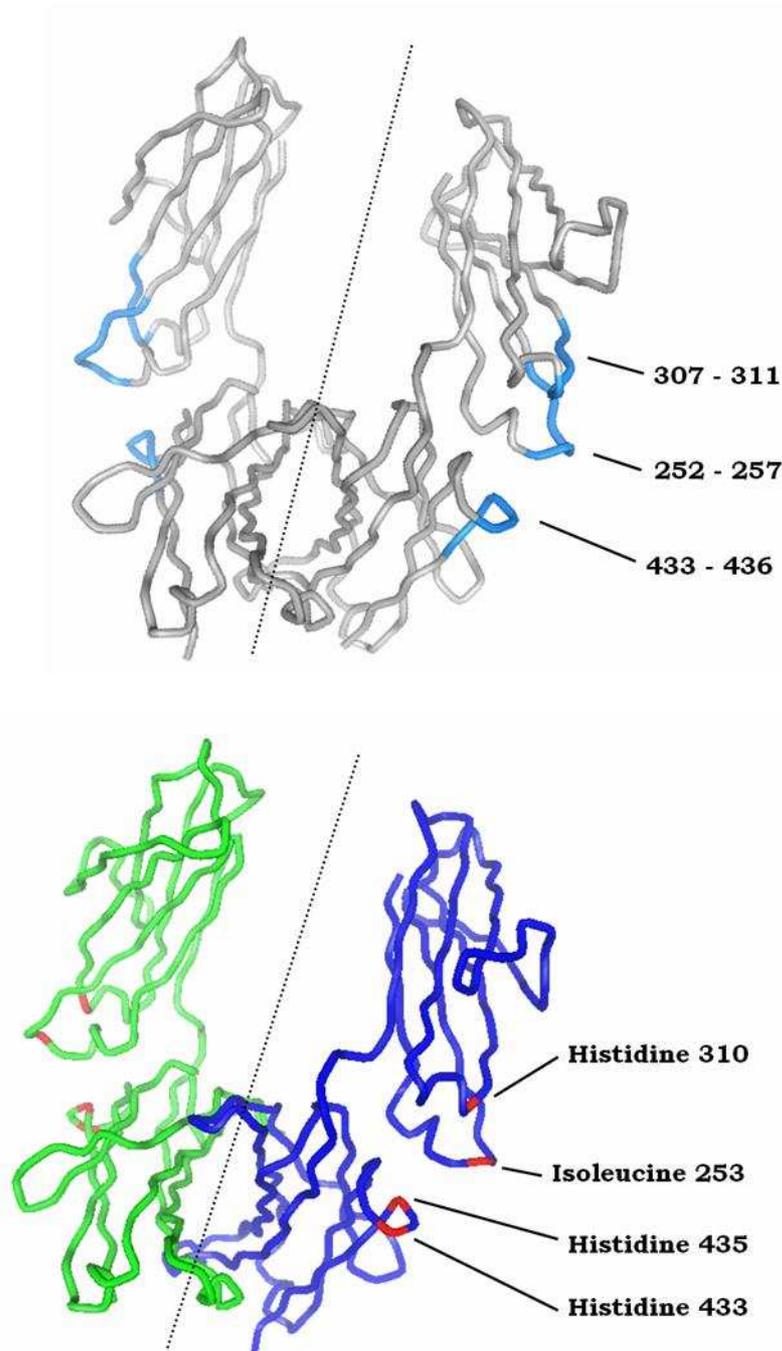


Figure 31 : Représentation des domaines CH2-CH3 de l'IgG impliqués dans la liaison au FcRn.

Analyse cristallographique du fragment Fc d'une IgG. Compte tenu de la symétrie de la molécule les régions n'ont été représentées que d'un seul côté. Dans la partie supérieure représentation des boucles impliquées dans la liaison de l'IgG aux molécules de FcRn. Ces boucles ont été identifiées par des analyses de demi vie d'anticorps mutés pour différentes régions. Parmi ces dernières certains acides aminés sont particulièrement importants ils sont représentés dans la partie inférieure de la figure. (Figure personnelle établie sous PyMol)

4 - Dépendance conformationnelle du site d'interaction entre FcRn et IgG

Les acides aminés distaux à l'interface du domaine CH2-CH3 peuvent également être impliqués dans la régulation de la demi-vie des IgG1. Les résidus critiques dans l'interaction avec le FcRn sont situés sur trois boucles dans un petit espace des domaines CH2-CH3 ²³⁸. Ceci suggère qu'ils pourraient dépendre fortement de la conformation des feuilletts β qui les soutiennent et également de la disposition relative des domaines CH2 et CH3. En effet le déplacement de la région charnière d'un fragment de Fc par des techniques de recombinaison entraîne une demi-vie plus courte dans le sérum ²³⁹. Le rôle de la charnière semble être d'imposer une contrainte sur les domaines CH2 du domaine CH2-CH3 de façon à ce que la configuration du site d'interaction avec le FcRn soit optimale.

5 - Rapport entre les sites d'interaction Fc/Fc γ Rs et Fc/FcRn

Des études de mutagenèse ont indiqué que les résidus se trouvant dans la région inférieure de la charnière des IgG sont capitaux dans leur liaison avec les récepteurs Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII ²⁴⁰. Cependant, il y a deux autres régions qui jouent un rôle en se liant à Fc γ RI (proline 331) et à Fc γ RII (glutamine 318) ²⁴¹. Ces régions sont dans un espace près de la charnière inférieure. Les données disponibles indiquent que la liaison des Fc γ R dépend également de l'état de glycosylation des IgG. Ainsi, le site d'interaction du FcRn semble être distinct de la région d'IgG impliquée dans la liaison des Fc γ R. Par analyse cristallographique il a été montré que l'interaction entre IgG et Fc γ RIIa impliquait la région inférieure de la charnière de l'IgG. En revanche, Fc γ RIIb impliquerait l'ensemble du domaine CH2-CH3 ²⁴² (Figure 32).

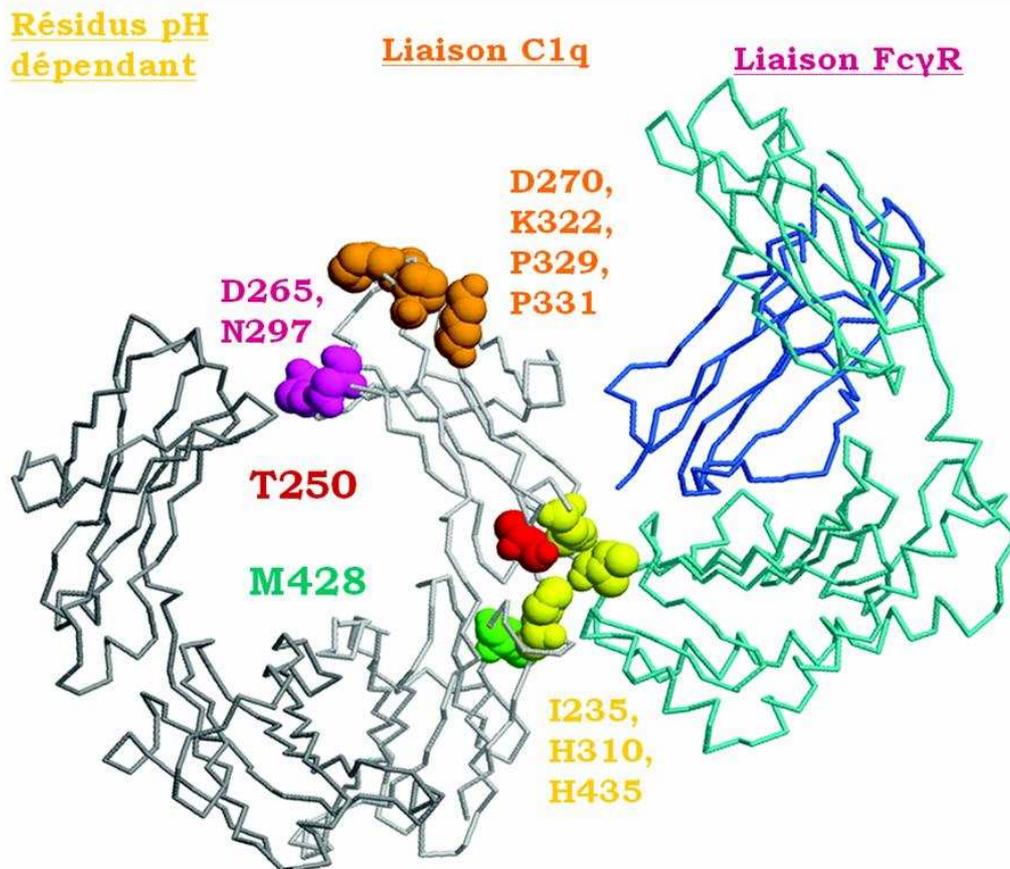


Figure 32 : Bilan des résidus aminés du fragment Fc des IgG impliqués dans les liaisons.

Analyse cristallographique du fragment Fc d'une IgG représenté en gris sur la figure. Le FcRn constitué de la sous unité β -2 microglobuline est représenté en bleu, tandis que la sous unité α est représentée en vert.

Sur le Fragment de l'IgG ont été identifiés en violet les résidus impliqués dans la liaison avec les récepteurs Fc γ R. En orange les résidus impliqués dans la liaison au complément (C1q). Enfin les autres résidus identifiés interviennent dans la liaison au FcRn. Certains d'entre eux sont pH dépendant et ont été représenté en jaune. Ils sont à l'origine du fonctionnement biologique du FcRn dont la liaison et la libération s'effectue en fonction du pH. (Figure inspirée des travaux de Petkova et al., 2006)

III - Conclusion

Actuellement on assiste au développement et à la mise sur le marché de très nombreux Acm-r de meilleure affinité pour un Ag cible donné et/ou aux fonctions cytotoxiques renforcées, avec la volonté sous-jacente de pallier à la variabilité de réponse aux Acm-r. En effet, si l'on prend l'exemple de la cible antigénique qu'est le récepteur CD20, les nouveaux Acm-r illustrent bien cette évolution certains comme l'ofatumomab (anti CD20 de type I, humax®, Genmab) ont une affinité pour le CD20 améliorée d'autres comme le GA101® (anti CD20 de type II, Glycart-Roche) ont une affinité améliorée au FcγRIIIa. Cependant si la lumière commence à être faite sur les aspects génétiques de la variabilité de réponse, peu d'informations sont disponibles confirmant l'impact de la masse antigénique sur l'efficacité thérapeutique de réponse au traitement.

De nombreuses études cliniques se sont intéressées à la variabilité dans la réponse au rituximab observée en clinique et ont montré qu'elle pouvait être partiellement expliquée par la variabilité pharmacocinétique^{198,202,211}. L'évolution des profils pharmacocinétiques du rituximab est très dépendante de la dose injectée pendant les différentes perfusions ainsi que des schémas d'administrations.

Cependant la réalisation d'une bonne analyse de ces paramètres pharmacocinétiques ne peut se faire sans la maîtrise de la relation dose - concentration - effet du rituximab. Cette relation ne peut être étudiée que par l'intermédiaire d'approches pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et par une analyse séparée de chaque type de lymphome ainsi que de chaque type de thérapie en clinique. De telles approches pourraient se faire via l'utilisation de bio marqueurs et pourrait ainsi conduire à une adaptation individuelle des schémas et des doses lors des traitements par le rituximab. L'une des premières études menées en clinique sur le rituximab, a permis de montrer, pour des patients atteints de lymphomes agressifs non hodgkiniens à grandes cellules B, l'existence d'une grande

variabilité dans l'exposition au traitement ²¹¹. De plus il a été démontré l'existence d'une relation entre les concentrations circulantes de rituximab et les taux de survie et de régression de la maladie.

Ces facteurs, dans un premier temps, ne peuvent être approchés que par l'intermédiaire d'un modèle animal. Seules conditions d'études permettant d'éviter certains facteurs étant à l'origine de cette variabilité comme les polymorphismes génétique, les schémas d'administration ou encore les stades d'évolution de la maladie.

Afin qu'il soit pertinent sur un plan scientifique un tel modèle doit parfaitement être maîtrisé. L'inoculation de la maladie doit être connue pour être reproductible et ainsi permettre les comparaisons. Le modèle cellulaire et le fond génétique animal choisis doivent aboutir à une maladie reproduisant les caractéristiques de la maladie chez l'homme.

Enfin dans le cas de ces études la modèle ne doit pas présenter de réaction immunologique qui viendrait compromettre la pertinence de l'essai. Le modèle et la stratégie d'étude mis en place doivent permettre un suivi non destructif de la tumeur. En parallèle le suivi de l'évolution de la maladie doit se faire de façon simple, fiable, reproductible mais doit surtout permettre d'analyser l'effet thérapeutique d'un traitement sans qu'aucune interférence ne vienne gêner l'analyse

C'est pourquoi la connaissance et la maîtrise des facteurs influençant cette variabilité sont devenus de véritables challenges afin de proposer des solutions thérapeutiques toujours plus adaptées ²⁰⁶.

TRAVAIL PERSONNEL

PREMIER ARTICLE : Méthode d'analyse quantitative de la bioluminescence adaptée aux essais de bimodalité pour le suivi du développement tumoral dans un modèle murin syngénique de lymphome B exprimant le CD20 humain.

I - Introduction

Les quelques données disponibles dans la littérature, obtenues lors d'essais de monothérapie avec le rituximab et présentées dans la revue de la littérature générale, sont insuffisantes pour s'assurer du rôle du volume tumoral dans l'efficacité clinique d'un traitement. La nature contradictoire des résultats de ces études, ainsi que la grande difficulté dans l'obtention de groupes d'individus comparables, du fait de l'implication de nombreux paramètres individuels dans la réponse au traitement, amène à envisager la mise en place d'un modèle animal. L'établissement d'une telle méthodologie où seul le paramètre "volume tumoral" peut varier permet d'appréhender le problème posé.

Les progrès récents dans le domaine de l'imagerie optique ainsi que de l'ingénierie moléculaire ont permis à la bioluminescence de devenir une méthode de référence. Reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique dans de nombreux domaines d'applications, elle est adaptée au suivi de la croissance tumorale. Sa flexibilité et ses aspects méthodologiques, permettent d'éviter l'utilisation d'un grand nombre d'animaux ainsi que de leur sacrifice pour une évaluation tumorale peu précise.

Le spectre d'émission de la luciférine de luciole (Beetle luciferin) est présenté dans la Figure 33 et suit une hyperbole de 400nm à 700nm. L'intensité d'émission maximale est obtenue avec une longueur d'onde de 556nm. Cependant ces paramètres se trouvent fortement modifiés lors du passage à un modèle *in vivo*. En effet, comme évoqué dans l'introduction générale et comme précisé dans la Figure 33 le spectre d'émission de la luciférine se trouve modifié *in vivo*. Il est décalé dans les longueurs d'ondes plus grandes.

In vivo les photons émis par les cellules bioluminescentes vont interagir fortement avec de nombreuses molécules. Des composés tels que l'eau, l'hémoglobine ou encore la mélanine sont capables d'absorber ces photons (Figure 34). Cette action va modifier la sensibilité du modèle. On peut remarquer qu'entre 500nm et 600nm l'intensité d'émission de la luciférine est maximale, l'eau n'absorbe que très peu et l'hémoglobine a une capacité d'absorption des photons assez faible. Seule la mélanine possède encore une capacité d'absorption importante.

Nous proposons dans cette partie la mise en place d'un modèle de lymphome murin, exprimant à la fois le CD20 humain et la luciférase. Lymphome dont l'histoire naturelle (évolution, présentation clinique) est proche d'un lymphome B humain. L'expression de CD20 par ces cellules nous a permis par la suite (second article) d'étudier l'effet anti-tumoral d'un traitement par le rituximab et la production de luciférase par ces cellules nous a permis d'analyser et de quantifier la croissance tumorale. Le choix d'un modèle syngénique (lignée cellulaire EL4 et souris de fond génétique C57BL/6J) nous a permis de nous affranchir des questions immunologiques rencontrées dans les modèles immunodéficients.

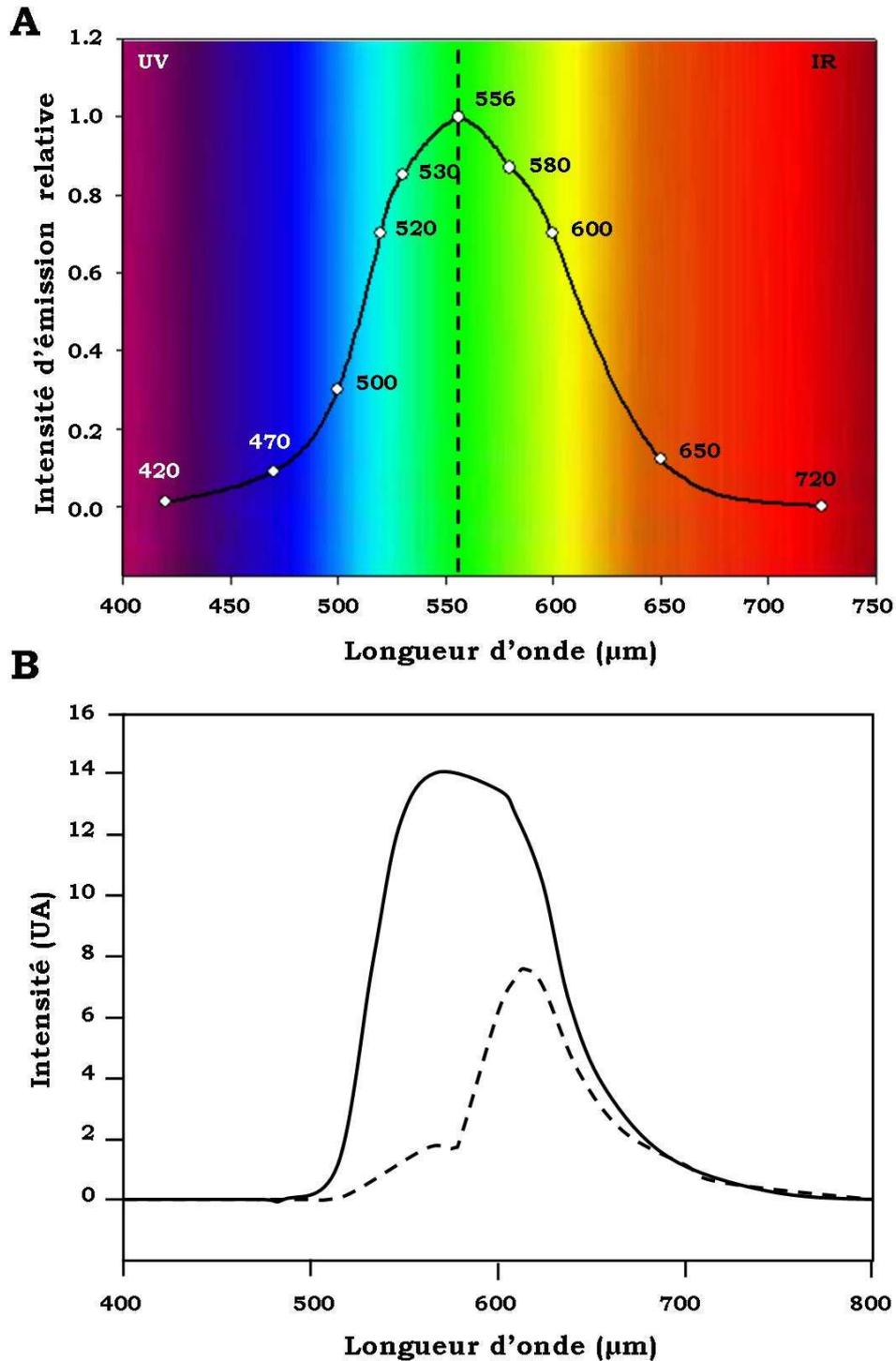


Figure 33 : Spectre d'émission de la luciférine de potassium *in vitro* et *in vivo*.

A. Spectre d'émission de la luciférine de potassium *in vitro*. Le spectre s'étale de 420 nm à 720 nm, ne comporte qu'un seul pic dont l'émission maximale se situe vers la longueur d'onde de 556 nm.

B. Spectres d'émissions de la luciférine de potassium *in vitro* en traits continus et *in vivo* en traits pointillés. *In vivo* le spectre est décalé vers des longueurs d'ondes plus grandes à cause de l'absorption par les tissus des photons émis.

(Source : King's College, Department of Biology, Wilkes-Barre, PA, Etats Unis)

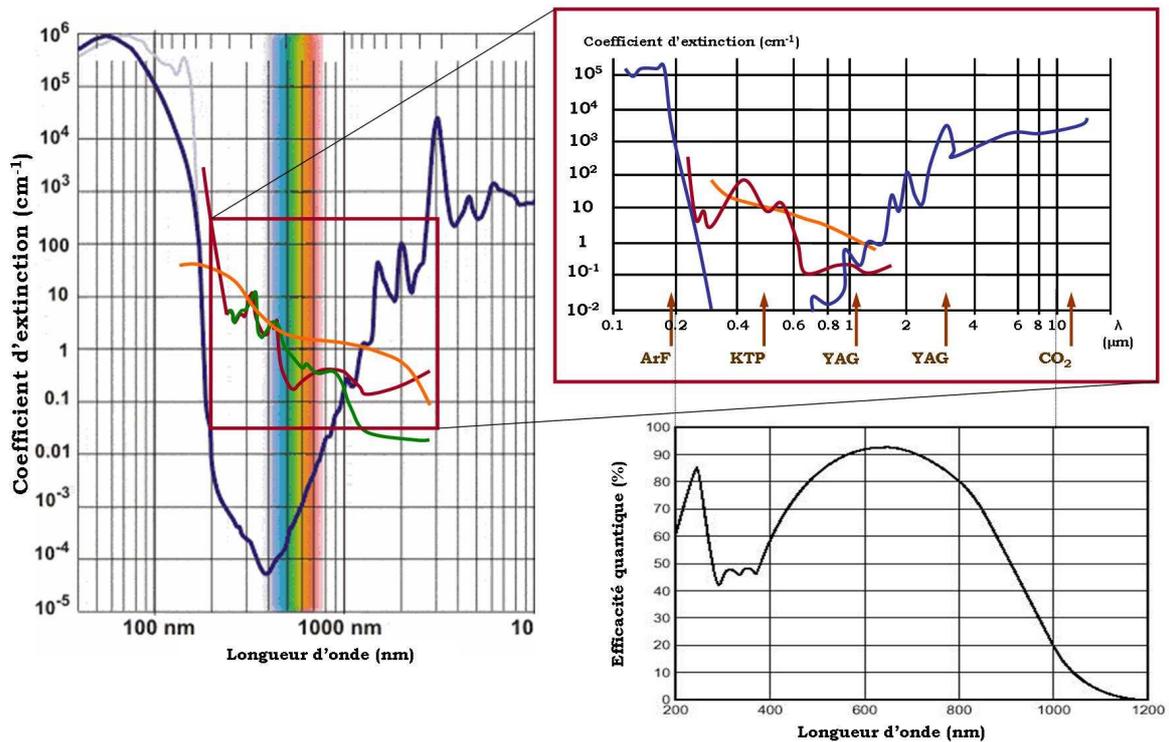


Figure 34 : Absorption de la lumière émise par différents composés *in vivo*.

Dans le diagramme de gauche : courbes d'absorption de la lumière en fonction de la longueur d'onde pour l'eau (en bleu), pour l'hémoglobine (en rouge), pour l'oxyhémoglobine (en vert) et pour la mélanine (en orange). Ces composés sont les principales causes d'absorption du signal de bioluminescence *in vivo*. Le même diagramme est repris en haut à droite dans des longueurs plus usuelles avec le même code couleur. Entre 500 nm et 700 nm l'absorption de la lumière émise est essentiellement due à l'hémoglobine et à la mélanine. Enfin dans la partie inférieure droite est présentée en parallèle l'efficacité quantique du capteur CCD ORCA2 BTL Hamamatsu® utilisé pour l'ensemble des essais. Ce capteur, refroidit à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, possède une efficacité quantique maximale dans des longueurs de 500 nm à 700 nm. Cette zone de longueur d'onde permet de se placer dans une zone véritable compromis entre l'émission maximale de la luciférine et l'absorption minimale des composés *in vivo*.

(Sources : diagrammes d'absorptions établis à l'aide de diverses sources bibliographiques ; diagramme d'efficacité quantique : Hamamatsu Photonics®)

II - Poster de présentation scientifique

L'ensemble des travaux de mise au point de la méthode d'analyse quantitative de la bioluminescence adaptée aux essais de bimodalité pour le suivi d'un modèle murin syngénique ont fait l'objet d'une présentation sous la forme d'un poster scientifique lors du 49^{ème} meeting annuel de l'ASH (*American Society of Haematology*) qui s'est déroulé du 08 au 11 décembre 2007 à Atlanta, Georgie, Etats-Unis. Le poster "*Quantitative bioluminescent method appropriate for bimodality analysis to improve and follow a syngenic murine model of B-cell lymphoma expressing human CD20*" (présenté ci après) a été complété par un *abstract* publié dans un numéro spécial du journal scientifique *Blood*, *abstract* N°1400, novembre 2007. Ce poster a aussi été présenté lors du congrès annuel de la SFH (Société Française d'Hématologie) qui s'est déroulé du 20 au 22 mars 2008 à Paris.

Quantitative Bioluminescent Method Appropriate for Bimodality Analysis to Improve and Follow a Syngenic Murine Model of B-Cell Lymphoma Expressing Human CD20.

David Daydé^{1*}, Florence Dommange^{1*}, Stéphanie Lerondel^{2*}, Josée Golay^{3*}, Alain Le Pape^{2*}, Gilles Paintaud^{1*}, Pierre Bardos^{1*}, Hervé Watier^{1*} and Guillaume Cartron^{4*}. (Introduced by Jean-François Rossi)

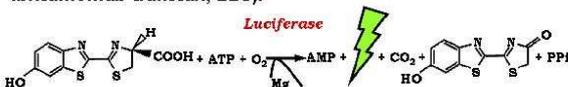
¹EA3853 Immuno-Pharmaco-Genetics of therapeutic Antibodies, Université François Rabelais, Tours, France; ²Service d'Imagerie Fonctionnelle, Centre de Distribution Typage et Archivage animal, Orléans, France; ³Laboratory of Cellular and Gene Therapy, Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo, Italy and ⁴Service d'Hématologie et Biothérapies, INSERM U847, CHU Lapeyronie, Montpellier, France. *There are no relevant conflicts of interest to disclose.

Abstract.

The anti-CD20 monoclonal antibody rituximab (C2B8) has shown promising results in the clinical treatment of patients with B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma. However, its therapeutic effect is variable whereas a better knowledge of factors affecting rituximab response could lead to improve its efficacy. It has been suggested that tumour burden could influence rituximab exposure and response in human. The lack of method to assess precisely tumour burden has however prevent to confirm such influence. Study of factors affecting antibody exposure requires bimodality analysis allowing to precise factors related to antibody from those related to tumour.

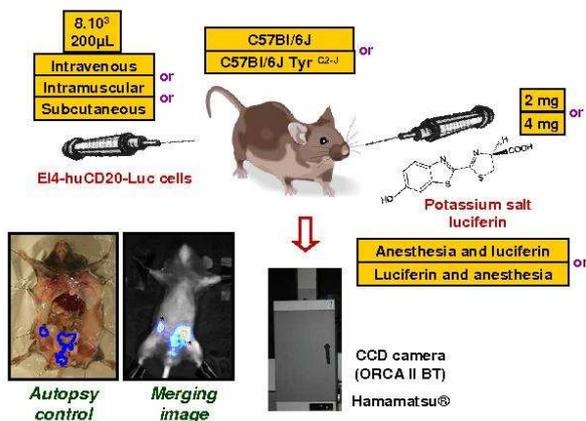
Objectives.

We purposed to develop a quantitative method of tumour burden using bioluminescence imaging (BLI) and simultaneously scintigraphic study of monoclonal antibody biodistribution and exposure (Indium-111 labelled ibritumomab-tiuxetan, 2B8).



Methods.

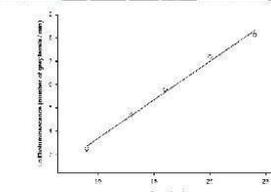
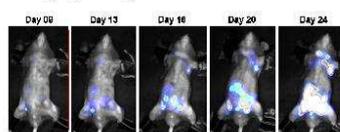
Murine model of T-lymphoma: E14
- transduced with human CD20 cDNA
- transfected with luciferase plasmid pCMV-Luc.



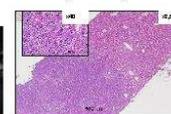
Results.

With an injection of 8.10^3 E14-huCD20-Luc cells all mice died within 30 days with liver, spleen, bone marrow and lymph nodes involvement confirmed by immunohistochemistry and PCR analysis (fig. 1 to 3).

Background noises and cosmic rays, were eliminated from merging image before bioluminescent activity analysis.



(fig.1) Tumoural progression follow-up.



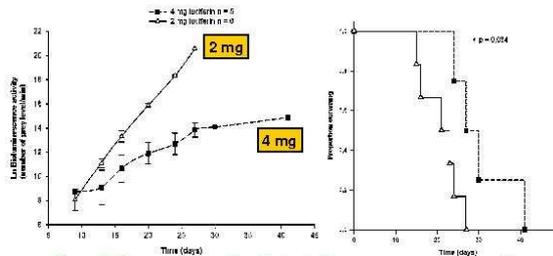
(fig. 2) Liver sample after hematein-eosin-safran coloration.



(fig. 3) Lymph node sample after coloration by an anti human CD20

Sensitivity of analysis was below than 10^2 cells and there was proportionality between bioluminescent activity and cells number from 10^3 to 10^9 cells. The use of different binning allowed the follow up of tumour burden evolution from 9 days after inoculation until the death of mice.

We validated the used of black phenotype C57Bl/6J compared to C57Bl/6J Tyr C2-I albinos phenotype.



(fig. 4) The amount of luciferin influences tumour growth.

Conclusion.

Such model and quantification method makes possible the follow-up of tumour growth and monoclonal antibody efficacy and exposure studied by bimodality analysis.

(see poster board N°537)



III - Article

Ces essais nous ont permis de réaliser un article scientifique qui est actuellement soumis pour publication et qui est présenté ci après.

Multimodality imaging of B-cell lymphoma expressing human CD20 in a syngeneic murine model with combined quantitative bioluminescence imaging, scintigraphy imaging and small-animal ⁶⁴Cu-anti-CD20 PET

David Daydé^{1,2}, Florence Dommange^{1,2}, Marc Ohresser^{1,2}, Stéphanie Lerondel³, Sabrina Pesnel³, Josée Golay⁴, Alain Le Pape^{3,5}, Gilles Paintaud^{1,2,6}, Pierre Bardos^{1,2,7}, Hervé Watier^{1,2,7}, Guillaume Cartron^{8,9,*}.

¹Université François Rabelais Tours, GICC, France ;

²CNRS, UMR 6239, France ;

³CNRS, UPS44, Centre de Distribution, Typage et Archivage animal, Institut de Transgènose, Orléans, France ;

⁴Laboratory of Cellular and Gene Therapy, Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo, Italia ;

⁵Inserm U618, Unité protéases et vectorisation pulmonaire, Tours, France ;

CHRU de Tours, departments of ⁶Pharmacology-Toxicology and ⁷Immunology, Tours, France ;

⁸INSERM U847, Biothérapies des cellules souches normales et cancéreuses, Montpellier, France ;

⁹CHU Lapeyronie, Service d'Hématologie et Biothérapies, Montpellier, France.

Corresponding author: Guillaume Cartron, MD, Ph-D, Service d'Hématologie et Biothérapies, INSERM U847, CHU Lapeyronie, CHU Montpellier, 191 avenue du doyen Gaston Giraud 34295 Montpellier, France. Tel: +33 (0)4 67 33 83 62 Fax: +33 (0)4 67 33 91 94, Email: guillaume.cartron@med.univ-tours.fr

First author: David Daydé, Ph-D student, GICC, UMR6239, Laboratoire d'immunologie, Université François Rabelais de Tours, 10 boulevard Tonnelé 37032 Tours, France. Tel : +33 (0)2 47 47 47 47, Email : dayde_d@med.univ-tours.fr

Financial support: D.D. was supported by a grant from Région Centre and a fellowship from the Société Française d'Hématologie. This study was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer and by Roche France.

Number of words in the abstract: 300

Total text word count: 6494

Number of figures: 7

Number of table: 1

Number of references: 28

Running title: *In vivo* multimodality imaging of lymphoma model

Abstract

Murine models are useful tools to evaluate efficacy and toxicity of new pharmaceuticals. In this setting, efficacy assessment is often limited to the evaluation of survival and there is a need to develop technologies allowing to analyze simultaneously treatment efficacy and pharmacokinetics of products. The anti-CD20 monoclonal antibody rituximab (Mabthera[®], Rituxan[®], huC2B8) is effective in the treatment of patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. However, its therapeutic effect might be influenced by tumor mass at diagnosis. We developed therefore an animal model allowing simultaneously a quantitative assessment of tumor burden and analyze anti-CD20 antibodies biodistribution.

Methods: EL4 lymphoma cells expressing human CD20 and luciferase genes (EL4-huCD20-Luc) were injected to C57BL/6J and C57BL/6J Tyr^{C2-J} mice. Early dissemination of tumor cells was evaluated by bioluminescence imaging (BLI) and ^{99m}Tc-EL4-huCD20-Luc scintigraphy. For each animal, tumor growth was followed by bioluminescence. After elimination of background noise and cosmic rays, bioluminescence was quantified for whole tumor foci taking into account light absorption by tissues according to anatomic localizations. Antibody biodistribution was analysed by ¹¹¹In-ibrutumomab (mIgG1 anti-CD20,mC2B8) scintigraphy and ⁶⁴Cu-ibrutumomab PET

Results: All mice developed a disseminated lymphoma leading to the death within 30 days. Combined BLI and scintigraphy demonstrated liver, spleen, lymph nodes and bone marrow involvement and presence of huCD20 expressing cells was confirmed by *ex-vivo* assays. Mouse phenotype (C57BL/6J or C57BL/6J Tyr^{C2-J}) did not significantly modify bioluminescence measurement whereas dose of luciferin and anesthesia time influenced tumor growth and bioluminescence activity, respectively. BLI combined with ¹¹¹In-ibrutumomab scintigraphy and ⁶⁴Cu-ibrutumomab PET shown the co-localisation of tumor cells and anti-CD20 antibody.

Conclusion: Combination of quantitative BLI, scintigraphy and PET allows in the same time a sensitive and improved quantification of tumor burden in mice and an evaluation

of antibody distribution. This technique is potentially useful to study and compare the dose-concentration-effect relationships of anti-CD20 antibodies.

Keywords : multimodal imaging, huCD20 lymphoma cells, quantitative bioluminescence, syngeneic murine model.

Introduction

Animal models are essential for the development of human pharmaceuticals. Despite important limitations related to their genetic distance with man, they offer a unique opportunity to test efficacy, toxicities and pharmacokinetics of new products. In this setting, one of the challenges of the study of anticancer drugs is to evaluate their efficacy, which often relies on animal survival or tumor size assessment after animal sacrifice. To improve the *in vivo* monitoring of tumor growth during treatment and to comply with international guidance for animal care and use, imaging technology has become a fundamental tool^{243,244}. Among these, bioluminescence imaging (BLI) and nuclear imaging are likely the most interesting methods to assess quantitatively both cell proliferation and effective delivery of a labelled anti tumor drug. BLI is based on a non invasive detection of photons emitted by luciferase expressing cells in the living animal and has been used for the study of a variety of tumor cells. The main limitation of this gene expression imaging is its strict dependence on tumor cell metabolism, leading to unreliable values for hypoxic and necrotic tumoral areas²⁴⁵.

Nuclear imaging with scintigraphy and positron emission tomography (PET) is a molecular imaging modality with satisfactory sensitivity allowing tumor assessment and measurement even for deep tumors. Despite relatively poor spatial resolution, it offers a reliable strategy to study the pharmacokinetics of therapeutic agents and to quantitate *in vivo* the *in situ* expression of a given antigen or the amount of drug in the tumor²⁴⁶. However, BLI and nuclear imaging are usually not combined to get these complementary informations simultaneously. This purpose can be achieved only if the performances of the highly sensitive CCD camera used for BLI are not altered by gamma rays coming from the radioactivity within the animal. The background noise of commercially available high performance bioluminescent imaging devices²⁴⁷ is usually increased 2.5 to 6 fold in the presence of radiotracers resulting in a decrease in sensitivity of at least 2 logs with an associated degradation of the response linearity. A dedicated bioluminescence imager was

therefore designed, based on a thin backside illuminated CCD camera previously checked to be non sensitive to gamma rays^{248,249}.

Monoclonal antibodies have dramatically improved the treatment of cancer in man but factors affecting their efficacy remain largely unknown. Among these factors, tumor burden is suspected to influence both antibody exposure and clinical response²¹¹. Because of the lack of a sensitive method to assess tumor burden, its influence on the relationship between dose and therapeutic effects has not been demonstrated yet. Study of factors influencing antibody exposure requires bimodality analysis allowing to discriminate in the same experiment factors related to antibody from those related to tumor. We have therefore developed a method of tumor burden quantitative assessment that uses BLI and allows simultaneous nuclear imaging. Because of the extended use of rituximab (anti-CD20, chimeric IgG1k) in man, we chose to develop this imaging method in the murine model of T-lymphoma cells transduced with the human CD20 cDNA (EL4-huCD20) and transfected with luciferase plasmid (EL4-huCD20-Luc). This murine model can be used to study the influence of tumor volume (antigenic mass) on the dose-concentration-effect of anti-CD20 antibodies.

Materials and methods

Cell line: EL4-huCD20-Luc

The EL4-huCD20 cell line (EL4 murine T lymphoma cells infected with the (LTR)-CD20-LTR vector containing the human CD20 cDNA) has been described previously¹⁸⁸. The plasmid pCMV-Luc (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was transfected into EL4-huCD20 cells by using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and selected by culture in 300 µg/mL of geneticin (G418) (Euromedex, Mundolsheim, France) for 4 weeks. The antibiotic-resistant cells clones obtained by 2 serial limiting dilutions were screened for luciferase activity in culture supernatant. All experiments were performed with exponentially growing cells at the fifth to ninth passage. Control of CD20 expression was carried out using a FITC-labelled mouse anti-CD20 mAb (Beckman Coulter, San Jose, CA, USA). Antibodies were incubated with 10^6 cells during 30 minutes at 4 °C before acquisition using a flow cytometer Epics XL-MCL® (Beckman Coulter), data analysis being carried out using the software System II® (Beckman Coulter). For analysis of antigen density, the average number of membrane CD20 molecules was estimated using the specific mAb binding value provided by Qifikit assay (Dako, Trappes, France)

Luciferase expression control

2×10^5 cells were lysed in 1 mL PBS and 20 µL of lysis reagent (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent®, Promega, Charbonnières, France). Cellular lysates were distributed in opaque plates (BandW isoplate®, Wallac, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). One hundred µL of reagent containing luciferin and ATP (Luciferase Assay Reagent®) were added before light measurement in a Wallac Victor 1240® luminometer (Perkin Elmer). Analysis of bioluminescence was made using the Wallac version 2.0 software (Perkin Elmer).

In vitro quantitative bioluminescence analysis

Various numbers of EL4-huCD20-Luc cells were washed in opaque plates and recovered in 100 μ L of PBS. After 15 minutes, 2 mg of beetle luciferin in 100 μ L culture medium were deposited and bioluminescence examination was carried out 4 minutes later. This camera was connected to a computer equipped with an acquisition and image processing software (HiPic®, Hamamatsu Photonics).

γ scintigraphic imaging of initial tumor cell domiciliation

Animal protocols were approved by the Regional Committee of Ethics for the Animal Experimentation (CREEA) UNI37-014 and were in accordance with the International Guidance for animal care and use. EL4-huCD20-Luc cells were labelled with technetium-99m (^{99m}Tc) using stannous fluoride extemporaneous reduction in limiting assessment (300 μ L saline) or with indium-111 (^{111}In) oxinate as described previously^{250,251}. Control of apoptotic cells was performed by cytometric method after labelling by annexin V-FITC. C57BL/6J mice and C57BL/6J Tyr^{C2-J} albino mice (male, 10-12 weeks of age) (Transgenose Institute, Orléans, France) were intravenously injected with ^{111}In or ^{99m}Tc labelled EL4-huCD20-Luc cells before undergoing anesthesia with 3% isoflurane (Aerrane®, Baxter, Deerfield, IT, USA). Mice were then placed on a high resolution γ camera equipped with a position sensitive photomultiplier tube and 1.3 mm holes parallel collimator (Gamma To colour, Biospace Mesures, Paris, France). Imaging was carried out immediately, 1h30 (60 seconds in a 256x256 pixels matrix), 18h and 60h after cells infusion (120 seconds in a 128x128 pixels matrix).

Bioluminescence imaging of syngeneic lymphoma model

C57BL/6J mice and C57BL/6J Tyr^{C-2j} were intravenously inoculated with 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells in tail vein. Animals were anesthetized by injection of 100 mg/kg hydrochlorate of ketamine (Imalgene 1000, Merial, London, UK) and 10 mg/kg of hydrochlorate of xylazine (Rompun 2%, Bayer, Deerfield, IT, USA). Mice previously shaven were intra peritoneally injected with 2 or 4 mg of luciferin (Promega). BLI was performed 4

minutes later using a high sensitivity CCD camera cooled to -70°C . To allow multimodal imaging combining bioluminescence imaging, scintigraphy and PET imaging, an ORCA II BT C4742-98-26 LW (Hamamatsu Photonics) was selected based on its insensitivity to 140 KeV γ -rays up to 20 MBq. Binning and duration of acquisition were set up depending upon tumor activity at the time of acquisition.

To quantify tissue specific absorption we inoculated C57BL/6J and C57BL/6J Tyr^{c-2j} mice with 10^3 to 10^6 EL4-huCD20-Luc cells by subcutaneous injection near thymus lymph nodes, aortic lymph nodes, axillary lymph nodes or inguinal lymph nodes or by intramuscular injection near mesenteric lymph nodes or in thigh hind paw. Fifteen minutes later, BLI analysis was realized. BLI intensities obtained *in vivo* were compared to those obtained with a same cell number in *in vitro* experiments.

Image processing and data calculation

Images were taken using HiPic® software version 6.4.0 (Hamamatsu Photonics). WASABI® software version 1.5. release pf7 (Hamamatsu Photonics) was used to carry out co-recording of both optical and bioluminescence images. Suppression of cosmic rays and background noise was achieved using Matlab® software version 7.0 (MathWorks, Paris, France). ImageJ software version 1.38 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) was used for quantification in regions of interest delineated by segmentation.

Immunohistochemistry of tumors

C57BL/6J mice were inoculated with 8×10^3 EL4-huCD20-Luc by i.v. injection. On day 13 (D13), an autopsy was performed to collect liver, spleen, kidneys and lymph nodes and to analyze tumoral cell infiltration. After fixing in formol (10%) for 24 hours, 4 μm sections were stained in hematein-eosin-safran (HES). Immuno chemistry analysis using the peroxidase complex and the Streptavidin-Biotin technique (LabVision microm, Fremont, CA, USA) was performed using 1/200 diluted anti-CD20 mAb (clone L26, Dako, Glostrup, Denmark).

PCR analysis

Livers, spleens, kidneys, lymph nodes and bone marrow cells on D9, D13, D16, D21, D24, D27, D30 and D34 after EL4-huCD20-Luc cells inoculation were sampled from inoculated or control mice. Tissues were homogenized, and DNA immediately purified with DNAzol® BD Reagent (Invitrogen). A total of 400 ng DNA were amplified by PCR in a volume of 10µl containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂ with 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 1.5 x 10⁻⁷ M of huCD20 specific primers (5'-AATTCAGTAAATGGGACTTTCCCG-3', 5'-ACTATGTTAGATTTGGGTCTGGAG-3'). Amplifications were performed with a 5-min denaturation step at 95°C, followed by 30 cycles of denaturation (95°C for 1 min), annealing (64°C for 1 min) and extension (72°C for 1 min). PCR products were run on a 8% TBE acrylamide gel Novex® (Invitrogen) and revealed by ethidium bromide (Invitrogen) staining. To verify DNA samples, a normal murine endogenous gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) was also amplified by PCR as described above²⁵².

Analysis of anti-CD20 antibody biodistribution using immunoscintigraphy and ⁶⁴Cu-anti-CD20 PET imagings

Antibody biodistribution of ibritumomab tiuxetan (mu-IgG1k anti-CD20, muC2B8, Zevalin®, Bayer Healthcare, Lys-lez-Lannoy, France) was assessed after its labelling with ¹¹¹In or copper-64 (⁶⁴Cu) in the same way as manufacturer's recommendations for labelling of yttrium 90 (⁹⁰Y) ibritumomab tiuxetan. C57BL/6J mice were inoculated with 8 x 10³ EL4-huCD20-Luc by i.v. injection (D0). Mice received 5.55 MBq of labeled ibritumomab on D19. Biodistribution of ¹¹¹In labeled ibritumomab was assessed by gamma camera (Gamma Imager, Biospace Mesures, Paris, France) on D20. For biodistribution of ⁶⁴Cu labeled ibritumomab analysis, a 10-min static single-frame scan was acquired on the small-animal PET camera (microPET P4, Concorde Microsystems Inc.). Images were reconstructed by

filtered backprojection using a ramp filter. The pixel size was 0.845 · 0.845 · 1.260 mm, and the resolution was approximately 1.85 mm.

Expression and statistical analysis of results

Statistical tests were performed with SigmaStat 3.1 and SigmaPlot 9.0 softwares (Systat Software, Paris, France) and used paired Student's *t*-test, Tukey-Kramer multiple comparisons test and Wilcoxon test when appropriate. Survival was calculated using the method of Kaplan and Meier and were measured from the day of lymphoma cells inoculation to animal death. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

Results

Bioluminescent lymphoma cell line: EL4-huCD20-Luc

Among the 384 EL4-huCD20-Luc clones obtained after transfection by the plasmid pCMV-Luc and screened for neomycin resistance 4 weeks later, the clone 1C8 with most active luciferase activity was selected (Figure 1). EL4, EL4-huCD20 and EL4-huCD20-Luc cells showed similar culture characteristics (microscopic aspect, cell division time...) and luciferase expression exhibited satisfactory stability over 30 subcultures for 15 weeks (data not shown). HuCD20 expression and stability were controlled by flow cytometry and showed a mean (\pm SEM) of 126,350 (\pm 1,170) huCD20 molecules per cell for the selected clone, a value similar to that of the parental cells EL4-huCD20 which had: 122,650 (\pm 850) huCD20 molecules per cell.

Tumoral dissemination of EL4-huCD20-Luc cells

Initial tumoral cell dissemination in mice was assessed by BLI after i.v. infusion of 1×10^7 EL4-huCD20-Luc cells (the highest cell dose tolerated by the mice – i.e. not leading to lung embolism - and required to allow a reliable homing assessment). Thirty minutes after cell infusion, animals displayed a major uptake in lungs and a low activity in liver and spleen (Figure 2A). One and a half hours after infusion, cells were found to be equally distributed into lungs, liver and spleen. Six hours after cell infusion, bioluminescence signal was too low to allow relevant imaging (data not shown).

^{111}In oxine labelling of tumor cells led to a dramatic proportion of cells engaged in apoptotic pathway (98%) whereas with $^{99\text{m}}\text{Tc}$, only 3% of tumor cells were apoptotic. Immediately after i.v. infusion of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled cells, tumor cells were mainly observed in the lungs (87% of the labelled cells) (Figures 2A and 2B). The percent of labelled tumor cells in lung decreased with the time: 75% at 1 hour, 67% at 2 hours and 5% at 36 hours. In the same period of time, we observed an increase of the labelled cells in liver and spleen (Figure 2B). When we performed BLI simultaneously with scintigraphy imaging, we observed similar

kinetic of tumor cells dissemination. In addition, tumor cells dissemination was not modified according to mouse phenotype (Figure 2A).

Histopathological and clinical characteristics of the murine huCD20⁺ lymphoma

8 x 10³ EL4-huCD20-Luc cells infused in C57BL/6J mice by the i.v route led to the development of disseminated lymphoma involving lymph nodes, spleen, liver and bone marrow. The EL4-huCD20-Luc cells exhibited the same tumorigenicity than parental cell line, resulting in 100% animal death with a median of 22 days (range: 15-29 days). Seventy-three percent and 100% of mice had quantifiable lymphoma tumors on D9 and D13, respectively, as assessed by BLI. Comparison between merged bioluminescence images and autopsy pictures (Figure 3A) indicated that all tumor foci were emitting light. Tumors developed in the hematopoietic organs, including lymph nodes (cervical, deep cervical, axillary, brachial, renal, mesenteric, inguinal, sacral and sciatic nodes), thymus, liver and spleen. Hematein-eosin-saffran staining and immunoperoxidase staining using an anti-CD20 mAb (L26) revealed a diffuse lymphoma infiltration by large cells expressing huCD20 (Figures 3B and 3C). EL4-huCD20-Luc cells could be detected by PCR amplifying huCD20 from week 2 in lymph nodes, week 3 in bone marrow and week 4 in spleen and liver (Figure 3D).

Tumor mass quantification by bioluminescence imaging

Luciferin was added to a cell suspension containing 10² to 10⁹ EL4-huCD20-Luc cells. Binning is the operation consisting in gathering the information carried by several close pixels in a single pixel. It can be performed either at the optics level or via a mathematical transformation²⁵³⁻²⁵⁵. The limit of detection was 1 x 10² cells and *in vitro* bioluminescence was linear over 1 x 10³ to 1 x 10⁸ cells ($r^2 = 0.972$). *In vitro* bioluminescence of EL4-huCD20-Luc was thus independent of binning and was linearly related with the number of cells, following the equation $y = 0.13 x - 1721.29$ where y is bioluminescence signal and x is the number of cells ($r^2 = 0.997$) (data not shown).

Background noise and cosmic rays disturb the acquisition of bioluminescence. We thus designed an original step to get rid of signal disturbances. Because of the random occurrence of cosmic rays, 2 images of same acquisition time taken with a few minute interval allows to detect the phenomenon using a pixel-to-pixel comparison of the intensities with a 10% threshold for rejection. If a cosmic ray is detected, the pixel value will be assigned to the average activity of the 8 surrounding pixels (Figure 4A).

As an alternative to manual delineation of the region of interest (ROI), an automatic segmentation was considered. After an i.v. infusion of 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells to C57BL/6J mice, we followed up tumor growth by BLI analysis using both manual delineation (by the operator) and automatic segmentation of the ROI (Figure 4B). Measurement by segmentation was more reliable than by manual delineation, with significantly lower standards deviations (*p < 0.05) and a lower impact of the ROI surface on the activity measured (an over-evaluation in small foci is usually observed within manual delineation) (Figure 4B).

10^4 EL4-huCD20-Luc were injected in main localizations observed in the tumoral development: thymus, aortic, axillary, inguinal or mesenteric lymph nodes and in thigh hind paw. After 15 minutes, bioluminescence activities were determined and intensities of tumor sites *in vivo* were compared to the activity of the same number of cells *in vitro*. Absorption of cell-emitted light by tissues was calculated and expressed in percent (AELP) of the bioluminescent intensity measured *in vitro* (Table 1). Absorption ranged from 15.84% for inguinal lymph node in white strain (C57BL/6J Tyr^{C2-J}) to 86.80% for intramuscular localisation in the thigh in black strain (C57BL/6J). Excepted for thymic localisation, no difference was found between white and black strain. Results were similar whatever the number of EL4-huCD20-Luc injected (ranging from 10^3 to 10^6 , data not shown).

Lymphoma tumor growth was then analyzed after an infusion of 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells. Bioluminescence was quantified for all tumoral foci (*i.e.* bioluminescence by animal) (Figure 5). *In vivo* tumoral activity assessed by BLI showed an exponential progression and could be described by the equation $Y = Y_0 + a e^{(bX)}$, $Y_0 = -4.40 \times 10^5$, $a =$

2.81×10^2 , $b = 5.45 \times 10^{-1}$ ($r^2=0.981$) where Y is the bioluminescent activity and X is the time in days.

Influence of anesthesia and luciferin dose on bioluminescence activity

We compared the kinetics of light emission over a 30 minutes period at different stages of lymphoma growth and studied the influence of anesthesia induction time and luciferin dose (Figure 6). Bioluminescent intensities were measured at appropriate binning and with 1 minute acquisition time. When anesthesia was performed before luciferin injection, there was a variable evolution of light emission depending on tumor growth, maximum activity being obtained 4 minutes, 7 minutes, 16 minutes and 30 minutes after the luciferin injection for a lymphoma at D9, D23, D27 and D34, respectively. The light emissions were not significantly influenced by luciferin dose (data not shown). Luciferin injection performed 4 minutes before anesthesia was the best procedure to obtain a stable emission of light whatever the stage of lymphoma growth (Figure 6A). This procedure showed a less than 20% decay 10 to 20 minutes after bioluminescence induction; luciferin dose (2 or 4 mg) did not significantly modify this kinetic (Figure 6A).

Using 4 mg of luciferin, we observed frequent failures in tumor detection at early stages of lymphoma and cytotoxicity was suspected. The influence of luciferin dose on tumor growth was therefore evaluated by BLI follow up (exams performed on D9, D13, and then twice a week until the death of animals) (Figure 6B) and mice survival (Figure 6C). We observed that luciferin dose significantly influenced both tumor growth ($P < 0.05$) and mice survival ($P < 0.05$) with a median survival of 21 days (range: 15-27 days) and 30.5 days (range: 27-41 days) for 2 and 4 mg of luciferin, respectively. The mice survival with 2 mg dose of luciferin was not significantly different from the control group, without luciferin injections, median survival of 20 days (range 18-26 days).

Multimodal analysis of anti-CD20 antibody distribution

We studied anti-CD20 antibody distribution and tumor cells dissemination with combined BLI, immunoscintigraphy or ^{64}Cu -anti-CD20 PET (Figure 7). Twenty days after tumor cells infusion we analyzed tumor dissemination and anti-CD20 antibodies biodistribution by using a fixed dose of 5.55 MBq of ^{111}In -labelled ibritumomab-tiuxetan or ^{64}Cu -labelled ibritumomab-tiuxetan. Immunoscintigraphy and PET imaging demonstrated similar biodistribution of labeled antibody compared to tumor cells dissemination analyzed by BLI and performed in the same time (Figures 7A and 7B). Such results demonstrated a well distribution of antibody in all tumor sites detected by BLI and an absence of bioluminescence signal disturbance due to radiotracers. No difference was found in median survival between animal groups demonstrating no significant toxicity of radionuclides (data not shown).

Discussion

Bioluminescence, scintigraphic and PET imagings have improved the *in vivo* monitoring of tumor growth and the evaluation of treatment efficacy in murine models. In this context, there is a need to develop quantitative methods respecting animal life. Because of the background noise induced by radiotracers, bioluminescence, scintigraphic and PET imagings are not usually combined as a multimodality method to get simultaneous experimental data. In the present report, we developed a new method to eliminate cosmic rays and background noise allowing a reliable quantification of bioluminescence activity and bimodality analysis.

The anti-CD20 rituximab is effective in the treatment of patients with B-NHL. However, its therapeutic effect is variable and factors such as tumor burden could affect both rituximab exposure and efficacy. We therefore developed a murine model of human lymphoma allowing a precise quantification of tumor burden. This animal model, whose tumor cells carry human CD20, will be used to analyse the influence of tumor mass on the dose-concentration-effect relationship of anti-CD20 therapeutic antibodies such as rituximab. The selected EL4-huCD20-Luc clone expressed a number of CD20 molecules close to those found on human B-NHL cells (range: 71,000 - 170,000 molecules / cell) or on human lymphoma cell lines (DHL4 and BJAB: 209,000 and 170,000 molecules / cell, respectively)²⁵⁶. As usually observed²⁵⁷, γ scintigraphy imaging demonstrated an initial domiciliation in lung followed by hepatic and spleen dissemination. Thirteen day after tumoral cell infusion, all mice developed lymphoma tumors as demonstrated by BLI. By both immunostaining and amplification of huCD20, all mice showed a typical disseminated and aggressive lymphoma involving mainly lymph nodes, liver, spleen and thymus leading to the death of animal after a median time of 22 days (range: 15-27 days). We have compared precision and reproducibility of manual and segmentation methods to measure bioluminescence in a given region of interest. This latter method is a procedure independent of the operator^{258,259} and was found to be more accurate whatever the tumor volume. Furthermore, bioluminescence was quantified for all the tumor foci of an animal and took into account the absorption of light

by tissues according to tumor anatomic localization. Melanin is completely absent from skin, hair and eyes of C57BL/6J Tyr^{C2-J} mice, reducing absorption of emitted photons when they pass through highly vascularized tissues and skin. Therefore, these white animals represent the “gold standard” to analyze bioluminescence activity. However, limited information is available on these animals and abnormalities of liver functions and fertility have been reported²⁶⁰. Nonetheless, because increased light absorption for black animals is small (about 5% higher than for white animals), the BLI method can clearly be adequately used also with black animals.

It is therefore the first murine model of disseminated lymphoma expressing human CD20 in which the method of tumor quantification allows a precise assessment of tumor volume. Given the fact that tumor cells expressed a constant level of human CD20, it can be assumed that tumor burden as assessed by our method is proportional to the number of cell targets.

Because the BLI measurement described here is not sensitive to gamma rays, multimodal imaging is possible, allowing to analyse simultaneously the biodistribution of radiolabelled antibody by immunoscintigraphy or by small-animal PET. It should be therefore possible to study the influence of the number of targets (tumor volume) on the relationship between dose and concentrations (pharmacokinetics) and on the relationship between concentration and antitumor effects (pharmacokinetic-pharmacodynamic, PK-PD) of an antibody directed against human CD20 (D.D. et al., manuscript in preparation).

We demonstrated that 2 mg of luciferin did not significantly modify survival of inoculated mice whereas injections of 4 mg of luciferin decreased tumor growth and prolonged significantly survival of mice. In our model, luciferin was injected twice a week from D9 until animal death, a procedure which may partly explain such an effect. Recent studies have confirmed the potentially toxic effect of luciferin on tumor growth in other models^{245,261,262}. BLI requires successive ventral and dorsal acquisitions of 5 to 10 minutes duration. When luciferin was injected 4 minutes before anesthesia, bioluminescence activity was relatively stable for the first 10 minutes whatever tumor volume. Anesthesia induced a

large variability in bioluminescence activity when it was administered before luciferin injection. Authors have previously shown that general anesthetics, at the concentration used in animal models, can inhibit bioluminescence activity of the firefly luciferase protein by 50%^{263,264}. This effect has been observed for most anesthetic agents including aromatic agonists of receptors (xylazine) and ketones (ketamine). The suspected mechanism is a competitive binding of the anesthetics on their specific receptors which interacts with the luciferin reaction²⁶⁵⁻²⁶⁷. Unlike other anesthetics, xylazine and ketamine do not reduce the release of intracellular ATP useful for bioluminescence reaction²⁶⁸. When we injected luciferin after anesthesia we observed a significant increase of the time necessary to obtain maximum bioluminescent activity. This was mainly observed at later times, when tumor burden was high (Figure 6A). The variability in bioluminescence that we have observed when luciferin was injected after anesthesia could be therefore explained by a decrease in distribution and activity of luciferin induced by anesthetics. A lower dose of luciferin and its injection 4 minutes before anesthesia allowed to avoid this variability.

This work describes a new murine lymphoma model expressing huCD20 and showing a similar pattern of dissemination to that observed in human. We developed a technology allowing bimodal imaging with simultaneous BLI evaluating tumor growth and scintigraphic or PET imaging assessing tumor cell dissemination or pharmacokinetics of radiolabelled antibody. This model offers a new opportunity to test and compare anti-CD20 antibodies in pharmacokinetic-pharmacodynamic studies.

Acknowledgements

The authors thank Danielle Degenne (Department of Immunology, CHRU de Tours, France), Maryline Lemée, Stéphanie Rétif (CNRS UPS44, Orléans, France) and Aurélie Sergent (IFIPS Optronique, Paris, France) for their helpful assistance.

Authorship

Contribution: D.D. designed and performed research, collected, analyzed, and interpreted data, and wrote the manuscript; G.C. and G.P. designed research, analyzed data, performed the coordination and funding of the study, interpreted data and wrote the manuscript; F.D., M.O., S.L., S.P. and A.L.P. performed experiments, analyzed data, and participated in the writing of the manuscript, J.G., H.W. and P.B. participated in the writing of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Gallowitsch HJ, Kresnik E, Gasser J, et al. F-18 fluorodeoxyglucose positron-emission tomography in the diagnosis of tumor recurrence and metastases in the follow-up of patients with breast carcinoma: a comparison to conventional imaging. *Investigative radiology*. May 2003;38(5):250-256.
2. Berger F, Paulmurugan R, Bhaumik S, Gambhir SS. Uptake kinetics and biodistribution of (14)C-D: -luciferin-a radiolabeled substrate for the firefly luciferase catalyzed bioluminescence reaction: impact on bioluminescence based reporter gene imaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. Jul 26 2008.
3. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(8):733-744.
4. Moorin RE, Davison A, Turner JH. Optimization of technetium-99m Sestamibi single-photon emission tomography to define multidrug resistance with confidence. *Nuclear medicine communications*. Oct 2004;25(10):1039-1048.
5. Alexandrakis G, Rannou FR, Chatziioannou AF. Effect of optical property estimation accuracy on tomographic bioluminescence imaging: simulation of a combined optical-PET (OPET) system. *Physics in medicine and biology*. Apr 21 2006;51(8):2045-2053.
6. Budzanowski M, Olko P, Marczevska B, et al. Dose distribution around a needle-like anode X-ray tube: dye-film vs. planar thermoluminescent detectors. *Radiation protection dosimetry*. 2006;120(1-4):117-120.

7. Shinji S, Ishiwata T, Tajiri T, et al. External whole-body image of EGFP gene expression. *Journal of Nippon Medical School = Nihon Ika Daigaku zasshi*. Dec 2003;70(6):462-463.
8. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. Aug 1998;16(8):2825-2833.
9. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*. Aug 1 2003;171(3):1581-1587.
10. Leners N, Ferrant A, Jamar F. Evaluation of two ¹¹¹In-oxinate formulations for labelling of white blood cells. *Int J Rad Appl Instrum B*. 1991;18(7):727-733.
11. Lerondel S, Le Pape A, Sene C, et al. Radioisotopic imaging allows optimization of adenovirus lung deposition for cystic fibrosis gene therapy. *Hum Gene Ther*. Jan 1 2001;12(1):1-11.
12. Shibata M, Hariya T, Hatao M, Ashikaga T, Ichikawa H. Quantitative polymerase chain reaction using an external control mRNA for determination of gene expression in a heterogeneous cell population. *Toxicol Sci*. Jun 1999;49(2):290-296.
13. Basden A, Geng D, Guzman D, Morris T, Myers R, Saunter C. Shack-Hartmann sensor improvement using optical binning. *Applied optics*. Aug 20 2007;46(24):6136-6141.
14. Fitzpatrick MJ, Starkschall G, Antolak JA, et al. Displacement-based binning of time-dependent computed tomography image data sets. *Medical physics*. Jan 2006;33(1):235-246.

15. Srinivas Y, Wilson DL. Quantitative image quality evaluation of pixel-binning in a flat-panel detector for x-ray fluoroscopy. *Medical physics*. Jan 2004;31(1):131-141.
16. Cittera E, Onofri C, D'Apolito M, et al. Rituximab induces different but overlapping sets of genes in human B-lymphoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother*. Mar 2005;54(3):273-286.
17. Farstad BS, Sundrehagen E, Opdahl H, Benestad HB. Pulmonary, hepatic and splenic sequestration of technetium-99m labelled autologous rabbit granulocytes: scintigraphic cell distributions after intravenous and intraarterial injections, exsanguination and intraarterial injection of cells passed through an intermediary host. *Acta physiologica Scandinavica*. Oct 1991;143(2):211-222.
18. Chow TW, Takeshita S, Honjo K, et al. Comparison of manual and semi-automated delineation of regions of interest for radioligand PET imaging analysis. *BMC nuclear medicine*. 2007;7:2.
19. Zhang T, Chi Y, Meldolesi E, Yan D. Automatic delineation of on-line head-and-neck computed tomography images: toward on-line adaptive radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Jun 1 2007;68(2):522-530.
20. Rinchik EM, Stoye JP, Frankel WN, Coffin J, Kwon BS, Russell LB. Molecular analysis of viable spontaneous and radiation-induced albino (c)-locus mutations in the mouse. *Mutation research*. Apr 1993;286(2):199-207.

21. Paroo Z, Bollinger RA, Braasch DA, et al. Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. *Mol Imaging*. Apr 2004;3(2):117-124.
22. Keyaerts M, Verschueren J, Bos TJ, et al. Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D: -luciferin: effect on intensity, time kinetics and repeatability of photon emission. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. May 2008;35(5):999-1007.
23. Ueda I, Kamaya H. Kinetic and thermodynamic aspects of the mechanism of general anesthesia in a model system of firefly luminescence in vitro. *Anesthesiology*. May 1973;38(5):425-436.
24. Franks NP, Lieb WR. Seeing the light: protein theories of general anesthesia. 1984. *Anesthesiology*. Jul 2004;101(1):235-237.
25. Ueda I, Kamaya H, Eyring H. Molecular mechanism of inhibition of firefly luminescence by local anesthetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 1976;73(2):481-485.
26. Zhang Y, Stabernack CR, Dutton R, et al. Luciferase as a model for the site of inhaled anesthetic action. *Anesthesia and analgesia*. Nov 2001;93(5):1246-1252.
27. Collaco AM, Rahman S, Dougherty EJ, Williams BB, Geusz ME. Circadian regulation of a viral gene promoter in live transgenic mice expressing firefly luciferase. *Mol Imaging Biol*. Sep-Oct 2005;7(5):342-350.

28. Heydarpour F, Amini B, Kalantari S, Rostami A, Heydarpour P. Determination of sensitivity of male Wistar rats to an equal dose of ketamine/xylazine injection at anesthetic dose in a chronic model of hypernatremia in comparison with control group. *Saudi medical journal*. Oct 2007;28(10):1485-1488.

EL4-huCD20-Luc injection site	for each condition n = 5	AELP ^a in white phenotype (%) (C57BL/6J Tyr ^{C2-J})	AELP ^a in black phenotype (%) (C57BL/6J)	Difference : white / black phenotype
Thymus injection	<i>mean ± (SD)</i>	28.06 ± (2.08)	33.53 ± (1.85)	P < 0.05
Aortic lymph node subcutaneous injection	<i>mean ± (SD)</i>	64.53 ± (4.50)	68.48 ± (7.45)	ns
Axillary lymph node subcutaneous injection	<i>mean ± (SD)</i>	16.37 ± (3.80)	21.59 ± (5.67)	ns
Inguinal lymph node subcutaneous injection	<i>mean ± (SD)</i>	15.84 ± (2.17)	19.55 ± (0.97)	ns
Mesenteric intramuscular injection	<i>mean ± (SD)</i>	32.22 ± (7.43)	39.53 ± (9.13)	ns
Thigh hind paw intramuscular injection	<i>mean ± (SD)</i>	83.11 ± (9.07)	86.80 ± (10.99)	ns

TABLE 1. Absorption of emitted light by different tissues according to mice phenotypes.

Bioluminescence was determined 15 minutes after inoculation of 10⁴ EL4-huCD20-Luc cells in the indicated sites (n = 5). ^a AELP: percentage of emitted light absorption by tissues (in vivo compared to in vitro) expressed as mean percentage and standard deviations in parentheses, ns: non-significant difference. For each comparison the power of performed test was satisfactory.

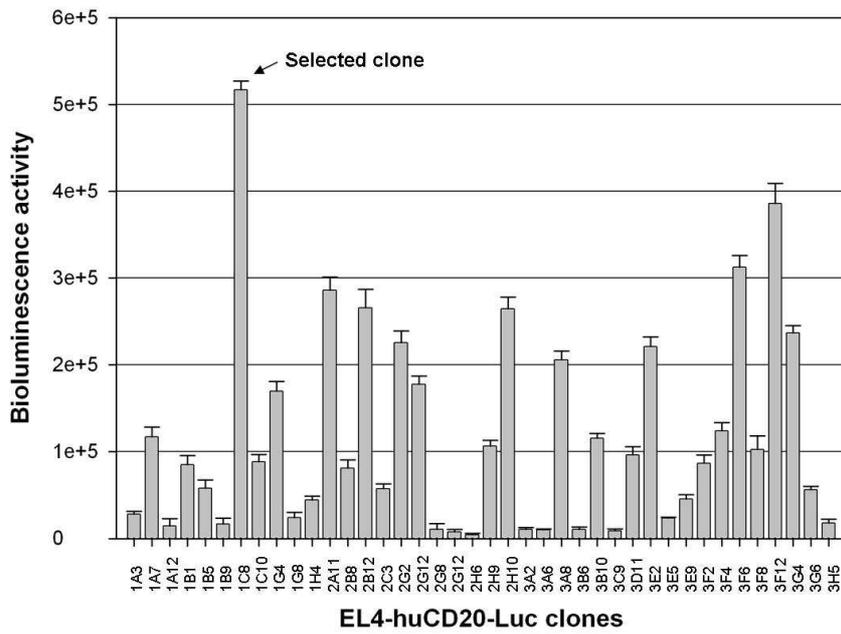


FIGURE 1. Screening of EL4-huCD20-Luc clones for bioluminescence activity

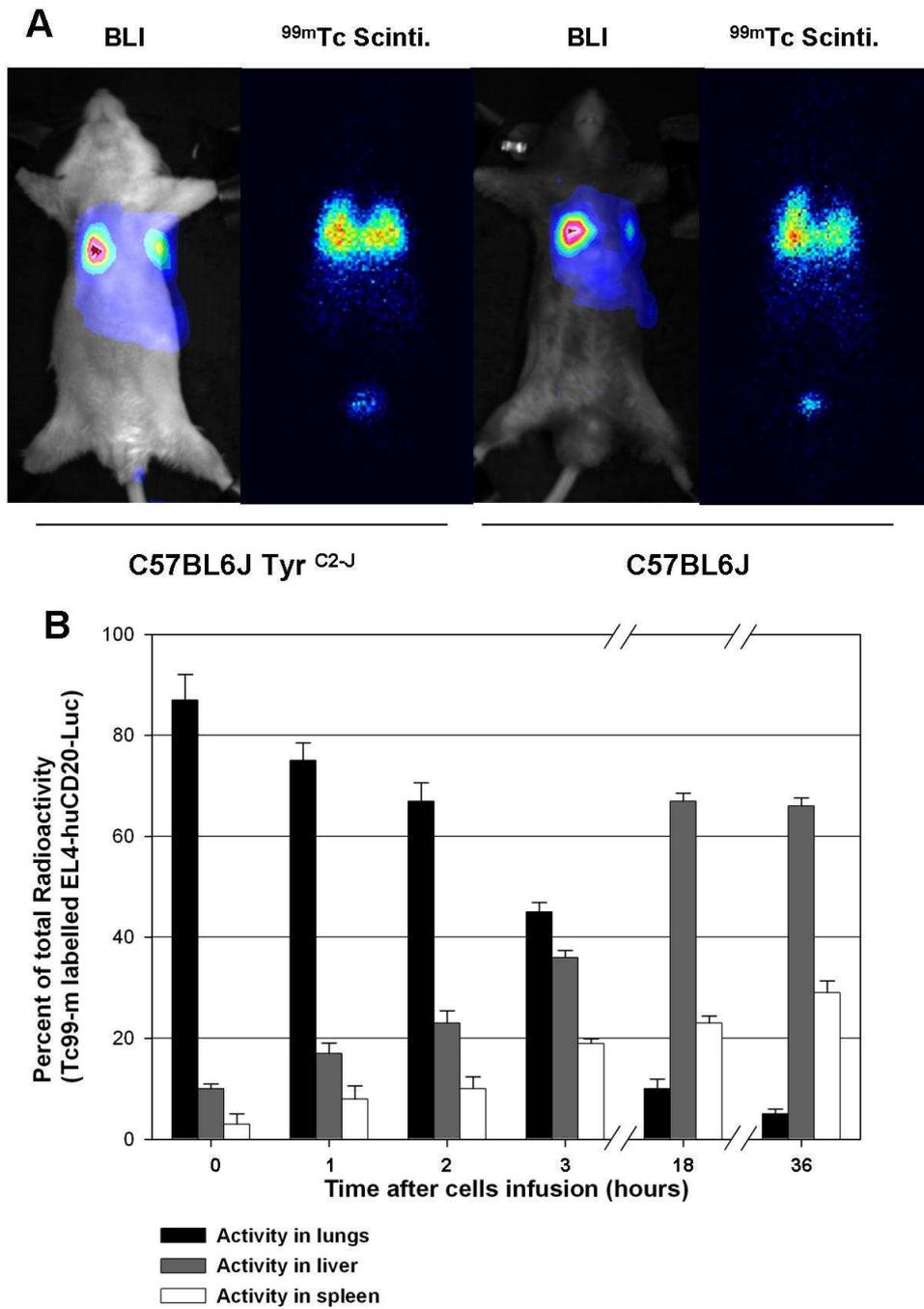


FIGURE 2. Bimodal investigations of initial dissemination of ^{99m}Tc labelled cells.

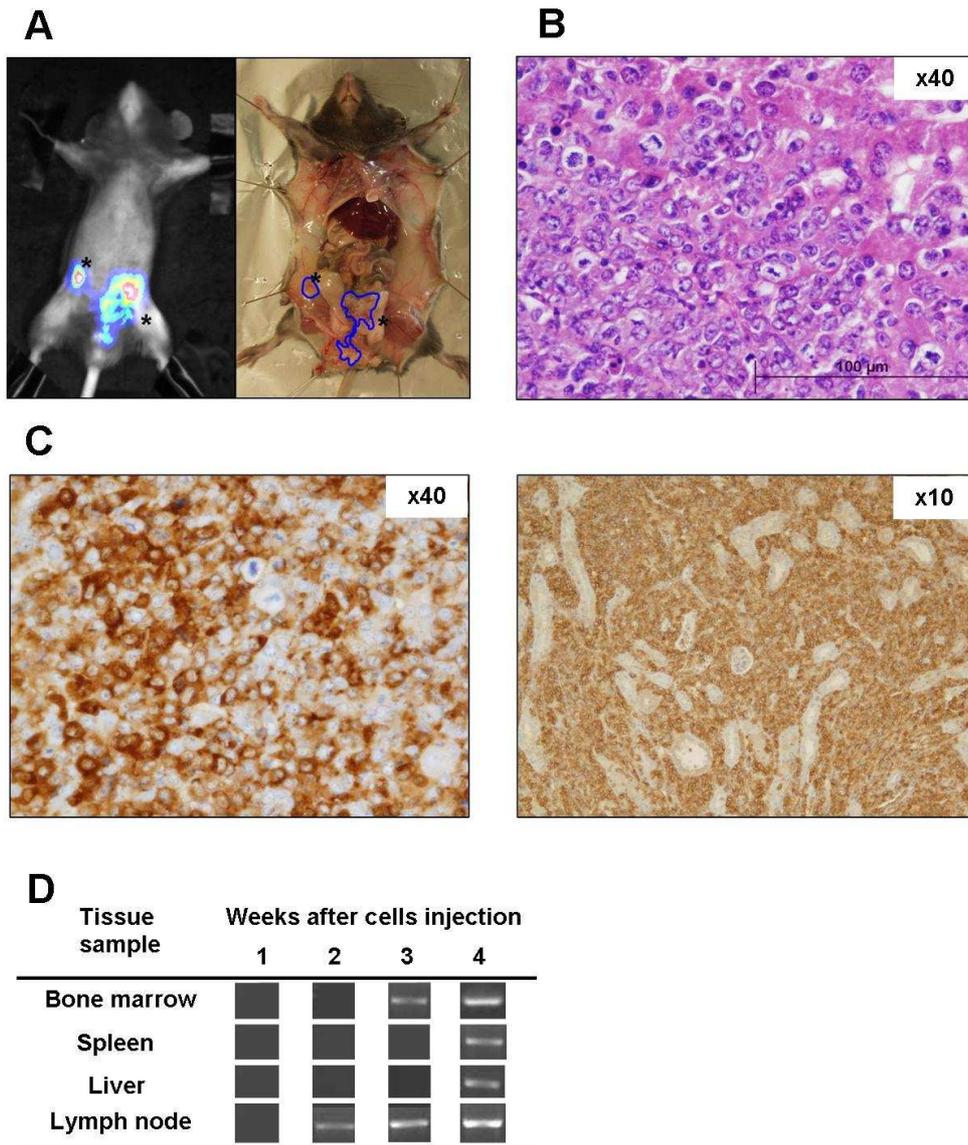


FIGURE 3. *In vivo* characterization of lymphoma on D20 after EL4-huCD20-Luc cells infusion.

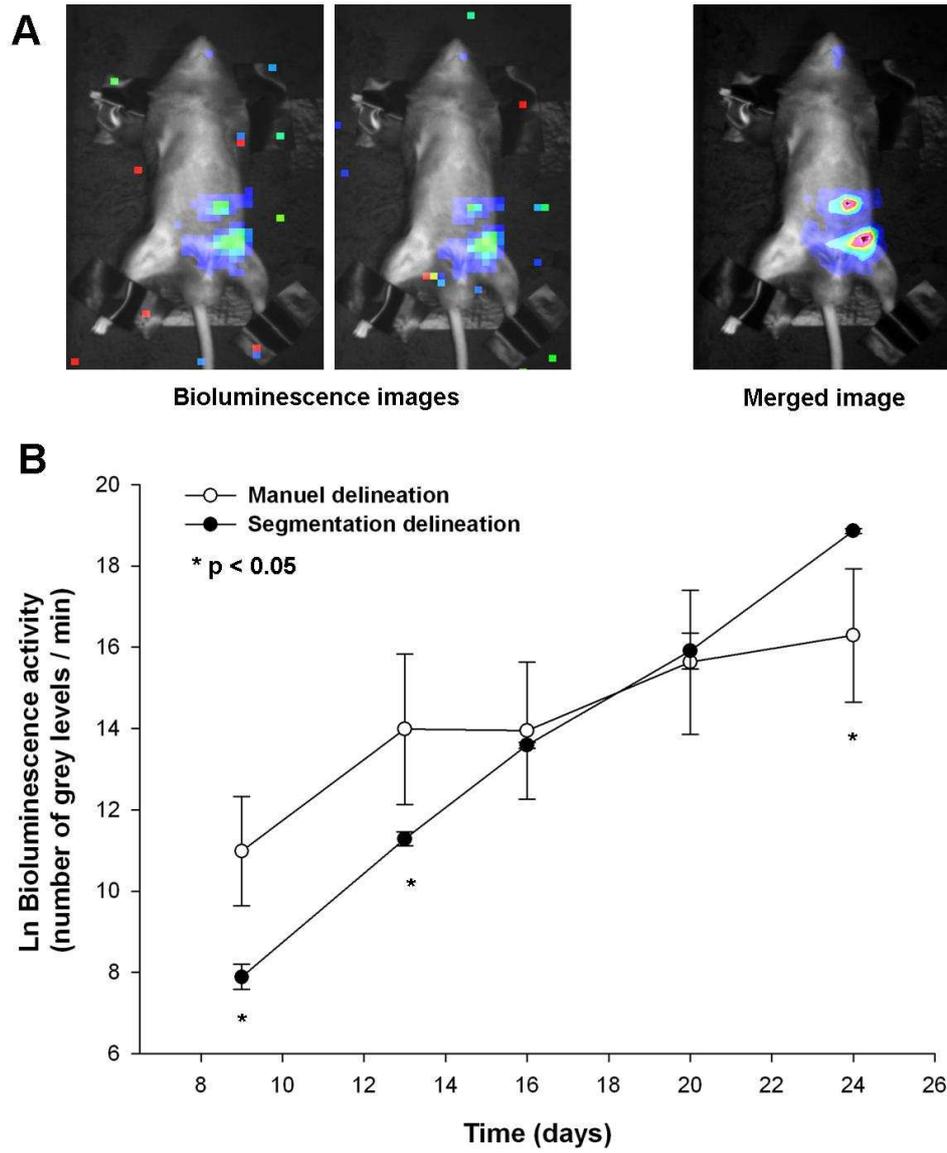


FIGURE 4. Methods of bioluminescence activity quantification.

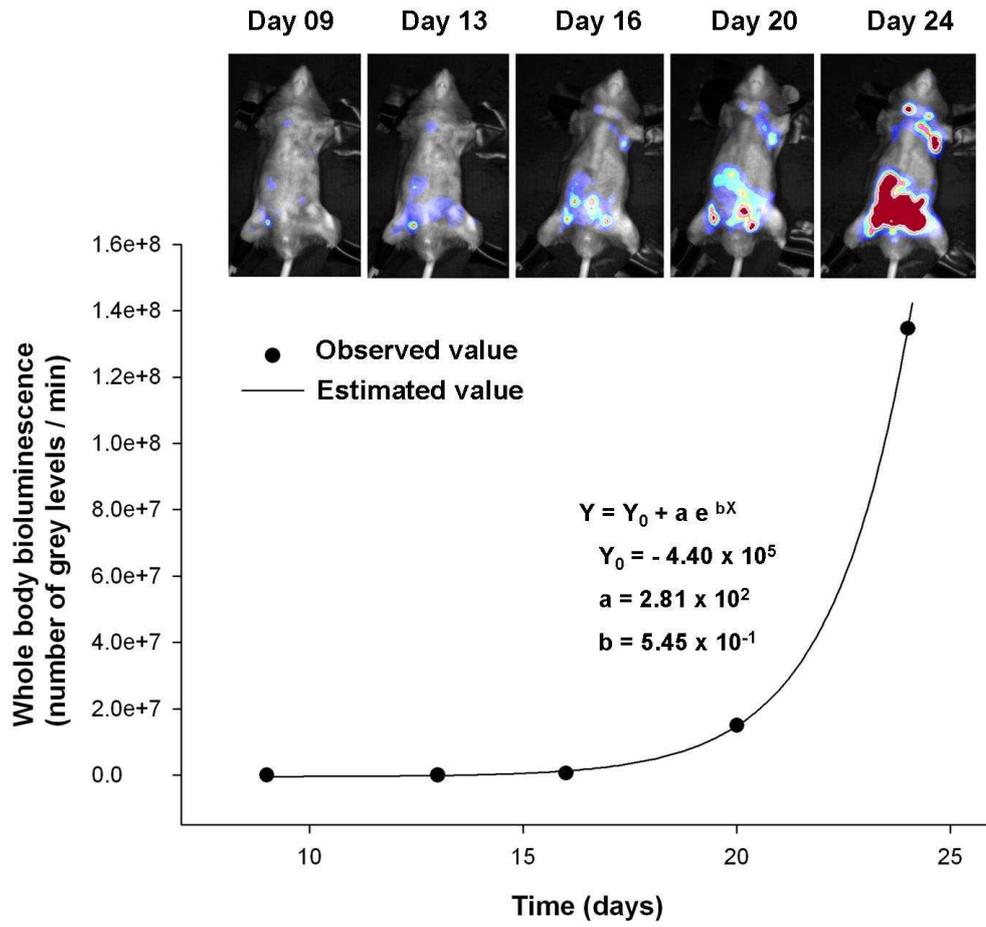


FIGURE 5. Tumor follow up.

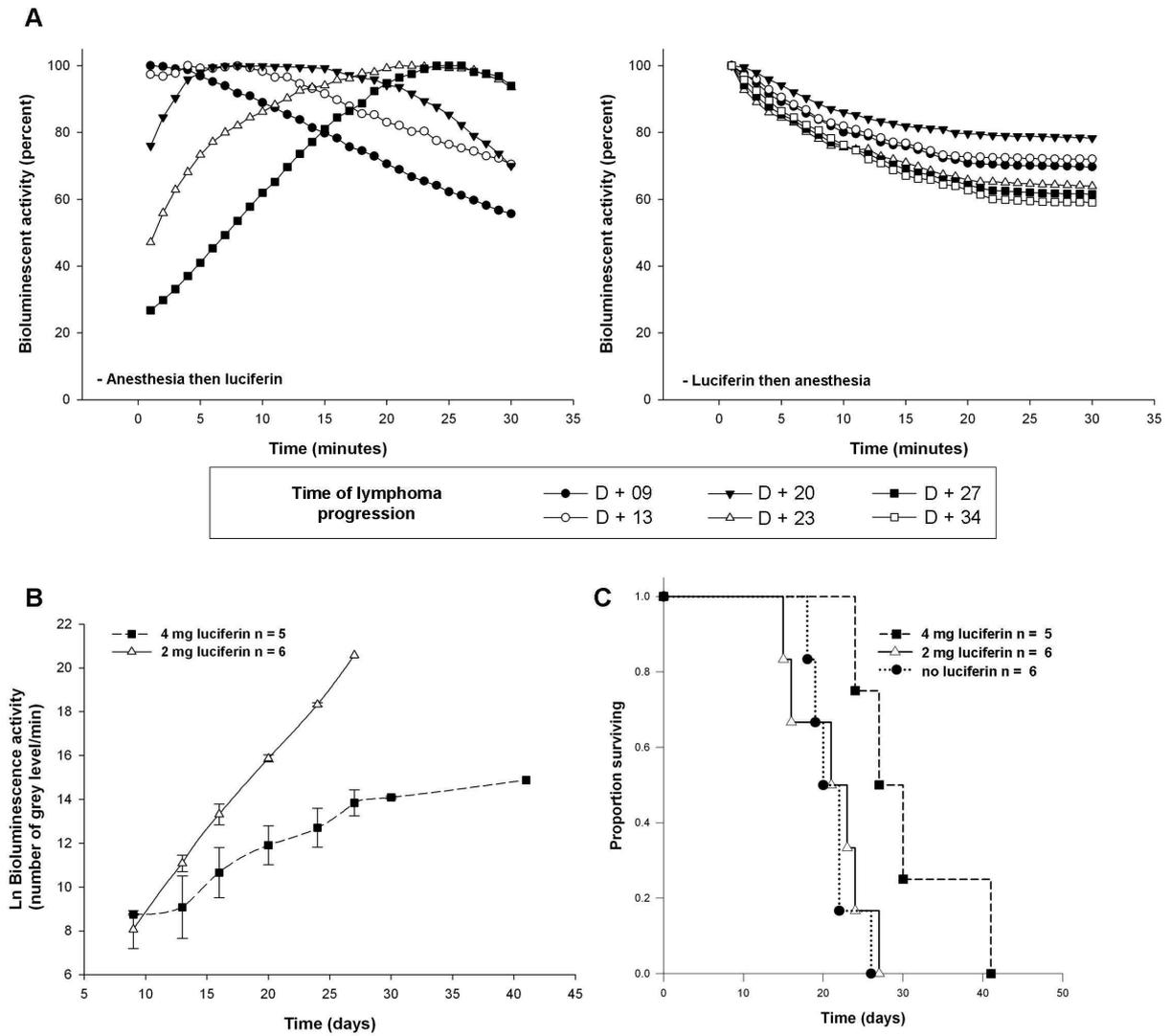


FIGURE 6. Effect of the ketamine / xylazine anesthesia induction and luciferin dose on *in vivo* kinetics of light emission, tumor growth and survival.

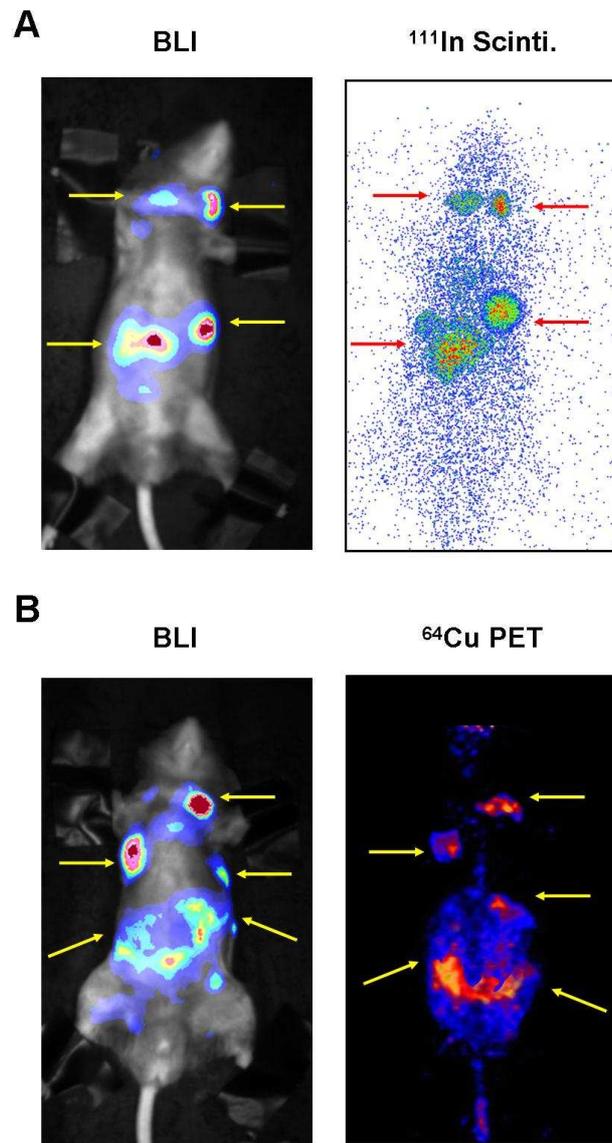


FIGURE 7. Multimodality imaging of tumor dissemination (BLI) and antibody biodistribution (^{111}In labelled ibritumomab scintigraphy imaging or ^{64}Cu labelled ibritumomab PET imaging).

Figures legends

FIGURE 1. Screening of EL4-huCD20-Luc clones for bioluminescence activity

Representative figure for first round of screening using bioluminescence activity of EL4-huCD20-Luc clones after transfection by luciferase plasmid. The most active clone for luciferase expression was selected for *in vivo* experiments.

FIGURE 2. Bimodal investigations of initial dissemination of ^{99m}Tc labelled cells.

(A) Thirty minutes after ^{99m}Tc labelled EL4-huCD20-Luc cells infusion, initial dissemination of labelled cells was simultaneously evaluated by BLI and scintigraphy for a C57BL/6J and a C57BL/6J Tyr^{C2-J} mice. (B) Percent of total radioactivity in lungs (black), liver (grey) and spleen (white) after an i.v. infusion of ^{99m}Tc labelled EL4-huCD20-Luc cells in tail vein of mice. Columns, mean of three independent experiments; bars, SE.

FIGURE 3. *In vivo* characterization of lymphoma on D20 after EL4-huCD20-Luc cells infusion.

(A) Merged bioluminescence image of animal, binning 8 by 8, acquisition time: 10 minutes, emitted light intensity transformed in colour levels and post mortem examination of tumors. Tumor sites are located (*). (B) Representative histological section from liver sample (hematein-eosin-safran) showing infiltration by large cells (x40). (C) Representative immunohistological control of human CD20 expression (clone L26) from tumor cells in lymph node (x40) and kidney (x10). (D) PCR analysis on bone marrow, spleen, liver and lymph nodes showed the presence of huCD20+ cells in all tumors collected.

FIGURE 4. Methods of bioluminescence activity quantification.

(A) C57BL/6J mice received an i.v. infusion of 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells. At D16 mice were: injection with 2 mg of luciferin. Acquisition of two successive bioluminescence images (first and second images) was performed and comparison pixel-to-pixel, with a 10%

threshold for acceptance was done allowing elimination of random activity from cosmic rays and background noise for obtaining of a quantifiable image (third image) (B). Bioluminescence for the whole animals was followed up and tumor growth was determined using manual delineation (by the operator) (○) or automatic segmentation (●) of the ROI. Measurement of the activity demonstrated a best reliability with automatic segmentation during the follow up of tumor growth (* P < 0.05).

FIGURE 5. Tumor follow up.

Mice were inoculated intravenously with 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells. On D9, D13, D16, D20 and D24 after inoculation, mice received 2 mg beetle luciferin, in PBS. After general anesthesia, bioluminescence activity (●) was determined on merged bioluminescence images. Model-predicted exponential tumor growth is shown by line.

FIGURE 6. Effect of the ketamine / xylazine anesthesia induction and luciferin dose on *in vivo* kinetics of light emission, tumor growth and survival.

(A) Kinetics of light emission (percent of the maximal activity) over a 30 minutes period at appropriate binning and 1 minute acquisition time, were assessed 09 (●), 13 (○), 20 (▼), 23 (△), 27 (■) and 34 (□) days after inoculation of 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells (n = 5 mice per group). Anesthesia induction at t = 0 minute, then injection of 2 mg beetle luciferin at t = 4 minutes (left panel). Injection of 2 mg beetle luciferin at t = 0 minute, then anesthesia induction at t = 4 minutes (right panel). (B, C) On D09, D13 and then twice a week until death, groups of animals received an intraperitoneally injection of 2 mg (△ and solid line) or 4 mg (■ and dash line) of luciferin. For survival analysis a control group without injections of luciferin was realized (● and dotted line).

FIGURE 7. Multimodality imaging of tumor dissemination (BLI) and antibody biodistribution (^{111}In labelled ibritumomab scintigraphy imaging or ^{64}Cu labelled ibritumomab PET imaging).

Mice were inoculated intravenously with 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells. On D19 they were injected with 5.55 MBq of ^{111}In labelled ibritumomab tiuxetan antibody (A) or ^{64}Cu labelled ibritumomab tiuxetan antibody (B). On D20, imaging combining BLI with scintigraphy (A) or PET imaging (B) demonstrated the localisation of antibody into tumor sites. Tumor locations are indicated by arrows.

IV - Matériels et méthodes complémentaires à ceux de l'article

Différents essais, complémentaires à ceux présentés dans cet article, ont été réalisés. Certains résultats n'ont pas été exposés dans l'article. C'est pourquoi nous souhaitons les présenter.

A - Analyses *in vitro*

Les essais *in vitro* nous ont permis de définir les conditions d'utilisation de chaque binning, les cinétiques d'apparition du signal, les zones de proportionnalité entre signaux de bioluminescence quantifiés et les nombres de cellules tumorales. Pour les analyses quantitatives *in vitro* divers nombres de cellules EL4-huCD20-Luc ont été lavées plusieurs fois en PBS et déposés dans les puits de plaques opaques (BandW isoplate®, Wallac, Perkin Elmer, Boston, MA, Etats Unis) dans un volume de 100 µL.

La plaque et les cellules ont été placées à 37°C et 5% de CO₂ durant 15 minutes. 2 mg de luciférine de potassium (Promega, Charbonnières, France) repris dans 100 µL de milieu de culture complet et équilibré en oxygène ont été ajoutés aux cellules. Après 4 minutes à température ambiante, l'examen de bioluminescence a été réalisé. Les images de bioluminescence ont été réalisées sur la caméra ORCA II BT C4742-98-26 LW (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Pour les analyses de proportionnalité de chaque binning nous avons testé de 10¹ à 10⁹ cellules EL4-huCD20-Luc. Pour le binning 8 par 8 (matrice 64x64 pixels) les images sont prises durant 10 minutes. Pour le binning 4 par 4 (matrice 128x128 pixels) les images sont prises durant 10 minutes. Pour le binning 2 par 2 (matrice 256x256 pixels) les images sont prises durant 2 minutes. Pour le binning 1 par 1 (matrice 512x512 pixels) les images sont prises durant 2 minutes. Pour l'ensemble

des cinétiques les images réalisées en boucle sont d'une durée individuelle de 1 minute.

B - Mise au point des conditions d'inoculation du lymphome

Afin de définir les conditions optimales de développement du lymphome nous avons testé tout un ensemble de paramètres d'inoculation.

1 - Choix de la modalité d'inoculation des cellules.

Des animaux C57Bl6J (mâles, 10-12 semaines) ont reçu une injection de cellules EL4-huCD20-Luc lavées et reprises en PBS. L'injection a été réalisée par voie intraveineuse dans la queue ou par voie sous cutanée au niveau de la patte arrière droite ou en présence de 250 UI de hyaluronidase (+25 µL de hyaluronidase à 15 mg/mL, Hyalase®, Wockhardt, Royaume Unis) par voie sous cutanée au niveau de la patte arrière droite. Le volume d'injection était adapté au mode d'inoculation et chacun de ces groupes était constitué de 10 animaux.

2 - Détermination du nombre optimal de cellules à injecter.

Des animaux C57Bl6J (mâles, 10-12 semaines) ont reçu une injection de 8.10^3 ou 5.10^4 ou 10.10^4 ou 25.10^4 ou 50.10^4 ou 10.10^5 cellules EL4-huCD20-Luc lavées et reprises en PBS par voie intraveineuse dans la queue (5 animaux pour chaque condition).

3 - Utilisation de souris de fond génétique C57Bl6J ou C57Bl6J

Tyr^{C2-J}.

Des animaux C57Bl6J ou C57Bl6J Tyr^{C2-J} (mâles, 10-12 semaines) (Charles River, L'Arbresle, France ou Service d'élevage CDTA, Orléans, France selon disponibilités) ont reçu une injection de 8.10^3 cellules EL4-huCD20-Luc lavées et

reprises en PBS par voie intraveineuse dans la queue (10 animaux pour chaque condition).

C - Examens de bioluminescence *in vivo*

La périodicité des examens de bioluminescence *in vivo* dépend du type d'essai réalisé. Les souris reçoivent dans un premier temps une injection de 2 mg de luciférine de potassium (Promega, Charbonnières, France) par voie intra-péritonéale. Après 4 minutes, les animaux sont anesthésiés afin d'obtenir une immobilité prolongée des animaux. Le suivi des opérations est identique à celui exposé dans l'article.

D - Analyse de la domiciliation cellulaire par fluorescence

En plus de l'utilisation de sondes radioactives pour le suivi de la dissémination cellulaire initiale présentée dans l'article, nous avons souhaité analyser cette domiciliation initiale par l'utilisation de sondes lipophiles fluorescentes. 1.10^5 cellules EL4-huCD20-Luc ont été lavées en PBS pendant 30 minutes. 100 μ L de traceurs à longues chaînes lipophiles dialkylcarbocyanines DID ou DIR (Molecular Probes, Eugene, OR, Etats Unis) ont été ajoutés avec les cellules. Après 30 minutes à 37°C et 5% de CO₂ les cellules ont été lavées deux fois par une solution de PBS. Sept souris C57Bl6J nude ont reçu une injection de 1.10^5 EL4-huCD20-Luc DID/DIR par voie intraveineuse après une anesthésie gazeuse constituée de 3% d'isofluorane (Aerrane®, Baxter, Deerfield, IT, Etats Unis). Après différents temps, l'émission de fluorescence a alors été mesurée avec le système IVIS200 (CCD) imaging system (Xenogen, Alameda, CA, Etats Unis) avec les filtres appropriés aux fluorochromes. L'utilisation de souris nude permet d'améliorer sensiblement la sensibilité de la méthode. L'aspect immunologique n'a pas été abordé pour cet essai.

V - Résultats complémentaires à ceux de l'article

A - Validation de l'utilisation d'une zone spécifique à chaque binning

Comme nous l'avons montré dans l'article, une zone de proportionnalité entre le nombre de cellules EL4-huCD20-Luc et le signal mesuré a pu être établie pour chaque binning. Ces différentes zones étant chevauchantes, nous avons avec ce modèle cellulaire une proportionnalité du signal mesuré qui va de 1.10^2 à 5.10^8 cellules. Ainsi l'utilisation systématique de la combinaison de l'ensemble des binnings pour une analyse d'images de bioluminescence *in vivo* permet de suivre la progression tumorale 9 jours après l'injection des cellules et jusqu'à la mort de l'animal. Cependant l'émission de lumière *in vitro* et *in vivo* suit une cinétique. Afin de valider l'utilisation des différents binnings nous avons réalisé une cinétique du signal d'émission de bioluminescence pour chacun d'entre eux (Figure 35). On remarque que le profil de cinétique d'émission de la lumière *in vitro* est identique quel que soit le binning choisit. Pour chaque binning utilisé lors de la mesure, le signal est d'emblée à 100% de son intensité et chute dans un premier temps avant de se stabiliser et de rester stable durant un moment. Ainsi lors de mesures *in vitro* l'activité de bioluminescence est maximale et indépendante du binning utilisé. Cependant pour des raisons de stabilité de la mesure il est capital, une fois la luciférine ajoutée, d'attendre 15 à 20 minutes afin de réaliser la mesure dans une zone d'émission constante. Cette démarche a été mise en place pour l'ensemble des essais d'imagerie de bioluminescence *in vitro*.

B - Modalité d'inoculation du lymphome

Le modèle tel qu'il est décrit dans l'article est basé sur une injection intraveineuse des cellules EL4-huCD20-Luc dans la queue des animaux. Il s'agit de

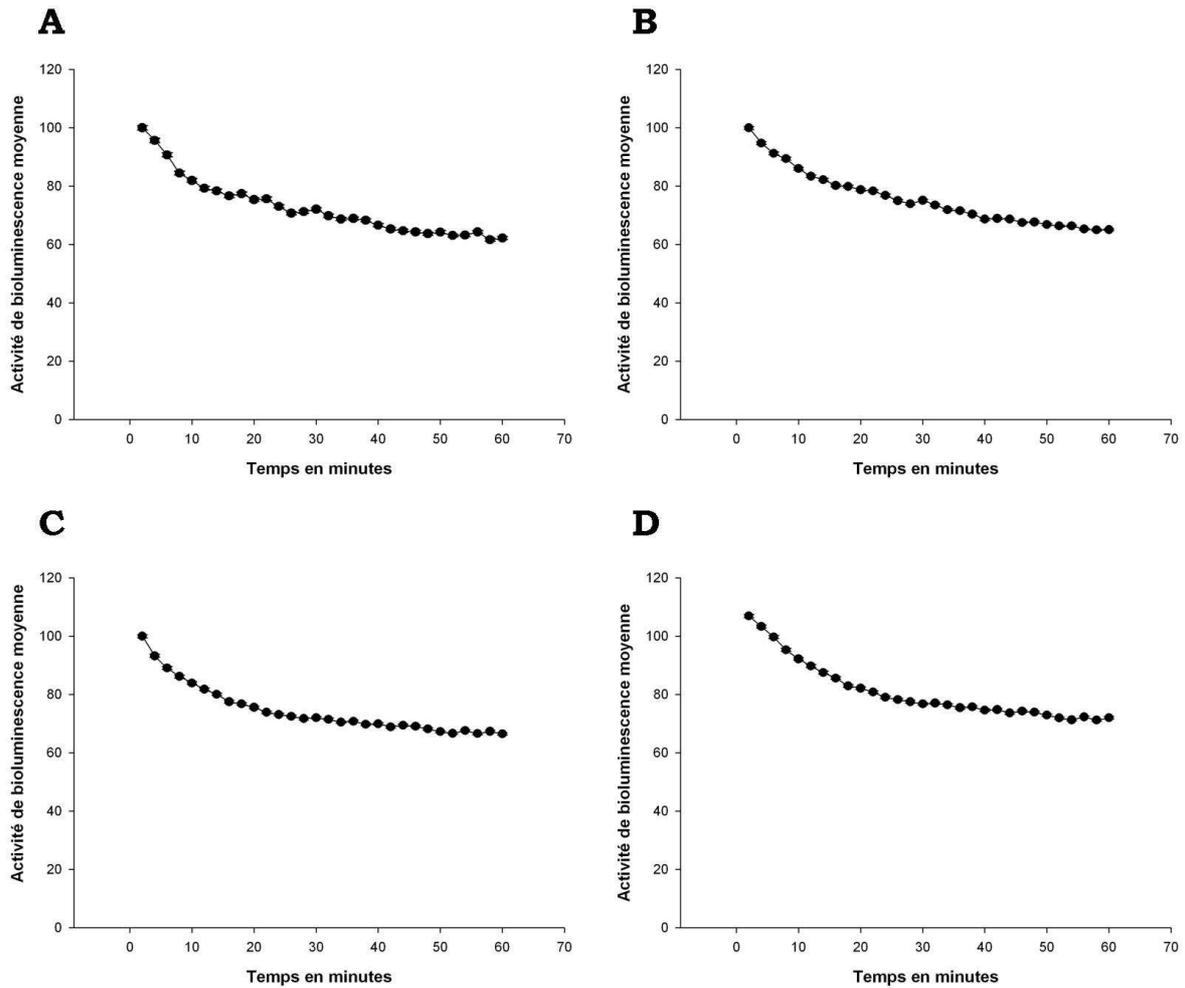


Figure 35 : Cinétiques du signal de bioluminescence des cellules EL4-huCD20-Luc *in vitro* pour l'utilisation des différents binnings.

Cinétiques moyennes de l'activité de bioluminescence *in vitro* exprimée en pourcentage de l'activité maximale mesurée. Courbes établies pour des nombres compris entre 1.10^4 et 1.10^6 cellules EL4-huCD20-Luc, mesures de 1 minute pour une durée totale de 60 minutes, définition des régions d'intérêts sur la première image. Mesure effectuée pour un binning 8x8 (matrice 64 par 64 pixels) (A.), pour un binning 4x4 (matrice 128 par 128 pixels) (B.), pour un binning 2x2 (matrice 256 par 256 pixels) (C.) et pour un binning 1x1 (matrice 512 par 512 pixels) (D.).

la modalité d'inoculation qui permet de reproduire le plus fidèlement le développement d'un lymphome B chez l'homme (Tableau 06). L'injection de cellules par voie sous cutanée dans les coussinets de la patte arrière des animaux, n'entraîne qu'un très faible nombre de développements tumoraux. En effet, seulement 20% des animaux ont développé des tumeurs quantifiables par bioluminescence. De plus, la position de l'animal en décubitus dorsal ne permet pas d'avoir une quantification de l'intensité de bioluminescence satisfaisante. Pour les animaux ayant développé une tumeur, cette dernière a naturellement régressé et n'est plus détectable 20 jours après l'injection des cellules, l'ensemble des animaux de ce groupe a ainsi survécu. Le développement tumoral est très différent avec une injection sous cutanée au niveau de la patte arrière droite. Un développement tumoral est apparu chez 90% des animaux et a été quantifiable par imagerie de bioluminescence 16 jours après l'inoculation des cellules. Cependant son développement est très agressif et 70% des animaux, ont développé une tumeur au niveau du ganglion inguinal de drainage proche, mais aussi au niveau musculaire avec une infiltration tumorale importante. L'ensemble de ces animaux a survécu, cependant compte tenu de la rapidité de la progression tumorale et pour des raisons éthiques le développement tumoral n'a pas pu être poursuivi au-delà de 20 à 25 jours. L'injection de fortes doses de rituximab à ces animaux par voie intraveineuse, n'a entraîné aucune modification de la progression tumorale. Pour favoriser la dissémination des cellules tumorales nous avons inoculé des souris par voie sous cutanée au niveau de la patte arrière droite mais en présence de hyaluronidase. Ce composé, ajouté aux cellules à la quantité de 250UI, n'a pas modifié la viabilité cellulaire. Le taux de développement de la tumeur a été identique dans ce groupe par rapport à celui n'ayant pas reçu de hyaluronidase. L'invasion du muscle par les cellules EL4-huCD20-Luc a été semblable en présence de hyaluronidase. L'injection des cellules par voie intraveineuse dans la queue des

Voie d'inoculation des cellules	Localisation anatomique	Ajout de hyaluronidase	Volume (µL)	Animaux ayant une tumeur (%)		Persistance de la tumeur	Survie (jours)
				à J+16	à J+20		
Intra veineuse	queue	non	200	100	100	Oui	22
Sous cutanée	inter digité patte arrière	non	50	20	10	Non	NA
Sous cutanée	ganglion patte arrière	non	100	80	90	Oui	25*
Sous cutanée	ganglion patte arrière	25µL (250UI)	100	90	90	Oui	25*

Tableau 06 : Analyse de la modalité d'inoculation du lymphome EL4-huCD20-Luc.

Mise en place du modèle : différentes voies d'inoculation des cellules tumorales ont été évaluées. Les cellules tumorales EL4-huCD20-Luc ont été inoculées dans un volume dépendant de la voie étudiée. L'ajout de hyaluronidase a été évalué. Les examens de bioluminescence réalisés permettent de définir le pourcentage d'animaux ayant développé un lymphome ainsi que la persistance de la tumeur. Enfin la survie moyenne des animaux a été évaluée. NA : non applicable, les animaux ne développent pas de tumeur détectable par bioluminescence et survivent 60 jours après l'inoculation des cellules. * la survie moyenne des animaux est biaisée par un développement tumoral intramusculaire qui impose une euthanasie des animaux.

animaux entraîne l'apparition d'un lymphome dans 100% des cas avec des caractéristiques proches de celles observées chez l'homme (Tableau 06). Cette voie d'injection a donc été choisie pour le modèle même si le nombre élevé de foyers tumoraux complexifie la méthodologie de quantification.

C - Nombre de cellules injectées

Nous avons testé une gamme de concentrations en cellules EL4-huCD20-Luc lors de l'inoculation des animaux. Différents groupes ont ainsi reçu de 8.10^3 à 10.10^5 cellules EL4-huCD20-Luc. Après 13 jours, 100% des animaux de l'ensemble des lots ont présenté des tumeurs quantifiables par bioluminescence. Cependant dès lors que le nombre de cellules injectées était supérieur ou égal à 5.10^4 les animaux ont présenté dès 13 jours un nombre important de foyers tumoraux plus ou moins distincts. Compte tenu de la précision de la méthode de délimitation des régions d'intérêt par segmentation, il est délicat de quantifier correctement un animal présentant de nombreux foyers à un stade précoce de développement (09 à 13 jours). Les animaux ayant reçu une injection de 8.10^3 cellules EL4-huCD20-Luc présentent une grande homogénéité dans le schéma d'apparition des lymphomes ainsi que dans l'évolution de la maladie. De plus dans les groupes d'animaux ayant reçu plus de 25.10^4 cellules nous avons pu montrer, par le biais de la recherche de l'expression de CD20 humain dans les cellules d'échantillons sanguins par PCR (méthode présentée dans l'article), qu'un nombre important de cellules EL4-huCD20-Luc restait dans la circulation sanguine de l'animal et était à l'origine de l'apparition de foyers secondaires plus tardifs remettant en cause l'effet thérapeutique du traitement.

D - Cinétiques du signal de bioluminescence *in vivo*

Dans l'article nous avons montré l'importance en bioluminescence *in vivo* de l'ordre des étapes anesthésie de l'animal / injection de luciférine sur l'évolution des cinétiques de bioluminescence et de croissance de la masse tumorale. Nous avons aussi montré qu'à 2 mg le substrat de la réaction enzymatique était déjà en excès et qu'ainsi l'utilisation de la moitié de la "dose standard" de luciférine convenait parfaitement à un suivi de l'évolution des foyers. Dans les essais complémentaires que nous avons réalisé, nous nous sommes intéressé à l'impact de tels paramètres, dans un modèle de tumeur sous cutanée. Pour ce faire nous avons injecté 2.10^5 cellules EL4-huCD20-Luc par voie sous cutanée au niveau de la nuque à des groupes d'animaux C57Bl6J. Les animaux ont ensuite été suivis par bioluminescence à différents temps de croissance tumorale (Figure 36). Les cinétiques observées pour une tumeur sous cutanée sont très différentes de celles observées pour une tumeur disséminée. On retrouve l'impact de l'ordre des événements anesthésie / injection de luciférine tandis qu'il n'existe pas de différence dans la croissance tumorale en fonction de la dose reçue de luciférine. Ainsi même dans le cas de l'utilisation d'un modèle de tumeur sous cutanée l'utilisation de 2 mg pour chaque examen (la moitié de la dose recommandée par les fabricants de systèmes de bioluminescence dont Xenogen) semble tout à fait satisfaisante. Le substrat est suffisamment en excès pour que la quantification de l'intensité d'émission de lumière par les cellules soit fiable. Dans la situation où l'anesthésie des animaux est réalisée avant l'injection de luciférine et contrairement au modèle de tumeur diffuse, le modèle de tumeur sous cutanée ne présente pas d'évolution du plateau d'émission maximale de lumière. En effet, il se situe entre 5 et 15 minutes après l'injection de luciférine et est très stable. Ces informations sont à mettre en parallèle avec des caractéristiques différentes des deux modèles. Une tumeur diffuse va développer de l'angiogenèse rapidement et de façon importante.

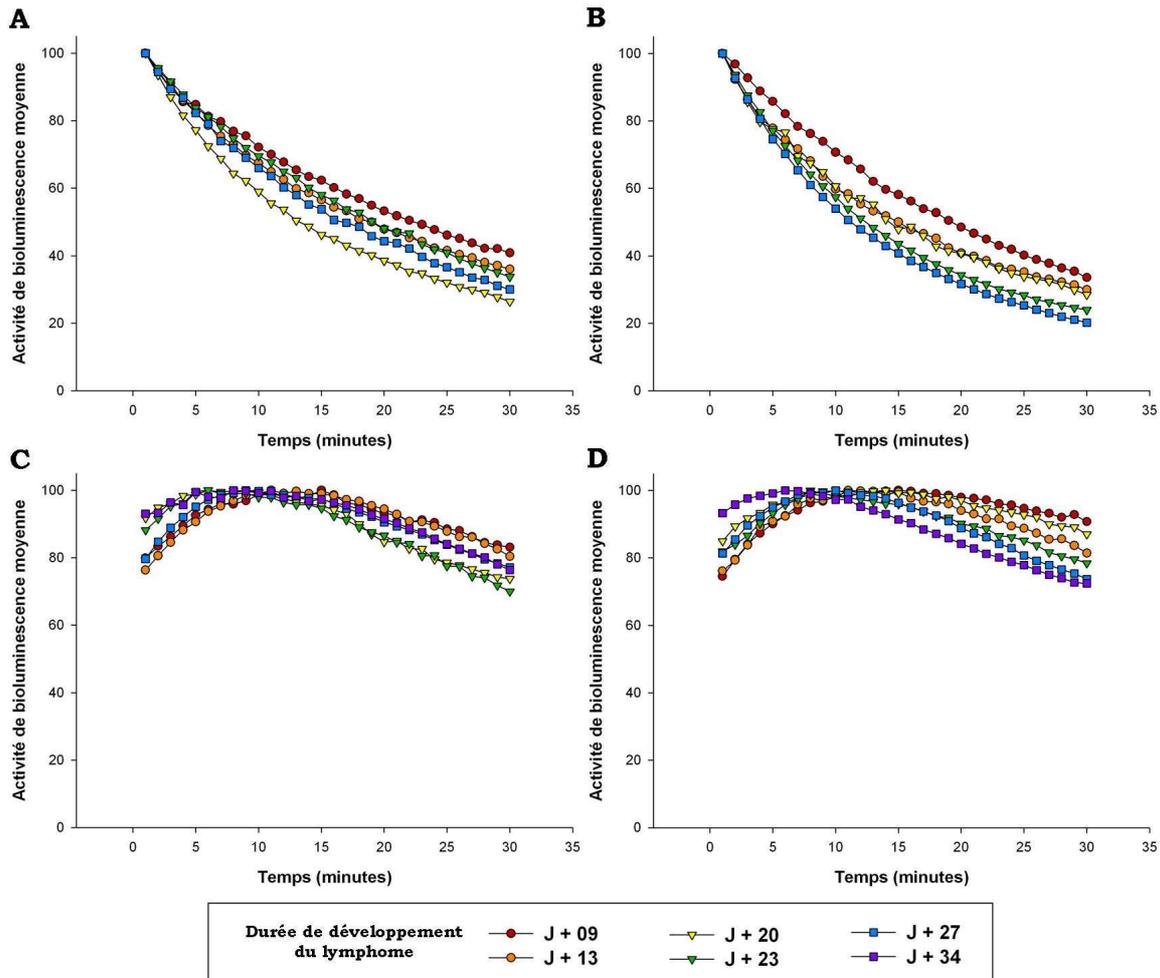


Figure 36 : Cinétiques d'apparition du signal de bioluminescence dans un modèle de tumeur sous cutanée : impact de la dose de luciférine et du moment de l'anesthésie.

Cinétiques du signal de bioluminescence sur des groupes d'animaux avec une tumeur sous cutanée (inoculation 2.10^5 cellules EL4-huCD20-Luc). Examen réalisé après 09 (rouge), 13 (orange), 20 (jaune), 23 (vert), 27 (bleu) et 34 (violet) jours (n = 5 animaux par groupe).

A. Injection de 4mg de luciférine à t = 0 minute, puis anesthésie des animaux.

B. Mêmes conditions que A. avec 2 mg de luciférine.

C. Anesthésie des animaux à t = 0 minute puis injection de 4mg de luciférine à t = 4 minutes.

D. Mêmes conditions que C. avec 2 mg de luciférine.

La cinétique d'émission de lumière après injection de luciférine sera alors limitée par l'importance de la masse tumorale de plus en plus vascularisée avec le temps, expliquant le décalage du plateau d'émission avec la croissance tumorale. Dans un modèle sous cutané la cinétique sera essentiellement limitée par la diffusion du composé au travers des tissus et sera stable au cours du temps et de la progression tumorale.

E - Age des animaux inoculés

Un premier groupe d'animaux C57Bl6J de 6-8 semaines (n = 10) et un second groupe de 10-12 semaines (n = 10) ont reçu une injection de $8 \cdot 10^3$ cellules EL4-huCD20-Luc par voie intraveineuse. Après 9 jours, 80% des animaux du premier groupe et 70% des animaux du second groupe présentaient des foyers quantifiables par bioluminescence et après 13 jours 100% des animaux des deux groupes ont développé des foyers tumoraux quantifiables. Les animaux du premier groupe avaient une médiane de survie de 15 jours (11-18 jours) contre 22 jours (15-27 jours) pour le second groupe, la différence de survie entre les deux groupes étant significative ($P < 0.05$). L'âge a donc une influence sur le développement tumoral. Il est probable que cette différence de survie puisse s'expliquer en partie par un défaut de développement du système immunitaire chez les animaux les plus jeunes. Même si notre modèle, n'a pas pour objectif l'analyse des mécanismes d'action du rituximab, nous avons choisi de n'utiliser que des animaux âgés de 10-12 semaines.

F - Développement tumoral et fond génétique (C57Bl6J versus C57Bl6J Tyr^{c2-J})

Les tissus et la mélanine sont responsables de l'absorption d'une partie de la lumière émise par les cellules tumorales. C'est pourquoi la quasi-totalité des

modèles murins de bioluminescence utilisent des animaux apigmentés de fond génétique albinos ou nude. Nous avons alors envisagé d'utiliser des souris C57Bl6J Tyr^{C2-J}. Pour rappel ces animaux de fond génétique identique aux souris sauvages présentent une mutation au niveau du gène de la tyrosinase. Cette protéine est notamment impliquée dans la synthèse de la mélanine ; les souris C57Bl6J Tyr^{C2-J} ne peuvent la produire et sont apigmentées. 10 animaux de chaque phénotype ont été inoculés par 8.10^3 cellules EL4-huCD20-Luc par voie intraveineuse et l'activité tumorale a été régulièrement analysée par imagerie de bioluminescence. On peut remarquer que, malgré le fait de produire de la mélanine, les animaux de fond génétique sauvage sont tout de même adaptés aux examens de bioluminescence. Par contre le développement tumoral sur les animaux Tyr^{C2-J} est parfois anormal avec 40% d'animaux présentant des régressions tumorales spontanées partielles ou totales en l'absence même de traitement. De plus des problèmes d'anesthésie ont été rapportés chez plus de 50% des animaux. Les animaux Tyr^{C2-J} plus sensibles que les animaux sauvages à une répétition d'anesthésies générales doivent avoir une dose de kétamine/xylazine plus faible ce qui est problématique pour un suivi rigoureux de la progression de l'activité tumorale via le suivi de la bioluminescence. Ainsi compte tenu du manque de connaissances dans les modifications physiologiques engendrées par la mutation du gène de la tyrosinase ainsi que de l'importante difficulté dans l'obtention de lots homogènes d'animaux C57Bl6J Tyr^{C2-J} (taux de fertilité extrêmement faible) nous avons validé, pour l'ensemble des essais, l'utilisation d'animaux C57Bl6J sauvages au pelage noir.

G - Délai entre l'inoculation des cellules EL4-huCD20-Luc et le début des examens de bioluminescence

Quatre groupes de 10 animaux ont reçu une injection de 8.10^3 cellules EL4-huCD20-Luc, les examens de bioluminescence ont été réalisés après 1, 3, 6 ou 9

jours après l'inoculation. Quel que soit le groupe d'animaux, les foyers de bioluminescence n'ont été détectés qu'à partir du jour 09 (Figure 37). Le pourcentage d'animaux ayant développé une tumeur quantifiable à J+9 était de 10% dans le groupe évalué dès J1, 30% et 70% pour les groupes évalués dès J3 et J6 respectivement. En revanche 100% des souris dont l'évaluation a débuté à J9 avaient une tumeur décelable en bioluminescence (Figure 37). Ces résultats peuvent rendre compte soit d'une toxicité précoce de la luciférine sur des cellules tumorales inoculées depuis peu de temps soit d'un développement tumoral trop peu important pour être détectable en bioluminescence. C'est pourquoi pour l'ensemble des essais réalisés par la suite nous n'avons commencé les examens de bioluminescence qu'à partir de J+09.

H - Domiciliation initiale des cellules tumorales

Dans l'article nous avons présenté l'analyse de la domiciliation cellulaire par bioluminescence directe des cellules inoculées ou après marquage des EL4-huCD20-Luc par du Tc99m (Figure 38 et 39). Nous avons réalisé en parallèle des essais de domiciliation par l'utilisation de sondes fluorescentes lipophiles. Les résultats sont identiques et on retrouve d'une part la même domiciliation et d'autre part une évolution de la localisation des cellules similaire (Figure 40). Ces résultats viennent donc confirmer les observations présentées dans l'article.

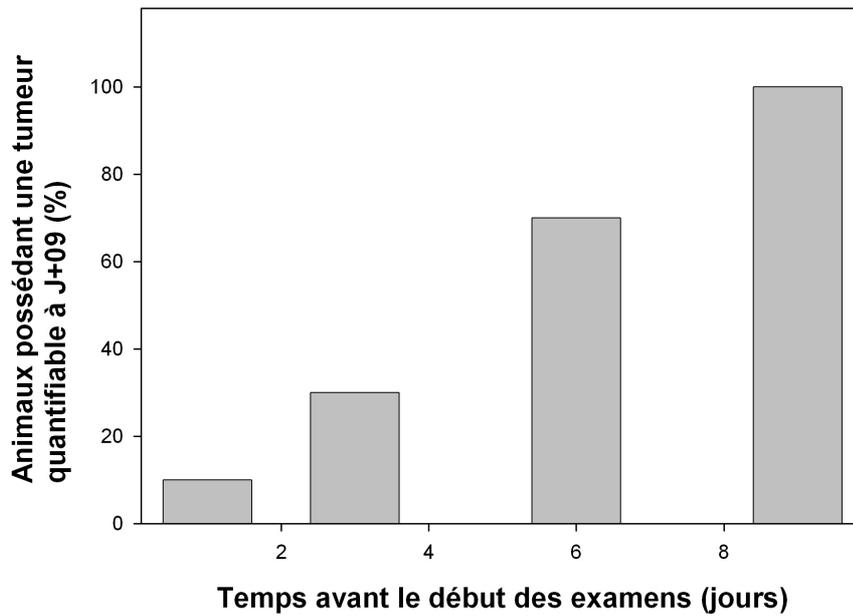


Figure 37 : Délai entre l'inoculation des cellules tumorales et le début des examens de bioluminescence.

Les animaux reçoivent une injection de 8.10^3 cellules EL4-huCD20-Luc. Les examens de bioluminescence débutent pour les différents groupes d'animaux après 1, 3, 6 ou 9 jours. Ils sont réalisés deux fois par semaine. Le graphe présente le pourcentage d'animaux de chaque groupe ayant un lymphome quantifiable 9 jours après l'inoculation des cellules et permet de mettre en évidence une probable toxicité de la luciférine de potassium lorsque cette dernière est injectée trop peu de temps après l'inoculation des cellules.

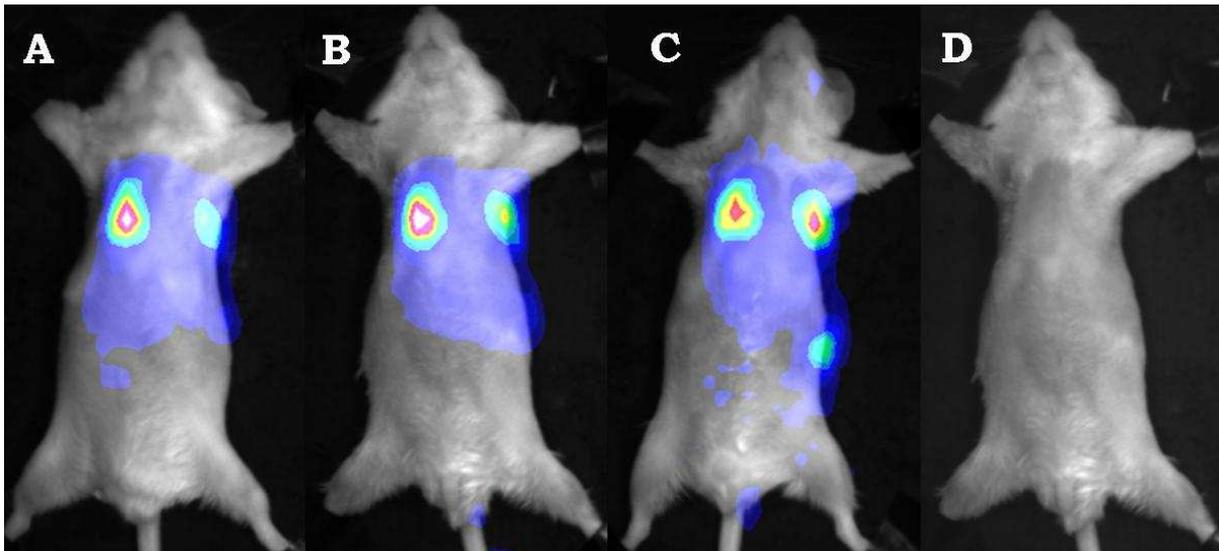


Figure 38 : Suivi de la domiciliation initiale des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc par bioluminescence.

Suivi de la dissémination initiale des cellules par bioluminescence des cellules tumorales après injection de 2 mg de luciférine de potassium. Examen immédiat (A), puis après 0h30 (B) après 1h30 (C) et après 20h00 (D). Après 20h00 les cellules sont toujours présentes mais ont migré vers divers sites, le signal est trop faible pour être mesuré.

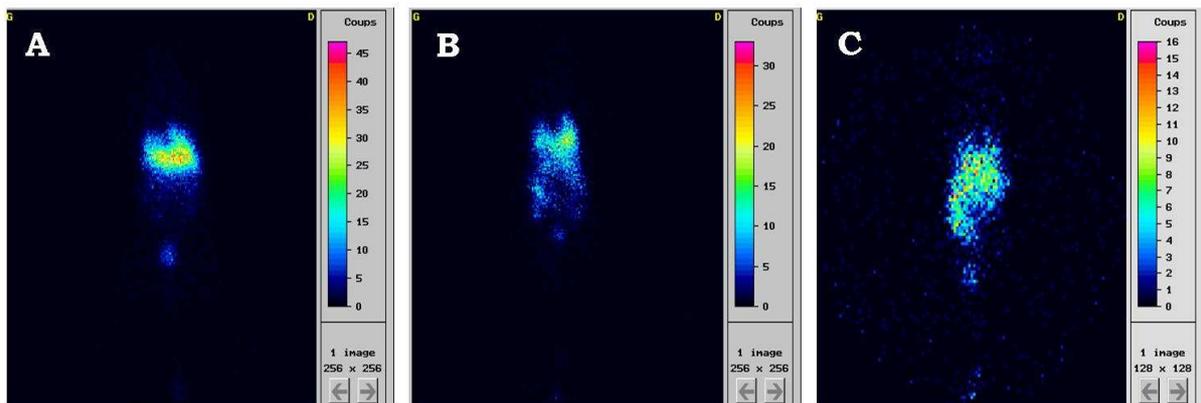


Figure 39 : Suivi de la domiciliation initiale des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc par scintigraphie après marquage au Tc99m.

Suivi de la dissémination initiale des cellules après marquage au Technétium 99m. Imagerie radiographique immédiatement après injection des cellules par voie intraveineuse (A), après 1h30 (B) et après 18h00 (C). On peut relever la bonne sensibilité de la méthode.

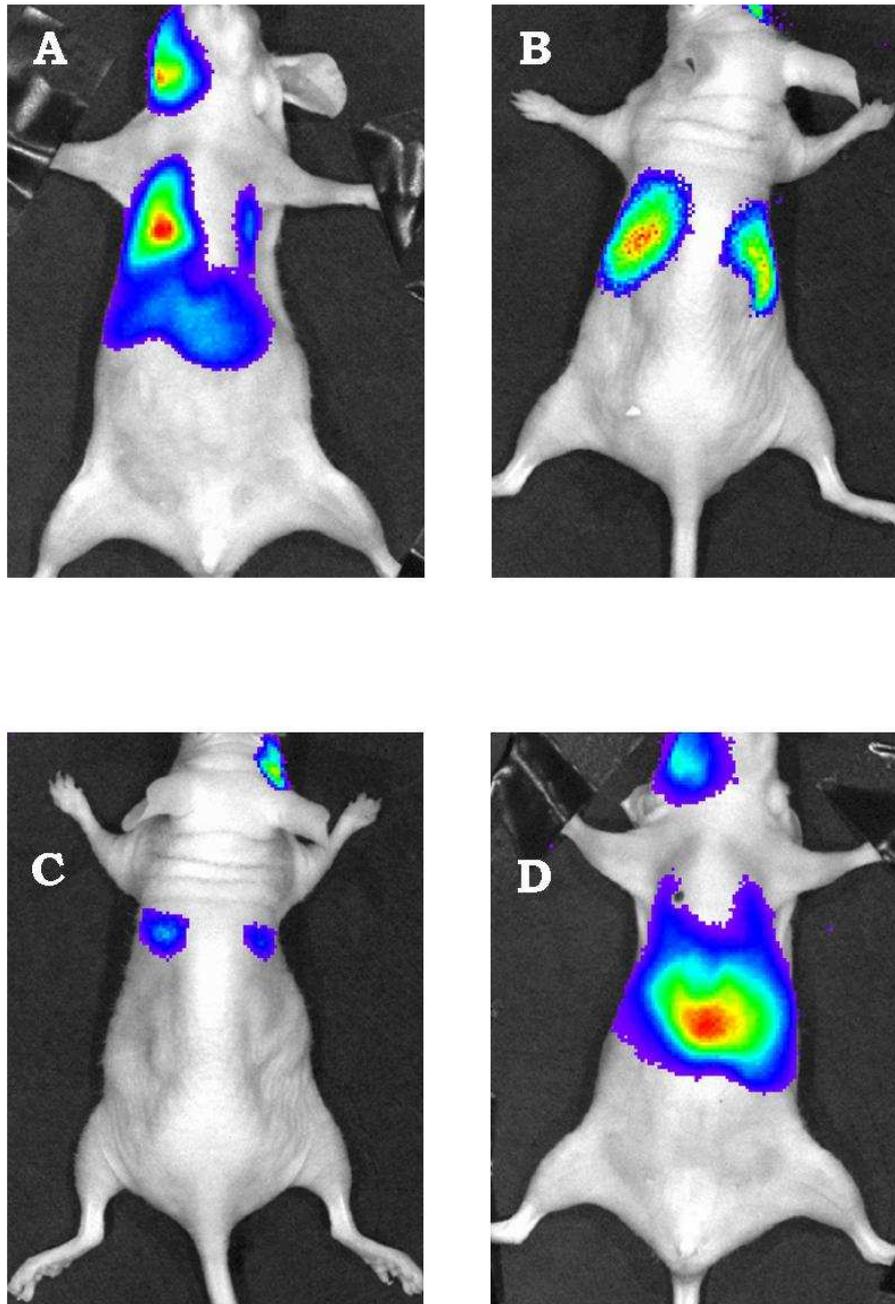


Figure 40 : Suivi de la domiciliation initiale des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc par fluorescence après marquage par sonde DID.

Suivi de la dissémination initiale des cellules par fluorescence des cellules tumorale, marquage par sonde lipophile DID. Examen immédiat en face antérieure (A) et postérieure (B), puis après 20h00 en face antérieure (C) et en face postérieure (D). L'utilisation de souris C57BL/6J nude permet de révéler l'excellente sensibilité de la méthode. Malgré une persistance de quelques cellules au point d'injection cette méthode confirme les observations réalisées précédemment.

VI - Discussion et conclusion

Cette première partie présente la mise en place et l'optimisation d'un modèle murin de lymphome exprimant le CD20 humain et la mise au point d'une technique de bioluminescence permettant le suivi et la quantification de la croissance tumorale. L'imagerie de bioluminescence requiert de fixer auparavant une série de paramètres.

Dans un premier temps, nous avons mis en place et développé le modèle cellulaire EL4-huCD20-Luc *in vitro*. Nous avons contrôlé l'expression du CD20 et de la luciférase. Nous nous sommes aussi intéressés aux aspects cinétiques de l'émission de lumière *in vitro* afin de nous placer dans des conditions optimales. Nous avons défini les conditions d'utilisation de notre modèle cellulaire *in vivo* en établissant la zone de proportionnalité entre le signal de bioluminescence mesuré et le nombre de cellules. Cette méthode est relativement sensible puisqu'elle permet de détecter 10^2 cellules tumorales. C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à l'utilisation d'animaux albinos C57Bl6J Tyr^{C-2J}. Ces animaux, présentent une mutation dans le gène de la tyrosinase qui les rend incapables de synthétiser la mélanine tout en possédant le fond génétique C57Bl6J. Dans ce travail nous avons montré qu'il était possible d'utiliser des souris noires C57BL/6J sans interférer sur la sensibilité de la méthode de quantification. L'apparition des foyers tumoraux se réalise au sein d'un organe lymphoïde (foie, rate, ganglions...) nous avons alors étudié l'absorption spécifique de la lumière émise par les cellules en fonction de la localisation anatomique des foyers tumoraux.

Nous avons aussi montré l'influence de certains paramètres sur l'imagerie de bioluminescence, comme la quantité de luciférine de potassium utilisée à chaque examen, l'utilisation de la moitié de la dose standard habituellement recommandée, l'ordre et le temps entre les opérations d'injection de luciférine et d'anesthésie ou encore le type de tumeur choisi pour le modèle (tumeur diffuse ou tumeur sous

cutanée localisée). Ce dernier point a récemment été décrit et présenté par une équipe belge ²⁶⁹.

Pour cette étude nous avons envisagé de réaliser des essais de bimodalité. En combinant le suivi de la progression des cellules tumorales par l'imagerie optique de bioluminescence à des méthodes de suivi par scintigraphie et autoradiographie de la biodistribution de l'anticorps injecté. Cependant la mise en place simultanée d'une telle combinaison de méthodes d'imagerie nécessite un système d'imagerie de bioluminescence insensible à la radioactivité. Parmi tous les systèmes de détection de la bioluminescence aujourd'hui sur le marché, seuls les systèmes ORCA Hamamatsu® sont réellement insensibles à la radioactivité. Les autres systèmes sont plus ou moins sensibles. Par exemple, le système Lumina de Xenogen® subit une augmentation du bruit de fond de 250% en présence d'une source de radioactivité de 400 μCi . *Une telle source correspond à la radioactivité moyenne d'un animal ayant reçu une injection d'anticorps marqué dans le but d'un examen de scintigraphie.* Une augmentation du bruit de fond de 250% entraîne une réduction de la sensibilité de détection de la bioluminescence d'un facteur de plus de 10 et réduit la zone de proportionnalité entre signal détecté et nombre de cellules de plus de 2 unités logarithmiques. Pour l'ensemble des systèmes de bioluminescence, à l'exception de celui développé par Hamamatsu®, l'augmentation du bruit de fond varie entre 250% et 600% en présence d'une source radioactive. Nous avons choisi d'utiliser le système de détection de la bioluminescence Hamamatsu® pour l'ensemble des essais. Le système CCD de ce système présente une efficacité quantique maximale entre 500nm et 700nm ce qui est parfaitement compatible avec la longueur d'onde maximale d'émission de la luciférine *in vivo* et permet de limiter l'interaction avec l'absorption de la lumière par les autres composés (Figure 34). Cependant ce système est qualitatif et non quantitatif. Nous présenterons donc dans cette partie les méthodes de quantifications que nous avons développées pour

le modèle. Nous exposerons la méthodologie de traitement de l'image afin de la rendre quantifiable (élimination du bruit du fond et de la perturbation du signal due au rayonnement cosmique), dans un second temps, nous préciserons la stratégie d'analyse de l'intensité des foyers et de détermination des régions d'intérêt par segmentation.

La réalisation de mesures de l'absorption de la lumière émise par les tissus en fonction de la localisation anatomique des foyers tumoraux nous a donné accès, par l'intermédiaire de l'imagerie quantitative de bioluminescence à une évaluation précise du volume tumoral des animaux avant traitement. En effet, par le biais de la mesure quantitative de l'activité de bioluminescence d'un foyer donné et de son volume relatif exprimé en unités de base (pixels) nous pouvons définir un volume tumoral. Une fois cette valeur corrigée de l'absorption par les tissus en fonction de la localisation du foyer, le volume tumoral obtenu reflète non seulement le volume occupé par les cellules mais constitue aussi un excellent indicateur de leur activité ainsi que de leur état métabolique.

Au terme de ce travail, nous disposons d'un modèle permettant une mesure précise de l'effet thérapeutique d'un anticorps anti CD20. Il nous est donc possible d'étudier l'influence du volume tumoral pré - thérapeutique sur la relation concentration - effet du rituximab.

VII - Développement des macros de traitement des images et de délimitation des régions d'intérêts

En complément à l'article et aux essais complémentaires nous avons développé des macros pour permettre le traitement des images et déterminer les régions d'intérêt par segmentation.

A - Macro d'élimination du bruit de fond et du rayonnement cosmique

Lorsque l'image de bioluminescence est réalisée le signal mesuré est perturbé par le bruit de fond intrinsèque à l'animal et au matériel optique de mesure. Il est aussi brouillé par le rayonnement cosmique qui interagit avec le système de détection du CCD. La macro mise au point, permet le traitement de deux images. En effet chaque image est une mesure d'une durée correspondant à la moitié du temps total. La comparaison entre elles des deux images permet l'identification et la suppression des perturbations grâce au caractère aléatoire de ce signal (nombre de niveaux de gris du pixel différant de plus de 10% entre les deux images : la valeur est alors remplacée par la moyenne des nombres de niveaux de gris des 8 pixels environnants). Les valeurs des pixels des 2 images sont alors ajoutées. Enfin une fois les images de bioluminescence et de bruit de fond nettoyées, leurs valeurs sont soustraites. L'image devient alors quantifiable. Cette macro a été réalisée en collaboration avec Sabrina Pesnel (Service d'imagerie, CDTA, Orléans, France) et Aurélie Sergent (IFIPS Optronique, Orsay, France) et a été développée sous Matlab version 7.002 (Matlab®) (Annexe : Macro de traitement de l'image).

B - Macro de délimitation des régions d'intérêt

Les régions d'intérêt des zones de bioluminescence de l'image sont déterminées par segmentation. Cette macro permet une délimitation automatique des régions d'intérêt des images des foyers tumoraux par la comparaison de l'intensité des pixels de proche en proche et par la définition de zones d'intensité. En outre la macro permet aussi une fusion de l'image optique et de l'image de bioluminescence. Cette macro a été réalisée en collaboration avec Sabrina Pesnel et a été développée sous ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) (Annexe : Macro de segmentation des régions d'intérêt).

**SECOND ARTICLE : Analyse de l'influence du volume tumoral
avant traitement sur l'exposition et la réponse au rituximab :
approche pharmacocinétique – pharmacodynamique par un
modèle murin syngénique bioluminescent.**

I - Introduction

Ces dernières années, grâce aux progrès réalisés dans l'humanisation des anticorps monoclonaux recombinants, ces derniers ont vu leur utilisation thérapeutique s'accroître, notamment dans le traitement du cancer. Parmi ces Acm-r, le rituximab (MabThera®, Rituxan®) est le premier à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis. Il s'agit d'un anticorps chimérique de type IgG1 kappa dirigé contre l'antigène de surface CD20 exprimé par plus de 95% des cellules lymphoïdes B. Le rituximab utilisé seul ou en association avec de la chimiothérapie a montré son efficacité dans le traitement des lymphomes de faible et de haute malignité. Néanmoins, lorsqu'il est utilisé en monothérapie, 30 à 50% des patients ne répondent pas au traitement. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette variabilité de réponse, parmi lesquelles l'importance du volume tumoral, un faible niveau d'expression du CD20, la présence de formes solubles de CD20 ou encore de faibles concentrations sériques de rituximab. Notre équipe de recherche a été la première à montrer qu'un polymorphisme nucléotidique du gène *FCGR3A*, conduisant à la substitution d'une valine (V) par une phénylalanine (F) en position 158 du récepteur pour la portion Fc des IgG (FcγRIIIa) sur les cellules effectrices cytotoxiques, était corrélé à la réponse clinique et moléculaire au rituximab chez des patients présentant un lymphome folliculaire ¹³⁷. Ainsi, le fait que ce

récepteur puisse être à l'origine d'une variabilité dans la réponse clinique au rituximab suggère fortement que l'ADCC constitue un mécanisme d'action du rituximab *in vivo* chez l'homme comme nous l'avons présenté dans l'introduction ¹⁷². Notre équipe a confirmé l'influence du génotype sur le niveau d'ADCC observé *in vitro*, et montré que l'influence du polymorphisme *FCGR3A* *in vitro* se manifestait surtout en présence de faibles concentrations de rituximab ¹⁹². Chez l'homme, la réponse clinique après administration de rituximab semble corrélée à l'exposition au médicament, les concentrations de rituximab étant significativement plus élevées dans le groupe des patients répondeurs ^{198,211,270} (Figure 41). Les concentrations sériques de rituximab, représentant la fraction libre circulante, sont par ailleurs inversement corrélées à la masse tumorale ¹⁹⁸ (Figure 42). De la même manière, la déplétion lymphocytaire B liée au rituximab est corrélée à la concentration sérique de rituximab et au génotype *FCGR3A* ²⁷¹. Ainsi, l'exposition au médicament et la masse tumorale pourraient être des facteurs de variabilité thérapeutique à prendre en compte, pour optimiser individuellement le traitement des patients atteints de lymphome malin non hodgkinien ²⁰⁶. La possibilité de modifier la demi-vie d'une IgG thérapeutique par ingénierie moléculaire ouvre également de nouvelles perspectives en vue d'une optimisation des traitements.

L'objectif général de cette seconde partie du travail a été d'analyser l'influence du volume tumoral sur la relation dose – concentration – effet du rituximab en utilisant le modèle murin de lymphome mis au point et présenté dans la première partie.

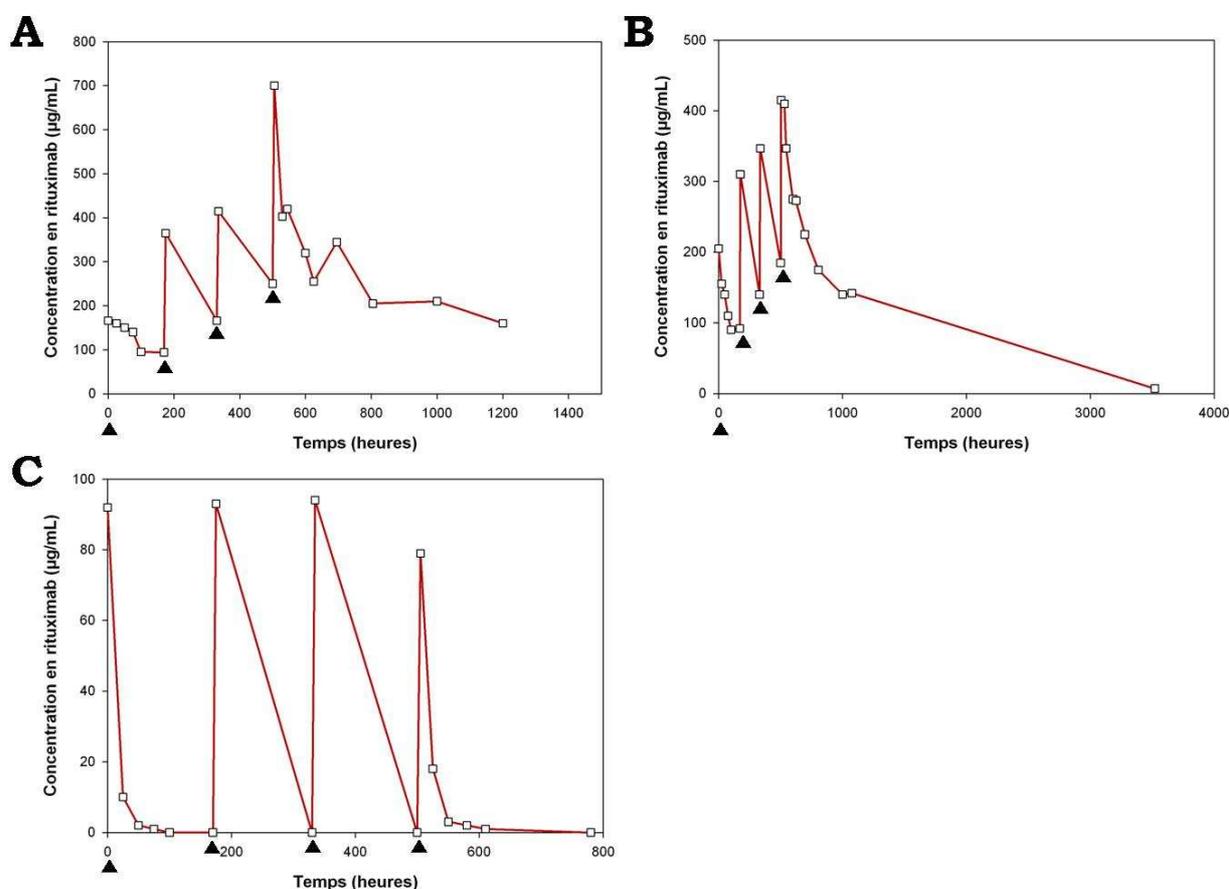


Figure 41 : Mise en évidence chez l'homme de la relation entre l'exposition au traitement et la réponse des patients.

Mise en évidence chez l'homme de la relation entre l'exposition au traitement et la réponse les patients. Bien que l'ensemble de ces individus ait reçu un traitement par le rituximab identique, leur exposition est différente, leur réponse au traitement est différente. Les triangles indiquent les perfusions de rituximab.

A. Ce groupe d'individus possède une bonne exposition à l'anticorps, après les 4 perfusions le taux d'anticorps dans le sérum reste élevé. Ces patients sont en rémission complète.

B. Ce groupe présente une moins bonne exposition à l'anticorps, malgré le fait que la concentration sérique en rituximab reste élevée après les 4 perfusions, ce taux s'effondre rapidement. Ces patients sont en réponse partielle.

C. Ce dernier groupe a une très mauvaise exposition à l'anticorps, le taux sérique du rituximab s'effondre après chaque perfusion et n'est jamais élevé. Ces individus sont en absence de réponse au traitement.

(Source : Mc Laughlin et al., 1998)

Temps	Diamètre maximum				
	n	Progression	Coefficient	Valeur de <i>p</i>	
Perfusion N°1	Avant	137	-0.019	-0.047	0.589
	Après	137	-6.034	-0.153	0.074
Perfusion N°2	Avant	147	-4.137	-0.300	0.001a
	Après	147	-9.151	-0.170	0.040a
Perfusion N°3	Avant	143	-7.943	-0.284	0.001a
	Après	143	-18.38	-0.238	0.004a
Perfusion N°4	Avant	141	-11.98	-0.264	0.002a
	Après	141	-16.88	-0.218	0.009a
Une semaine après traitement	Suivi	143	-12.31	-0.264	0.001a
Un mois après traitement	Suivi	124	-7.567	-0.278	0.002a
Trois mois après traitement	Suivi	104	-2.154	-0.257	0.009a

Temps	Somme des produits des diamètres des 6 foyers				
	n	Progression	Coefficient	Valeur de <i>p</i>	
Perfusion N°1	Avant	137	-0.001	-0.044	0.609
	Après	137	-0.359	-0.128	0.137
Perfusion N°2	Avant	147	-0.551	-0.486	<0.001a
	Après	147	-1.187	-0.268	0.001a
Perfusion N°3	Avant	143	-0.713	-0.352	<0.001a
	Après	143	-1.608	-0.287	0.001a
Perfusion N°4	Avant	141	-1.118	-0.339	<0.001a
	Après	141	-1.412	-0.251	0.003a
Une semaine après traitement	Suivi	143	-1.635	-0.426	<0.001a
Un mois après traitement	Suivi	124	-0.880	-0.407	<0.001a
Trois mois après traitement	Suivi	104	-0.224	-0.333	0.001a

Figure 42 : Mise en évidence chez l'homme de la relation entre la concentration en rituximab dans le sérum des patients et leur volume tumoral.

Présentation des données de l'analyse clinique de *Berinstein et al.* La mesure des concentrations circulantes en rituximab ainsi que l'évaluation du volume tumoral des patients avant et après chaque perfusion permet d'établir la relation entre ces paramètres. Les tests statistiques appliqués sont significatifs pour $p < 0,05$ (a). La première partie du tableau montre l'analyse de la relation entre les concentrations en anticorps et le plus grand diamètre mesuré sur les tumeurs des patients. La seconde partie montre la relation entre la concentration sérique en rituximab et la somme des produits des diamètres des 6 plus grands foyers tumoraux. Cette seconde analyse possède l'avantage de s'intéresser de façon plus importante au volume tumoral des individus avant/après traitement. (Source : *Berinstein et al., 1998*)

II - Poster de présentation scientifique

L'ensemble des travaux d'analyse de l'influence de la charge tumorale initiale sur l'exposition et la réponse au rituximab a fait l'objet d'une présentation sous la forme d'un poster scientifique lors du 49^{ème} meeting annuel de l'ASH (*American Society of Haematology*) qui s'est déroulé du 08 au 11 décembre 2007 à Atlanta, Georgie, Etats-Unis. Le poster "Tumour burden influence on individual rituximab exposure and response : pharmacokinetic – pharmacodynamic approach by using a syngenic bioluminescent murine model" (présenté ci après) a été complété par un *abstract* dans un numéro spécial du journal scientifique *Blood* (journal officiel de l'ASH) *abstract* N°2347, novembre 2007. Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale lors du congrès annuel de la SFH (Société Française d'Hématologie) qui s'est déroulé du 20 au 22 mars 2008 à Paris.

Tumour Burden Influence on Individual Rituximab Exposure and Response: Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Approach by Using a Syngenic Bioluminescent Murine Model.

David Daydé¹, David Ternant¹, Stéphanie Lerondel², Hervé Watier¹, Alain Le Pape², Pierre Bardos¹, Gilles Paintaud¹ and Guillaume Cartron³. (Introduced by Jean-François Rossi)

¹EA3853 Immuno-Pharmaco-Genetics of therapeutic Antibodies, Université François Rabelais, Tours, France; ²Service d'Imagerie Fonctionnelle, Centre de Distribution Typage et Archivage animal, Orléans, France and ³Service d'Hématologie et Biothérapies, INSERM U847, CHU Lapeyronie, Montpellier, France. *There are no relevant conflicts of interest to disclose.

Abstract.

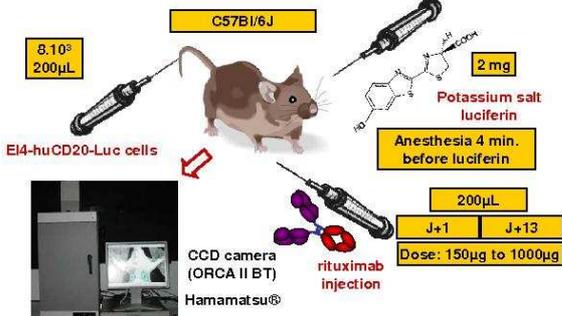
Immunotherapy with the humanized monoclonal anti-CD20 antibody rituximab (C2B8) represents an interesting therapeutic option for patients with B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma. Early clinical trials have shown that rituximab exposure was variable in patients receiving similar doses and that clinical response was related to rituximab concentrations.

Objectives.

The aim of our study was to evaluate the influence of tumour burden on rituximab exposure and response to treatment. We purposed to use a syngenic bioluminescent murine model with a reliable quantification method of bioluminescence activity taking into account absorption coefficients of the cells light emitted according to their localization.

Methods.

Murine model of T-lymphoma: E14-huCD20-Luc.



Tumour detection, disease dissemination and progression were evaluated by in vivo quantitative bioluminescence imaging after background noises and cosmic rays elimination (for more information see poster board N°554).

Rituximab concentrations were carried out by ELISA on plasma samples.

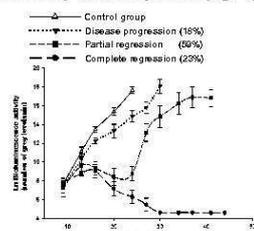
Results.

One dose of rituximab was injected 13 days after lymphoma cell infusion: in the control group without rituximab all mice died within 30 days.

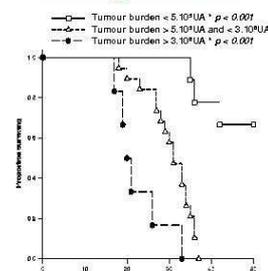
There is a significant dose/response relationship with increased doses of rituximab (from 150µg to 1000µg) (fig. 1).

At 500µg of rituximab, we found an important variability in response to treatment (fig. 2). We determined the tumour burden value before rituximab injection, 13 days after lymphoma induction. The tumour burden, were calculating taking into account the source's size and bioluminescent activities. There is a significant correlation between tumour burden, response to rituximab and survival (fig. 3) and (fig. 4).

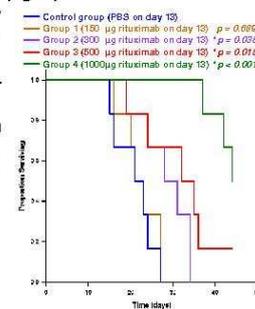
Mice with the lower tumour burden having increased remission rates and survival. Using a pharmacokinetic – pharmacodynamic model we also demonstrated a connection between tumour burden, rituximab exposure, rituximab efficiency and response (fig. 5).



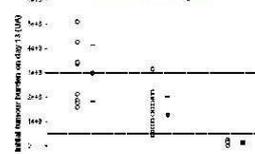
(fig. 2) Variability in response with 500µg of rituximab.



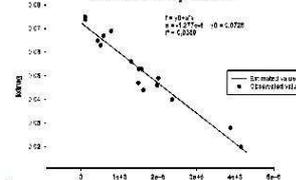
(fig. 4) Proportion surviving and initial tumour burden with 500µg of rituximab.



(fig. 1) Dose / response relationship.



(fig. 3) Tumour burden and disease response.



(fig. 5) Tumour burden and rituximab efficiency parameter.

Conclusion.

With this quantitative murine model of human lymphoma we demonstrated the influence of the tumour burden on individual exposure and response to treatment. Such results should have consequences for the rituximab use in human and in pre-clinical assessment of new anti-CD20 antibodies.



III - Article

Ces essais nous ont conduits à la réalisation d'un article scientifique actuellement soumis pour publication.

Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic - pharmacodynamic modelling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20

David Daydé^{1,2}, David Ternant^{1,2}, Marc Ohresser^{1,2}, Stéphanie Lerondel³, Sabrina Pesnel³, Hervé Watier^{1,2,4}, Alain Le Pape^{3,6}, Pierre Bardos^{1,2,4}, Gilles Paintaud^{1,2,5}, Guillaume Cartron^{7,8,*}

¹Université François Rabelais Tours, GICC, France ;

²CNRS, UMR 6239, France ;

³CNRS, UPS44, Centre de Distribution, Typage et Archivage animal, Institut de Transgèneose, Orléans, France ;

CHRU de Tours, departments of ⁴Immunology and ⁵Pharmacology-Toxicology ;

⁶INSERM U618, Protéases et vectorisation pulmonaire, Tours, France ;

⁷INSERM U847, Biothérapies des cellules souches normales et cancéreuses, Montpellier, France ;

⁸CHU Lapeyronie, Service d'Hématologie et Biothérapies, Montpellier, France.

Running title: Tumor burden influences response to rituximab

Keywords : Rituximab, mathematical model, dose-response relationship, bioluminescence imaging, syngeneic murine model.

Corresponding author: Guillaume Cartron, MD, Ph-D, Service d'Hématologie et Biothérapies, INSERM U847, CHU Lapeyronie, CHU Montpellier, 191 avenue du doyen Gaston Giraud 34295 Montpellier, France. Tel: +33 (0)4 67 33 83 62 Fax: +33 (0)4 67 33 91 94, Email: guillaume.cartron@med.univ-tours.fr

Number of words in the abstract: 199

Total text word count: 4327

Number of figures: 6

Number of references: 24

Abstract

Clinical studies have shown a large interindividual variability in rituximab exposure and its significant influence on clinical response in patients receiving similar doses of antibody. The aim of this study was to evaluate the influence of tumor burden on dose-concentration-response relationships of rituximab. Murine lymphoma cells (EL4, 8×10^3) transduced with human CD20 cDNA and transfected with luciferase plasmid (EL4-huCD20-Luc) were intravenously injected to C57BL/6J mice. Tumor burden detection, dissemination and progression were evaluated quantitatively by *in vivo* bioluminescence imaging. Different doses of rituximab (6 mg/kg, 12 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg) were infused thirteen days after lymphoma cell inoculation and rituximab serum concentrations were measured by ELISA. Without rituximab, all mice developed disseminated lymphoma and died within 30 days whereas a significant dose-response relationship was observed in mice receiving rituximab. The 20 mg/kg dose was adequate to study interindividual variability in response since 23% of mice were cured, 59% had partial response and 18% had disease progression. Rituximab concentrations were inversely correlated with tumor burden, mice with low tumor burden having high rituximab concentrations. Furthermore rituximab exposure influenced response and survival. Finally, using a pharmacokinetic–pharmacodynamic model, we demonstrated that tumor burden significantly influenced rituximab efficacy.

Introduction

Rituximab (MabThera®, Rituxan®), a chimeric IgG1κ monoclonal antibody (mAb) directed against the CD20 antigen, has dramatically improved the outcome of patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL). It is now indicated in association with chemotherapy in both low and high grade NHLs and as maintenance therapy in relapsed follicular NHL. As for most antibodies, a large variability in clinical response is observed when rituximab is given as a single agent. Individual characteristics that were shown to explain this variability, are genetic factors such as FcγRIIIa-158V/F polymorphism²⁷² or factors leading to rituximab trapping such as tumor burden²⁷³, level of CD20 expression¹⁶² or presence of circulating CD20²⁷⁴.

In phase II trials using rituximab as single agent in untreated patients with indolent NHL, 60 to 70% objective response was obtained²⁷⁵⁻²⁷⁷ and responders showed different patterns of response, with only few of them experiencing complete remission. The pivotal study²⁷⁸ clearly showed a large variability in rituximab exposure between patients treated for relapsed B-NHL. Because authors later demonstrated a relationship between rituximab concentrations and both clinical response and progression-free survival (a low exposure being associated with progressive disease and a shorter progression-free survival)^{270,273,279}, a trial was designed to improve rituximab individual exposure by using pharmacokinetic-guided administrations²⁰². However, the authors failed to demonstrate a clear advantage of this approach and responder patients still had significantly higher rituximab concentrations than non responders. These results underline the need for a better understanding of factors influencing rituximab exposure before new rituximab administration modalities may be proposed.

Distribution, availability and number of tumor antigens as well as presence of circulating antigens are factors known to influence pharmacokinetics of mAbs²⁰⁶ and could explain part of the differences in rituximab pharmacokinetics observed between different types of B-NHL. In the pivotal study, the authors observed an inverse relationship between serum level of rituximab and both circulating B cells and tumor burden at baseline^{273,278}. However, patients treated after

autologous stem cell transplantation and thus characterized by minimal residual disease had similar serum concentrations to those measured in relapsed patients ²¹⁰. These conflicting results may be explained by the difficulty of evaluating tumor burden in clinical practice. In the pivotal study, tumor burden was defined by the maximum lesion diameter or the sum of products of the diameters of the six largest lesions assessed by CT-scan. There is currently no technology allowing to measure precisely the mass of disseminated lymphomas in patients ¹⁹⁸. This partly explains the lack of study analyzing the relationship between tumor volume measured by a quantitative method and rituximab concentrations and/or efficacy. Rituximab has dramatically improved the standard of care treatments of patients with NHLs and there is an urgent need to quantify the dose-concentration-effect relationship of rituximab using pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis and to identify the individual factors influencing it.

The aim of this study was therefore to characterize the dose-concentration-effect relationship of rituximab and to investigate the role of tumor burden on this relationship. We used a murine syngeneic model of lymphoma expressing human CD20 and luciferase gene (EL4-huCD20-Luc) and a quantitative bioluminescent imaging method adapted for bimodality analysis, (D.D. et al., manuscript submitted, July 2008). In the present study, we observed an influence of tumor volume on rituximab exposure and response and developed a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model describing this relationship.

Materials and Methods

EL4-huCD20-Luc cell line

EL4 murine T lymphoma cells transduced with human CD20 cDNA (EL4-huCD20)²⁸⁰ were kindly provided by Dr J. Golay (Laboratory of Cellular and Gene Therapy "G. Lanzani", Ospedali Riuniti, Bergamo, Italy). Plasmid containing luciferase cDNA (pCMV-Luc, Stratagene, La Jolla, CA, USA) was transfected into EL4-huCD20 cells by using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies Inc, Cergy Pontoise, France). Transfected cells were selected with standard medium containing 300 µg/mL of G418 (Euromedex, Mundolsheim, France). Clonal EL4-huCD20 cells expressing luciferase (EL4-huCD20-Luc) were generated by limiting dilution culture of G418-resistant colonies. Intensity and stability of the luciferase and huCD20 expressions were checked before each experiment. CD20 expression was assessed by flow cytometry (Epics XL-MCL®, Beckman Coulter, San Jose, CA, USA) using mouse CD20 mAb directly coupled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Beckman Coulter, San Jose, CA, USA). For analysis of antigen density, the number of membrane CD20 molecules was estimated using the specific mAb binding value provided by Qifikit assay (Dako, Trappes, France). Data were analysed using the software System II® (Beckman Coulter). For luciferase expression analysis, 20 µL of lysis reagent (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent®, Promega, Charbonnières, France) were added to 2×10^5 EL4-huCD20-Luc cells according to manufacturer's recommendations. Cells were distributed in opaque wells (BandW isoplate®, Wallac, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) and 100 µL of reagent containing luciferin and ATP (Luciferase Assay Reagent®, Promega, Charbonnières, France) were added before placing the plates in a Wallac Victor 1240® luminometer (Perkin Elmer, Charbonnières, France).

Syngeneic lymphoma model and bimodal imaging analysis

Animal protocols were approved by the Regional Committee of Ethics for the Animal Experimentation (CREEA) UNI37-014 and were in accordance with the International Guidance for animal care and use.

In all experiments with tumor inoculation, C57BL/6J mice (male, 10–12 weeks of age) purchased from Charles River (L'Arbresle, France) were intravenously injected with 8×10^3 EL4-huCD20-Luc in 200 μ L of PBS on day 0 (D0). Thirteen days later (the time needed for a quantifiable tumor growth), a single dose of 6 mg/kg, 12 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg rituximab (ch-IgG1k anti-CD20, ch-C2B8, Mabthera[®], Roche, Neuilly, France) was intravenously injected. For rituximab pharmacokinetics analysis in animals without tumor, a group of mice was injected with 200 μ L of PBS, and received thirteen days later a single dose of 20 mg/kg rituximab. In some experiments, 6 mg/kg of infliximab (ch-IgG1 κ anti-TNF α , Schering-Plough, Levallois Perret, France) were injected together with rituximab.

In vivo bioluminescence imaging (BLI) was performed on day 9 (D9), D13, and then twice a week until the death of animals. Mice were anaesthetized to obtain a prolonged immobility. They were shaven off on the ventral and dorsal faces and were intraperitoneally injected with 2mg beetle luciferin (potassium salt, Promega, Charbonnières, France). Four minutes later, bioluminescence analyses were carried out using a ORCA II BT C4742-98-26 LW (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Data acquisition and image processing were achieved using HiPic[®] software (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Merging of bioluminescence images was obtained using WASABI[®] software version 1.5 (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Matlab[®] software version 7.0 (MathWorks, Paris, France) was used to eliminate cosmic radiations and background noise. ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) was used to delineate regions of interest by segmentation analysis (D.D. et al., manuscript submitted, July 2008). Complete response (CR) was defined by a complete disappearance of detectable bioluminescence signal, partial response (PR) by significant but transient reduction in

bioluminescence activity and progressive disease (PD) by a lack of decrease of bioluminescence activity.

Antibody biodistribution was assessed using ibritumomab tiuxetan (mu-IgG1k anti-CD20, muC2B8, Zevalin®, Bayer Healthcare, Lys-lez-Lannoy, France) labeled with Tc99m in the same way as the manufacturer's recommendations for the labelling of yttrium 90 ibritumorab tiuxetan . Mice received 130 µCi of labeled ibritumomab and biodistribution was assessed by gamma camera (Gamma Imager, Biospace Mesures, Paris, France) every day for 3 days. Gamma acquisition v3.0 and Gamma vision+ v3.8.5 softwares (Biospace Mesures, Paris, France) were used for biodistribution data analysis. In some experiments, mice received 400 µCi of labeled ibritumomab. They were sacrificed on D1 and antibody distribution was evaluated on 3 µm cuts of pathologic lymph nodes as previously determined by BLI analysis. Radioactivity was revealed on mammographic films for 15 minutes.

Immunohistochemistry and PCR analysis of tumors

Liver, spleen, kidneys, lymph nodes and bone marrow cells from rituximab-treated and untreated mice were collected on D9, D13, D16, D21, D24, D27, D30 and D34. On D13, D24 and D34, the samples were examined after hematein-eosin-safran staining and were assessed for CD20 expression (clone L26, Dako, Glostrup, Denmark) by immunochemistry using the streptavidin-biotin complex technique (LabVision microm, Fremont, CA, USA).

At the same times, liver, spleen, lymph nodes and bone marrow cells were homogenized and DNA was immediately purified with DNAzol® BD Reagent extraction (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to manufacturer procedures. Two hundred ng of DNA were amplified by PCR in 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂ with 0.5U Taq DNA polymerase and 1.5×10^{-7} M of huCD20 specific primers (5'-AATTCAGTAAATGGGACTTTCCCG-3', 5'-ACTATGTTAGATTTGGGTCTGGAG-3'). Amplifications were performed with a 5-min denaturation step at 95°C, followed by 30 cycles of denaturation (95°C for 1 min), annealing (64°C for 1 min) and extension (72°C for 1 min. PCR

products were run on a 8% TBE acrylamide gel Novex® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and revealed by ethidium bromide (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). A 691-pb DNA fragment containing huCD20 was detected on samples from inoculated animals. To verify DNA samples, a normal murine endogenous gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) was also PCR amplified as control using specific primers (5'-AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3', 5'-GAAGATGGTGATGGGCTTCC-3') as described above²⁵².

Antibodies concentrations

Blood samples were collected at the vein of the eye with heparin mini capillary blood tube twice a week from D13 to the death of animals. Tubes were centrifuged (2000 rpm for 30 minutes) and plasma was frozen at -20° C until analysis. Rituximab and infliximab plasma concentrations were measured using enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) adapted from methods described previously^{281,282}. Briefly, microwell plates (Nunc, Richester, NY) were coated with an anti-rituximab idiotype monoclonal antibody (MCA 2260, Serotec, Cergy Pontoise, France) or recombinant human tumor necrosis factor alpha (TNF α , Tebu, Le Perray en Yvelines, France) at concentration of 1 μ g/mL and 0.75 μ g/mL, respectively. Mouse plasma, diluted 1/100 in PBS buffer, was added to the wells and a goat anti-human IgG conjugated to horseradish peroxidase (A2290, Sigma, Lyon) was used for detection. The plates were developed using the substrate generator Sigmafast® O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (P9187, Sigma, Lyon, France) and absorbance was read using a spectrophotometer. Therapeutic antibodies concentrations were calculated using calibration curves of known concentrations of rituximab or infliximab. The lower limits of quantification of these assays were 0.2 μ g/mL and 0.04 μ g/mL of rituximab and infliximab, respectively.

Rituximab Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling

In untreated mice, the injection of EL4-huCD20-Luc cells was followed by an exponential increase in bioluminescence activity which was described by: $dA/dt = k_{in} \cdot A_0 - k_{out} \cdot A$ [equation 1] where A is bioluminescence, A_0 is baseline bioluminescence (measured on D13), k_{in} is a zero order tumor production constant (describing an exponential growth) and k_{out} is a first order constant describing spontaneous tumor lysis (decrease in bioluminescence).

Rituximab pharmacokinetics and concentration-effect relationship were modeled simultaneously. The elimination of infliximab was described by a conventional monoexponential decline: $dC/dt = k_{10} \cdot C$ [equation 2] where C is the plasma concentration of the therapeutic antibody and k_{10} is a first order elimination constant. The plot of rituximab plasma concentrations over time in PR showed a deviation from this log-linear decrease, with an apparent acceleration in rituximab elimination with time. Because this could be explained by the binding of rituximab to an increasing tumor mass, the elimination rate of the mAb was described by the following

equation: $\frac{dC}{dt} = k_{10} \cdot \left(1 - \frac{A_{nadir}}{A}\right) \cdot C$ [equation 3] where C is the plasma concentration of the

therapeutic antibody, k_{10} is a first-order rituximab elimination constant and A_{nadir} is the minimum observed value of A during rituximab treatment.

In CR and PR mice, the relationship between rituximab plasma concentration and bioluminescence was described by adding a sigmoid E_{max} model to equation [1], as follows:

$\frac{dA}{dt} = k_{in} \cdot A_0 - k_{out} \cdot A - k_{drug} \cdot \left(\frac{C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}\right)$ [equation 4] where k_{drug} is a zero order constant

corresponding to maximal rituximab-induced tumor lysis, EC_{50} is the concentration of rituximab leading to 50% of k_{drug} and γ is the slope factor. Because rituximab effect displayed an "on/off" pattern, γ was fixed to 10. Therefore, EC_{50} was the threshold concentration for which rituximab-induced tumor lysis was present. Pharmacokinetic and concentration-effect modelling were performed using WinNonLin professional 4.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, California, USA).

Statistics

The results of each series of experiments are expressed as the mean values \pm SEM. Statistical tests were performed with InStat software (Graphpad software, San Diego, CA, USA) and included the paired Student's *t*-test, Tukey-Kramer multiple comparisons test and Wilcoxon test when appropriate. Survivals were calculated using the Kaplan-Meier method and were calculated from the day of lymphoma cell inoculation to the death of animals. Comparison of survivals was performed using the log-rank test. A P-value < 0.05 was considered significant.

Results

Therapeutic effect of rituximab

In all mice, an intravenous injection of 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells led to the development of tumors involving lymph nodes, spleen, liver and bone marrow, these organs being infiltrated by CD20 positive large lymphoma cells (D.D. et al., manuscript submitted, July 2008). BLI analysis showed an exponential increase in activity corresponding to the *in vivo* growth of lymphoma tumors (Figure 1A) with 73% and 100% of mice having a quantifiable lymphoma development on D9 and D13, respectively. Death was observed in all mice after a median time of 22 days (range: 15-27 days) (Figure 1B). EL4-huCD20-Luc cells could be detected by PCR in lymph nodes 2 weeks (W2) after lymphoma cells inoculation and at W3 and W4 in bone marrow and liver, respectively (Figure 1C). In mice treated with 6 mg/kg of rituximab one day after inoculation of EL4-huCD20-Luc cells, rituximab prevented the development of lymphoma tumor (Figure 1A), leading to a significantly longer survival (Figure 1B) with 100% of mice in CR. Mice sacrificed 60 days after lymphoma cell inoculation showed no lymphoma involvement in lymph nodes, thymus, spleen or liver as assessed by macroscopic examination and cytometry analysis of huCD20⁺ cells (data not shown). EL4-huCD20-Luc cells were detected by PCR at W2 in lymph nodes and at W3 in bone marrow but were undetectable at W4 in all organs collected (Figure 1C)

Influence of tumor burden on rituximab response

To analyse the dose-response relationship of rituximab, we infused doses of 6 mg/kg, 12 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg of rituximab on D13, the time needed for the development of a disseminated disease quantifiable by BLI. We observed that 6 mg/kg of rituximab did not modify survival, median survival time being 22 days (range: 16-27 days) (Figure 1D) whereas mice treated with 12 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg of rituximab had a significantly longer survival than

those of the control group with median survivals of 28 days (range: 19-34 days), 32 days (range: 19-60 days) and 43 days (range: 37-60 days), respectively (Figure 1D). The 20 mg/kg dose of rituximab led to a variable response, with 23% of mice in CR, 59% in PR and 18% in PD (Figure 2A). BLI analysis showed a slight reduction of lymphoma growth in PD mice compared to untreated mice whereas lymphoma growth was completely abrogated, with undetectable disease, in mice with CR (Figure 2B). As defined in the Methods section, mice with PR had a partial and transient decrease of bioluminescence activity. Median survival of mice with PD was not different from that of the control group (22 days, range: 17-28 days) whereas survivals were significantly longer for mice with PR (median: 33 days, range: 27-42 days, $P < 0.05$) or with CR (100% of mice alive at 60 days, $P < 0.05$) (Figure 2C).

Because our aim was to develop an animal model representative of the variability in response observed in treated patients, the 20 mg/kg dose of rituximab was selected to study the influence of tumor burden on rituximab plasma concentrations and efficacy. Tumor burden was measured before rituximab injection on D13. This was done for each lymphoma tumor and measured in A.U., arbitrary unit corresponding to the bioluminescent activity of the tumor site in number of grey level divided by the volume in pixel and corrected by the absorption of light by tissues according to tumor localization. For mice displaying several lymphoma tumors, tumor burden was assessed by the sum of specific bioluminescence activity of all tumor sites. Thus, the value of tumor burden reflects not only the size but also the bioluminescence activity of all lymphoma tumor sites (D.D. et al., manuscript submitted, July 2008). After the inoculation of 8×10^3 EL4-huCD20-Luc cells, median tumor burden on D13 was 1.52×10^6 A.U. (range: 2.22×10^4 - 5.09×10^6 A.U.). There was significant differences in tumor burden on D13 between the three types of response to rituximab (Figure 3A, $P < 0.05$). We therefore defined three groups of animals, with low ($< 0.15 \times 10^6$ A.U., $n = 7$, 18%), intermediate (0.15×10^6 to 3×10^6 A.U., $n = 24$, 62%) or high ($> 3 \times 10^6$ A.U., $n = 8$, 20%) tumor burden. Mice with a low tumor burden had a significantly higher CR rate (66%) and a significant longer survival (66% alive at 60 days) than mice with intermediate (CR rate: 0%, median survival: 30.5 days, range: 18-37 days) or high

tumor burden (CR rate: 0% and median survival: 22.6 days, range: 17-33 days) (Figure 3B, $P < 0.05$).

Pharmacokinetics and concentration-effect relationship of rituximab

In the group of mice treated with 20 mg/kg of rituximab, mAb plasma concentrations were measured twice a week from D13 until mice death ($n = 39$). Some mice ($n = 7$) were also administered 6 mg/kg of infliximab on D13 and the plasma concentrations of this mAb were measured at the same times as rituximab. The presence of tumor had an influence on rituximab pharmacokinetics since the control group without tumor had significantly higher rituximab concentrations than the group with a tumor involvement. In inoculated mice, rituximab concentrations were higher in the animals with lower tumor burden than in those with intermediate or high tumor burden (Figure 4A). An association between concentration and response was found since mice in CR had significantly higher rituximab concentrations than mice in PR or PD (Figure 4B). Rituximab concentration had also an influence on survival since it was significantly better in mice with rituximab concentrations higher than 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 14 days after mAb infusion than in those with a lower concentration (Figure 4C).

We developed a mathematical model (Equation 1) describing tumor growth in untreated mice and integrating both an exponential growth rate and a spontaneous tumor lysis. A large inter-individual variability was observed in the parameters (Figure 5A), with k_{out} values = 0 (i.e. no spontaneous tumor lysis) in some mice. Since infliximab does not bind to mouse TNF α , the pharmacokinetics of this mAb should not be influenced by tumor mass. Mean (inter-individual CV) estimated infliximab parameters were: volume of distribution (V_d) = 2.0 mL (106%) and $k_{10} = 8.2 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (54%). In mice with CR (Figure 5B), decrease in rituximab concentration was log-linear and the pharmacokinetics of this mAb could therefore be described by a conventional equation (Equation 2). In these mice, mean (inter-individual CV) rituximab pharmacokinetics parameters were: $V_d = 4.8 \text{ mL}$ (36%) and $k_{10} = 6.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (31%). In mice with PR, decrease in tumor mass stopped approximately 13 days after rituximab injection, at which time tumor mass

reinforced (Figure 5C). There was an acceleration in rituximab elimination concomitant with this tumor reincrease and rituximab pharmacokinetics were satisfactorily described by a model integrating tumor mass (Equation 3). Mean (interindividual CV) parameters were: $V_d = 2.1$ mL (82%) and $k_{10} = 5.3 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (64%).

In PR and CR mice, the concentration-effect relationship of rituximab was satisfactorily described by a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model (Equation 4 and Figure 5A). Because during rituximab treatment, bioluminescence decreased in a log-linear manner, i.e, independently of rituximab concentrations, this model describes the effect of rituximab as an “on-off” phenomenon using a γ value of 10 (Figure 5B and 5C). Finally, we found a significant correlation ($r^2 = 0.89$) between tumor burden measured on D13 and K_{drug} , a constant quantifying rituximab efficacy (Figure 5D).

Anti-CD20 monoclonal antibody distribution

After infusion of a fixed dose of 130 μCi of Tc99m-labelled ibritumomab-tiuxetan (mulgG1 κ , muC2B8), we observed a significant ($r^2 = 0.97$) correlation between tumor burden and the amount of labelled mu-C2B8 antibody located in the tumor and detected by immunoscintigraphy (Figure 6A). This radioactivity located in the tumor decreased with time in mice with high tumor burden whereas it increased in mice with low tumor burden and slightly decreased in mice with intermediate tumor burden (Figure 6B). These data suggest that mice with high tumor burden “captured” more antibodies but these antibodies were more quickly released from tumor than in mice with low tumor burden. Intra-nodal distribution of Tc99m-labelled ibritumomab-tiuxetan was therefore evaluated 24 hours after infusion of 400 μCi of radiolabelled antibody on cuts of involved lymph nodes with different sizes (determined and quantified by BLI analysis). Immunohistochemistry and hematein-eosin-safran staining controls showed a homogeneous tumoral cells infiltration and an absence of hypoxic or necrotic area in all lymph nodes (data not shown). We found that small lymph nodes had homogeneous

distribution of labelled antibody within the tumor whereas antibody did not penetrate the middle of largest lymph nodes which was not vascularized (Figure 6C and 6D).

Discussion

Despite its efficacy, most of previously untreated patients with indolent NHL are in PR after rituximab monotherapy²⁷⁵⁻²⁷⁷. There is therefore a need for a better understanding of factors influencing rituximab efficacy. It has been reported^{273,283} that tumor burden could be one of them and may influence both rituximab exposure (i.e. dose-concentrations relationship) and rituximab efficacy (i.e. concentration-effect relationship)^{209,283-285}. The aim of the present study was to characterize the role of tumor burden on the dose-concentration-effect relationship using a syngeneic murine model of lymphoma expressing human CD20. We developed pharmacokinetic and PK-PD models which allowed to demonstrate the influence of tumor mass on rituximab pharmacokinetics and the influence of tumor burden on the dose-effect relationship of rituximab.

Murine lymphoma models are usually subcutaneous¹⁹⁰ and tumor growth estimated by the measure of two diameters¹⁴⁷. Our model shared characteristics usually observed in human with a disseminated disease involving mainly lymph nodes, spleen or liver and leading to the death of mice in absence of rituximab treatment. Furthermore, we have developed a quantitative BLI method which allows the assessment of global tumor growth in all animals and take into account the depth of each tumor. Given the fact that tumor cells expressed a constant level of human CD20 (mean (\pm SEM) of 126,350 (\pm 1,170) per cell; (D.D. et al., manuscript submitted) July 2008), it can be assumed that tumor burden as assessed by our quantitative method in different animals is proportional to the number of targets. We demonstrated that rituximab is able to cure animals with disseminated EL4-huCD20-Luc lymphoma with a clear dose-response relationship. Our murine model is the first model reproducing a disseminated lymphoma expressing human CD20 where tumor volume is the only variable parameter. It represents therefore a unique model to study the role of tumor burden on the dose-concentration-effect relationship of rituximab.

Tumor growth and rituximab pharmacokinetics were satisfactorily described by mathematical models. Because there was an interindividual variability in response with the 20 mg/kg dose, this dose was selected to study the sources of variability of clinical response reported in patients. For mice with CR, rituximab displayed a linear elimination whereas for mice with PR, rituximab elimination accelerated dramatically with the resumption of tumor growth. The lack of effect of tumor growth on infliximab pharmacokinetics indicates that the non-linear elimination of rituximab is not related to its Fc portion but more probably to a “consumption” of the mAb by its target tumor cells. The antibody distribution analysis demonstrated that it penetrated into the middle of small lymph nodes but not in that of large lymph nodes. We have verified that there was no necrotic area in the middle of large nodes and these results suggest that, in the case of large tumors, the anti-CD20 binds to the tumor cells at the periphery of the nodes but may not penetrate into the middle of the nodes. In this model, we clearly demonstrated a dose-response relationship of rituximab. In the group of mice treated with 40 mg/kg (n=6), all mice experienced a response with 3 PR and 3 CR. These mice had an intermediate- (n=3) or high- (n=3) tumor burden (data not shown) at the time of rituximab infusion suggesting that an increase in dose could compensate for larger tumors.

Our study was designed to analyze the role of tumor burden on the dose-concentration-effect relationship of rituximab. Mathematical models were used to confirm our analyses and to quantify the relationships. As observed in clinical studies ²⁷³, high rituximab plasma concentrations were associated with a better tumor response (Equation 4 and Figure 4B) and a longer mouse survival (Figure 4C). A high tumor burden on D13 was associated with low rituximab concentrations (Figure 4A), an impairment of rituximab concentration-effect relationship with low value of k_{drug} , a parameter corresponding to rituximab efficacy (Figure 5D), and both lower tumor response (Figure 3A) and shorter mouse survival (Figure 3B). The effect of tumor burden was not limited to its magnitude on D13 because in mice with partial or complete response, tumor mass was shown to accelerate rituximab elimination (Equation 3, Figure 5B and Figure 5C). Our PK-PD model was not appropriate to describe mice with progressive disease

(where, by definition, $K_{drug} = 0$) and, therefore, does not suggest a mechanism of tumor resistance to treatment. However, a slight reduction in tumor growth was observed in these mice, which had significantly higher tumor burden compared to mice with CR and PR. This suggests that the amount of available antibodies was dramatically low compared to the number of tumor cells, even if others mechanisms such as loss or mutation of CD20 may be also possible.

In human, rituximab is currently used at the same dose and schedules of infusion (i.e. interval and number of infusion) have been empirically defined. In the present study, we clearly demonstrated that tumor (CD20) burden influences both rituximab exposure and efficacy. Taken together, our results support the concept of the individual adjustment of rituximab dose to tumor burden. These results should be taken into account in the development of new schedules of antibodies administration in anticancer therapy.

Acknowledgements

The authors thank Danielle Degenne (Laboratoire d'Immunologie, CHRU de Tours, France), Anne Claire Duveau (Université François Rabelais Tours, Faculté de Médecine, Tours, France), Maryline Lemée, Stéphanie Rétif (CNRS UPS44, Orléans, France) and Aurélie Sergent (IFIPS Optronique, Paris, France) for their helpful assistance.

D.D. was supported by grant from Région Centre and fellowship from the Société Française d'Hématologie. This study was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (Grant number: 3229), the Institut National du Cancer and Cancéropôle Grand Ouest (MAb IMPACT – IMProving ACTivation of FcγRIIIa-expressing effector cells, pharmacogenetic-based optimisation of monoclonal antibody therapy for cancer – federative project) and by Roche France.

Authorship

Second article : Analyse de l'influence du volume tumoral

Contribution: D.D. designed and performed research, collected, analyzed, and interpreted data, and wrote the manuscript; G.C. and G.P. designed research, analyzed data, performed the coordination and funding of the study, interpreted data and wrote the manuscript; D.T., M.O., S.L., S.P. and A.L.P. performed experiments, analyzed data, and participated in the writing of the manuscript; H.W. and P.B. participated in the writing of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Guillaume Cartron, MD, Service d'Hématologie et Biothérapies, INSERM U847, CHU Lapeyronie, CHU Montpellier, 191 avenue du doyen Gaston Giraud 34295 Montpellier, France. Email: guillaume.cartron@med.univ-tours.fr

References

1. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc γ R11a gene. *Blood*. 2002;98:754-758.
2. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995-1001.
3. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2006;12:4027-4035.
4. Manshouri T, Do KA, Wang X, et al. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood*. 2003;101:2507-2513.
5. Witzig TE, Vukov AM, Habermann TM, et al. Rituximab therapy for patients with newly diagnosed, advanced-stage, follicular grade I non-Hodgkin's lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:1103-1108.
6. Hainsworth JD, Burris HA, 3rd, Morrissey LH, et al. Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000;95:3052-3056.
7. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*. 2001;97:101-106.
8. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.

9. Igarashi T, Kobayashi Y, Ogura M, et al. Factors affecting toxicity, response and progression-free survival in relapsed patients with indolent B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma treated with rituximab: a Japanese phase II study. *Ann Oncol.* 2002;13:928-943.
10. Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M, et al. Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. The IDEC-C2B8 Study Group. *Ann Oncol.* 1998;9:527-534.
11. Gordan LN, Grow WB, Pusateri A, Douglas V, Mendenhall NP, Lynch JW. Phase II trial of individualized rituximab dosing for patients with CD20-positive lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol.* 2005;23:1096-1102.
12. Cartron G, Blasco H, Piantaud G, Watier H, Le Guellec C. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;62:43-52.
13. Mangel J, Buckstein R, Imrie K, et al. Pharmacokinetic study of patients with follicular or mantle cell lymphoma treated with rituximab as 'in vivo purge' and consolidative immunotherapy following autologous stem cell transplantation. *Ann Oncol.* 2003;14:758-765.
14. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 1998;9:995-1001.
15. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003;171:1581-1587.
16. Shibata M, Hariya T, Hatao M, Ashikaga T, Ichikawa H. Quantitative polymerase chain reaction using an external control mRNA for determination of gene expression in a heterogeneous cell population. *Toxicol Sci.* 1999;49:290-296.
17. Ternant D, Mulleman D, Degenne D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit.* 2006;28:169-174.
18. Blasco H, Lalmanach G, Godat E, et al. Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *J Immunol Methods.* 2007.

19. Maloney DG. Follicular NHL: From Antibodies and Vaccines to Graft-versus-Lymphoma Effects. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007;2007:226-232.
20. Shipp MA. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? Blood. 1994;83:1165-1173.
21. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, et al. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 1997;15:3266-3274.
22. Regazzi MB, Iacona I, Avanzini MA, et al. Pharmacokinetic behavior of rituximab: a study of different schedules of administration for heterogeneous clinical settings. Ther Drug Monit. 2005;27:785-792.
23. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. Nat Med. 2000;6:443-446.
24. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. Blood. 2003;101:949-954.

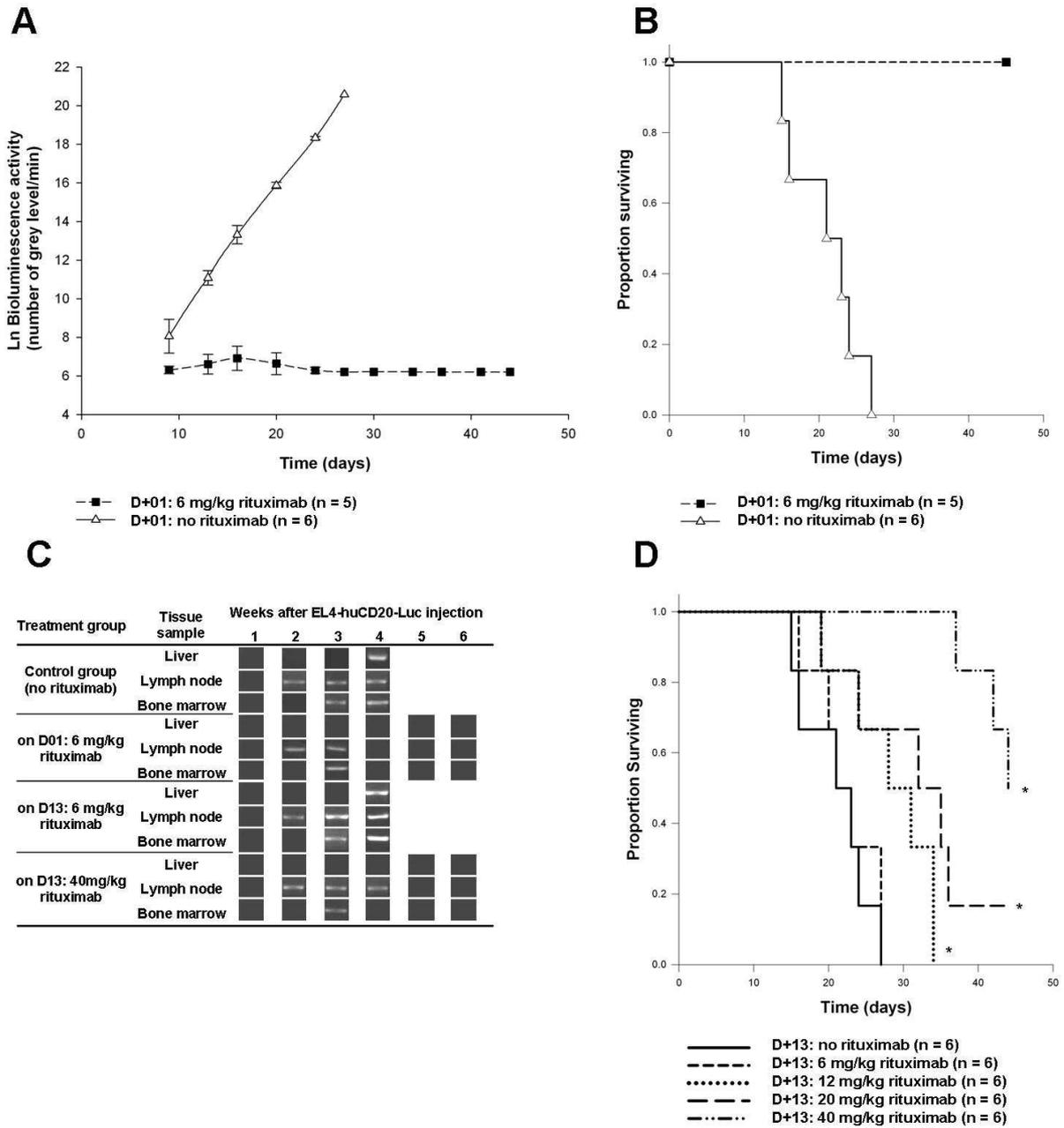


Figure 1. Therapeutic effect of rituximab after EL4-huCD20-Luc lymphoma cells inoculation.

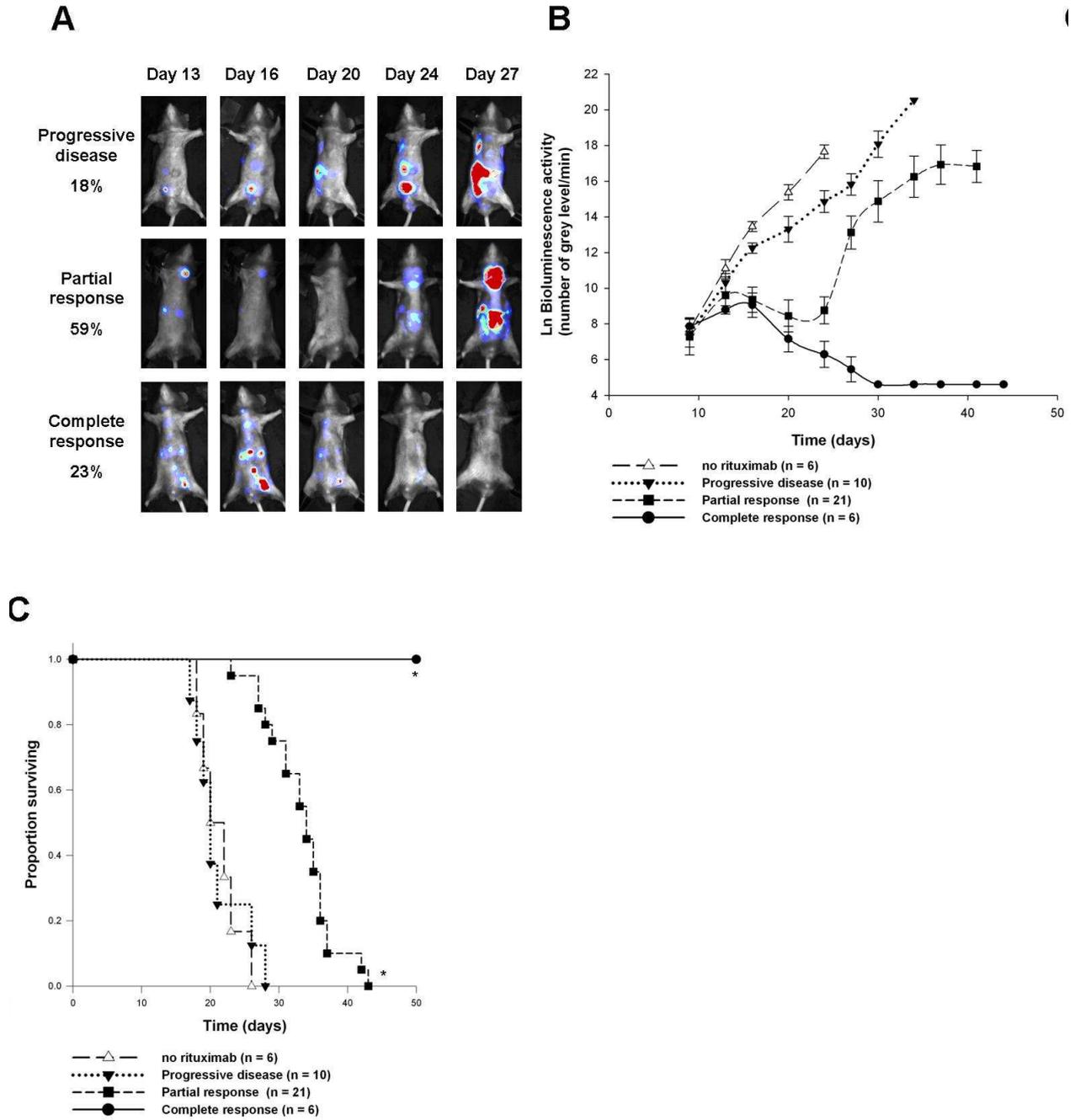


Figure 2. Variability of response to rituximab on pre-established lymphoma tumors.

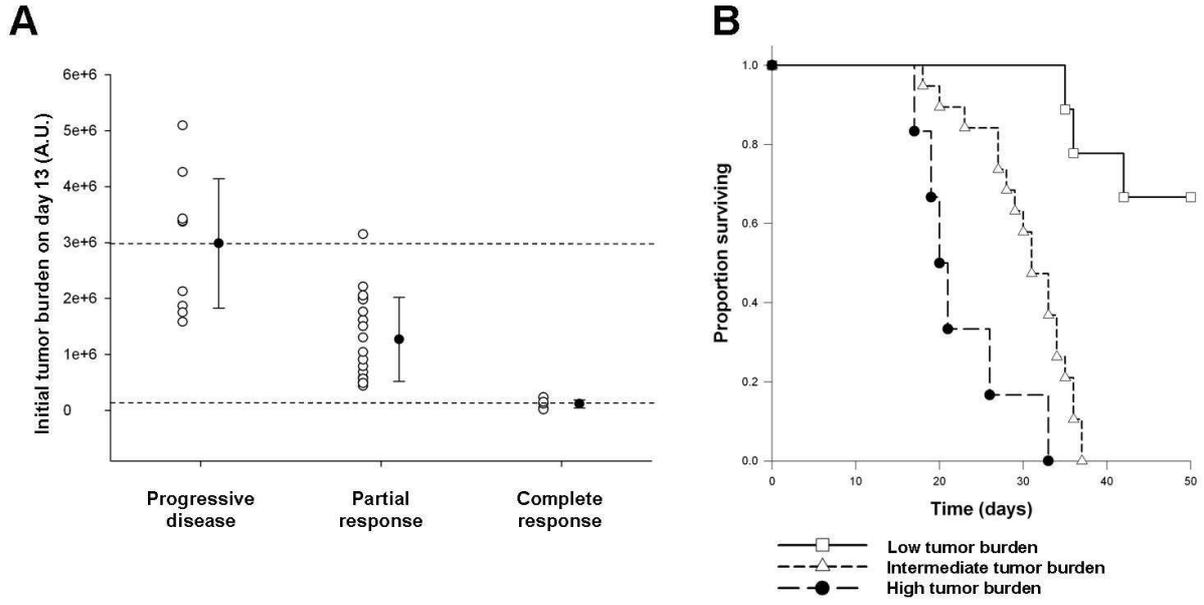


Figure 3. Tumor burden influence on response and survival.

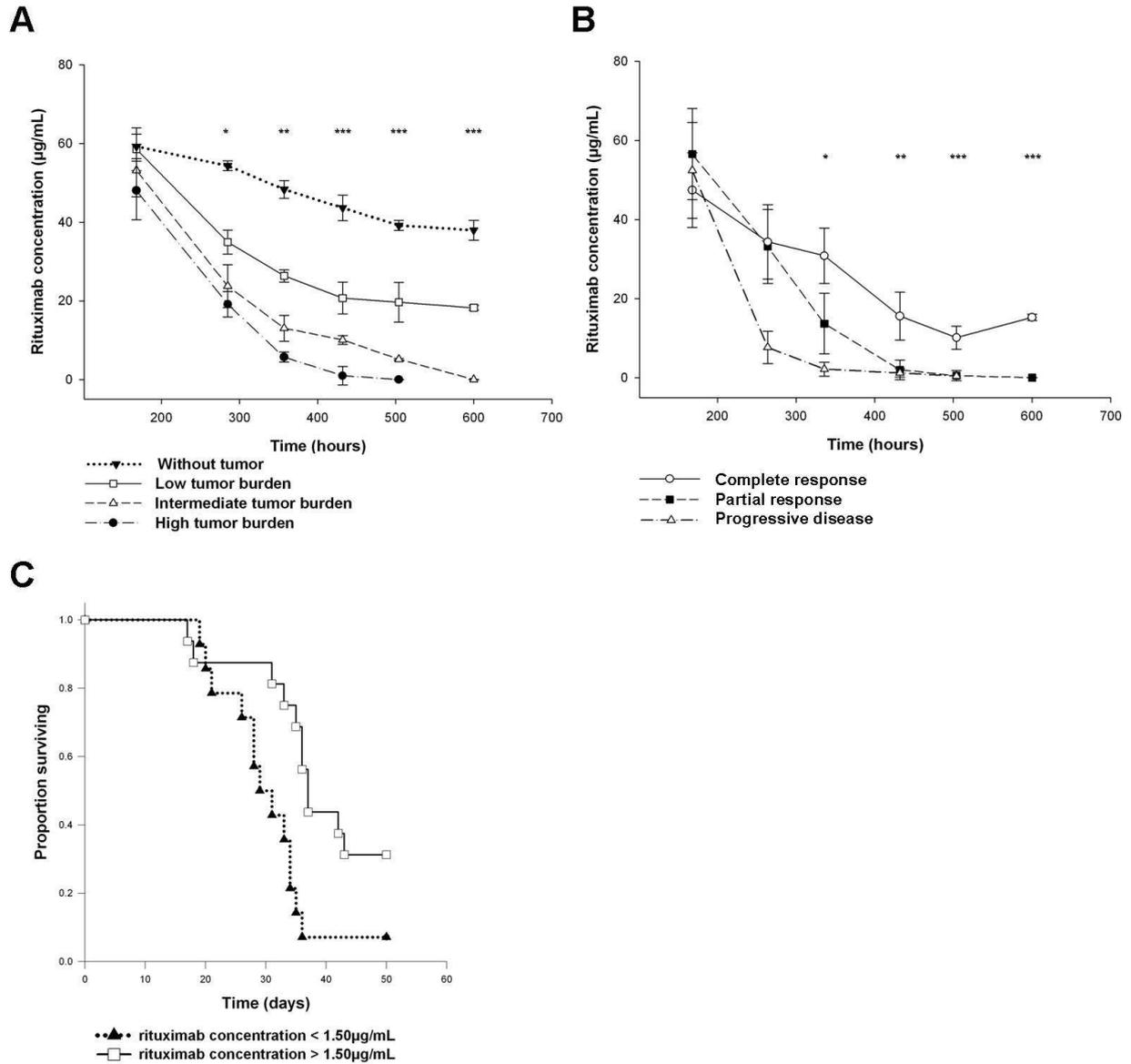
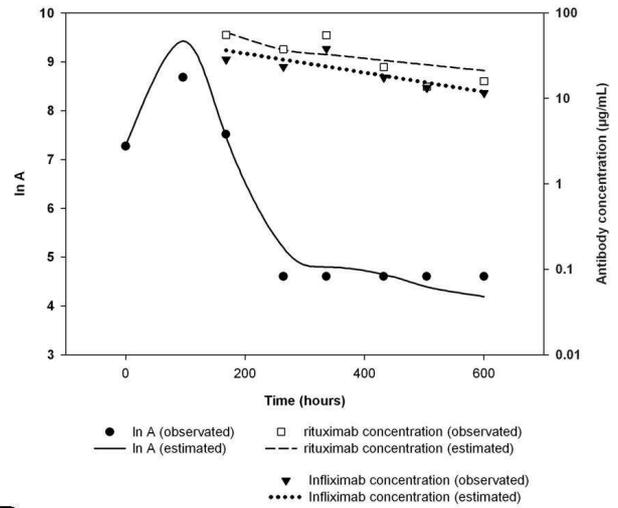


Figure 4. Rituximab exposure is influenced by tumor burden and influences response to treatment and survival.

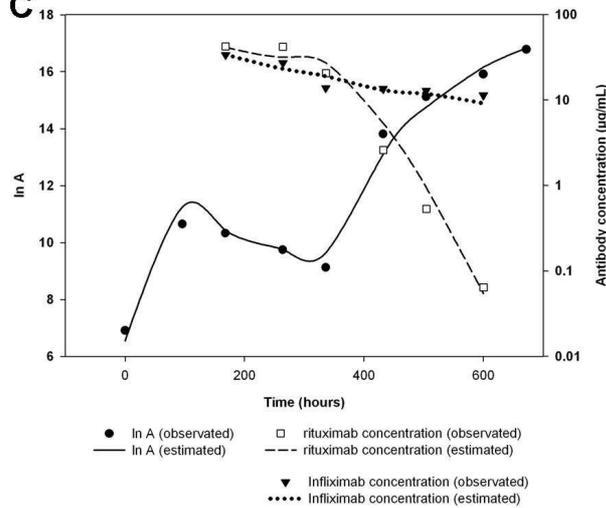
A

Parameters (CV _n %)					
Response	A ₀	K _{in} (h ⁻¹)	K _{out} (h ⁻¹)	K _{drug} (h ⁻¹)	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Untreated	7.81 (14)	0.0069 (72)	0.0017 (164)	-	-
Progressive Disease	7.32 (21)	0.0057 (61)	0.0015 (161)	-	-
Partial Response	6.30 (20)	0.0210 (45)	0.0025 (130)	0.057 (32)	13.40 (59)
Complete Response	7.87 (7)	0.0089 (59)	0.0023 (137)	0.033 (55)	2.31 (56)

B



C



D

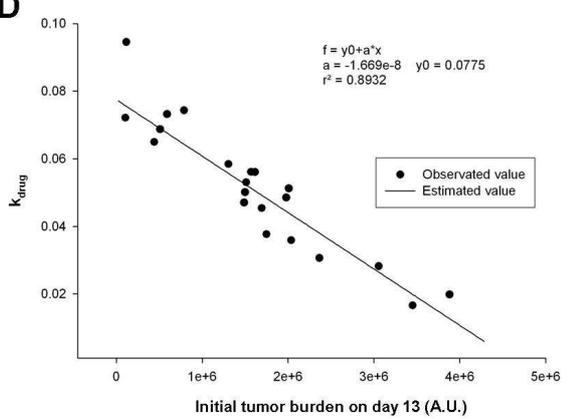


Figure 5. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of tumoral progression and rituximab plasma concentrations.

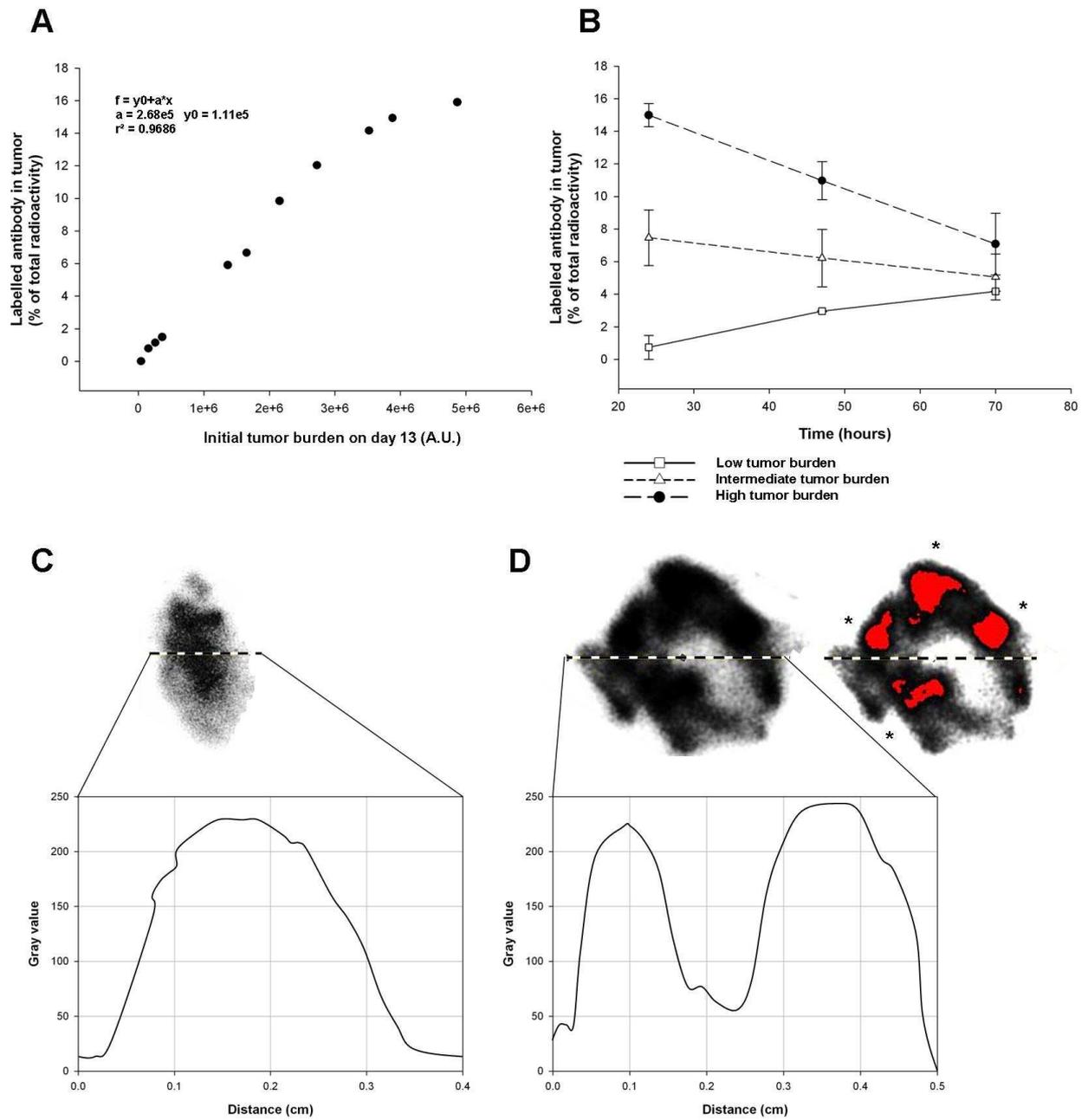


Figure 6. Distribution of mu-IgG1k anti-huCD20 (C2B8, ibritumomab-tiuxetan)

Figure Legends

Figure 1. Therapeutic effect of rituximab after EL4-huCD20-Luc lymphoma cells inoculation.

Mice were inoculated with 8×10^3 EL4-huCD20-Luc intravenously and then administered 6 mg/kg of rituximab (■) or PBS (△) the day after (D01) or administered different doses (6 mg/kg, 12 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg) of rituximab on pre-established lymphoma tumor on D13. Tumor growth and mice survival were evaluated by BLI on D9, D13, and then twice a week until the death of mice.

(A) Compared to control group, *in vivo* lymphoma growth was completely abrogated by administration of 6 mg/kg rituximab on D01 (significantly different $P < 0.001$). (B) Mice administered rituximab on D01 showed a significantly increased survival compared to control group ($P < 0.05$). (C) PCR analysis on liver, lymph nodes and bone marrow showed a disappearance of EL4-huCD20-Luc as early as 4 weeks after the infusion of rituximab on D01. (D) Mice survival was significantly increased after infusion of 12 mg/kg, 20 mg/kg or 40 mg/kg of rituximab on D13, (*) significant differences ($P < 0.05$), whereas 6 mg/kg of rituximab did not modify mice survival ($P > 0.05$).

Figure 2. Variability of response to rituximab on pre-established lymphoma tumors.

(A) A group of 37 mice was administered 20 mg/kg of rituximab on D13 and 23% of CR, 59% of PR and 18% of PD were observed. (B) *In vivo* tumor growth assessed by BLI in mice in PD (▼), PR (■) or CR (●) after infusion of 20 mg/kg of rituximab ($P < 0.001$). (C) Survival was significantly increased in mice in CR (●) compared to those in PR (■), PD (▼) or control group receiving PBS (△) on D13 (*) ($P < 0.05$).

Figure 3. Tumor burden influence on response and survival.

(A) Response to 20 mg/kg of rituximab administered on D13 was significantly different according to tumor burden ($P < 0.05$) ($n = 37$). Individual values of tumor burden are

represented by open circles and respective means (\pm standard deviations) by closed circles. (B) Three groups of animals with low ($< 0.15 \times 10^6$ A.U., $n = 7$) (\square), intermediate (0.15×10^6 to 3×10^6 A.U., $n = 24$) (\triangle) and high ($> 3 \times 10^6$ A.U., $n = 8$) (\bullet) tumor burden. Survival was significantly higher for mice with low tumor burden compared to mice with intermediate and high tumor burden ($P < 0.05$).

Figure 4. Rituximab exposure is influenced by tumor burden and influences response to treatment and survival.

(A) Mice without tumor had significantly higher rituximab concentrations than mice with tumor (\blacktriangledown). Mice with low-tumor burden ($< 0.15 \times 10^6$ A.U.) (\square) had significantly higher rituximab concentrations than those with intermediate (from 0.15×10^6 to 3×10^6 A.U.) (\triangle) or high ($> 3 \times 10^6$ A.U.) tumor burden (\bullet) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). (B) Mice in CR (\circ) had significantly higher rituximab concentrations compared to mice in PR (\blacksquare) or in PD (\triangle) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). (C) A concentration above $1.5 \mu\text{g/mL}$ 14 days after rituximab infusion had a significant influence on survival ($P < 0.05$).

Figure 5. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of tumoral progression and rituximab plasma concentrations.

(A) Pharmacodynamic parameters describing tumor mass in treated and untreated mice. Results are given as mean (interindividual CV). (B) Representative examples of animals in CR and (C) in PR after rituximab infusion : observed tumor BLI (\bullet), rituximab (\square) and infliximab (\blacktriangledown) plasma concentrations, and model-predicted tumor BLI (continuous line), rituximab (dashed line) and infliximab (dotted line) plasma concentrations. (D) Relationship between tumor burden and k_{drug} , a pharmacodynamic parameter which quantifies rituximab efficacy, observed values (\bullet) and model-predicted values (continuous line) ($r^2 = 0.89$).

Figure 6. Distribution of mu-IgG1k anti-huCD20 (C2B8, ibritumomab-tiuxetan)

(A) A group of 30 mice received 130 μCi of radiolabelled ibritumomab and biodistribution was assessed by immunoscintigraphy. Amount of radioactivity was correlated with tumor burden ($r^2 = 0.97$). (B) Radioactivity decreased with time for mice with high ($> 3 \times 10^6$ A.U.) (●) and intermediate (from 0.15×10^6 to 3×10^6 A.U.) (Δ) tumor burden whereas it increased for mice with low ($< 0.15 \times 10^6$ A.U.) (\square) tumor burden. (C and D) To evaluate antibody tissue distribution, a group of mice ($n = 20$) received 400 μCi of radiolabelled ibritumomab and was sacrificed on D1. Involved nodes identified and quantified by BLI were then collected and radioactivity was evaluated on 3 μm cuts. The smallest nodes showed a homogeneous antibody distribution whereas no radioactivity was found in the middle of the biggest nodes. Blood vessels (*) and radioactivity were co-localized at the peripheral of the nodes. The results shown are representative of independent experiments.

IV - Matériels et méthodes complémentaires à ceux de l'article

A - Analyse de l'impact de la tumeur sur la concentration circulante en rituximab

Des animaux C57Bl6J (mâles, 10-12 semaines) (Charles River, L'Arbresle, France ou Service d'élevage CDTA, Orléans, France selon disponibilités) ont reçu une injection de $8 \cdot 10^3$ cellules EL4-huCD20-Luc lavées et reprises en PBS ou une injection de PBS. Les animaux ont été répartis en trois groupes ($n = 10$ pour chaque groupe). 13 jours après l'inoculation des animaux, une dose de 6 mg/kg de rituximab (ch-IgG1k anti-CD20, ch-C2B8, MabThera® Produits Roche, Neuilly, France) a été injectée par voie intraveineuse dans la queue. Les animaux ont ensuite eu un prélèvement de plasma dans la veine de l'œil après 0, 2, 5 heures, 2, 5, 31, 62, 93, 124, 155 jours. Sur ces échantillons le rituximab a été dosé conformément à la méthode présentée dans l'article. Une analyse des données et une modélisation pharmacocinétique ont été réalisées.

B - Tomographie par émission de positrons à l'aide zévalin marqué au cuivre 64

Des animaux C57Bl6J (mâles, 10-12 semaines) ont reçu une injection de $8 \cdot 10^3$ cellules EL4-huCD20-Luc. Nous avons ensuite réalisé un marquage de l'ibritumomab-tiuxetan au cuivre 64 afin de suivre sa bio distribution par tomographie par émission de positrons (TEP). Cet élément radioactif émet deux rayons gamma diamétralement opposés ce qui permet son suivi par TEP adaptée au petit animal. Dans un premier temps nous avons préparé un tampon de formulation du marquage de l'anticorps (76 mg de chlorure de sodium, 28 mg

d'hydrogénophosphate de sodium, 2 mg de phosphate de potassium, 2 mg de chlorure de potassium, q.s.p. 9,5 mL eau ppi sans DTPA). Nous avons ajouté 0,5 mL de sérum de souris C57Bl6J (préparé à partir d'une souris saine) et ajusté le pH à 7,1. Nous avons ensuite ajouté dans un flacon sous vide (l'oxygène de l'air empêchant la réaction) 0,344 mM d'acétate de sodium, 5,5 mCi de cuivre 64 (Amersham Health, Vélizy, France) 0,5 mL d'ibritumomab-tiuxetan (mu-IgG1k anti-CD20, muC2B8, Zevalin®, Bayer Healthcare, Ly-lez-Lannoy, France) sous une très faible agitation en évitant la formation de bulles d'air tout en restant sous vide. Après 30 minutes de préparation nous avons ajouté le tampon de formulation q.s.p. 8 mL. Un contrôle de l'efficacité du marquage et de la pureté de la solution a été réalisé par radio-HPLC.

Nous avons ensuite préparé les seringues contenant l'anticorps radiomarqué. 13 jours après l'inoculation des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc les animaux ont reçu une dose de 0,5 mCi de zévalin marqué au cuivre 64. Après 30 minutes les animaux ont suivi un examen TEP de 30 minutes sur le système eXplore adapté au petit animal (eXplore, General Electrics Healthcare, Vélizy, France)

C - Recrutement d'effecteurs cellulaires au niveau de la tumeur (essais ROICIL)

Nous avons décidé d'analyser le recrutement des populations cellulaires immunitaires au niveau de la tumeur lors d'un traitement par le rituximab. Ce protocole a été réalisé en collaboration avec l'UMR 6218 Immunologie et embryologie moléculaire, équipe Immunité acquise et allergie. Des animaux C57Bl6J (mâles, 10-12 semaines) (Charles River, L'Arbresle, France ou Service d'élevage CDTA, Orléans, France selon disponibilités) ont reçu une injection de 8.10^3 cellules EL4-huCD20-Luc lavées et reprises en PBS par voie intraveineuse dans la queue (10 animaux pour chaque condition) ou de PBS seulement (groupe

d'animaux non inoculés). 13 jours après, certains groupes d'animaux ont reçu une unique injection à la dose de 20 mg/kg de rituximab par voie intraveineuse dans la queue des animaux. Dès J+13 et jusqu'à leur mort, les animaux ont subi, deux fois par semaine, un examen de bioluminescence dans les conditions décrites précédemment. A J+21, J+24 et J+27 des groupes d'animaux (non inoculés, inoculés et non traités, inoculés et traités) ont été sacrifiés. Lors de l'autopsie l'ensemble des ganglions lymphatiques présentant un développement tumoral (identifié et confirmé lors des examens de bioluminescence) a été prélevé. Les échantillons ont été broyés et filtrés afin de récupérer les cellules présentes. Après avoir lysé les globules rouges et effectué différents lavages, des marquages ont été effectués à l'aide d'anticorps anti CD19 murin (muCD19), anti CD4 murin (muCD4), anti CD8 murin (muCD8), anti CD11b murin (muCD11b), anti CD11c murin (muCD11c) et anti CD20 humain (huCD20). Après marquage et analyse par cytométrie de flux sur la plateforme d'Immunologie cellulaire d'Orléans les proportions des différents types de populations cellulaires ont été déterminées. En complément une analyse de la formation sanguine des animaux a été effectuée régulièrement.

V - Résultats complémentaires à ceux de l'article

Compte tenu des contraintes qui nous ont été imposées lors de l'écriture de l'article certains résultats et interprétations n'ont pas pu être exposés. Nous souhaitons les présenter dans cette partie complémentaire à l'article.

A - Relation dose - effet du rituximab

Nous avons pu montrer une relation dose - effet significative en utilisant des doses de rituximab de 6 mg/kg à 40 mg/kg par animal 13 jours après l'inoculation des cellules EL4-huCD20-Luc. Nous avons aussi pu montrer cette relation en analysant les courbes de suivi de l'activité tumorale. Pour ce faire, chacun des animaux des différents groupes de traitement ont subi un examen de bioluminescence 09, 13 jours après l'inoculation des cellules puis deux fois par semaine jusqu'à leur mort. L'activité de bioluminescence a ainsi été déterminée et les courbes moyennes calculées pour chacun des groupes (Figure 43). Le groupe d'animaux ayant eu une injection de 6 mg/kg de rituximab ne présente pas de différence significative dans la progression tumorale des animaux par rapport au groupe d'animaux contrôle. Le groupe recevant une injection de 12 mg/kg de rituximab montre une réponse au traitement. On peut observer une grande variabilité dans la réponse avec une très faible proportion d'animaux en réponse complète. L'effet du traitement est plus important dans le groupe d'animaux ayant reçu une injection de 20 mg/kg de rituximab. On retrouve une grande variabilité dans la réponse avec des animaux en absence de réponse, des animaux en réponse incomplète ou partielle et des animaux en réponse complète. C'est cette variabilité qui est à l'origine de cette courbe moyenne donnant l'illusion de tumeurs qui après avoir été en décroissance se développent à nouveau. Enfin l'effet est très important avec le groupe d'animaux recevant une injection de 40 mg/kg de rituximab, une proportion importante d'individus est en réponse complète.

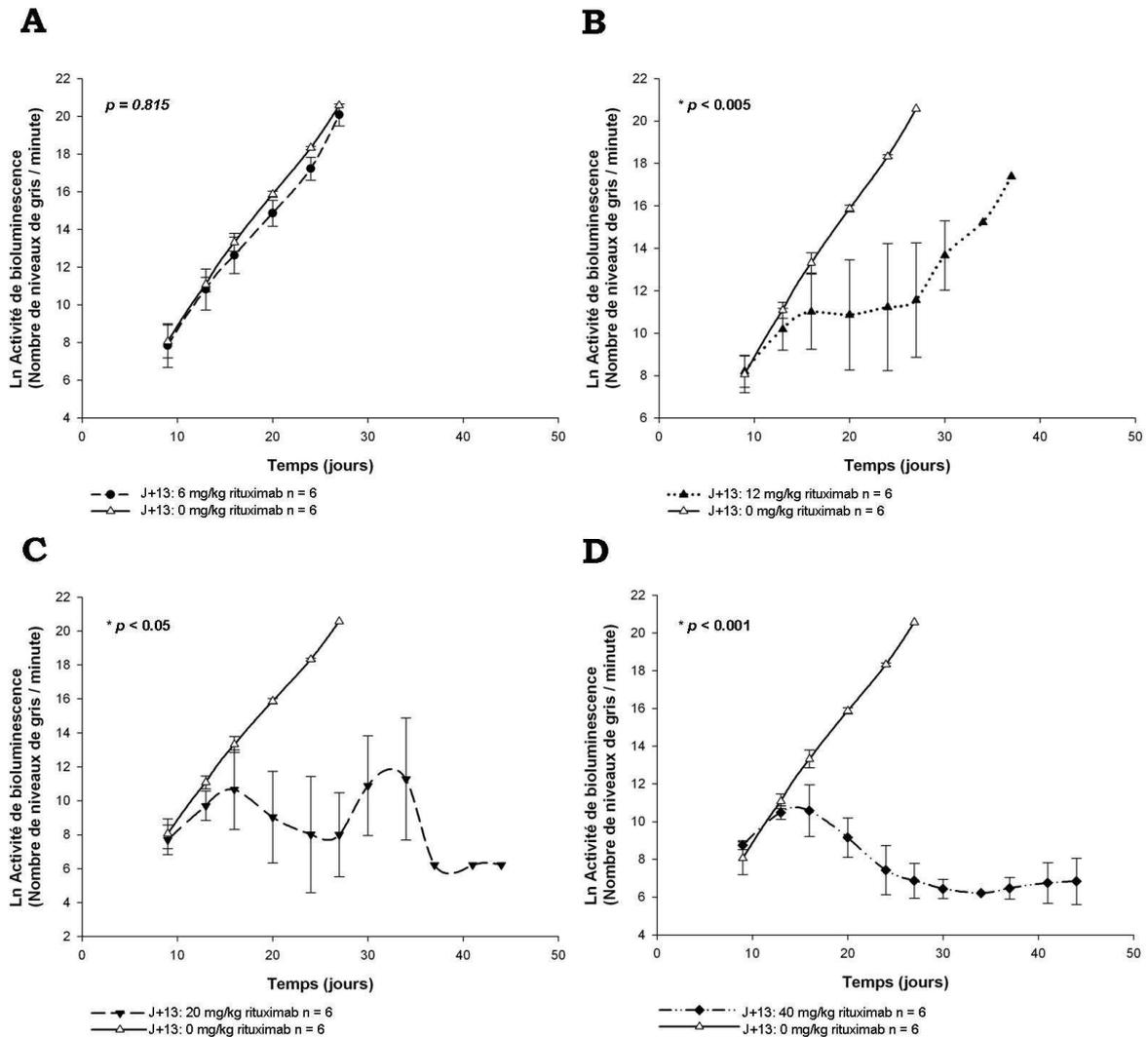


Figure 43 : Relation dose - effet d'un traitement par une unique injection de rituximab, 13 jours après l'inoculation de cellules EL4-huCD20-Luc.

Relation dose - effet d'un traitement par le rituximab. Les animaux reçoivent une injection intraveineuse de $8 \cdot 10^3$ cellules EL4-huCD20-Luc. Le groupe contrôle reçoit à J+13 une injection de 200 μ L de PBS. L'activité tumorale est régulièrement évaluée par imagerie de bioluminescence quantitative.

- A. Le groupe d'animaux reçoit une injection de 6 mg/kg de rituximab.
- B. Le groupe d'animaux reçoit une injection de 12 mg/kg de rituximab.
- C. Le groupe d'animaux reçoit une injection de 20 mg/kg de rituximab.
- D. Le groupe d'animaux reçoit une injection de 40 mg/kg de rituximab.

Finalement le suivi de la progression tumorale par bioluminescence quantitative confirme les résultats obtenus par l'analyse des courbes de survie des animaux présentée dans l'article. Ce suivi confirme la relation dose - effet observé et complète les données en apportant des informations sur les animaux en réponse partielle ou encore sur l'importante variabilité interindividuelle au traitement observée notamment avec le groupe d'animaux ayant reçu une injection de 20 mg/kg de rituximab.

B - Dosage du rituximab et de l'inflximab dans le plasma

Comme présentée dans l'article les dosages de rituximab et d'inflximab dans le plasma des souris ont été réalisés par méthode ELISA. A chacun des dosages effectués une gamme étalon a été réalisée. Les gammes de chacun des anticorps ont été modélisées.

En règle générale, lorsque l'on étudie l'interaction d'un médicament avec le métabolisme, si l'on fait l'hypothèse que la molécule se fixe de façon réversible à son récepteur, que l'intensité de l'effet observé est proportionnelle au nombre de récepteurs occupés et qu'un effet maximum est observé lorsque tous les récepteurs sont occupés, cette interaction suit la loi d'action de masse. La relation entre l'effet et la concentration libre du médicament peut être décrite par une hyperbole. En pratique et dans notre situation, la relation entre la concentration plasmatique de l'anticorps thérapeutique (C) et l'effet (E) induit *in vivo* dans notre modèle murin est un peu plus complexe, et est de type sigmoïde :

$$E = [E_{max} \cdot C_g / (EC_{50g} + C_g)]$$

Cette relation est définie par trois paramètres : E_{max} , l'effet maximum susceptible d'être induit par le médicament (efficacité du médicament), EC_{50} , la concentration du médicament nécessaire pour induire un effet égal à 50% de l' E_{max} (puissance du médicament), et g , le coefficient de Hill (caractérisant la pente

de la relation). Lorsque $g = 1$, on retrouve la relation hyperbolique dérivant de la loi d'action de masse. Ainsi cette allure sigmoïde caractéristique de ce modèle a été obtenue pour la mesure du signal d'absorbance en fonction de la gamme de concentration en rituximab (Figure 44) ou en fonction de la gamme de concentration en infliximab (Figure 45) pour l'ensemble des essais de dosages. Une modélisation de ces courbes étalons a été réalisée et les différents paramètres ont été déterminés pour le rituximab (Tableau 07) et pour l'infliximab (Tableau 08). Quelle que soit la séance de dosage ces paramètres sont très stables ce qui prouve la robustesse et la reproductibilité de la méthode.

C - Impact de la tumeur sur la concentration circulante en rituximab

Avant de réaliser la modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique présentée dans l'article, nous avons réalisé une étude des principaux paramètres de la pharmacocinétique du rituximab. Les données de dosages ont été ainsi analysées et les valeurs de volume de distribution, de clairance et de demi-vie de distribution de l'anticorps ont été déterminées et sont présentées dans le tableau 09 pour des groupes d'animaux une injection de cellules tumorales ou de PBS puis 3 jours après une injection de rituximab. Les comparaisons entre les différents lots ont été effectuées à l'aide de tests de Mann-Whitney. La pharmacocinétique du rituximab chez ces animaux peut être décrite à l'aide de deux phases : une première étape de distribution et une seconde d'élimination (Figure 46). On peut noter une différence significative des clairances et des demi-vies de distribution et d'élimination des animaux ayant une tumeur comparativement aux souris non inoculées (Figure 46). Ainsi ces données suggèrent fortement l'influence du volume tumoral sur l'exposition à l'anticorps.

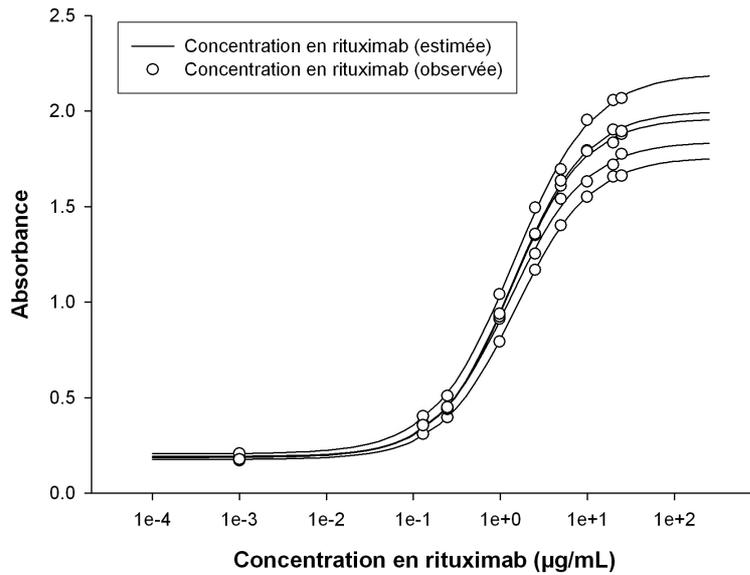


Figure 44 : Gammes étalons de dosage du rituximab.

Gammes de dosages du rituximab dans le plasma des souris, données observées en cercles et modélisées en traits continus.

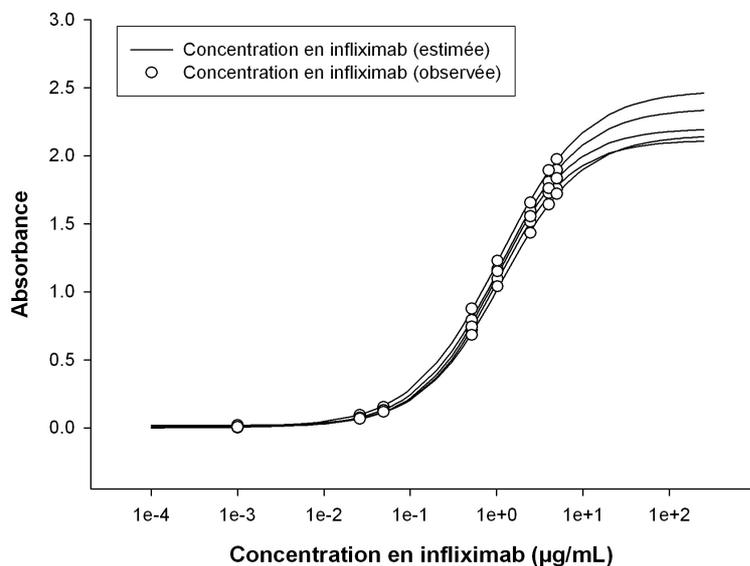


Figure 45 : Gammes étalons de dosage de l'infliximab.

Gammes de dosages de l'infliximab dans le plasma des souris, données observées en cercles et modélisées en traits continus.

Paramètres modélisation	Numéro de l'essai					Valeur moyenne
	1	2	3	4	5	
Emax	1.759	1.840	1.962	2.198	2.001	1.952
EC50	1.503	1.281	1.338	1.399	1.364	1.377
E0	0.177	0.187	0.193	0.207	0.188	0.190
gamma	1.009	0.996	1.041	0.952	1.023	1.004

Tableau 07 : Paramètres de modélisation de la gamme étalon du rituximab.

Paramètres modélisation	Numéro de l'essai					Valeur moyenne
	1	2	3	4	5	
Emax	2.349	2.115	2.481	2.200	2.154	2.260
EC50	1.068	0.991	1.064	0.991	1.153	1.053
E0	0.001	0.017	0.003	0.010	0.004	0.007
gamma	0.914	1.009	0.867	0.984	0.929	0.941

Tableau 08 : Paramètres de modélisation de la gamme étalon de l'infliximab.

Lot		Date dernière mesure (jours)	V1 (mL)	CL (mL/min)	V2 (mL)	CLD2 (mL/min)	T 1/2 distrib (heures)	T 1/2 élimin (jours)
1+2	19/20	72	0.30	0.08	0.22	0.08	40.1	7.8
3	10/10	6	0.26	0.11	0.21	0.08	44.8	4.6
Général	29/30	50	0.29	0.09	0.21	0.08	40.9	6.8
Valeur p			0.266	0.006	0.389	0.126	0.002	0.019

Tableau 09 : Paramètres de la modélisation pharmacocinétique.

Analyse de la pharmacocinétique de population, les lots 1 et 2 ont reçu une inoculation de 8.10^3 cellules EL4-huCD20-Luc, le lot 3 lui n'a rien reçu. Les 3 lots ont reçu une injection de rituximab à la dose de 6 mg/kg 13 jours après et ce dernier a été dosé dans le plasma à différents moments. La phase de distribution est définie par V1 (volume de distribution) et CL (clairance), la phase d'élimination par V2 et CLD2. Le premier temps correspond au temps $\frac{1}{2}$ de distribution en heures et le second au temps $\frac{1}{2}$ d'élimination en jours.

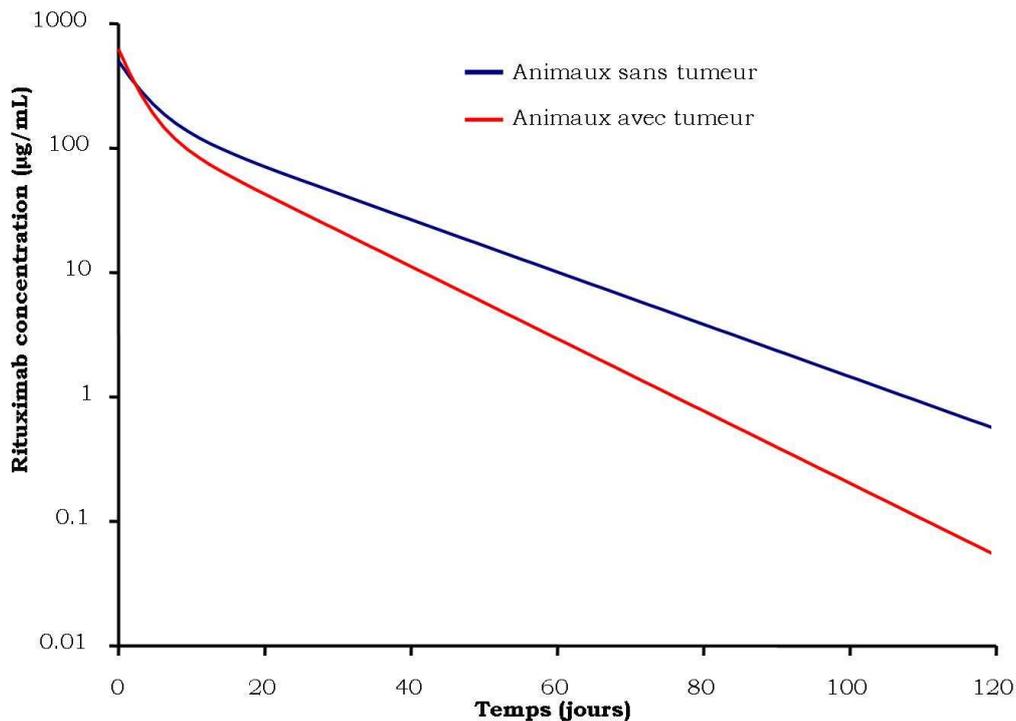


Figure 46 : Pharmacocinétique de population du rituximab.

La pharmacocinétique du rituximab chez les souris présente deux phases : une phase de distribution et une phase d'élimination. Cette évolution de la concentration en rituximab a été modélisée pour des animaux sans tumeur (bleu) ainsi que pour des animaux avec tumeur (rouge).

D - Modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique et réponse au traitement

Dans l'article nous avons présenté la modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique mise en place pour notre étude.

$$\frac{dA}{dt} = k_{in} \cdot A_0 - k_{out} \cdot A - k_{drug} \cdot \left[\frac{C^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}} \right]$$

Où dA/dt représente la progression tumorale au cours du temps, A_0 correspond à l'activité bioluminescente du volume tumoral avant traitement, C la concentration circulante en rituximab et A à la concentration en rituximab au moment de l'analyse. γ correspond à un facteur introduit par l'allure sigmoïde des courbes ; ce facteur est en relation avec EC_{50} , la concentration en anticorps nécessaire pour induire 50% de l'effet anti-tumoral maximal observé. Enfin le paramètre k_{in} correspond à la constante endogène de production de la tumeur, k_{out} à la constante de destruction endogène de la tumeur et k_{drug} est le facteur d'efficacité du traitement.

La figure 5 de l'article illustre cette modélisation par l'exemple de deux animaux présentant une réponse différente au traitement. La progression tumorale et l'évolution des concentrations sériques en rituximab (ainsi qu'en infliximab pour les animaux en ayant reçu) ont été modélisées pour l'ensemble des animaux et sont présentées en annexe de cette partie.

Cette étape nous a permis de définir les paramètres individuels de la modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique. Les valeurs moyennes ont été succinctement présentées dans l'article, le tableau 10 indique le détail de ces paramètres. Chez les souris traitées, l'examen conjoint de l'évolution des concentrations plasmatiques en rituximab et de l'activité tumorale montre trois types de profils :

Rituximab		PK-PD				PD-PK	
Réponse	souris	A0	Kin	Kout	Kdrug	V (L)	k10 (h ⁻¹)
Absence	446	9.10	0.0105	0.0061	-	0.0079	0.227
Absence	450	4.52	0.0098	0.0023	-	0.0163	0.026
Absence	454	7.21	0.0036	-	-	0.0109	0.054
Absence	459	7.65	0.0025	-	-	0.0174	0.072
Absence	460	7.77	0.0046	0.00065	-	0.0259	0.068
Absence	469	7.67	0.0034	-	-	0.0093	0.087
Partielle	436	6.53	0.0141	0.0049	0.049	0.0034	0.054
Partielle	437	6.91	0.0139	0.0054	0.056	0.0022	0.047
Partielle	440	5.96	0.0111	0.0021	0.067	0.0010	0.039
Partielle	441	6.56	0.0092	0.0020	0.053	0.0005	0.069
Partielle	442	7.13	0.0055	-	0.0470	0.0004	0.085
Partielle	443	6.50	0.0059	-	0.0444	0.0002	0.163
Partielle	444	8.36	0.0046	-	0.0404	0.0008	0.141
Partielle	445	5.35	0.0124	0.0017	0.063	0.0017	0.031
Partielle	447	7.78	0.0051	-	0.0456	0.0016	0.061
Partielle	448	4.98	0.0114	-	0.0691	0.0008	0.047
Partielle	456	5.27	0.0107	0.0023	0.074	0.0053	0.020
Partielle	461	4.42	0.0167	0.0031	0.040	0.0027	0.056
Partielle	462	4.57	0.0113	-	0.0651	0.0019	0.025
Partielle	463	7.03	0.0059	-	0.0528	0.0020	0.037
Partielle	466	4.68	0.0161	0.0022	0.075	0.0006	0.041
Partielle	467	6.07	0.0037	-	0.0276	0.0006	0.077
Complète	438	7.26	0.0426	0.0338	0.155	0.0042	0.0058
Complète	439	7.28	0.0057	0.0008	0.049	0.0076	0.0044
Complète	451	8.24	0.0099	0.0127	0.024	0.0035	0.0098
Complète	453	8.28	0.0015	0.0300	-	0.0055	0.0059
Complète	455	8.02	0.0016	0.0254	-	0.0033	0.0069

Infliximab	PK	
Souris	V (L)	K10 (h ⁻¹)
436	0.0023	0.0062
437	0.0007	0.0105
438	0.0036	0.0026
439	0.0061	0.0023
440	0.0007	0.0121
441	0.0004	0.0108
442	0.0005	0.0126

Tableau 10 : Paramètres individuels de la modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique.

Modélisation pharmacocinétique (PK) pharmacodynamique (PD) des animaux ayant reçu à J+13 une injection de rituximab à la dose de 20 mg/kg. L'importante variabilité de réponse observée avec ce traitement est retrouvée dans cette modélisation avec des animaux en absence de réponse, des animaux en réponse partielle ou transitoire et des animaux en réponse complète. La première partie du tableau donne les paramètres de la modélisation PK-PD et PD-PK du rituximab. La seconde partie présente les paramètres PK de la modélisation des animaux ayant reçu une dose d'infliximab.

Les souris en absence de réponse (n = 6) : l'activité tumorale augmente progressivement malgré l'administration de rituximab.

Les souris en réponse partielle (n = 16) : après administration du rituximab, l'activité tumorale décroît jusqu'à une valeur minimale, puis augmente à nouveau.

Les souris en réponse complète (n = 5) : après administration du rituximab, l'activité tumorale décroît puis devient et reste indétectable pendant toute la période de suivi.

Pour 7 souris, mortes prématurément, le nombre d'observations était insuffisant pour analyser les données.

Les quatre groupes considérés étaient animaux (A) non traités, (B) en absence de réponse, (C) en rémission partielle et (D) en réponse complète (les données complètes étant données en annexe) (Figures 47 et 48).

E - Tomographie par émission de positrons

Le marquage du zévalin au cuivre 64 a permis d'obtenir une pureté supérieure à 95%. La tomographie donne de très bons résultats puisqu'elle permet de suivre la biodistribution de l'anticorps via l'émission du cuivre 64. Trente minutes après le marquage on retrouve une majeure partie de l'anticorps en circulation et une partie se trouve au niveau du foie et la rate. Après 4 heures la distribution de l'anticorps est bien plus effective puisqu'on retrouve une majorité de l'anticorps radiomarqué au niveau du/des sites tumoraux identifiés par bioluminescence. La concordance entre les deux images (bioluminescence et tomographie par émission de positrons) est supérieure à 90%. On retrouve donc des résultats similaires à ceux obtenus par suivi scintigraphique de ce même anticorps marqué à l'indium. Cependant cet examen, via les données vidéo et les reconstructions, donne accès à une vue tridimensionnelle de l'animal et donc fournit des informations très nettes quand à la localisation anatomique des foyers sur

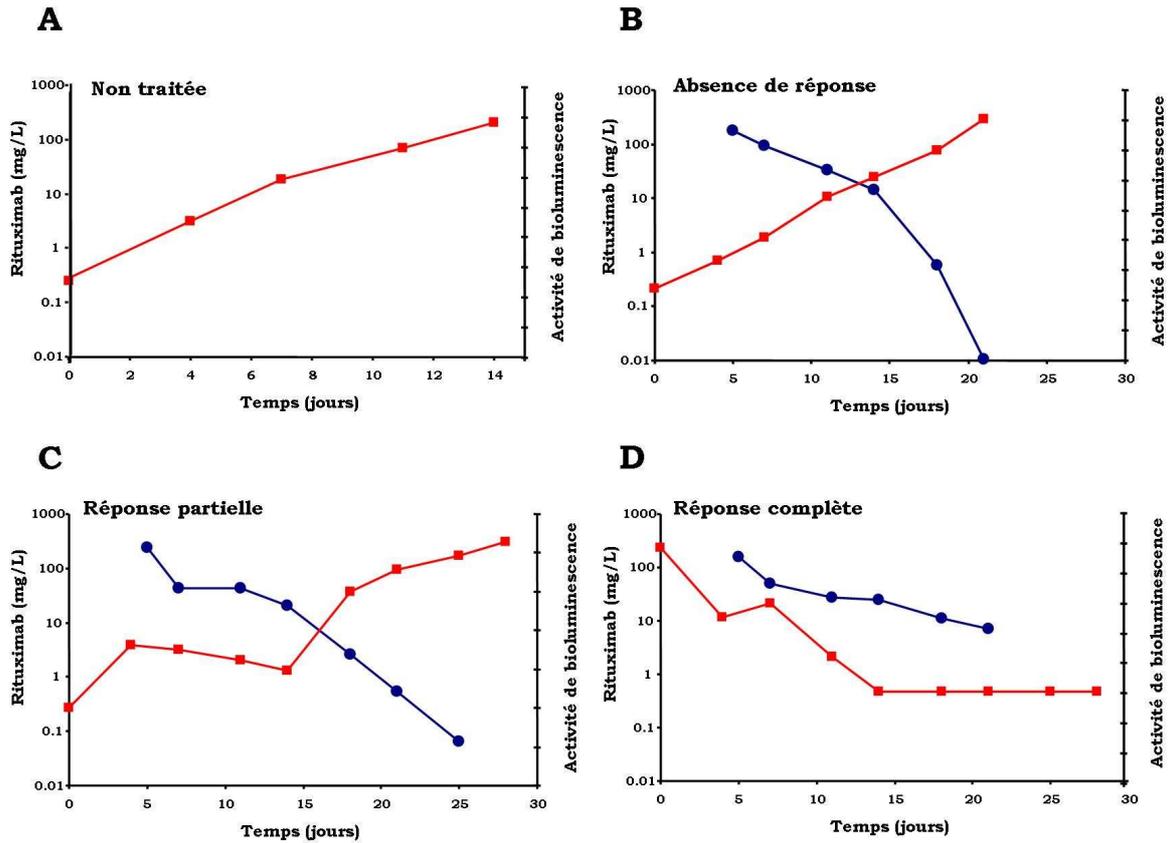


Figure 47 : Modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique.

Concentrations observées en rituximab (en bleu) et activité de bioluminescence de la tumeur observée (en rouge) pour des souris présentant des profils types.

- A. Une souris non traitée par le rituximab.
- B. Une souris en absence de réponse au traitement.
- C. Une souris en réponse ou rémission partielle.
- D. Une souris en réponse ou rémission complète.

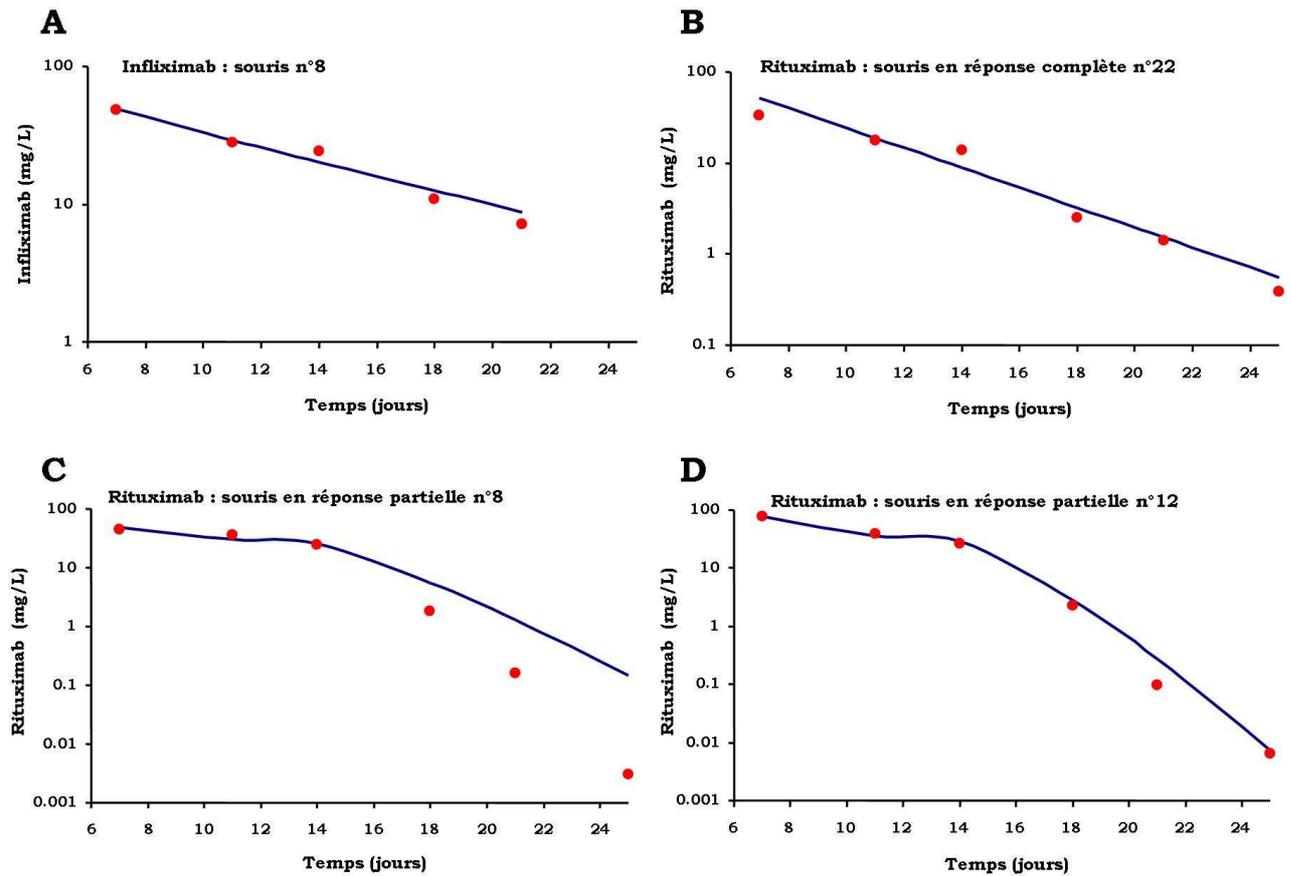


Figure 48 : Modélisation pharmacocinétique du rituximab pour les différents profils de réponse observés.

Pharmacocinétique du rituximab et de l'infiximab chez des souris typiques, données observées représentées en points rouges et données modélisées représentées en traits bleus.

A. La pharmacocinétique de l'infiximab est linéaire.

B. La pharmacocinétique du rituximab est linéaire chez les animaux en réponse complète.

C. D. La pharmacocinétique du rituximab n'est pas linéaire et est dépendante de la masse tumorale chez les souris en réponse partielle.

lesquels ce sont fixé les molécules d'anticorps radiomarqué. Ce système peut aussi être couplé à une imagerie scanner adaptée au petit animal. Ainsi par superposition des différentes images on parvient à une localisation extrêmement précise et fiable de la biodistribution de l'anticorps en rapport avec les cibles antigéniques identifiées par bioluminescence.

F - Recrutement d'effecteurs cellulaires au niveau de la tumeur

Nous avons analysé les populations de cellules immunitaires présentes au niveau des ganglions lymphatiques présentant un développement tumoral en l'absence de traitement et après un traitement par 20 mg/kg de rituximab 13 jours après l'inoculation des cellules tumorales (Figure 49). En ce qui concerne les cellules huCD20+ on remarque leur disparition progressive au sein des ganglions traités par le rituximab, à contrario du groupe témoin dans lequel leur proportion progresse. On observe aussi que dans le groupe d'animaux traités l'effet thérapeutique du rituximab est visible dès J+21 soit 7 jours seulement après le traitement avec une proportion de cellules tumorales significativement plus basse que celle des animaux ayant reçu du PBS. En ce qui concerne les populations cellulaires immunitaires recrutées au niveau de la tumeur après le traitement par le rituximab, on peut observer une réponse rapide avec une augmentation significative dès J+21 de la proportion de cellules muCD19+ (22,9% ± 4,1), muCD4+ (15,5% ± 2,9) et muCD8+ (18,7% ± 2,3). Cette tendance est confirmée dans les groupes de souris analysés 24 et 27 jours après inoculation des cellules. L'analyse des proportions de populations cellulaires muCD11b+ et muCD11c+, n'a permis d'observer aucune différence significative entre les différents groupes d'animaux (Figure 49).

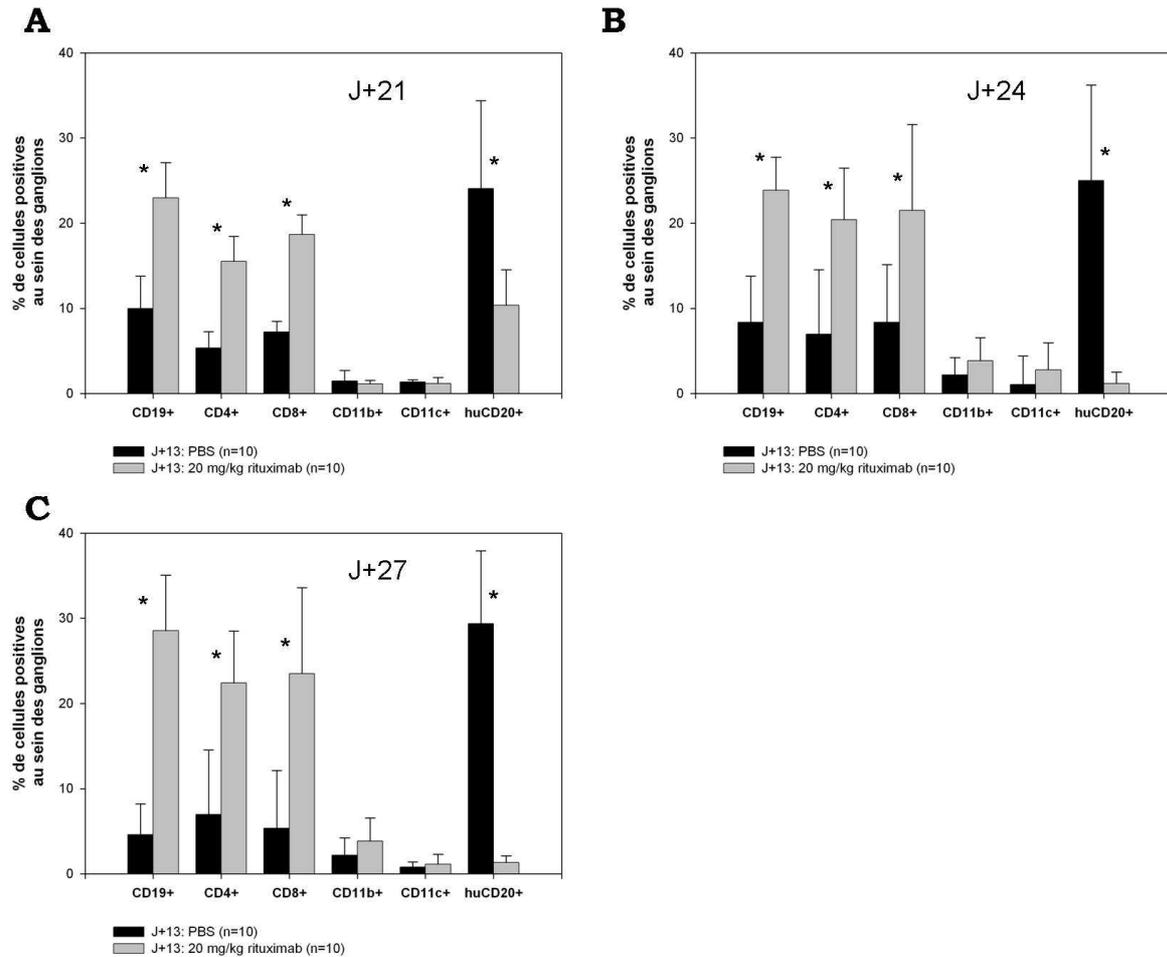


Figure 49 : Analyse des populations cellulaires immunitaires recrutées au niveau de la tumeur lors d'un traitement à la dose de 20 mg/kg de rituximab.

Proportions de cellules positives après marquage de cellules issues de ganglions ayant développé une tumeur après inoculation de cellules EL4-huCD20-Luc. Marquage par des anticorps anti CD19 murin, CD4 murin, CD8 murin CD11b murin, et CD11c murin. Enfin l'analyse de la proportion de cellules CD20 humain positive permet de révéler le développement tumoral au sein des ganglions. 13 jours après l'inoculation des cellules EL4-huCD20-Luc un groupe d'animaux a reçu une injection de PBS et un autre groupe a reçu une injection à la dose de 20 mg/kg de rituximab par voie intraveineuse.

A. Analyse des populations cellulaires 21 jours après l'inoculation.

B. Analyse des populations cellulaires 24 jours après l'inoculation.

C. Analyse des populations cellulaires 27 jours après l'inoculation.

VI - Discussion et conclusion

Nous avons testé l'efficacité thérapeutique du rituximab. Dans un premier temps, une dose de 6 mg/kg de rituximab a été injectée 24 heures après l'inoculation des cellules EL4-huCD20-Luc afin de reproduire les conditions expérimentales des essais de Di Gaetano *et al.*¹⁸⁸. Nous nous sommes ensuite intéressés au traitement de tumeurs établies : une seule injection de rituximab à dose progressivement croissante (de 6 mg/kg à 40 mg/kg) a été réalisée 13 jours après l'inoculation des cellules lymphomateuses (temps nécessaire au développement d'un lymphome quantifiable par imagerie de bioluminescence). La concentration en rituximab circulant a été évaluée par une méthode ELISA adaptée à l'analyse de faibles volumes de plasma. Dans ce modèle, nous avons étudié la relation entre la dose administrée et la survie des souris. Nous avons ainsi défini une dose de rituximab permettant l'obtention d'une grande variabilité dans la réponse au traitement, comme cela est observé chez l'homme. Pour l'ensemble des souris recevant cette dose, nous avons déterminé précisément le volume tumoral au moment de l'injection du rituximab et évalué les concentrations de rituximab au décours du traitement. Nous avons pu ainsi déterminer l'influence du volume tumoral au moment de l'injection sur la relation dose – concentration – effet du rituximab. L'analyse des concentrations de rituximab nous a permis de montrer une très grande variabilité d'exposition au rituximab semblable à l'observation faite chez l'homme. Nous avons pu modéliser les concentrations de rituximab et la progression des foyers tumoraux par la construction d'un modèle concentration-effet (PK-PD).

A - Modèle PK-PD et relation dose – concentration - effet

1 - Modélisation PK-PD

Chez les souris en rémission partielle, la décroissance de l'activité tumorale était exponentielle. Il est donc possible que la disparition des cellules tumorales ne soit pas dépendante de la concentration en anticorps. La reprise de la croissance de la tumeur se produisant probablement quand la concentration en rituximab n'était plus suffisante. Le modèle décrit dans l'article nous a permis de prendre en compte l'ensemble de ces phénomènes. Les données ont été décrites par le modèle de façon satisfaisante pour chaque groupe (voir graphes présentés en annexe et Figure 47). La précision de l'estimation des paramètres pharmacodynamiques a été correcte : pour chaque paramètre, le coefficient de variation (CV) médian était compris entre 5% et 37%. Pour certains paramètres, nous avons observé une grande variabilité interindividuelle. Pour k_{out} , la grande variabilité provient du fait que, pour certaines souris, il était très proche de 0, ce qui peut biaiser l'estimation de la variance d'échantillonnage. k_{out} correspond à une constante de destruction endogène de la tumeur, or il se trouve que dans notre modèle de tumeur diffuse une importante vascularisation s'effectue diminuant ainsi les phénomènes d'hypoxie et donc de destruction cellulaire ceci pouvant expliquer l'observation réalisée. Les phénomènes décrits par le modèle que sont la production exponentielle de la tumeur et la mort de certaines cellules, restent compatibles avec la réalité. Le modèle n'est pas à proprement parler un modèle physiologique indirect : il décrit une voie d'élimination de la tumeur par le rituximab (k_{drug}) distincte de l'élimination endogène de la tumeur (k_{out}) et prenant en compte la multiplication des cellules tumorales (k_{in}).

Chez les souris en réponse partielle, l'efficacité du rituximab semblait biphasique : pendant la première phase, le rituximab semblait en quantité suffisante pour détruire les cellules tumorales, et pendant la deuxième phase le rituximab n'était plus en quantité suffisante, et la croissance de la tumeur reprenait. Les résultats obtenus sont compatibles avec l'hypothèse d'une destruction de la tumeur

par le rituximab indépendante de sa concentration. La variable binaire décrivant l'efficacité du rituximab peut s'interpréter comme étant la présence de rituximab en quantité suffisante pour être actif / quantité insuffisante pour avoir un effet. Pendant la période de décroissance de la tumeur, k_{drug} était constante. La destruction des cellules tumorales était donc, elle aussi, constante, malgré les variations de concentrations du rituximab. L'explication pourrait être que bien que le rituximab eut été en excès par rapport au nombre de sites CD20 disponibles, seule une partie des sites CD20 pouvait être ciblée par le rituximab. Il est donc possible que le rituximab soit actif majoritairement en périphérie de la tumeur (hypothèse que nous avons étayée avec les analyses en scintigraphie présentées dans l'article, figure 06).

2 - Influence des cibles CD20 sur la PK du rituximab

Les concentrations en rituximab ont été analysées chez les souris en rémission partielle ou complète. Les concentrations de l'infliximab ont été analysées chez les souris qui en ont reçu. Pour les deux anticorps, les données pharmacocinétiques suggéraient au moins deux phases de décroissance : une phase de distribution et une phase d'élimination (Figures 46 et 47). Cependant, un seul point (05 jours après injection de l'anticorps soit J+18) permettait de décrire la phase de distribution.

Pour le rituximab, la décroissance terminale était log linéaire chez les souris en réponse totale ; tandis que, chez les souris en réponse partielle, la vitesse d'élimination semblait augmenter quand les concentrations en rituximab diminuaient. Pour chaque jour de prélèvement, les concentrations ont été comparées entre les souris en réponse partielle et celles en réponse totale (Figure 48 et article). Les concentrations étaient significativement plus faibles chez les souris en réponse partielle que chez les souris en réponse totale à partir de J+14 (test de

Wilcoxon à chaque temps de prélèvement). Pour les souris en réponse partielle, la réascension tumorale avait lieu en moyenne 13 jours après l'injection du rituximab. L'augmentation de la clairance pourrait donc être liée à cette réascension : une composante de la clairance du rituximab pourrait avoir été liée à la captation de celui-ci par les foyers tumoraux.

a - Modélisation pharmacocinétique

Une approche individuelle a été utilisée et des modèles ont été testés. Le modèle bicompartimental n'a pas permis de décrire les données de façon satisfaisante, ce qui était vraisemblablement dû au fait que seule l'observation 05 jours après l'injection de l'Ac permettait de décrire la phase de distribution. Par conséquent, seule la phase d'élimination terminale a été étudiée : l'observation après 05 jours n'a pas été prise en compte et un modèle monocompartimental a été appliqué.

(i) Pharmacocinétique de l'infliximab

Le modèle monocompartimental a permis de décrire les données de façon satisfaisante, avec une précision correcte (Figure 48 A). Les valeurs moyennes des paramètres estimés et les CV interindividuels étaient : $V_d = 2,0 \text{ mL}$ (106%) (Volume de distribution) et $k_{10} = 8,2 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (54%) (Constante d'élimination). Ces résultats sont compatibles avec une cinétique linéaire de l'élimination de l'infliximab.

(ii) Pharmacocinétique du rituximab chez les souris en réponse complète

Le modèle monocompartimental a permis de décrire les données de façon satisfaisante, avec une précision correcte (Figure 48 B). Les valeurs moyennes des paramètres estimés (et les CV interindividuels) étaient : $V_d = 4,8 \text{ mL}$ (36%) et $k_{10} =$

$6,6 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (31%). Ces résultats sont compatibles avec une cinétique linéaire de l'élimination du rituximab chez les animaux en réponse complète.

(iii) Pharmacocinétique du rituximab chez les souris en réponse partielle

Un modèle monocompartimental classique ne permettait pas de décrire l'élimination de façon satisfaisante. Pour prendre en compte l'influence de la masse tumorale sur l'élimination du rituximab, les données ont été décrites à l'aide du modèle présenté dans l'article :

$$\frac{dC_{RTX}}{dt} = -k_{10,max} \times \left(1 - \frac{A_{nadir}}{\hat{A}} \right) \times C_{RTX}$$

Où C_{RTX} est la concentration plasmatique en rituximab, k_{10} est la constante d'élimination d'ordre 1, A_{nadir} est le logarithme népérien (Ln) de l'activité tumorale (bioluminescence) minimale après administration du rituximab, et \hat{A} est l'estimation du Ln de l'activité par le modèle. Le facteur $\left(1 - A_{nadir} / \hat{A} \right)$ permet de moduler la valeur de k_{10} en fonction de la masse tumorale : la valeur de k_{10} est d'autant plus importante que l'activité de bioluminescence est élevée. La valeur estimée de k_{10} par ce modèle est la valeur maximale de k_{10} que peut engendrer la tumeur, elle est notée $k_{10,max}$. Ce modèle a permis de décrire les données de façon satisfaisante avec une précision correcte (Figures 48 C et 48 D). Les valeurs moyennes des paramètres estimés (et les CV interindividuels) étaient : $Vd = 1,6 \text{ mL}$ (82%), $k_{10,max} = 6,2 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (64%).

b - Interprétation de ces paramètres de modélisation

L'inflximab ne cible pas le TNF- α murin, et donc n'est pas supposé être éliminé autrement que par la voie du catabolisme physiologique. Les résultats sont compatibles avec une cinétique linéaire d'élimination de l'inflximab, et pourraient

être représentatifs des IgG humaines ne ciblant pas d'éléments murins dans la gamme de concentrations plasmatiques observées. La valeur de k_{10} du rituximab des souris en réponse complète était du même ordre que celle de l'infliximab ($p = 0,43$, test de Wilcoxon) ; ce parallélisme observé dans les pentes d'éliminations terminales suggère que l'élimination terminale du rituximab est liée à un catabolisme physiologique. En revanche, le Vd du rituximab était 2 fois plus élevé que celui de l'infliximab, même si cette tendance est non significative, du fait d'une grande variabilité interindividuelle ($p = 0,07$ test de Wilcoxon). Le Vd plus important du rituximab pourrait être expliqué par la disparition de celui-ci du plasma après sa fixation sur les cibles antigéniques. Chez les souris en réponse partielle, la valeur de $k_{10,max}$ était 10 fois supérieure au k_{10} des animaux en réponse complète ($p < 0,0001$ test de Wilcoxon), ce qui confirme une influence très nette du volume tumoral sur la clairance du rituximab.

B - Biodistribution de l'anticorps

Nous avons complété cette étude par la mise en place d'essais d'imagerie du petit animal en bimodalité permettant un suivi de la localisation et de la progression des foyers tumoraux par bioluminescence tout en réalisant une analyse de la biodistribution et de la pénétration de l'anticorps par des méthodes faisant appel à la radioactivité. L'analyse de la biodistribution a été réalisée par scintigraphies à l'ibritumomab-tiuxetan (2B8) marqué à l'indium-111 et par autoradiographies des foyers tumoraux. Nous avons aussi réalisé une analyse en tomographie par émission de positons, à l'ibritumomab-tiuxetan marqué au cuivre 64, adaptée au petit animal. L'indium lui ne peut être suivi par cette technique. Le marquage du zévalin au cuivre 64 est très proche de celui à l'indium si ce n'est que nous avons choisi de ne pas introduire de DTPA dans le tampon de formulation. Le DTPA risquerait d'entrer en compétition et de perturber le marquage. Le cuivre 64 possède une période 12,705

heures. Ce qui risque d'être sa faiblesse. Dans le cas où sa demie vie ne le pénalise trop nous pourrions envisager le marquage du zévalin par du cuivre ⁶⁷ qui possède une période de 61.9 heures.

Comme nous l'avons présenté, les progrès de ces dernières années ont permis de passer outre les barrières dues aux ruptures technologiques et ainsi adapter avec succès chez le petit animal (souris, rat, singe de petite taille...) des systèmes créés à la base pour la clinique chez l'homme. Ainsi les programmes de recherche en cancérologie faisant appel à des modèles animaux se sont dotés de nombreuses techniques très pertinentes et permettant d'extrapoler les données cliniques chez l'homme. Ce véritable arsenal de recherche dans le domaine de l'imagerie s'est aussi vu compléter par la bioluminescence, technique exclusivement développée pour les modèles animaux mais dont les progrès en ont fait en quelques années une véritable technique de référence. Ainsi du fait de leur relative simplicité et de leur complémentarité les méthodes d'imagerie multimodale sont très adaptées aux études de cancérologie. On peut envisager la biodistribution de fragments d'anticorps marqués à l'aide de sondes radioactives.

C - Populations cellulaires immunitaires

Le modèle a été ainsi parfaitement caractérisé et, même si il n'existe pas de parfaite similitude entre les Fc γ R humains et murins, ces approches nous ont permis d'évaluer les populations cellulaires d'intérêt et d'interpréter les données de la littérature utilisant le modèle murin pour la compréhension des mécanismes d'action de cet anticorps ¹⁹¹. L'analyse des proportions des cellules immunitaires CD19+, CD4+ et CD8+ en l'absence et en présence d'un traitement à la dose de 20 mg/kg de rituximab révèle un recrutement important de lymphocytes B et de lymphocytes T au niveau de la tumeur. Par contre en observant les populations CD11b+ et CD11c+, on ne note aucun recrutement de ces cellules incluant les polynucléaires neutrophiles,

les monocytes et les cellules dendritiques. Ces données sont parfaitement en adéquation avec les données de la littérature sur ce genre de modèle animal et cellulaire ²⁸⁶⁻²⁸⁸. Le rituximab est un anticorps chimérique et sa capacité à mobiliser les cellules FcyR+ reste mal connue. L'absence de déplétion lymphoïde B dans notre modèle confirme l'absence de reconnaissance du CD20 murin par les lymphocytes B.

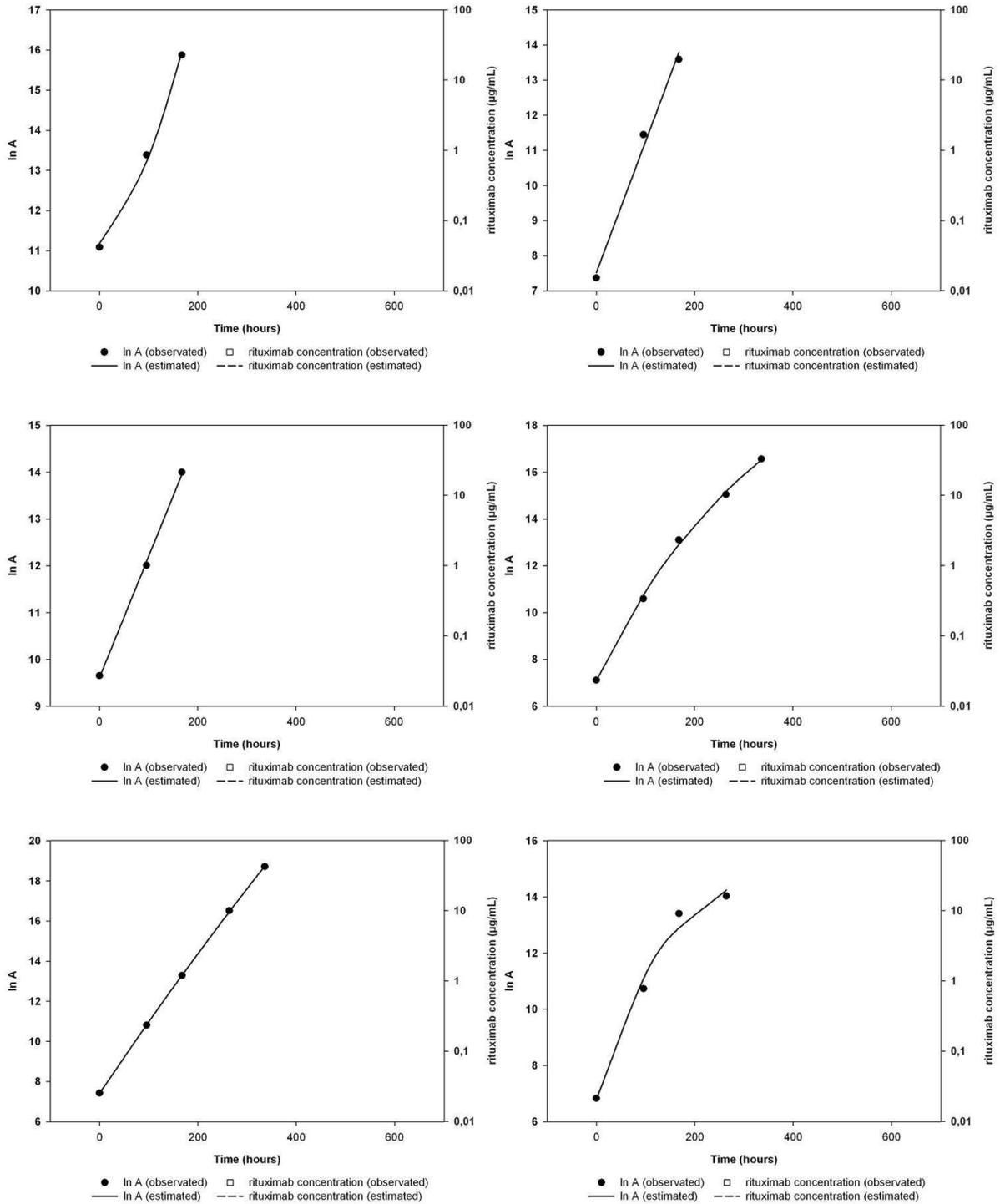
D - Etudes chez l'homme

Ce travail est très important car il permet de modéliser l'activité anti lymphomateuse du rituximab. Les résultats montrés ici nous indiquent l'existence d'une relation significative entre le volume tumoral, la réponse au traitement et l'exposition au rituximab. Si nous extrapolons à l'homme ceci signifie que nous devrions adapter la dose de rituximab au volume tumoral du patient. Cet objectif est celui d'une étude ancillaire au protocole GOELAMS 0203 (Professeur T. Lamy) que nous avons initié en partenariat avec Roche Pharma (investigateur : Dr G. Cartron). Dans cette étude, le volume tumoral est évalué par TDM et par TEP-TDM (couplage de la tomographie par émission de positrons à la tomodensitométrie), l'exposition au rituximab est évaluée par ELISA. L'ensemble de ces travaux devrait permettre de préciser le rôle exact du volume tumoral dans la réponse au traitement par le rituximab. Une telle approche méthodologique pourrait être appliquée pour d'autres anticorps anti CD20 comme le GA101 ou l'humax. En effet le modèle développé et présenté dans cette partie peut constituer un outil de choix dans la comparaison d'effets thérapeutiques d'anticorps anti CD20 déjà sur le marché ou en cours d'élaboration par les firmes pharmaceutiques. La relation dose – effet ainsi que l'étroite relation entre le volume tumoral avant traitement, la réponse au traitement et l'exposition à l'anticorps pourrait être évaluées pour chacun des anticorps avec une réelle pertinence.

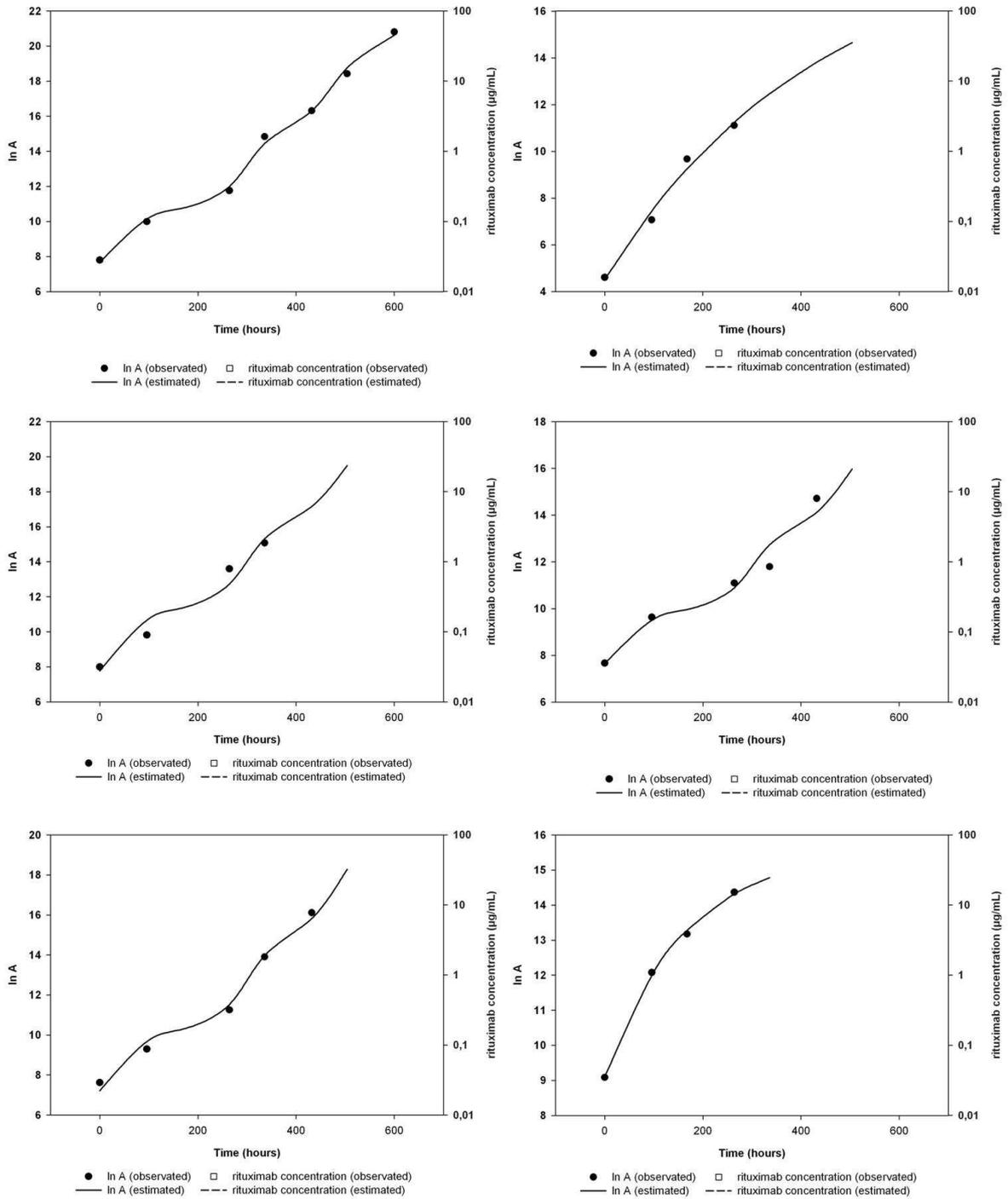
VII - Modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique

En complément à cette partie nous souhaitons présenter la modélisation pharmacocinétique pharmacodynamique de l'ensemble des animaux. Cette modélisation présentée dans l'article et complétée dans cette partie analyse la progression tumorale des animaux ainsi que l'évolution de la concentration plasmatique en rituximab et en infliximab pour les animaux en ayant reçu.

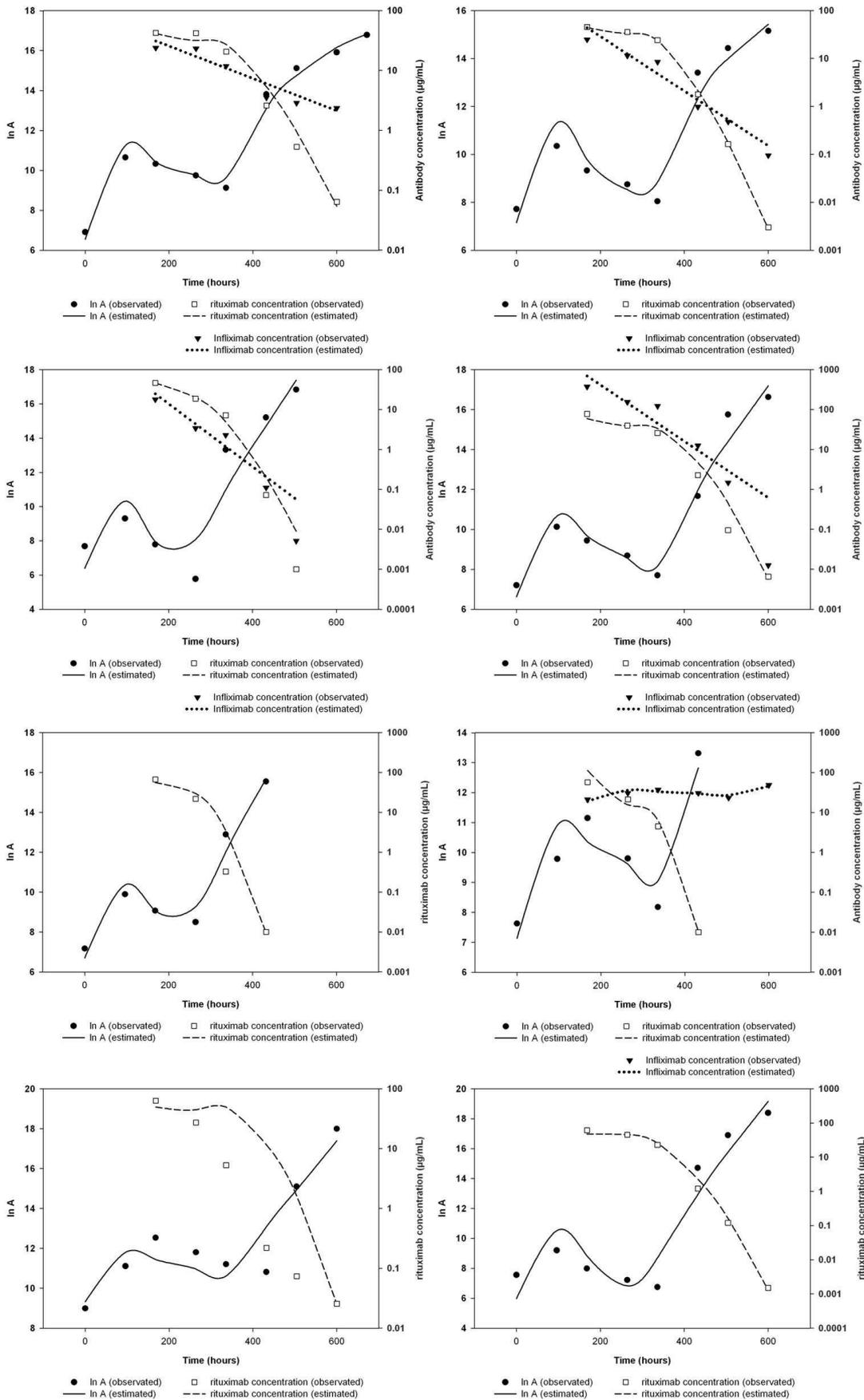
A



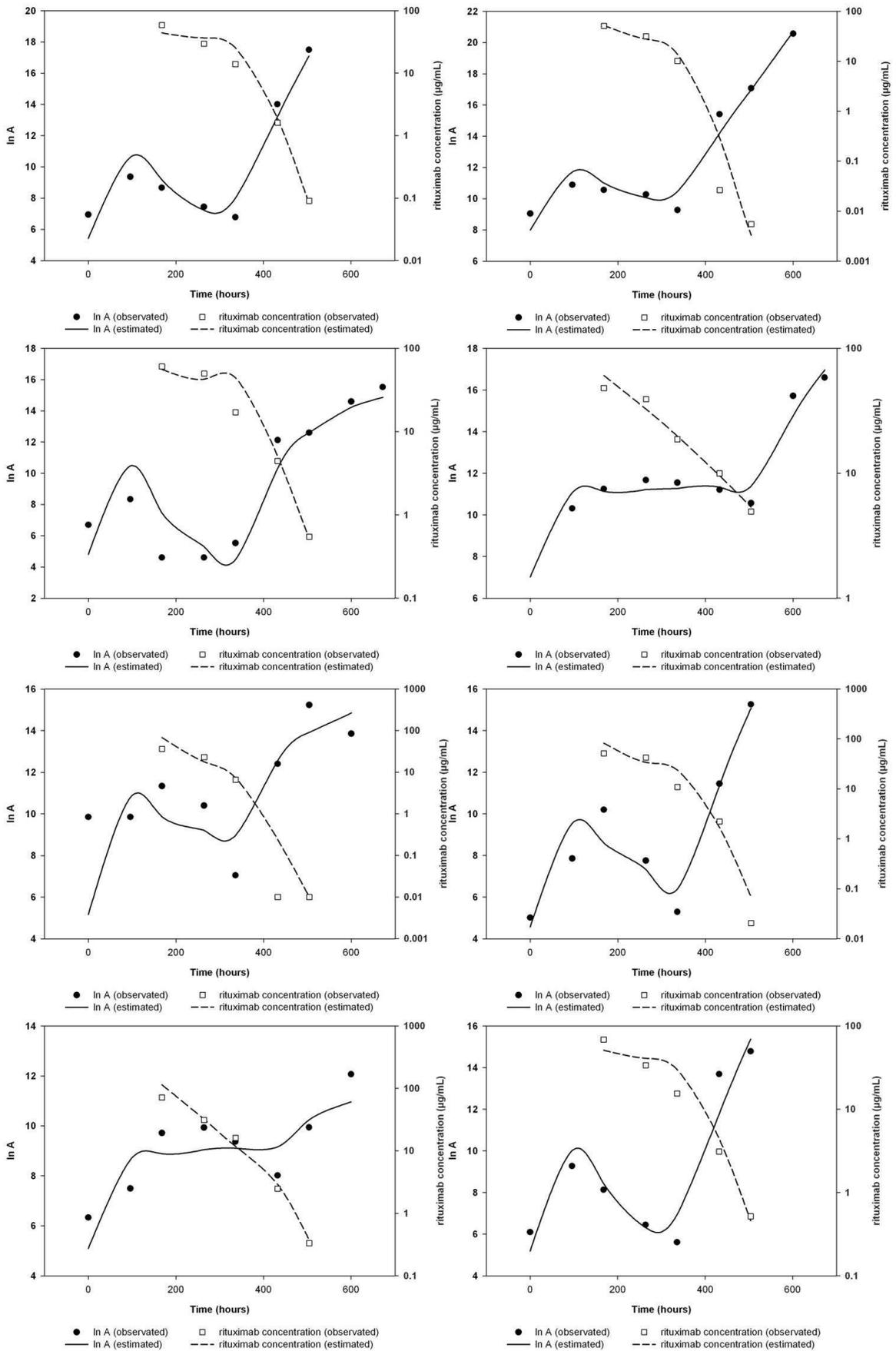
B



C1



C2



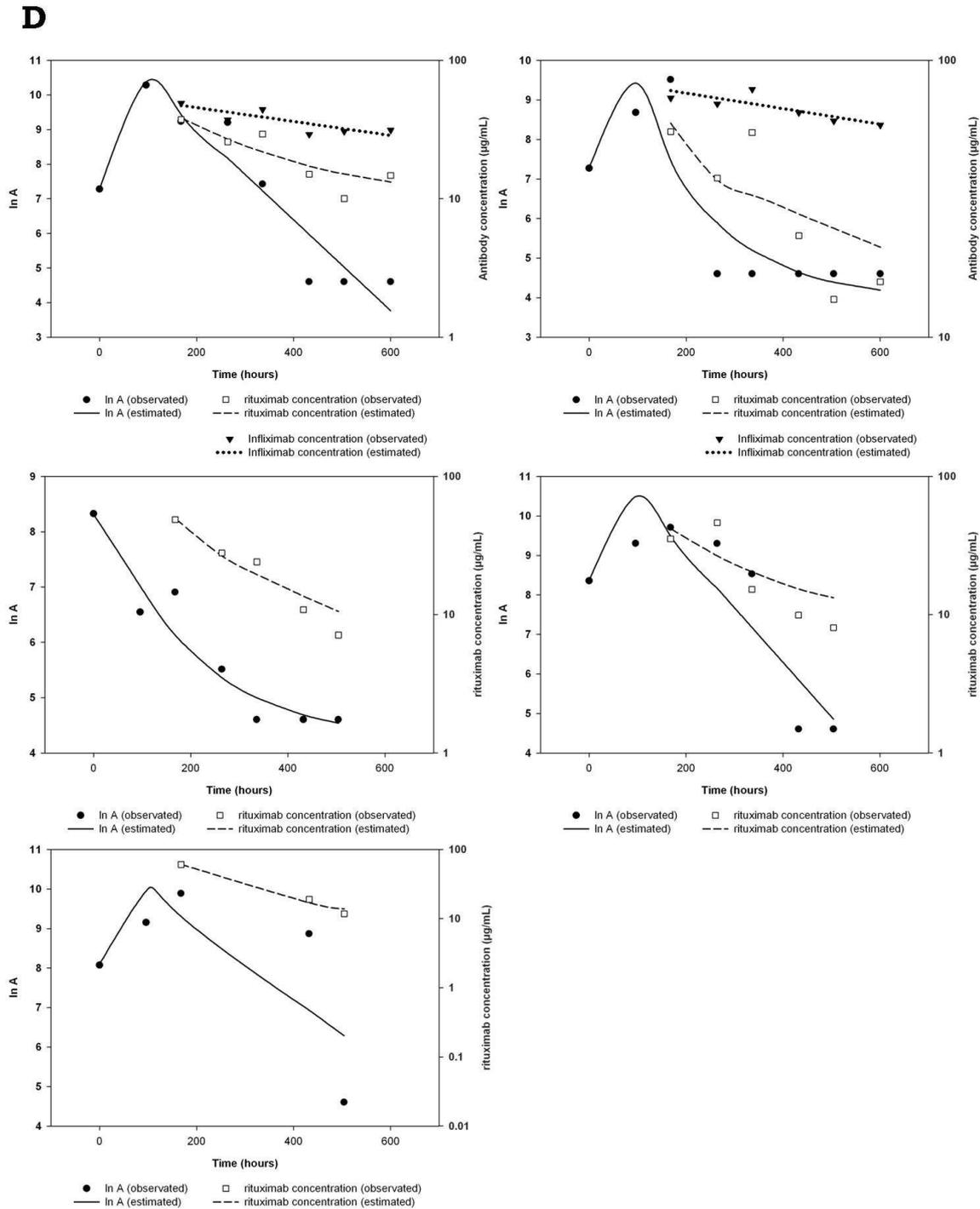


Figure 50 : Modélisation PK-PD des animaux

Présentation de la modélisation PK-PD pour l'ensemble des animaux, l'activité tumorale (Ln de la mesure de bioluminescence) observée (●) et estimée par modélisation en traits continus, la concentration en rituximab dans le plasma observée (□) et estimée en tirets, la concentration en infliximab, pour les animaux en ayant reçu, observée (▼) et estimée en pointillés.

A. Animaux non traités

B. Animaux en absence de réponse

C1. C2. Animaux en réponse partielle

D. Animaux en réponse complète.

TROISIEME ARTICLE : Optimisation de l'effet anti tumoral des neutrons sur des cellules tumorales via des particules d'oxydes de gadolinium.

I - Introduction

Le traitement du cancer, repose le plus souvent sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie ²⁸⁹. Ces techniques sont parfois exclusives mais sont souvent diversement associées pour s'adapter au mieux au type de la tumeur et à son génie évolutif. La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants, le plus souvent des photons de haute énergie ou des électrons, pour détruire les tumeurs ^{290,291}. Ces rayonnements sont généralement produits par des accélérateurs linéaires de particules. Les faisceaux sont focalisés sur le volume cible (radiothérapie externe) en mettant en œuvre aujourd'hui tous les progrès de l'imagerie moderne ^{292,293}. Les rayonnements peuvent également provenir de la désintégration radioactive d'implants localisés (curiethérapie) dans le cas particulier de petites tumeurs ^{294,295}. Cependant il existe des tumeurs résistantes aux traitements classiques de radiothérapie, soit parce qu'elles sont situées dans ou à proximité immédiate d'organes critiques, empêchant la délivrance d'une dose efficace, soit du fait de leur nature et/ou de leur mode évolutif. Dans le premier cas, les solutions proposées peuvent être d'ordres balistiques et des techniques complexes utilisant des photons se sont développées : radiochirurgie, radiothérapie de conformation et plus récemment radiothérapie par modulation d'intensité ²⁹⁶. La protonthérapie met en œuvre d'autres rayonnements, les protons, aux propriétés balistiques particulièrement bien adaptées aux situations dans lesquelles la tumeur est à proximité immédiate d'un organe critique ²⁹⁷. Lorsque la radiorésistance est

liée à la tumeur proprement dite, il est alors possible de recourir à un traitement par neutronthérapie qui est une technique de radiothérapie utilisant des neutrons rapides ²⁹⁸. La neutronthérapie fait désormais partie de l'arsenal thérapeutique des oncologues. Les photons ou les électrons sont des rayonnements à faible transfert d'énergie linéique (TEL), les neutrons sont au contraire des rayonnements à haut TEL ²⁹⁹. Les premiers interagissent par l'intermédiaire des électrons de la matière, les seconds réagissent avec les noyaux. A l'échelle microscopique, la densité des ionisations induites par les particules secondaires chargées est, dans le cas des neutrons, 50 à 100 fois plus élevée que dans le cas des photons ou des électrons ²⁹⁹⁻³⁰¹. Dans ces conditions, il se produit au niveau des cellules un effet biologique majeur (événement létal) alors que les rayonnements à faible TEL conduisent plus fréquemment à des lésions sub-létales que par la suite les cellules saines et tumorales vont tenter de réparer avec une efficacité inégale. Cette variabilité des réponses biologiques à une irradiation est connue sous le terme d'effets différentiels. Pour les rayonnements à faible TEL, ces propriétés sont bénéfiques dans les cas fréquents où les cellules tumorales présentent une plus forte sensibilité à l'irradiation que les cellules saines (ces effets différentiels seront par ailleurs et dans ces cas, amplifiés en fractionnant la dose d'irradiation) ³⁰²⁻³⁰⁵. Elles seront au contraire un frein sévère dans les cas inverses où l'hypoxie, la nature des cellules tumorales ou leur mode de repopulation conduit à des phénomènes de radiorésistance tumorale. Les neutrons rapides, utilisés en clinique, nivellent par contre tous les effets différentiels. En comparant rayonnements à faible TEL et neutrons rapides à niveau d'effet égal sur les tissus sains, les neutrons auront une action plus forte sur les tumeurs dites radiorésistantes. Découverts en 1932, par J. Chadwick, les neutrons ont été utilisés pour la première fois dans un essai thérapeutique en 1938 au Lawrence's Cyclotron (Berkeley, Etats-Unis). Ces essais ont été interrompus par la seconde guerre

mondiale et les études ont été reprises dans les années 60 au Hammersmith Hospital (Londres, Royaume Unis). Les résultats très encourageants notés à l'époque ont conduit à l'ouverture d'une vingtaine de centres dans le monde. Il faudra près d'une vingtaine d'années pour définir de manière précise les indications de la neutronthérapie.

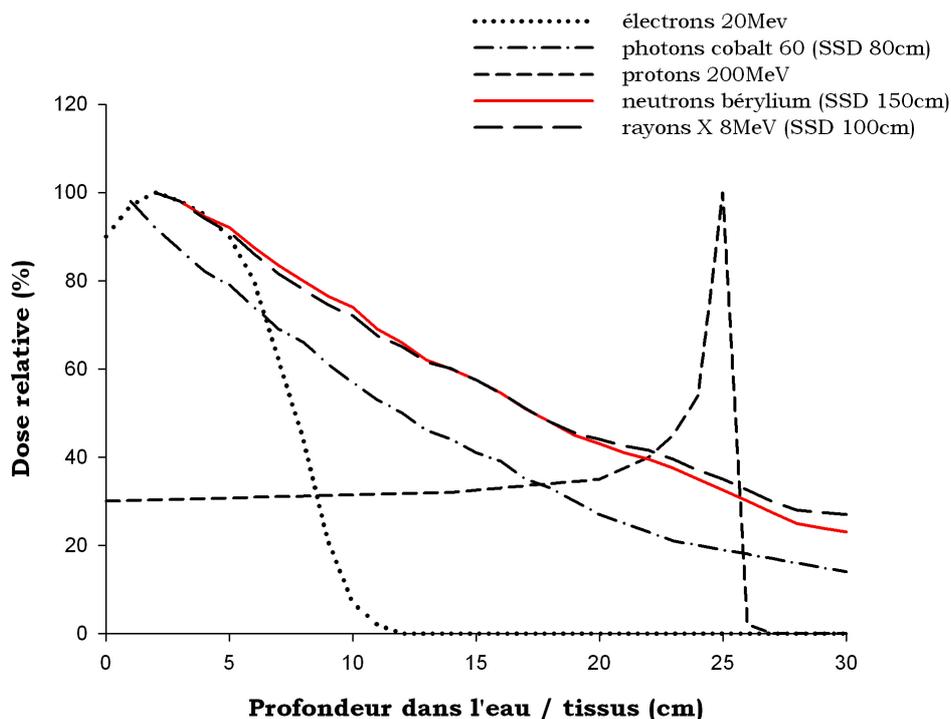


Figure 51 : Efficacité des principaux types de rayonnement en fonction de la profondeur dans l'eau ou dans les tissus.

L'efficacité ou rendement énergétique des différents rayonnements varie fortement en fonction de la profondeur au sein de l'eau ou des tissus. Ces données ont des retombées très importantes sur l'utilisation en médecine d'un type de rayon ainsi que sur les appareillages développés pour les mettre en œuvre. L'efficacité des neutrons ici représentée en rouge est très proche de celle des rayons X et diminue proportionnellement avec la profondeur. (Figure établie avec l'aide de M. Sabbattier et M. Blondiaux, campus CNRS, Orléans, France)

Compte tenu des effets biologiques particuliers de ce type de rayonnement, la précision balistique conditionne très fortement le risque de complications liées au traitement. Dans de telles conditions, seuls des appareils produisant des faisceaux au pouvoir de pénétration comparable à celui des faisceaux de photons de haute énergie peuvent être utilisés, ce qui implique des appareils importants. La neutronthérapie doit pouvoir bénéficier de tous les apports de la technologie moderne et notamment de l'imagerie de façon à réaliser les traitements par approche conformationnelle ^{299,306-308}. Au cours des dernières années, des recherches pluridisciplinaires ont porté sur la potentialisation de ces traitements par neutrons rapides par un supplément significatif de dose sélectivement délivrée aux cellules tumorales. Ceci pouvant être obtenu par la réaction nucléaire de capture des neutrons thermiques au niveau du volume cible par des éléments paramagnétiques. La neutronthérapie potentialisée par cette technique prometteuse pourrait ouvrir une fenêtre thérapeutique pour de nombreux types de tumeurs ³⁰⁹⁻³¹¹.

Les éléments à propriétés paramagnétiques, c'est-à-dire possédant dans leurs couches électroniques des électrons célibataires comme le gadolinium, le manganèse et le fer sont utilisés en médecine dans un but diagnostique pour renforcer le contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Le gadolinium est un élément classé parmi les terres rares, présent seulement à l'état de traces dans la nature. Il existe sous forme de plusieurs isotopes stables, le plus abondant ayant la masse 158. Du fait de l'existence de sept électrons célibataires, le gadolinium a un effet paramagnétique ou ferromagnétique très élevé, de 10,8 magnétons de Bohr, alors que celui du fer n'est que de 5,6. Le rayon ionique des ions Gd^{3+} est de 1,02 Angström, il est extrêmement proche de celui du Ca^{2+} qui est de 0,99 Angström, mais il porte une charge positive de plus. Le gadolinium est très peu absorbé par le tube digestif et comme il est très peu répandu dans la

nature, sa concentration physiologique dans les milieux biologiques est trop faible pour être détectée par les méthodes analytiques usuelles ³¹²⁻³¹⁴. Le gadolinium s'est révélé utile pour améliorer les contrastes en IRM. On a synthétisé des complexes laissant des électrons célibataires disponibles mais masquant les effets toxiques de l'élément. Les complexes de gadolinium utilisés en thérapeutique sont le gadopentétate de méglumine, le gadotérate de méglumine, le gadotéridol et le gadodiamide. L'IRM utilise la propriété des protons de l'organisme, en particulier ceux de l'eau, d'émettre des signaux lorsqu'ils retournent à leur état d'équilibre après avoir été stimulés par un champ magnétique. La présence d'un élément à effet paramagnétique élevé comme le gadolinium au contact des protons de l'eau, accélère leurs temps de relaxation T1 et T2 et permet d'améliorer le contraste des images obtenues et de mettre en évidence des lésions, notamment certaines tumeurs ³¹⁵. Le gadopentétate de méglumine est un chélate de diéthylène-triamine-penta-acétate (DTPA) et de gadolinium. Le gadotérate de méglumine est un cryptate ou clathrate dans lequel le ligand, le tétra-azacyclododécane-tétra-acétate (DOTA) forme un macrocycle entourant l'ion Gd^{3+} . Le gadotéridol est un complexe macrocyclique de gadolinium dont la structure est proche de celle du DOTA. Le gadodiamide est un complexe de gadolinium et de DTPA dont deux des cinq fonctions acides -COOH sont transformées en méthylamide. Les trois fonctions acides restantes sont neutralisées par le gadolinium et on obtient ainsi un complexe non ionique. Ces chélateurs ont une très grande affinité pour l'ion Gd^{3+} qui, dans ces conditions, ne se trouve pas à l'état libre. La première indication des complexes de gadolinium a été la mise en évidence par IRM de la rupture de la barrière hématoencéphalique. Ils ont maintenant d'autres utilisations : le diagnostic des tumeurs cérébrales, des tumeurs de la moelle épinière, des os, des parties molles, du foie ³¹⁶⁻³¹⁸.

Parallèlement à ces propriétés d'agent de contraste différentes équipes de recherche ont déjà utilisé le modèle cellulaire EL4 pour étudier l'effet des neutrons via des particules de bore ou de gadolinium ³¹⁹. En effet le modèle cellulaire EL4 est particulièrement adapté au suivi de l'impact des neutrons. Ces cellules sont naturellement peu sensibles aux neutrons comme la quasi totalité des cellules lymphomateuses (Figure 52). Néanmoins, il a déjà été rapporté que les cellules EL4 peuvent entrer en apoptose sous l'impact d'un faisceau de neutrons d'intensité importante ³²⁰. Ce modèle constitue donc un outil intéressant dans l'étude de l'effet d'oxydes de particules de terres rares. Enfin la présence de CD20 humain à la surface des cellules nous a permis avant ces essais d'envisager l'utilisation d'anticorps dirigés contre le CD20 humain pour amener les particules de gadolinium au niveau des cellules tumorales.

Dans cette partie, nous proposons d'utiliser notre modèle cellulaire de lymphome pour étudier l'effet paramagnétique de particules de gadolinium. Nous nous proposons aussi d'étudier l'effet de particules boostées par des atomes de bore, la bioluminescence constituant un indicateur de viabilité cellulaire. Ces travaux ont été réalisés grâce à une étroite collaboration entre différentes équipes de recherche appartenant à divers domaines :

- Le service d'imagerie du CDTA d'Orléans pour son expertise dans les domaines de l'imagerie notamment par bioluminescence, du suivi de l'évolution qualitative et quantitative des foyers tumoraux. Mais aussi pour leur expertise en radiologie et techniques d'imagerie du petit animal.
- L'UMR 5620, le laboratoire de physico chimie des matériaux luminescents de Lyon pour leur expertise dans le domaine des nano particules et des oxydes de terres rares.

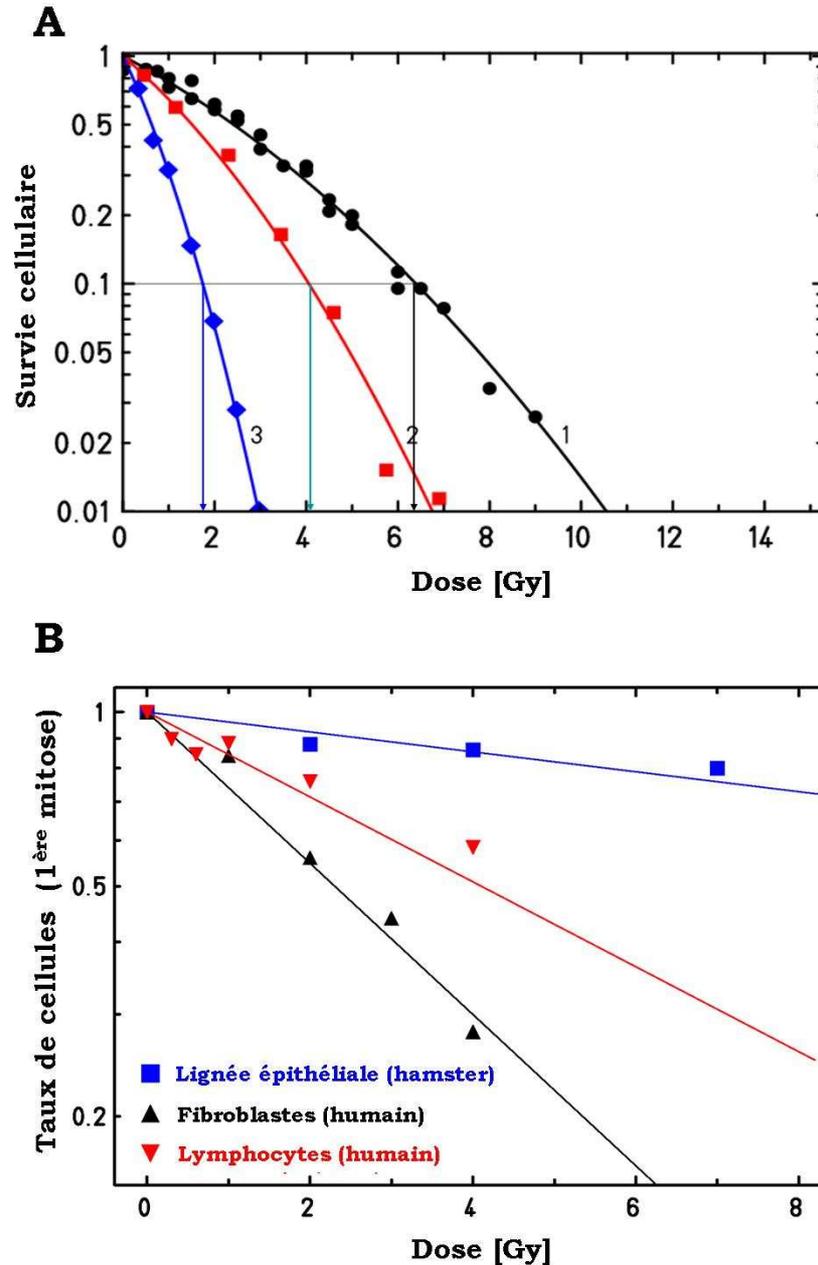


Figure 52 : Survie cellulaire et sensibilité à l'effet d'un rayonnement neutronique.

Les différents types cellulaires sont plus ou moins sensibles à l'effet d'un rayonnement de neutrons.

A. Le taux de survie cellulaire dépend fortement du type de cellule étudié. Leur sensibilité au rayonnement est très différente. Ainsi si l'on considère un objectif thérapeutique de survie de 10% des cellules, la dose nécessaire pour arriver à cet effet peut varier de 2 Gy (lignée cellulaire sensible à la neutronthérapie) en bleu à 6 Gy (lignée cellulaire résistante à la neutronthérapie) en noir.

B. L'effet des neutrons et des rayonnements engendre un arrêt du cycle cellulaire. Ici le taux de cellules passant la première mitose après irradiation a été mesuré en fonction de la dose délivrée pour une lignée épithéliale de hamster (bleu), pour des lymphocytes humains (rouge) et pour des fibroblastes humains (noir).

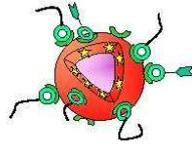
Diagrammes établis avec l'aide de M. Sabbatier et M. Blondiaux .

- L'EA 3853 IPGA Immuno Pharmaco Génétique des Anticorps thérapeutiques de Tours pour son expertise en immunologie, en cellules cancéreuses ainsi qu'en anticorps thérapeutiques.

II - Poster de présentation scientifique

L'ensemble des travaux de caractérisation des particules d'oxydes de gadolinium ainsi que de l'analyse de l'impact des neutrons sur les cellules tumorales ont fait l'objet d'une présentation intitulée : « Nanoparticules hybrides de Gd₂O₃ : des sondes pour combiner diagnostic et thérapie » sous la forme d'un poster scientifique lors du congrès Nano-hybride N°4 qui s'est déroulé du 02 au 06 juin 2007 en Corse, France, le poster est présenté ci après.

Nanoparticules hybrides de Gd_2O_3 : des sondes pour combiner diagnostic et thérapie



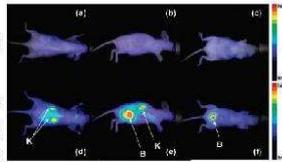
* Jean-Luc Enlot, Anne-Charlotte Faure, Stéphane Roux, Olivier Tillent,
 † David Boyle, Stéphanie Larroze, Roland Sabotier, Alain LaPage,
 ‡ Charlotte Rivière, Nicolas Charvet, Cédric Louis,
 § Véronique Josseland, Jean-Luc Coll,
 ¶ Claire Billotey, Marc Janier,
 ** Gaëlle Cartron,
 †† Pascal Perrinat,
 ††† Nano-H.SAS, 23 rue Royale, 69001 Lyon
 †††† CREATIS Animage, UMR 5519 CNRS-UMR 1053 INSERM-INSA de Lyon
 ††††† Institut Pharmacogénétique des Anticorps Thérapeutiques LIPRES-EA 3853 (IFRA), Tours
 †††††† Groupe de Recherche sur le Cancer du Poumon, INSERM U578, Institut Albert Bonniot, 38706 La Tronche Cedex
 ††††††† Groupe d'Études de Métallurgie Physique et de Physique des Matériaux, UMR 5510 CNRS-INSA de Lyon, 69621 Villeurbanne Cedex
 †††††††† Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, UMR 5620 CNRS-Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex

Imagerie In Vivo

Imagerie par fluorescence

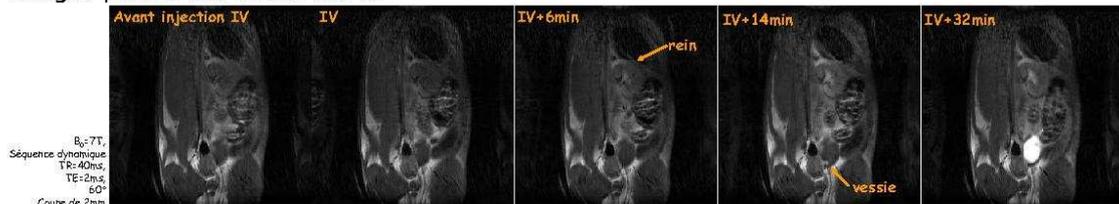
avant injection IV (a, b, c)

3h après injection IV
 de $100 \mu L$, $[Cy5]=0.03mM$ (d, e, f)
 $\lambda_{exc.}=633nm$, tps d'exp.=200ms



Visualisation optique de la biodistribution des nanoparticules.
 Localisation au niveau des reins et de la vessie 3h après injection IV.
 Absence de fluorescence au niveau des poumons et du foie, bonne circulation des nanoparticules

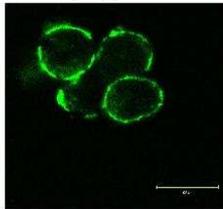
Images pondérées T1 sur un rat



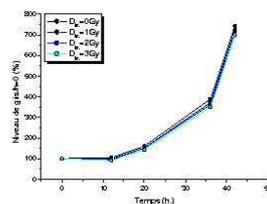
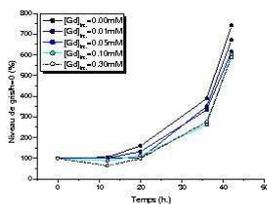
Visualisation de la biodistribution des nanoparticules par IRM, début de rehaussement au niveau des reins et de la vessie 6 et 14 minutes après injection IV respectivement contre 2 minutes pour une injection de Dotarem®. Rehaussement plus marqué 32 min après injection IV.

GdNCT In vitro

Marquage EL4-CD20-Luc

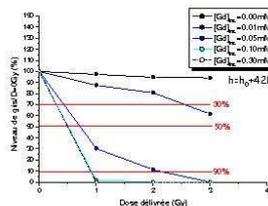
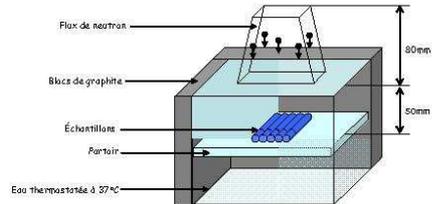


Incubation $37^\circ C$,
 30 min, saccharose 300mM
 $[Gd]=0.3mM$



Pas ou peu de modifications de l'activité métabolique des cellules en fonction de la dose d'irradiation ou de la présence de nanoparticules

Irradiation EL4-CD20-Luc



Combinaison neutron + nanoparticules : létale
 Effet d'autant plus fort avec la dose d'irradiation et la concentration en nanoparticules



III - Article

Ces essais nous ont permis de réaliser un article scientifique actuellement soumis pour publication et est présenté ci après.

Hybrid gadolinium oxide nanoparticles combining imaging and therapy

Jean-Luc Bridot,¹ David Dayde,² Charlotte Rivière,³ Céline Mandon,⁴ Claire Billotey,⁴ Stéphanie Lerondel,⁵ Roland Sabattier,⁶ Guillaume Cartron,⁷ Alain Lepape,⁵ Gilbert Blondiaux,⁸ Marc Janier,⁴ Pascal Perriat,⁹ Stéphane Roux,^{*1} Olivier Tillement.¹

¹ Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, UMR 5620 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

² Laboratoire d'immunologie, EA 3853 IPGA Faculté de Médecine, 37032 Tours Cedex, France.

³ Nano-H SAS, 23 rue Royale, 69001 Lyon, France.

⁴ Laboratoire CREATIS – Animage, UMR 5515 CNRS - U630 INSERM - INSA de Lyon - Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

⁵ Centre de Distribution, Typage et Archivage Animal, UPS CNRS 44, 3A rue de la Férollerie, 45071 Orléans, France.

⁶ Centre Hospitalier Régional d'Orléans, 45000 Orléans, France.

⁷ Service d'hématologie et de biothérapie, U847 INSERM, Centre Hospitalier Universitaire Lapeyronnie, 34295 Montpellier, France.

⁸ CERI-CNRS Centre d'Etudes et de Recherches par Irradiation, 3A rue de la Férollerie, 45071 Orléans cedex 2 France.

⁹ MATEIS, UMR 5510 CNRS - INSA de Lyon, 69621 Villeurbanne Cedex, France.

Corresponding author. E-mail: roux@pcml.univ-lyon1.fr; phone: +33 472 43 12 00 ; fax: +33 472 43 12 33.

ABSTRACT

The killing effect of luminescent and paramagnetic gadolinium oxide nanoparticles activated by a harmless thermal neutron irradiation was evaluated on luciferase coding gene transfected lymphoma cells (EL4-Luc). Cellular uptake of nanoparticles was determined by fluorescence and magnetic resonance imaging and by Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry analyses while the metabolic activity of irradiated EL4-Luc cells was monitored by bioluminescence. The alteration of the irradiated cells depends both on neutron irradiation dose and on gadolinium content within cells. Besides their dual modality imaging ability, the application of these multifunctional particles for neutron capture therapy can be advantageously envisaged.

INTRODUCTION

In the line of the works devoted to the fruitful and plentifully development of nanoparticles for diagnostic applications, cancer therapy based on nanometer sized structures received recently much attention since their small size facilitates their accumulation in tumor.¹⁻³ The nanoparticles are not only attractive for their size but also for their great diversity in shape and in composition⁴ which allows envisaging many complementary strategies for the tumor destruction.⁵ According to their operating mode,⁵ two main classes of particles can be distinguished. Particles can be used either to deliver drugs (delivery drug systems, DDS) to the cancerous cells⁶⁻⁸ or to induce the tumor eradication after an interaction with an external physical stimulus.⁹⁻¹⁴ Many ways are currently explored in order to incorporate a large number of drugs inside or onto the nanoparticles.⁶ However the chemotherapy based on the administration of DDS with submicronic sizes like liposomes, which were extensively applied for pharmaceutical formulations, can be seriously restricted because of the great toxicity of the drugs. This undesirable side effect will not completely be circumvented by the size reduction of DDS since the toxicity is inherent to the drug.⁶ The activation of nanoparticles by an external stimulus provides therefore a promising alternative. The research groups of Drezek and of El-Sayed demonstrated independently the lethal potential of gold nanostructures for cancerous cells which was induced by the absorption of near infrared (NIR) light whereas gold nanostructures and NIR light alone are both harmless.¹⁰⁻¹² Gold particles were designed for having a strong plasmon band in the NIR region of the spectral domain. Upon NIR excitation, this feature allows the absorption of NIR light resulting in temperature elevation sufficient to destroy cancerous cells. The simultaneous presence in the same location of biocompatible gold nanostructures and non-toxic NIR light led then to the destruction of the cancerous cells by a photothermal effect. Although the use of nanoparticles is rare and recent, the development of therapy based on a binary system is not new. Locher proposed in 1936 an original therapeutic strategy for the eradication of glioblastome which rests on the irradiation of compounds with a high neutron capture cross-

section (neutrophages) by a thermal neutrons beam (neutron capture therapy -NCT).¹⁵ If, as required for a binary system, each component is harmless, the irradiation of neutrophages by thermal neutrons undergoes a succession of physical reactions with a therapeutic effect. Among the stable isotopes, ^{10}B , ^{155}Gd and ^{157}Gd appear as the most attractive NCT agents because their natural abundance is relatively high (~20% for ^{10}B and ~30.5% for $^{155,157}\text{Gd}$), they exhibit a neutron capture cross section largely higher than the one of the living matter components and the irradiation by thermal neutron of these nuclides provides particles with a high cytotoxic effect.^{15,16} In the case of B-NCT, boron based molecular agents were specifically developed such as boronphenylalanine (BPA),¹⁷ carborane derivatives¹⁸ and macrocycles (porphyrins or phtalocyanins) functionalized with organic derivatives of boron¹⁹⁻²⁰ whereas gadolinium based NCT agents benefited from the intense research activity devoted to the contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) since paramagnetic Gd^{3+} ions are able to greatly enhance the image contrast.²¹ As a result, a large panel of non-toxic gadolinium chelates is available both for MRI and for Gd-NCT. However the neutron capture induced cytotoxic effect of these NCT agents is limited owing to their molecular nature which prevents a sufficient accumulation in cancerous cells. Since their residence time in the blood pool is expected to be longer, the use of boron or gadolinium based dendrimers and nanoparticles was recently envisaged.²²⁻²⁹ Functionalized boron carbide nanoparticles synthesized by Bjørnholm *et al.* exhibit indeed a real potential for B-NCT.³⁰ However there is a lack of data concerning the cytotoxic effect in NCT of gadolinium isotopes $^{155,157}\text{Gd}$, even if they seem more attractive than ^{10}B . Beside a neutron capture cross-section higher than the one of ^{10}B (66 and 16 times higher for ^{157}Gd and ^{155}Gd , respectively), Gd^{3+} containing compounds are widely used as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) which is a powerful noninvasive imaging technique for clinical diagnosis.²¹ In a previous paper, we demonstrated that luminescent hybrid nanoparticles composed of a gadolinium oxide core embedded in a polysiloxane shell whose inner part is functionalized by organic fluorophores and the outer part is derivatized by short poly(ethylene glycol) chains (PEG) were well suited for in vivo dual modality magnetic resonance and fluorescence

imaging.³¹ Despite the small size of the core, as compared to the liposome, lipidic vesicles or chitosan microspheres, the number of gadolinium ions per particle is relatively high (about 200 gadolinium ions) owing to the crystalline nature of Gd_2O_3 (cubic structure). As a result, the accumulation of these particles in cancerous cells is expected to have a great potential for Gd-NCT. Such particles appear therefore very attractive because they could combine dual modality imaging and therapy. In this paper we report on the results of the in vitro application of these multifunctional gadolinium oxide nanoparticles as Gd-NCT agents. Their uptake by cells was monitored by fluorescence and MRI and quantified by Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) analysis while the influence of the gadolinium concentration and of the irradiation dose on the cytotoxic effect was determined by quantitative bioluminescence imaging of the cells which reflects the metabolic activity.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals.

Gadolinium chloride hexahydrate (99.99%), sodium hydroxide (99.99%), tetraethyl orthosilicate ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, TEOS, 98%), (3-aminopropyl)triethoxysilane ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, APTES, 99%), rhodamine B isothiocyanate (RBITC), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 98+%), pentafluorophenol (PFP, 99%), poly(ethylene glycol)bis(carboxymethyl)ether $250 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\text{PEG}(\text{COOH})_2$, 99%), hepes solution (solution in water, pH 7.0 - 7.6), sodium chloride, triethylamine (TEA, 99.5%) and hydrochloric acid (HCl, 37%) were purchased from Aldrich Chemical (France). Cy5 mono NHS ester (89.1%) was purchased from Amersham Bioscience. Ethanol, diethylene glycol (DEG, 99%), and other organic solvents (reagent grade) were purchased from SDS (France) and used as received. For the preparation of an aqueous solution of nanoparticles, only milli-Q water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega$) was used. The dialysis of colloidal solutions was performed with tubular membrane of cellulose (MWCO=4-6 kDa) purchased from Roth (France).

Synthesis of gadolinium oxide nanoparticles embedded in a polysiloxane shell.

These particles were obtained by a two-step route. Gadolinium oxide nanoparticles were first synthesized by applying a modified "polyol" protocol.³² Afterwards a polysiloxane shell growth was induced by hydrolysis-condensation of convenient siloxane precursors in presence of the nanoparticles.³¹

Preparation of gadolinium oxide core. Gadolinium chloride salt (11.53g) was placed in 200mL of DEG at 60°C under vigorous stirring overnight. 7.5mL of sodium hydroxide solution (3M) were added and the solution was heated at 140°C for 1h and at 180°C for 4h. A transparent colloid of gadolinium oxide nanoparticles was obtained and can be stored at room temperature for weeks without alteration.

Encapsulation of Gd_2O_3 cores by polysiloxane shell. A solution containing RBITC (1.6 mg) and 1.4 μL of APTES dissolved in 291 μL of DMSO was prepared as a precursor and stirred

overnight. The coupling reaction between the organic fluorophores and APTES was certified by mass spectrometry with complete disappearance of the molecular peak of the fluorophore ($m/z = 500.3$ for RBITC) and the appearance of the molecular peak of the fluorophore conjugated APTES ($m/z = 721.2$ for RBITC-APTES, respectively). Organic dyes conjugated APTES solution and a portion of $327\mu\text{L}$ of APTES and of $209\mu\text{L}$ of TEOS were added to 1.5 mL solution containing Gd_2O_3 nanoparticles diluted in 13.5 mL of DEG under stirring at 40°C . After 1h, a portion of $792\mu\text{L}$ of a DEG solution (0.1 M of TEA, 10M of water) was added. The other portions of polysiloxane precursors and of hydrolysis solution were sequentially and alternatively added. The final mixture was stirred for 48h at 40°C .

Purification. Purification of naked and polysiloxane-coated nanoparticles was performed by dialysis against ethanol. 20 mL of the colloidal solution was introduced in a tubular membrane of cellulose (MWCO=4-6 kDa) and immersed in 250 mL of ethanol which was replaced every 24h for 3 days. A fourth stage of dialysis can eventually be carried out for 4 days. For the preparation of a stem solution which is stable for weeks, 3mL DEG were added to the purified solution and ethanol was eliminated under reduced pressure. For the transfer of the polysiloxane-coated nanoparticles in water, the colloid in ethanol was dialyzed against water.

Covalent grafting of poly(ethylene glycol)bis(carboxymethyl)ether on hybrid nanoparticles.

x moles of 0.091 M poly(ethylene glycol)bis(carboxymethyl)ether ($250\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{PEG}(\text{COOH})_2$) in DEG were added to isopropanol solution containing $2x$ moles of EDC and $2x$ moles of PFP (0.367 M). The mixture was stirred for 1h30 at room temperature. The reaction between COOH groups of the polymer and PFP, assisted by EDC, is expected to yield pentafluorophenyl esters.³³ The covalent grafting of PEG onto the hybrid nanoparticles was performed by the addition of pentafluorophenyl ester modified PEG in DEG solution containing hybrid nanoparticles ($x/12000$ moles, $7.5\mu\text{M}$). This solution was stirred for 12h at

room temperature. Afterwards the colloid was dialysed for 48 h against water (1:20, v/v) which was renewed three times.

Size Measurement.

Direct measurement of the size distribution of the nanoparticles suspended in the polyol medium was performed via Zetasizer NanoS PCS (Photon Correlation Spectroscopy) from Malvern Instrument. Measurements were directly taken on the colloid after synthesis or surface modification in DEG.

ζ -potential measurements.

Direct determination of the ζ -potential of the hybrid nanoparticles were performed via a Zetasizer 3000 HSA (laser He-Ne (633 nm)) from Malvern Instrument. Prior to the experiment, the sol was diluted in an aqueous solution containing 0.01M NaCl and adjusted to the desired pH.

Inductively coupled Plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analysis.

Determination of the gadolinium content in a sample was performed by ICP-MS analysis (with a Thermo Elemental serie X7 VG X7 CCT). Before measuring Gd concentration, samples were diluted in 0.5 M HNO₃ (1:2500, v/v) and in HNO₃ (2%, 2ppb In; 1:50, v/v).

MR imaging.

MRI was carried out at 7 T using an inversion recovery FLASH (IR-FLASH) imaging sequence with varying IR time (Biospec System 70/20, Bruker, Ettlingen, Germany). T₁-weighted contrast enhancement was performed running a standard spinecho (SE) sequence with 500 ms TR and 12 ms TE.

Cell line: EL4 and EL4-Luc.

The wild type EL4 cell line was purchased from the American Type Culture Collection ([ATCC], Rockville, MD, USA). Plasmid pCMV-Luc (Stratagene, La Jolla, CA, USA) is transfected into EL4 cells by using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies Inc) and screened for neomycin resistance with 300 mg/mL of geneticin (G418) (Euromedex, Mundolsheim, France) per milliliter for 4 weeks. The antibiotic-resistant cell clones were harvested and further screened by dilution titer. These cells were grown in monolayer culture in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Inc. St Louis, MO, USA), supplemented with fetal bovine serum (10% (v/v); Gibco BRL, Tokyo, Japan), glutamine 2mmol/L (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), penicillin 100,000 U/L (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), streptomycin 100 mg/L (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and geneticin 8mg/L (Euromedex, Mundolsheim, France), at 37°C in a 5% CO₂ environment. For routine passages, cultures were split 1:10 generally every 3 days. For all experiments, cells were used from passage 5 to 9. All experiments were performed with exponentially growing cells.

Luciferase expression control.

The expression of luciferase by this monoclonal culture was checked before every experiment. A cellular lysate of 2×10^5 cells of monoclonal culture was prepared starting from a cellular base rinsed with PBS. 20µL of lysis reagent (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent®, Promega, Charbonnières, France) were added during a few minutes to ambient temperature. The cellular lysates were distributed in opaque wells of plates (BandW isoplate®, Wallac, Perkin Elmer, Boston, MA, USA). 100µL of reagent containing luciferin and ATP (Luciferase Assay Reagent®, Promega) were added before the passage of the plate in the luminometer Wallac Victor 1240® (Perkin Elmer). The analysis of luminescence was made using the software Wallac version 2.0 (Perkin Elmer). The intensity and the stability of the expression of luciferase by the clone selected for imaging were checked after prolonged culture of the transfected cells.

Internalization of hybrid gadolinium oxide nanoparticles in EL4- Luc cells.

Before they were put in contact with nanoparticles, EL4-Luc cells were extracted from the culture media by centrifugation (5 minutes at 1600 rpm). The supernatant in each tube was replaced by 50mL buffered sucrose (300mM). After an additional centrifugation (5 minutes at 1600 rpm), the supernatant was eliminated and the cells were resuspended in buffered sucrose whose volume was adjusted for obtaining a cell concentration of 3×10^6 cells/mL. EL4-Luc cells were exposed to the hybrid gadolinium oxide nanoparticles in buffered sucrose solution for 30 minutes at 37°C and CO₂ 5% with gadolinium concentrations ($[Gd]_{inc}$) of 0.30, 0.10, 0.05, 0.01 and 0 mM (i.e. no particle). During the incubation, samples were gently stirred in order to maintain the cells in suspension. Afterwards cells were recovered by centrifugation and thoroughly washed by several cycles of centrifugation (5 minutes at 1600 rpm) - removal of the supernatant - resuspension in buffered sucrose solution in order to remove the nanoparticles. For the last cycle, cells were resuspended in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Inc. St Louis, MO, USA), supplemented with fetal bovine serum (10% (v/v); Gibco BRL, Tokyo, Japan), penicillin 100,000 U/L (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), streptomycin 100 mg/L (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The samples were placed at 37°C and CO₂ 5% for 30 minutes. For the neutron irradiation, 5mL of each sample was distributed in 5mL round bottom tubes (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France). 5 tubes were prepared for each condition. The tubes were sealed with parafilm (Laboandco, Mandres-les-Roses, France) and the volume of liquid was optimized in order to limit the size of the air bubble.

Neutron irradiation of the cells.

The labeled and unlabeled cells (for the preparation, see the precedent paragraph) were irradiated under a neutron beam at the cyclotron of Orléans (France) per series of 5 tubes under 30 cm of water at 37°C. The irradiation duration was dependent on the delivered dose (0, 1, 2. and 3 Gy). However, all the samples (whatever the delivered dose) spent the same time in identical conditions (except the dose) before analyses and culture. Afterwards, cells were transferred in individual flasks (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) containing 25mL

of culture medium (final concentration: 1×10^6 cells/ml to have a good sensitivity in bioluminescence detection) and were cultured at 37°C.

Bioluminescence imaging analysis

The metabolic activity of the labeled and unlabeled cells are monitored immediately after the irradiation stage (including the samples at 0 Gy), then 12, 20, 36, and 42 hours after the irradiation. 100µL of each sample were deposited on an opaque plate (BandW isoplate®, Wallac, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) in a selection of 12 wells sufficiently distant from each other in order to limit the disturbances of the light emitted by the other wells or by the plate. The plate and the cells were left 15 minutes in the black at 37°C and CO₂ 5%. Four minutes after the deposition of 100 µL of culture medium containing potassium luciferin (2mg) on the cells, bioluminescence was monitored for 10 minutes by a BT (back-thinned) Cooled Digital Camera CCD with a very high quantum efficiency over the spectrum (ORCA II BT C4742-98-26 LW, Hamamatsu Photonics, Massy, France). This camera is connected to a module controller which is connected to a computer equipped with software of acquisition and image processing.

RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis of the hybrid particles, which were composed of a gadolinium oxide core, a fluorescent polysiloxane shell and a poly(ethylene glycol) layer, required several steps. The cores were obtained by applying a previously described protocol which consists in a direct precipitation of oxides in diethyleneglycol.³²⁻³³ The alkaline hydrolysis of GdCl_3 carried out in DEG at 180°C and in sub-stoichiometric conditions (i.e. the amount of aqueous NaOH solution added to the gadolinium salt is smaller than the stoichiometric amount) led to the formation of Gd_2O_3 nanoparticles. Their hydrodynamic diameter, determined by photon correlation spectroscopy, is 3.3 ± 0.8 nm (Figure 1a).

Gd_2O_3 cores were embedded in a luminescent polysiloxane shell whose growth is controlled by a sequential addition of shell precursors and of an aqueous triethylamine solution to a diluted sol of Gd_2O_3 nanoparticles dispersed in DEG.³⁴ The encapsulation was carried out at 40°C for 48h after the addition of the last portion of reagents to the sol. This fluorescent polysiloxane shell was formed by hydrolysis-condensation of a mixture of tetraethyl orthosilicate (TEOS, as reticulating agent), aminopropyltriethoxysilane (APTES) whose amino groups will serve as anchoring sites for further functionalization and, for the first portion added, organic fluorophores (rhodamine B isothiocyanate (RBITC)) conjugated to APTES. The thickness of the shell which is fixed by the amount of reagents (shell precursors and aqueous triethylamine solution) is about 2 nm (Figure 1b). As these particles are not sufficiently stable in biological medium (aqueous solutions at pH 7.4 and 150 mM NaCl or 300 mM sucrose), their surface was derivatized by a biocompatible and hydrophilic polymer. A low molecular weight poly(ethylene glycol) ($250 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) with both extremities carrying carboxylic acid groups ($\text{PEG}(\text{COOH})_2$) was therefore grafted by one out of two ends to the aminated surface of the hybrid core-shell nanoparticles through amide linkage. Such a post-functionalization induces an increased colloidal stability in neutral and alkaline aqueous solutions due to the carboxylate groups. The stability is ensured by electrostatic repulsion

between particles since carboxylate groups confer to the particles a negative ζ -potential varying from -16 mV at pH 4 to -42 mV at pH 11. Before applying these nanoparticles for in vivo applications, a severe protocol for the purification of the nanoparticles was developed in order to remove the toxic Gd^{3+} ions, short ungrafted polysiloxane chains and PEG.

The study of the cytotoxic effect of hybrid gadolinium oxide nanoparticles was performed with EL4-Luc cells using thermal neutron beam of the Centre d'Etudes et de Recherche par Irradiation (CERI, Orléans, France). Except in the case of the monitoring of particles uptake by fluorescence, EL4 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were transfected by luciferase coding gene (further called EL4-Luc) and were therefore bioluminescent. As their bioluminescence is dependent on the metabolic activity, survival of cells and their proliferative capacity were determined by the measurement of bioluminescence intensity: dead cells do not emit light anymore. Prior to their irradiation, EL4-Luc cells were incubated with the hybrid gadolinium oxide nanoparticles in buffered sucrose media for 30 minutes. After a thorough washing of the cells (by a cycle of centrifugation - removal of the supernatant - resuspension in fresh complete cell culture medium) which aimed at removing particles, the uptake of the particles from cells has been monitored by fluorescence microscopy and by MRI since these hybrid particles contain rhodamine B moieties covalently bound to the polysiloxane shell and paramagnetic Gd_2O_3 core. Fluorescence microscopy confirms the uptake of the particles by EL4 cells: cells exposed to the particles are detected by the characteristic red light emitted by rhodamine B (Figure 2).

The labelling of cells is also revealed by MRI. T_1 -weighted images of agar gel phantoms containing EL4-Luc cells (with 24×10^6 cells per mL) show obviously that cells incubated with nanoparticles (concentration during the incubation: $[Gd]_{inc} = 0.3$ mM) appear brighter than the negative control (i.e. cells which were not incubated with the nanoparticles) (Figure 3). The

positive contrast enhancement (120%) reflects the uptake of the nanoparticle by EL4-Luc cells.

The quantification of the amount of hybrid nanoparticles in cells, in respect with the concentration used for incubation, was achieved by ICP-MS experiments. Prior to the analysis, each sample with a known cell density was dissolved in concentrated nitric acid and diluted in HNO₃ solution containing a precise amount of indium element as control. The amount of gadolinium detected in each sample which is correlated to the uptake of the nanoparticle by EL4-Luc cells increases with incubation concentration until to reach a plateau at about 14 pg per cell for [Gd]_{inc} = 0.1 mM (Figure 4).

Since NCT (like all the binary system therapy) is based on the innocuousness of the agents (i.e. the hybrid nanoparticles) and of the thermal neutron beam, the viability of the EL4-Luc cells was checked after incubation step and after irradiation of untreated cells. The proliferative capacity of EL4-Luc cells was determined by the evolution of the I to I_0 ratio where I_0 , which is taken as reference, is the bioluminescence intensity of cells in complete culture medium measured at t_0 (i.e. just after the treatment (incubation or irradiation) and washing steps) and I is the intensity measured in the same conditions but at various time $t > t_0$. The increase of this ratio indicates that the EL4-Luc cells proliferate whereas the decrease reflects both the disappearance of cells arisen from the lethal effect of the treatment and the alteration of the cellular activity which prevents the normal unfolding of the mitosis cycle and therefore the proliferation of the cells. Whatever the nanoparticles concentration used for the incubation, the I to I_0 ratios increase and follow over the time a similar increasing evolution than the ratio determined for the negative control cells (Figure 5a). Even if the labeled cells proliferate slightly less rapidly than the unlabeled ones do (the negative control), we can deduce from the data that the alteration of the metabolic activity of the cells associated to the nanoparticles internalization is very moderate. Proliferation occurs almost at the same rate than in the case of the unlabeled cells.

Figure 5b shows that the proliferation of the unlabeled EL4-Luc cells is not affected by thermal neutron irradiation up to a delivered dose of 3 Gy: the increasing evolution of the I to I_0 ratio over time of each irradiated sample is identical to the one observed for non-irradiated sample. However it must be pointed out that unloaded cells submitted to a 7 Gy dose are affected since I/I_0 ratio remains constant during 42 h. This indicates that no proliferation occurs. Since these preliminary experiments revealed that the uptake of the hybrid nanoparticles (with gadolinium concentration varying from 0.01 mM to 0.3 mM) and the neutron irradiation of unloaded cells (for a dose ≤ 3 Gy) do not inhibit the proliferation of the EL4-Luc cells, the cytotoxic effect of the particles as Gd-NCT agents was studied in these ranges of incubation concentration and neutron irradiation dose. To achieve this goal, three batches of 5 samples (unlabeled EL4-Luc cells as negative control and four series of labeled EL4-Luc cells which were distinguished by the incubation concentration) were irradiated with a different dose (1, 2 and 3 Gy).

Figure 6 gathers for each delivered dose the results obtained for the five cells samples. As previously reported (Figure 5a), the irradiation of the unlabeled cells (whatever the dose) does not alter their proliferation since I/I_0 , which is determined after the irradiation step, increases over time. On the other hand, the proliferative capacity of the nanoparticle-containing EL4-Luc cells closely depends on the incubation concentration (since it determines the gadolinium content in the cells (Figure 4)) and on the delivered dose. For the lowest concentration of incubation ($[Gd] = 0.01$ mM), the evolution of I/I_0 over the time after irradiation at 1 or 2 Gy is almost the same than the behavior observed for the unlabeled cells. The proliferative capacity is not affected for irradiation dose <3 Gy and the proliferation is only slowed down when the cells are exposed to a dose of 3 Gy. EL4-Luc cells, which were incubated with the highest hybrid nanoparticles concentrations (0.1 and 0.3 mM), exhibit a diametrically opposed behavior after the irradiation. I/I_0 ratios decreased quickly and dramatically up to zero 42 hours after the irradiation, whatever the studied dose. Even at the

lowest irradiation dose (1 Gy), the metabolic activity of these cells is so seriously affected that they do not survive. The cytotoxic effect observed for cells exposed to the highest concentration of incubation is assigned to the capture of the neutrons by the internalized nanoparticles since cell labeling with hybrid gadolinium oxide nanoparticles and neutron radiation alone have no cytotoxic effect in the same ranges of concentration and dose (Figure 5). The response of the labeled EL4-Luc cells which were incubated in a colloidal solution containing the gadolinium equivalent of 0.05 mM to the neutron irradiation is more dependent on the dose. Figure 7 displays the bioluminescence of gadolinium oxide nanoparticles labeled cells ($[Gd]_{inc} = 0.05$ mM, 7.6 pg/cell (Figure 4)) irradiated at various doses (0, 1, 2 and 3 Gy). The bioluminescence intensity remains almost constant during 42 h for 1 and 2 Gy while it decreases abruptly when 3 Gy were administered to these cells. 42 hours after the irradiation, no more light was emitted from the well containing gadolinium oxide nanoparticles loaded cells (7.6 pg/cell) irradiated at 3 Gy (Figure 7).

This qualitative observation is confirmed by the temporal evolution of I/I_0 ratios for various doses (Figure 6). For the lowest dose (1 Gy), the I to I_0 ratio remains constant up to 36 hours and then slightly increases (Figure 6a). This indicates that the irradiation of these nanoparticles loaded cells at 1 Gy generates a metabolic disorder which only delays the proliferation. The cellular alterations that occurred during the neutron capture from the particles are probably too minor and are easily repaired. But for higher dose the metabolic activity was more affected. For a delivered dose equals to 2 Gy, the proliferation is inhibited since I/I_0 slightly decreases while the damage inflicted on the cells at 3 Gy are largely more important: the cells are all killed ($I/I_0 = 0$, 42 hours after the irradiation).

In conclusion, this study shows the potential of hybrid gadolinium oxide nanoparticles as therapeutic agents. Although the uptake of these nanoparticles in EL4 cells and the irradiation of unlabeled cells are harmless, the irradiation of gadolinium oxide nanoparticles with thermal neutrons generates a cytotoxic effect. The administration of a 3 Gy dose leads

to the death of the EL4 cells only if they were, prior to the irradiation, incubated in a colloidal solution containing at least 0.05 mM Gd. The therapeutic activity, highlighted by this work, reinforces the attractiveness of these hybrid particles (composed of a gadolinium oxide core embedded in a luminescent polysiloxane shell) since their uptake by cells can be followed up by fluorescence imaging and MRI. These hybrid gadolinium oxide nanoparticles can therefore combine imaging and therapy and could be exploited both for the localization and the destruction of tumor.

ACKNOWLEDGMENT.

This work was supported by a grant from the regional council of Rhône-Alpes (France) and by ANR-05-NANO-037-02. The confocal microscopy on labeled EL4 cells was performed by Jérémie Fizet (Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR CNRS 5123, Université Claude Bernard Lyon1, Villeurbanne, France).

REFERENCES

- (1) Kelly, Y.; Kim, N. A. *Nanomedicine* **2007**, *3*, 103.
- (2) Sinha, R.; Kim, G. J.; Nie, S.; Shin, D. M. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1909.
- (3) Ferrari, M. *Nat. Rev.* **2005**, *5*, 161.
- (4) Pellegrino, T.; Kudera, S.; Liedl, T.; Muñoz Javier, A.; Manna, L.; Parak, W. J. *Small* **2005**, *1*, 48.
- (5) Cuenca, A. G.; Jiang, H.; Hochwald, S. N.; Delano, M.; Cance, W. G.; Grobmyer, S. R. *Cancer* **2006**, *107*, 459.
- (6) Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818.
- (7) Koo, Y.-E. L.; Reddy, G. R.; Bhojani, M.; Schneider, R.; Philbert, M. A.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D.; Kopelman, R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1556.
- (8) Torchilin, V. P. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1532.
- (9) Ohulchanskyy, T. Y.; Roy, I.; Goswami, L. N.; Chen, Y.; Bergey, E. J.; Pandey, R. K.; Oseroff, A. R.; Prasad, P. N. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2835.
- (10) Choi, M.-R.; Stanton-Maxey, K. J.; Stanley, J. K.; Levin, C. S.; Bardhan, R.; Akin, D.; Badve, S.; Sturgis, J.; Robinson, J. P.; Bashir, R.; Halas, N. J.; Clare, S. E. *Nano Lett.* **2007**, 10.1021/nl072209h
- (11) Loo, C.; Lowery, A.; Halas, N. J.; West, J.; Drezek, R. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 709.
- (12) Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2115.
- (13) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. *Phys. Med. Biol.* **2004**, *49*, N309-N315.

- (14) Shi Kam, N. W.; O'Connell, M.; Wisdom, J. A.; Dai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 11600.
- (15) Soloway, A. H.; Tjarks, W.; Barnum, B. A.; Rong, F.-G.; Barth, R. F.; Codogni, I. M.; Wilson, J. G. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2389.
- (16) De Stasio, G.; Casalbore, P.; Pallini, R.; Gilbert, B.; Sanita, F.; Ciotti, M. T.; Rosi, G.; Festinesi, A.; Larocca, L. M.; Rinelli, A.; Perret, D.; Mogk, D. W.; Perfetti, P.; Mehta, M. P.; Mercanti, D. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4272.
- (17) Barth, R.F.; Coderre, J.A.; Vicente, G.H.; Blue, T.E. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3987.
- (18) Valliant, J. F.; Guenther, K. J.; King, A. S.; Morel, P.; Schaffer, P.; Sogbein, O. O.; Stephenson, K. A. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 173.
- (19) Mody, T. D. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2000**, *4*, 362.
- (20) Bregadze, V. I.; Sivaev, I. B.; Gabel, D.; Wöhrle, D. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, *5*, 767.
- (21) Caravan, P. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 512-523.
- (22) Barth, R. F.; Adams, D. M.; Soloway, A. H.; Alam, F.; Darby, M. V. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 58.
- (23) Parrott, M. C.; Marchington, E. B.; Valliant, J. F.; Adronov, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12081.
- (24) Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Saga, T.; Sato, N.; Ishimori, T.; Konishi, J.; Ono, K.; Togashi, K.; Brechbiel, M. W. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 587.
- (25) Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Bernardo, M.; Brechbiel, M. W.; Knopp, M. V.; Choyke, P. L. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 343.
- (26) Watanabe, T.; Ichikawa, H.; Fukumori, Y. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54*, 119.

- (27) Oyewumi, M. O.; Mumper, R. J. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1328.
- (28) Saha, T. K.; Ichikawa, H.; Fukumori, Y. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2835
- (29) Le, U. M.; Cui, Z. *Int. J. Pharm.* **2006**, *320*, 96.
- (30) Mortensen, M. W.; Bjorkdahl, O.; Sorensen, P. G.; Hansen, T.; Jensen, M. R.; Gundersen, H. J. G.; Bjornholm, T. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 284.
- (31) Bridot, J.-L.; Faure, A.-C.; Laurent, S.; Riviere, C.; Billotey, C.; Hiba, B.; Janier, M.; Josserand, V.; Coll, J.-L.; Vander Elst, L.; Muller, R.; Roux, S.; Perriat, P.; Tillement, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5076.
- (32) Bazzi, R.; Flores-Gonzalez, M. A.; Louis, C.; Lebbou, K.; Dujardin, C.; Brenier, A.; Zhang, W.; Tillement, O.; Bernstein, E.; Perriat, P. *J. Lumin.* **2003**, *102-103* 445.
- (33) Bazzi, R.; Flores, M. A.; Louis, C.; Lebbou, K.; Zhang, W.; Dujardin, C.; Roux, S.; Mercier, B.; Ledoux, G.; Bernstein, E.; Perriat, P.; Tillement, O. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *273*, 191.
- (34) Louis, C.; Bazzi, R.; Marquette, C. A.; Bridot, J.-L.; Roux, S.; Ledoux, G.; Mercier, B.; Blum, L.; Perriat, P.; Tillement, O. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1673.

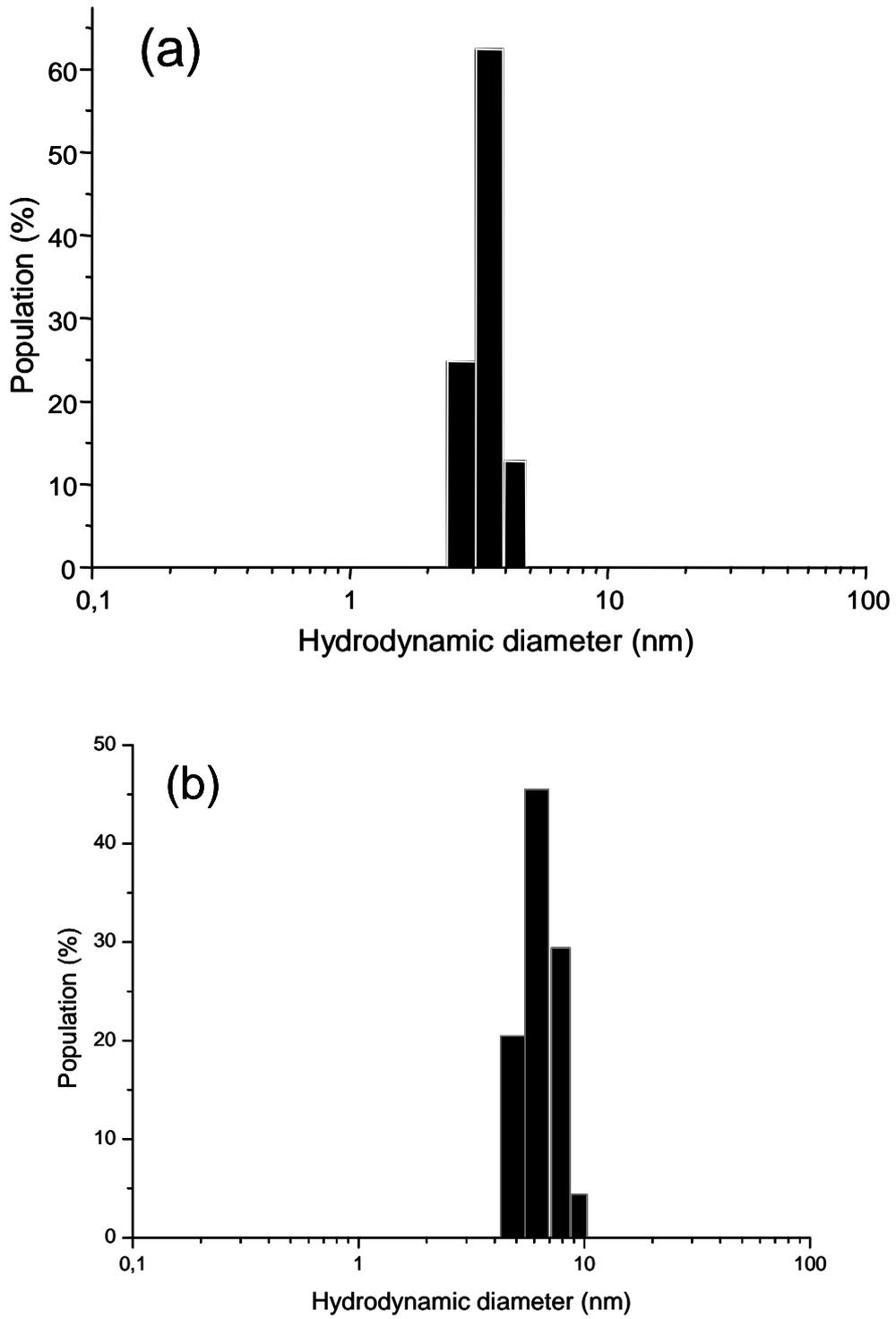


Figure 1. Size distribution determined by photon correlation spectroscopy

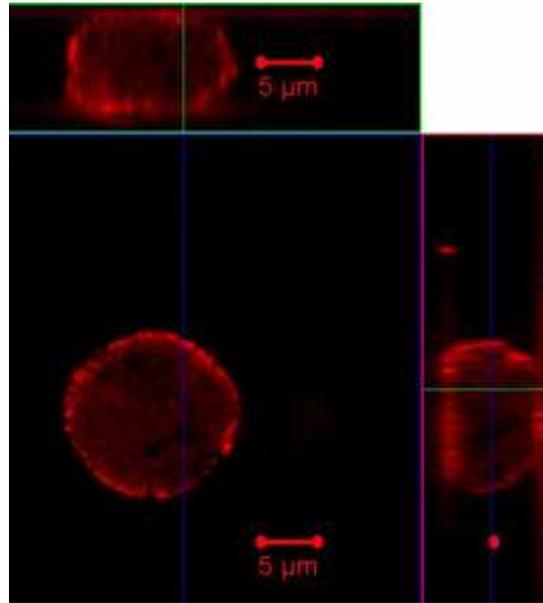


Figure 2. Confocal microscopy image of EL4 cell after incubation in presence of luminescent hybrid gadolinium oxide particles.

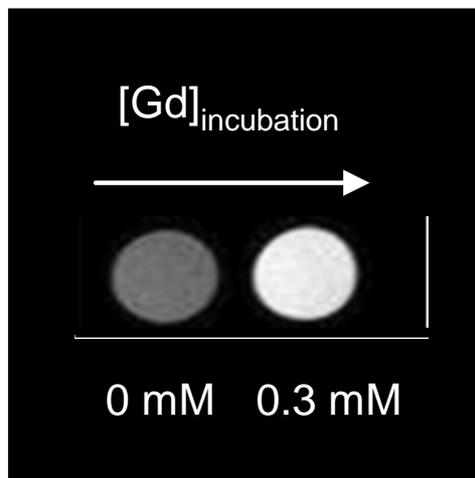


Figure 3. T₁-weighted images of agar gel phantoms containing unlabeled EL4-Luc cells and (b) hybrid gadolinium oxide nanoparticles loaded EL4-Luc cells.

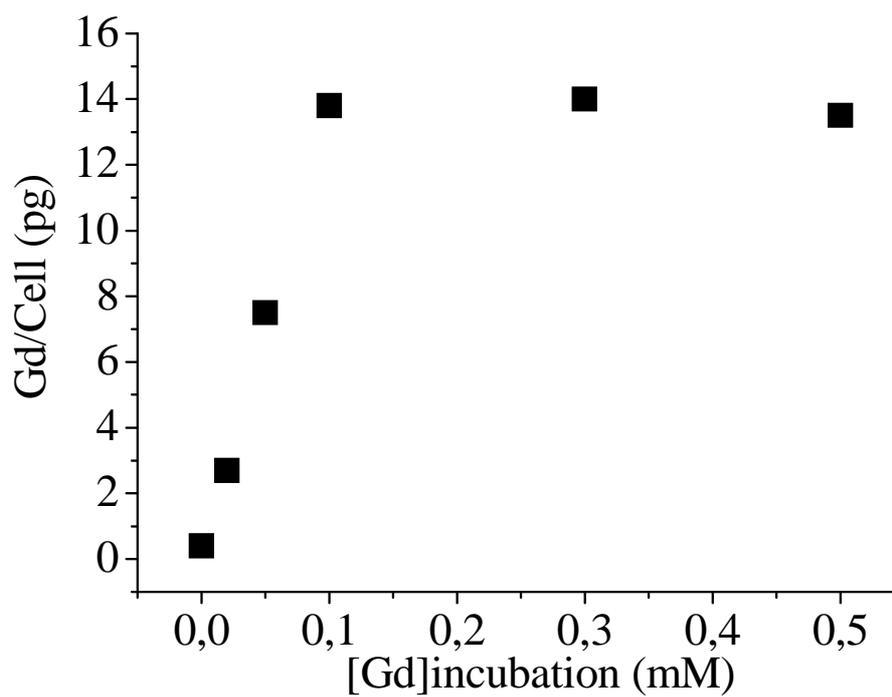


Figure 4. ICP-MS analysis of cells after incubation with gadolinium.

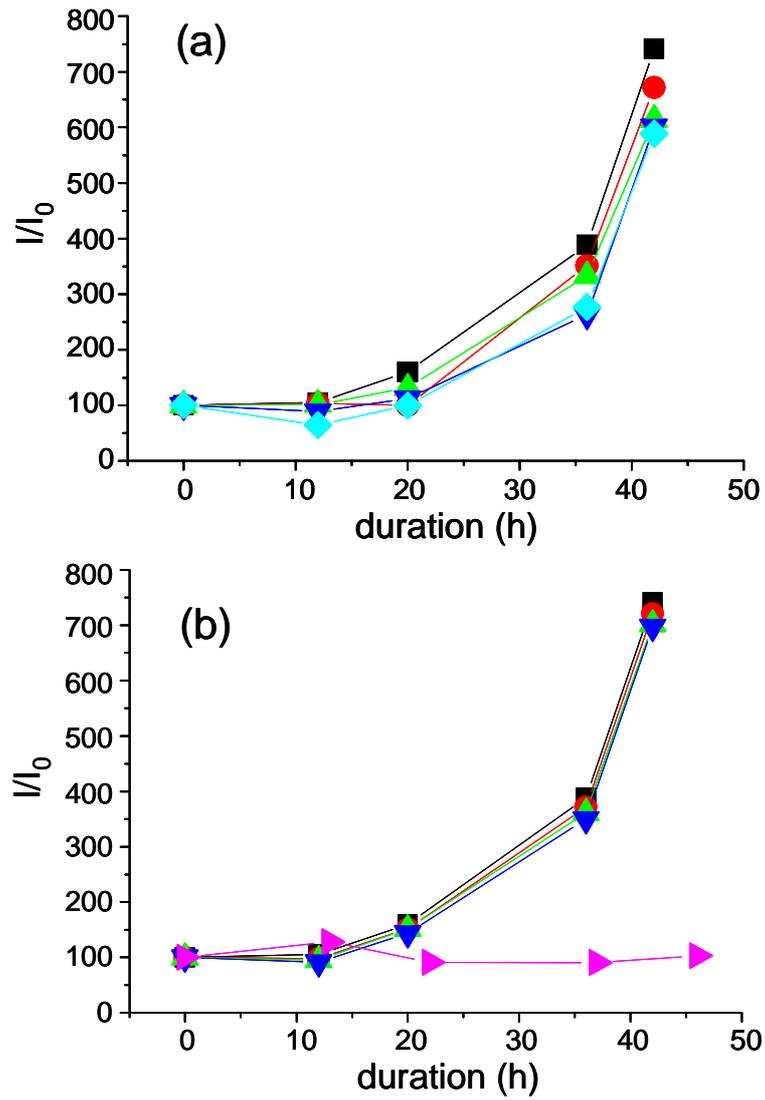


Figure 5. Temporal evolution of I/I_0 for EL4-Luc cells after incubation in solution containing various concentration of hybrid Gd_2O_3 nanoparticles and unloaded EL4-Luc cells after exposure to a thermal neutron beam at various dose.

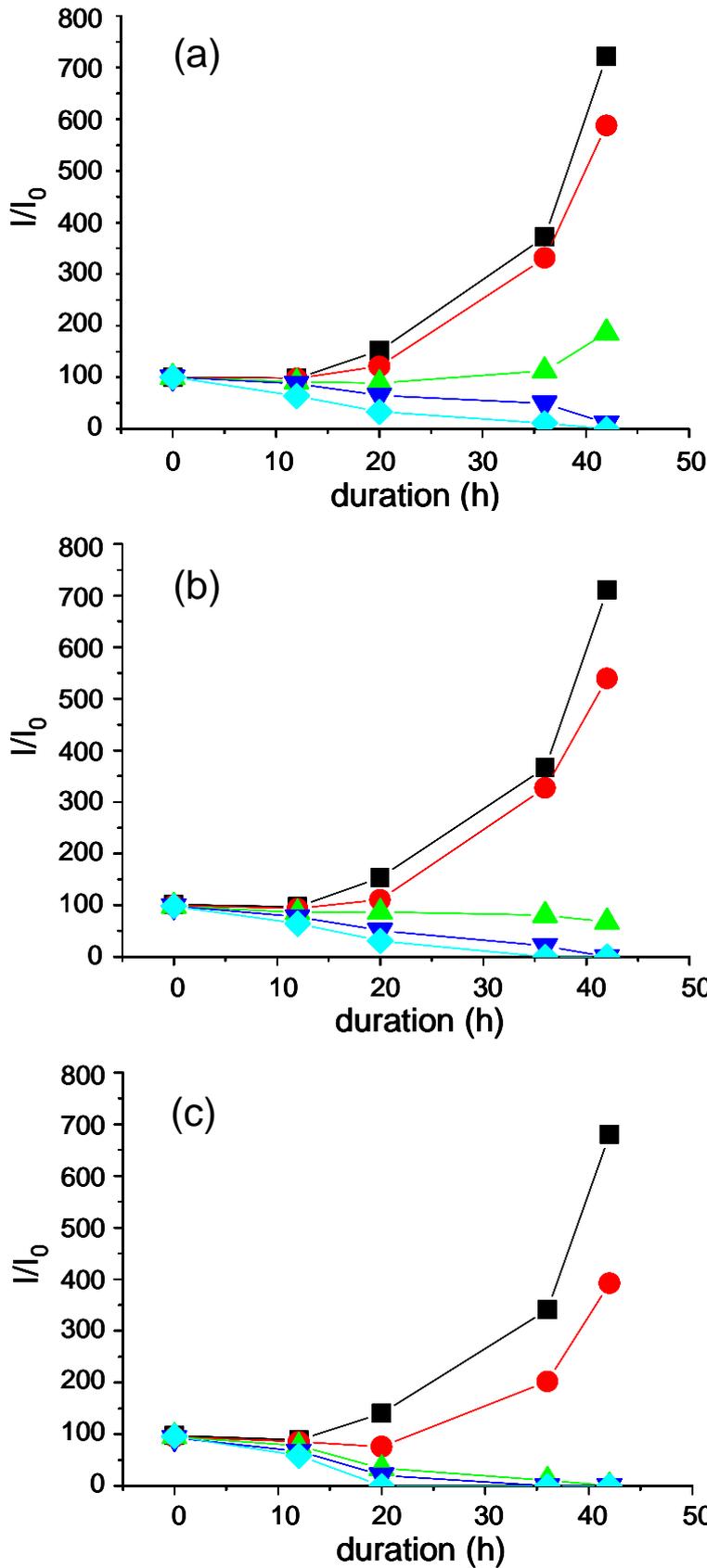


Figure 6. temporal evolution of I/I_0 for Gd_2O_3 nanoparticle loaded EL4-Luc cells after thermal neutron irradiation.

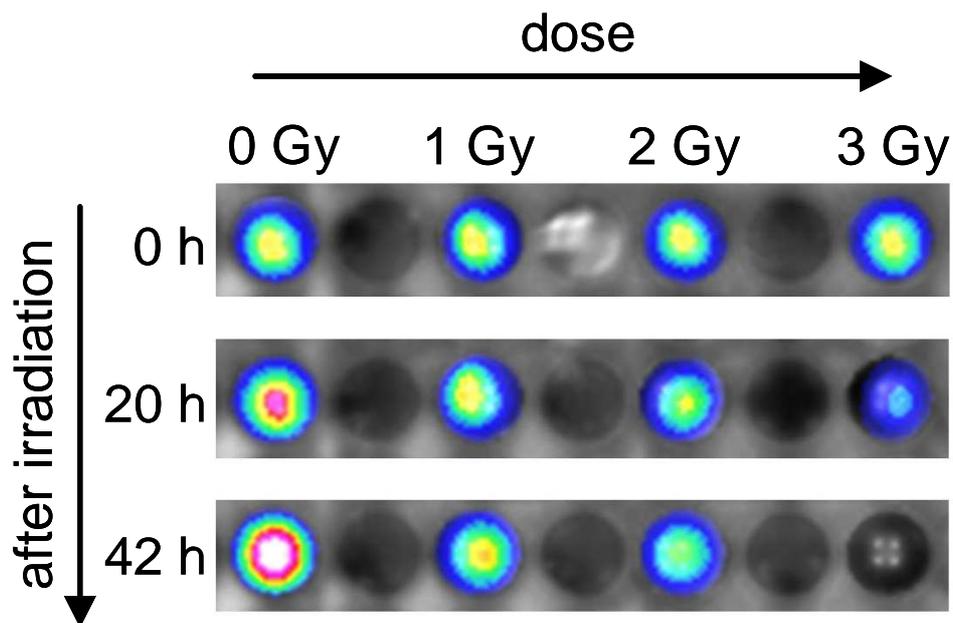


Figure 7. Temporal evolution of bioluminescence of nanoparticles containing EL4-Luc cells after the thermal neutron irradiation .

FIGURES LEGEND

Figure 1. Size distribution determined by photon correlation spectroscopy of (a) Gd_2O_3 nanoparticles and (b) Gd_2O_3 core embedded in a polysiloxane shell (thickness ~ 2 nm).

Figure 2. Confocal microcopy image of EL4 cell after incubation in presence of luminescent hybrid gadolinium oxide particles.

Figure 3. T_1 -weighted images of agar gel phantoms containing (a) unlabeled EL4-Luc cells and (b) hybrid gadolinium oxide nanoparticles loaded EL4-Luc cells (24×10^6 cells per mL for each sample).

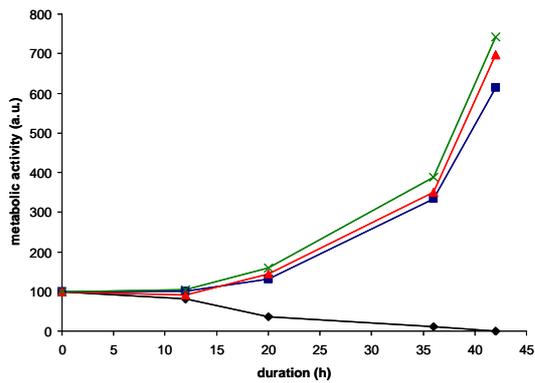
Figure 4. ICP-MS analysis of cells after incubation with solution containing various gadolinium concentration (i.e. various amount of Gd_2O_3 nanoparticles).

Figure 5. temporal evolution of I/I_0 for (a) EL4-Luc cells after incubation in solution containing various concentration of hybrid Gd_2O_3 nanoparticles ($[Gd]_{inc} = 0$ (■), 0.01 (●), 0.05 (▲), 0.10 (▼) and 0.30 mM (◆)) and (b) unloaded EL4-Luc cells after exposure to a thermal neutron beam at various dose ((■) 0 Gy, (●) 1 Gy, (▲) 2 Gy, (▼) 3 Gy and (▶) 7 Gy).

Figure 6. temporal evolution of I/I_0 for Gd_2O_3 nanoparticle loaded EL4-Luc cells after thermal neutron irradiation at (a) 1Gy , (b) 2Gy and (c) 3Gy. $[Gd]_{inc} = 0$ (■), 0.01 (●), 0.05 (▲), 0.10 (▼) and 0.30 mM (◆).

Figure 7. temporal evolution of bioluminescence of nanoparticles containing EL4-Luc cells after the thermal neutron irradiation at 0, 1, 2 and 3 Gy ($[Gd]_{inc} = 0.05$ mM).

TABLE OF CONTENT



Metabolic activity of

unlabeled EL4

unlabeled EL4 after neutron irradiation

hybrid Gd₂O₃ nanoparticles labeled EL4

hybrid Gd₂O₃ nanoparticles labeled EL4

after neutron irradiation

IV - Matériels et méthodes complémentaires à ceux de l'article

Dans l'article nous avons présenté l'utilisation de particules d'oxydes de gadolinium à l'interface de l'imagerie et de la thérapeutique. Nous avons notamment montré l'effet des particules sur l'irradiation neutronique des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc. Nous avons décidé secondairement d'amplifier l'action de ces particules en greffant à leur surface des atomes de bore. En effet, Les composés absorbants le mieux les neutrons sont le bore, le gadolinium et le xénon. Ainsi l'ajout de bore à la surface des particules d'oxydes de gadolinium devrait amplifier l'effet des neutrons sur les cellules tumorales, les atomes de bore jouant alors le rôle "d'antenne relais" pour les atomes de gadolinium.

A - Internalisation de nanoparticules hybrides d'oxydes de gadolinium et de bore

Les cellules EL4-huCD20-Luc ont été centrifugées (5 minutes à 1600rpm) et lavées plusieurs fois en PBS. Le surnageant de chaque tube a ainsi été remplacé par 50 mL de solution de saccharose (300 mM, solution de fixation et d'internalisation des particules compatible avec la survie des cellules EL4-huCD20-Luc). Après une centrifugation supplémentaire, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire a été repris dans un volume adéquat de solution de saccharose afin d'ajuster la concentration à $3 \cdot 10^6$ cellules EL4-huCD20-Luc par mL. Les particules hybrides d'oxydes de gadolinium et de bore ont été ajoutées à la suspension cellulaire afin que la concentration en particules soit de 0 - 0,01 - 0,05 - 0,10 et 0,30 mM. Les suspensions ont été incubées durant 30 minutes à 37°C et 5% de CO₂. Les échantillons ont été homogénéisés régulièrement afin de maintenir les

cellules en suspension. Après cette étape de fixation des particules, les cellules ont été centrifugées (15 minutes à 1600rpm) et lavées plusieurs fois dans une solution de saccharose afin d'ôter les particules hybrides non fixées. Enfin les cellules ont été reprises en milieu de culture complet RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Inc. St Louis, MO, Etats Unis), complémenté par du sérum de veau foetal (10% (v/v); Gibco BRL, Tokyo, Japon), pénicilline 100,000 U/L (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), streptomycine 100 mg/L (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les échantillons ont été placés à 37°C et 5% de CO₂ pendant 30 minutes afin de favoriser l'internalisation des particules au sein des cellules. Pour la préparation de l'irradiation neutronique, 5 mL de chaque échantillon ont été distribués en tubes de 5 mL (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France). Cinq tubes ont été préparés pour chaque condition. Les tubes ont été scellés à l'aide de parafilm (Laboandco, Mandres-les-Roses, France) et le volume de liquide a été optimisé afin de limiter la taille de la bulle d'air dans le tube.

B - Irradiation neutronique des cellules et des particules.

Les cellules chargées avec les particules d'oxydes de gadolinium et de bore et les cellules non chargées (protocole d'internalisation en l'absence de particules) ont été irradiées à l'aide d'un faisceau de neutrons au cyclotron d'Orléans (France) par séries de 5 tubes sous 30cm d'eau maintenue à 37°C. La durée de l'irradiation est proportionnelle à l'intensité du faisceau de neutrons au moment de l'essai et à la dose effectivement délivrée (0, 1, 2 et 3 Gy). Afin que les conditions soient comparables entre elles, l'ensemble des échantillons (dose d'irradiation et charge de particules) ont été traités dans des conditions identiques. Après cette étape d'irradiation et après s'être assuré que l'irradiation neutronique n'avait pas engendré une radioactivité trop importante au sein du tube, les échantillons ont été transférés dans des flasques de culture individuelles (Sigma Aldrich, Saint Louis,

MO, Etats Unis) contenant 25 mL de milieu de culture complet (concentration cellulaire finale : 1.10^6 cellules/mL afin de se situer dans une zone de sensibilité de bioluminescence optimale) et ont été mis en culture à 37°C et 5% CO₂.

V - Résultats complémentaires à ceux de l'article

A - Toxicité des particules hybrides d'oxydes

Dans un premier temps nous nous sommes intéressé à la toxicité des particules hybrides d'oxydes de gadolinium avec ou sans bore vis-à-vis des cellules tumorales. Cet essai nous a aussi permis de vérifier l'homogénéité des échantillons. Pour ce faire les particules ont été internalisées comme présenté dans l'article et dans le paragraphe précédent. Une fois les échantillons répartis dans les tubes destinés aux différentes irradiations, un aliquote de chaque tube a été prélevé et l'activité de bioluminescence a été mesurée en triplicate, les moyennes et les écarts types ont été calculés (Figure 53). Les écarts types sont très faibles ce qui confirme la stabilité et la reproductibilité de la mesure de l'activité de bioluminescence. On observe que, pour une concentration en particules donnée et quelle que soit la dose d'irradiation utilisée par la suite, les intensités de bioluminescence sont identiques ce qui nous autorise à comparer les échantillons entre eux. Ensuite on peut observer une relation dose - effet entre la concentration en particules d'oxydes et la toxicité immédiate observée sur les cellules. Plus la concentration en particules est élevée et moins les cellules sont dans un état métabolique satisfaisant après internalisation, les différences étant significatives. Cette toxicité est plus faible pour les particules d'oxydes de gadolinium (Figure 53 A) que pour les particules d'oxydes de gadolinium et de bore (Figure 53 B). Pour le premier type de particules nous n'observons pas de différence significative entre les concentrations de 0.05 mM, 0.01 mM et les échantillons contrôles. Pour le second type de particules, cette différence est significative et montre la toxicité accrue des particules en présence de

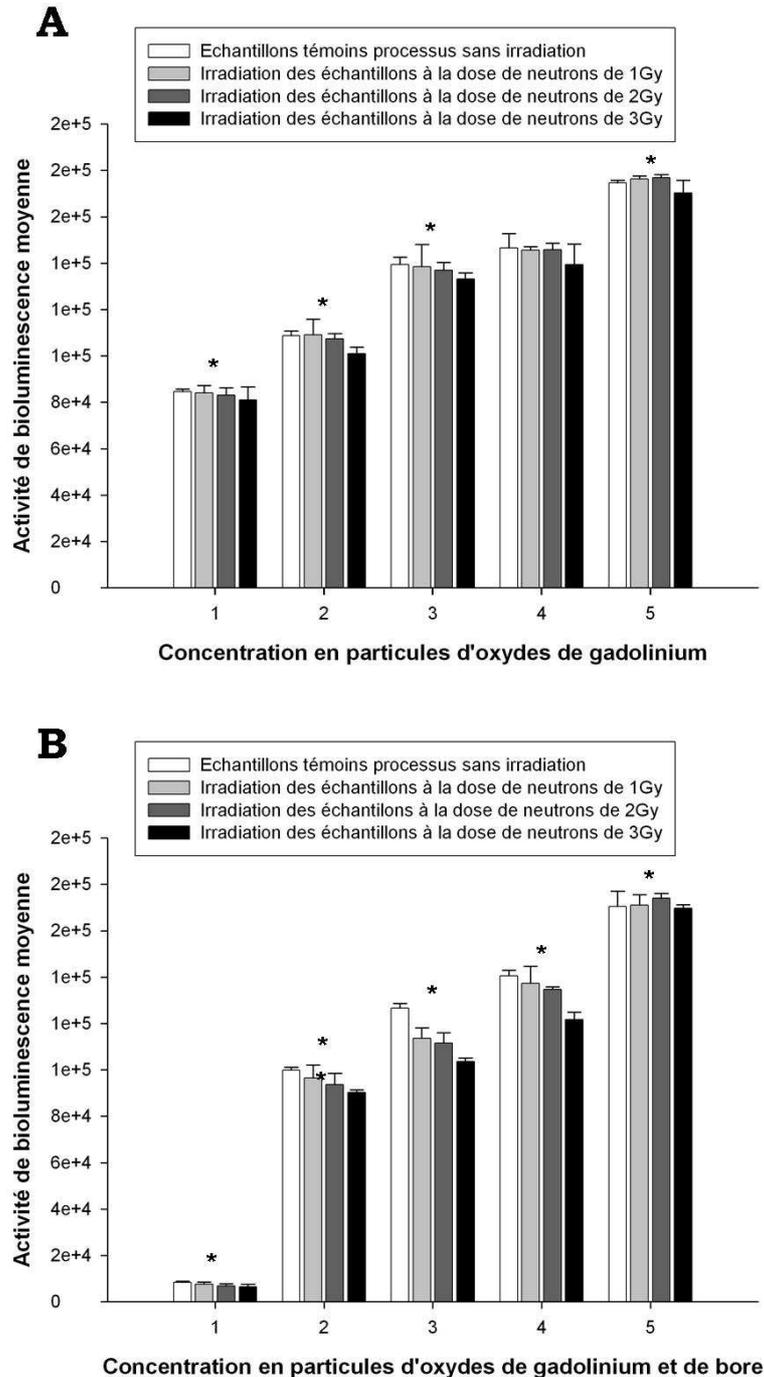


Figure 53 : Analyse de la toxicité immédiate des particules d'oxydes sur les cellules tumorales avant irradiation.

Les particules hybrides d'oxydes de gadolinium (A) ou d'oxydes de gadolinium et de bore (B) ont été internalisées au sein de cellules EL4-huCD20-Luc selon le protocole présenté. Les échantillons ont été répartis dans différents tubes et sont destinés à une irradiation de 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy ou 3 Gy. La concentration en particules lors de la fixation est de 0.30 mM (en 1), 0.10 mM (en 2), 0.05 mM (en 3), 0.01 mM (en 4) et 0.00 mM (en 5). L'activité de bioluminescence de chacun des échantillons est déterminée avant irradiation, * signifie une différence significative entre les différents groupes.

bore. Lorsque cette concentration est de 0.30 mM seulement 5% des cellules sont bioluminescentes. La concentration en particules lors de l'internalisation a donc une grande importance. Afin que les résultats ne soient pas influencés par cette toxicité immédiate nous avons décidé d'analyser l'effet de l'irradiation neutronique sur une évolution d'activité de bioluminescence. Ainsi pour chaque mesure de bioluminescence après irradiation, nous avons comparé son activité avec la mesure initiale et défini un pourcentage d'évolution de l'activité métabolique. Le signal de bioluminescence est non seulement proportionnel au nombre de cellules (indicateur de leur capacité à se diviser) mais aussi de leur état métabolique (Figure 53).

B - Relation dose - effet des particules hybrides boostées au bore sur l'activité métabolique cellulaire

Afin d'analyser l'impact des particules d'oxydes sur l'évolution de l'activité métabolique cellulaire nous avons fait varier la concentration en particules au moment de l'internalisation ainsi que la dose de neutrons délivrés lors de l'irradiation. Lorsque nous faisons varier la concentration en particules nous observons une relation dose - effet (Figure 54). La présence de bore amplifie l'irradiation des neutrons et montre un effet plus important que les particules de gadolinium. En l'absence d'irradiation (0 Gy) les cellules répondent déjà fortement aux particules. Avec des concentrations de 0.10 mM et 0.30 mM, l'activité métabolique s'effondre rapidement et est nulle 12 heures après l'irradiation. On retrouve ici l'effet toxique des particules vis-à-vis des cellules tumorales. Bien qu'après internalisation les cellules aient été lavées et qu'elles aient été introduites dans un grand volume de culture, les cellules vont réaliser un phénomène de chasse en expulsant les particules. Leur concentration va progressivement augmenter dans le milieu et vont présenter un effet toxique. Ce problème semble être limité avec les concentrations inférieures ou égales à 0.05 mM. Dès la première

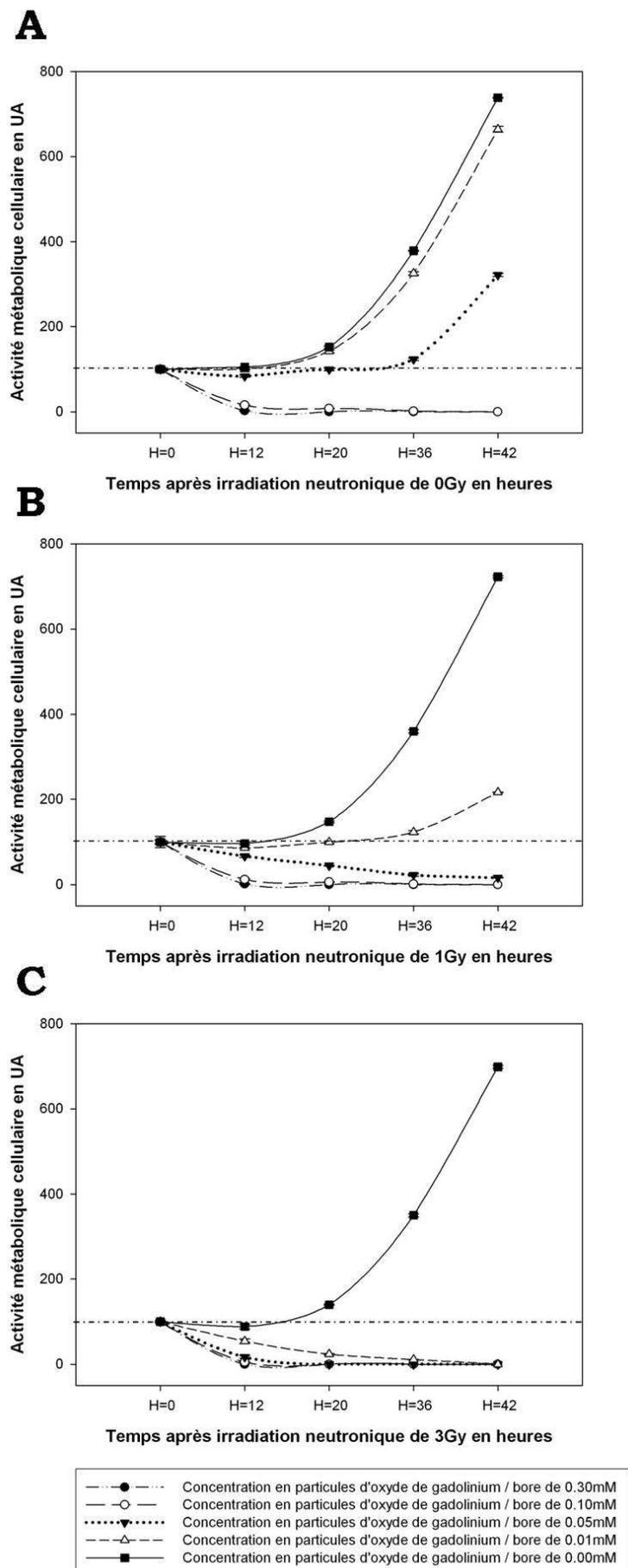


Figure 54 : Relation dose - effet de la concentration en particules sur l'activité métabolique cellulaire.

Suivi de l'évolution de l'activité métabolique cellulaire après 0, 12, 20, 36 et 42 heures d'échantillons ayant subi une irradiation de neutrons. Les particules hybrides d'oxydes de gadolinium et de bore ont été internalisées à la concentration de 0 mM (■), 0.01 mM (△), 0.05 mM (▼), 0.10 mM (○) et 0.30 mM (●).

A. Irradiation des échantillons à la dose de 0 Gy (témoin contrôle).

B. Irradiation des échantillons à la dose de 1 Gy.

C. Irradiation des échantillons à la dose de 3 Gy.

irradiation à 1 Gy on voit un effet net sur l'évolution de l'activité métabolique des cellules. On peut noter que l'effet est bien plus important qu'avec des particules d'oxydes de gadolinium "simples". Avec une concentration de 0.01 mM de particules, après 42 heures l'état métabolique n'est que le tiers de celui qu'il est sans particules. L'activité des échantillons dont la concentration en particule est supérieure à 0.05 mM s'effondre rapidement : la totalité des cellules sont endommagées et ne se divisent plus. A 3 Gy nous observons le même phénomène puisqu'une dose de particule de 0.01 mM est suffisante pour obtenir le même effet (Figure 54).

C - Relation dose - effet de l'irradiation neutronique sur l'activité métabolique cellulaire

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à l'effet de la dose d'irradiation sur l'évolution de l'activité métabolique (Figure 55). Cette figure nous permet de montrer une nouvelle fois l'effet très toxique de ce type de particules vis à vis des cellules tumorales. En effet avec une concentration de 0.10 mM de particules de gadolinium et de bore, l'activité métabolique s'effondre quelle que soit la dose d'irradiation. Nous retrouvons sur cette figure la faible toxicité des particules avec une concentration de 0.05 mM. En l'absence d'irradiation neutronique l'état métabolique baisse dans un premier temps avant de progresser de façon tout à fait correcte. Sous l'effet d'une irradiation cet état métabolique chute très rapidement. Il apparaît que l'irradiation est bien plus efficace lorsque les particules sont boostées par des atomes de bore. Lorsque la concentration en particules n'est que de 0.01 mM, l'effet toxique semble avoir disparu. En l'absence d'irradiation, l'évolution de l'état métabolique des cellules reste tout à fait correcte pour atteindre après 42 heures des valeurs proches de celles observées en l'absence de particules. Une irradiation de 1 Gy est suffisante pour obtenir un effet important

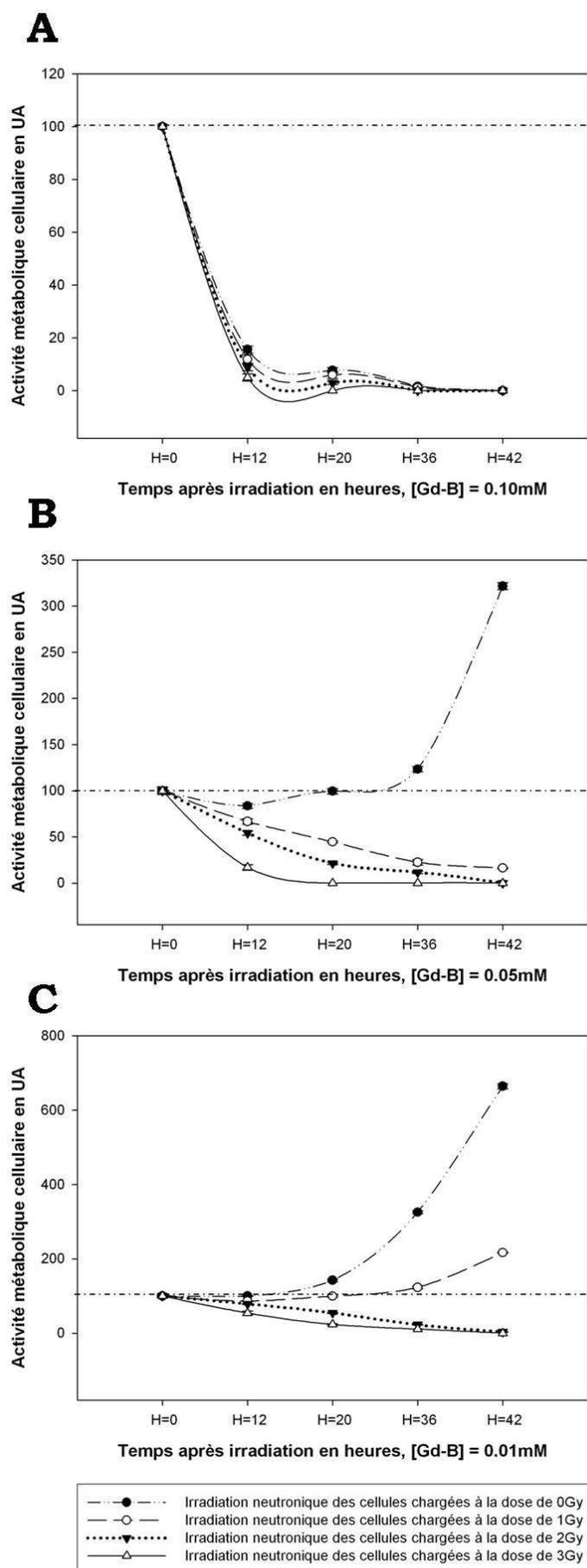


Figure 55 : Relation dose - effet de la dose d'irradiation sur l'activité métabolique cellulaire.

Suivi de l'évolution de l'activité métabolique cellulaire après 0, 12, 20, 36 et 42 heures d'échantillons ayant subi une irradiation de neutrons. Les échantillons ont été irradiés à la dose de 0 Gy (témoin) (●), 1 Gy (○), 2 Gy (▼) et 3 Gy (△), la durée de l'irradiation dépend de la dose de neutrons délivrée.

A. Concentration en particules d'oxydes de gadolinium et de bore de 0.10 mM.

B. Concentration en particules d'oxydes de gadolinium et de bore de 0.05 mM.

C. Concentration en particules d'oxydes de gadolinium et de bore de 0.01 mM.

sur les cellules. Cet effet est très important avec une dose d'irradiation supérieure à 2 Gy puisqu'il conduit à l'effondrement rapide de l'état métabolique (Figure 55).

D - Détermination des conditions optimales de l'effet radio thérapeutique des particules boostées

En nous plaçant dans la perspective d'un effet thérapeutique nous devons non seulement prendre en compte la concentration en particules au moment de l'irradiation neutronique, la dose en neutrons mais aussi nous placer dans des conditions telles que les cellules tumorales après irradiation soient encore viables mais incapables de se diviser permettant ainsi de réduire la toxicité de la procédure. Les cellules EL4-huCD20-Luc se divisent en 20 à 24 heures. Ainsi on peut définir deux facteurs d'efficacité biologique. Le premier, correspond à d'excellentes conditions d'irradiation et est caractérisé par l'obtention d'une activité métabolique réduite de 50% 20 heures après irradiation. Avec ce premier paramètre il y a une forte probabilité pour que l'ensemble des cellules ne soient plus capables de se diviser et que l'activité métabolique chute avec la mort des cellules. Cet effet thérapeutique doit pouvoir limiter la toxicité de la procédure. Le second facteur d'efficacité, a été défini comme les conditions d'irradiation nécessaires pour que l'activité métabolique après 20 heures ne soit plus que de 10% : la quasi-totalité des cellules présentes avant irradiation seraient alors mortes ce qui peut cependant préjuger d'une toxicité accrue de la procédure.

Dans l'essai réalisé avec les particules d'oxydes de gadolinium on observe un important effet thérapeutique. Avec une irradiation de 0 Gy il est impossible d'atteindre un facteur d'efficacité thérapeutique de 50% 24 heures après irradiation ce qui est parfaitement logique car la chute de l'activité métabolique observée ne correspond qu'à la toxicité des particules. Pour atteindre une efficacité thérapeutique de 50% avec une irradiation de 1 Gy ou 2 Gy la concentration en

particules d'oxydes de gadolinium doit être de 0.10 mM à 0.15 mM. Cependant dans ces conditions on se retrouve confronté aux problèmes de toxicité des particules vis-à-vis des cellules tumorales comme évoqués ci-dessus. Enfin avec une irradiation de 3 Gy la concentration doit être de 0.03 mM (Figure 56 A). On observe l'existence d'une étroite relation entre concentration en particules au moment de l'internalisation et dose d'irradiation nécessaire pour obtenir un facteur d'efficacité satisfaisant. Nous avons aussi observé qu'avec ce type de particules il était impossible d'obtenir un facteur d'efficacité de 90% à 20 heures quelle que soit la dose d'irradiation et la concentration en particules.

Lorsque nous nous sommes intéressés aux particules d'oxydes de gadolinium et de bore nous avons retrouvé l'effet plus important de ce type de particules. En l'absence d'irradiation, toute concentration supérieure à 0.05 mM présente d'importants effets. Pour obtenir un facteur d'efficacité de 50% à 20 heures avec une irradiation de 1 Gy la concentration en particules doit être de 0.05 mM, avec une irradiation de 2 Gy elle doit être de 0.01 mM et avec une irradiation de 3 Gy elle doit être de 0.008 mM (Figure 56 B). On retrouve pour ce type de particules l'étroite relation entre dose d'irradiation, concentration en particules et effet biologique observé. En ce qui concerne le facteur d'efficacité de 90% à 20 heures, il peut être observé pour une irradiation de 1 Gy ou 2 Gy avec des concentrations en particules proches de 0.10 mM et pour une irradiation de 3 Gy avec une concentration de 0.02 mM. Nous avons réalisé l'analyse complémentaire, c'est-à-dire que nous avons fixé les concentrations en particules d'oxydes et nous avons déterminé les doses d'irradiations neutroniques nécessaires pour avoir un facteur d'efficacité de 50% ou de 90%, 20 heures après irradiation. Nous avons obtenu des résultats similaires (Figure 56 C et 56 D).

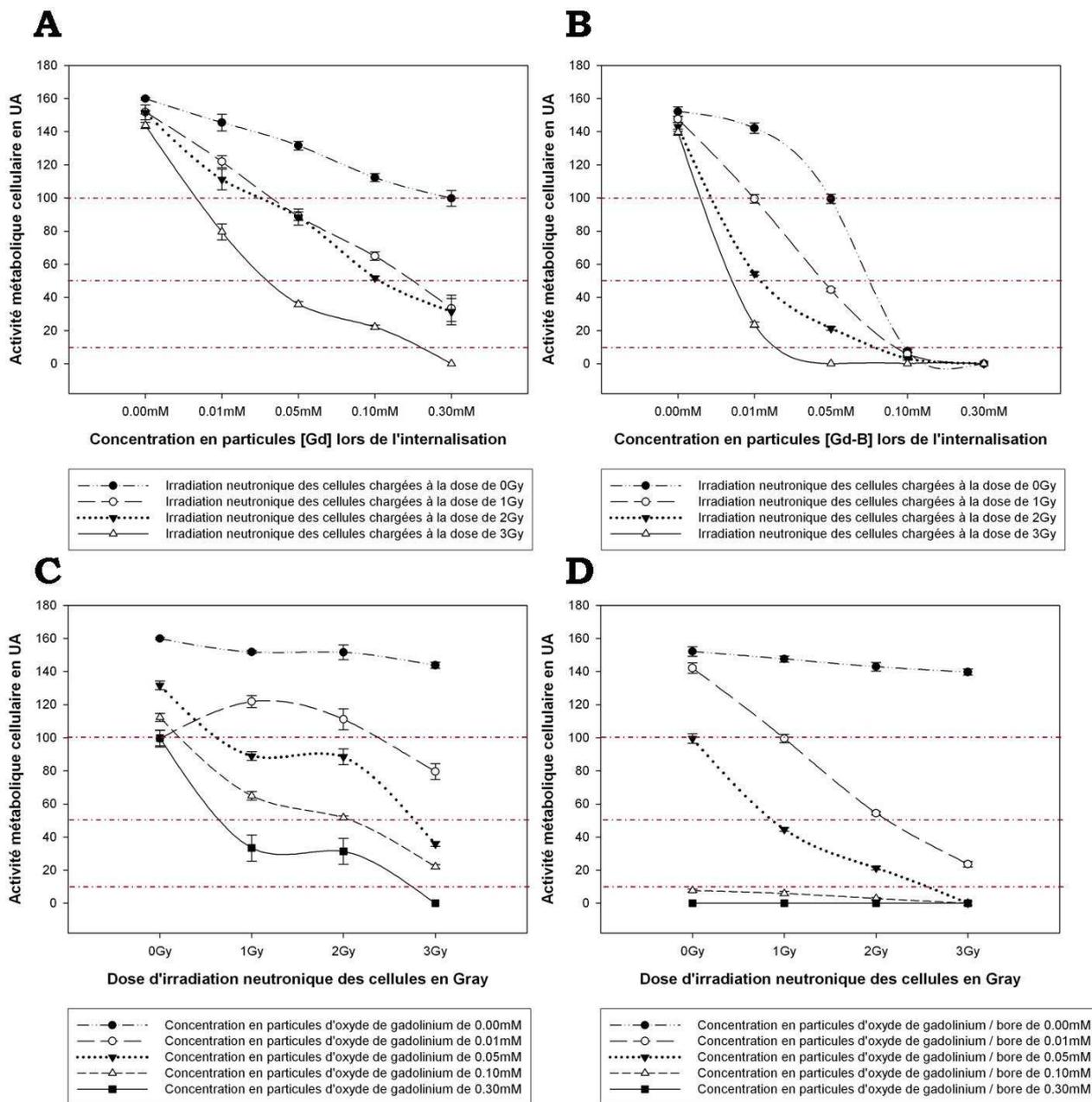


Figure 56 : Détermination des conditions de concentration en particules et d'irradiation pour l'obtention d'un effet biologique optimal.

Analyse de l'activité métabolique 20 heures après irradiation de particules d'oxydes hybrides internalisées au sein de cellules. Les particules ont été internalisées à la concentration de 0 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.10 mM, 0.30 mM et les irradiations ont été effectuées à la dose de 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy. Une activité métabolique de 100 correspond à un effet statique sur la multiplication des cellules tumorales. Les activités métaboliques 50 et 10 correspondent aux conditions des facteurs d'efficacité tels qu'ils ont été définis.

A. Concentration optimale en particules d'oxydes de gadolinium.

B. Concentration optimale en particules d'oxydes de gadolinium et de bore.

C. Dose d'irradiation optimale des particules d'oxydes de gadolinium.

D. Dose d'irradiation optimale des particules d'oxydes de gadolinium et de bore.

VI - Discussion et conclusion

Cette troisième partie repose sur l'étude de l'effet radiobiologique des neutrons sur des cellules tumorales EL4-huCD20-Luc via des particules d'oxydes de gadolinium boostées ou non par le bore. Les résultats obtenus sont très prometteurs.

Lorsqu'en radiothérapie on utilise un rayonnement on introduit la notion de survie cellulaire. Cette survie dépend de la dose de l'irradiation mesurée en Gray. Cette observation est aussi vraie pour la neutronthérapie. La courbe de survie cellulaire est variable d'un type cellulaire à l'autre ainsi les lignées de lymphomes sont plus sensibles aux neutrons que les lignées épithéliales et moins sensibles que les lignées de fibroblastes (Figure 52) ^{321,322}. On peut définir, pour un type cellulaire donné, l'efficacité biologique relative qui est le rapport entre la dose du rayonnement de référence et la dose de rayonnement donné. L'efficacité biologique permet de comparer les différentes solutions de radiothérapie et est une fonction du TEL (énergie du rayonnement directement proportionnel au numéro atomique de la particule), de l'effet biologique considéré, du modèle biologique (type cellulaire considéré) et de sa capacité à réparer les lésions et les altérations ^{323,324}. Lorsque les rayonnements vont interagir avec la cellule ils vont entraîner différents types de lésion. Ils peuvent altérer de façon réversible ou irréversible l'ADN, on considère que quel que soit le type cellulaire une irradiation de 1 Gy va entraîner 35 cassures de l'hélice double brin ³²⁵. Ils peuvent aussi intervenir au niveau du cycle cellulaire et entraîner son arrêt en provoquant des lésions chromosomales. Ainsi pour évaluer l'effet biologique d'un couple type cellulaire – particule on peut évaluer la proportion de cellules qui réussissent à réaliser une mitose après irradiation (Figure 52). Enfin il a été aussi montré que les rayons de particules pouvaient agir au niveau de protéines capitales dans la réalisation des différentes phases de la division cellulaire

³²⁶.

Nous avons étudié dans un premier temps l'aspect des particules d'oxydes synthétisées par tout un ensemble de techniques d'imagerie. Puis dans un second temps nous nous sommes intéressés à l'aspect imagerie et nous nous sommes assuré que les particules modifiées conservaient leurs propriétés utilisées dans la détection. Enfin nous avons étudié l'aspect thérapeutique de la combinaison de ces particules avec un faisceau de neutrons. Nous avons montré l'existence d'une toxicité immédiate de ces particules vis-à-vis des cellules tumorales. Cette toxicité s'observant d'une part lors de l'internalisation mais aussi plus tard pour les fortes concentrations où un phénomène de chasse a pu être observé. Cette toxicité étant bien plus importante pour les particules contenant des oxydes de bore. Une forte relation existe entre dose d'irradiation, concentration en particules et facteur d'efficacité. Ce paramètre nous a permis de définir des conditions optimales afin d'obtenir un effet biologique et thérapeutique satisfaisant. Nous sommes pour l'instant les seuls à avoir réalisé une étude fonctionnelle sur ces nanoparticules stimulées par des neutrons en relation avec un effet biologique. Bien que le monde des nano particules et des nano hybrides soit en pleine ébullition depuis quelques années, le passage de la chimie de synthèse à la biologie est souvent difficile. Dans cette étude les échantillons ont été placés dans des tubes, scellés puis pour l'irradiation, ils ont été placés sous 30cm d'eau à 37°C afin de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo* tout en conservant la souplesse des tests *in vitro*.

Nous aimerions maintenant pouvoir valider cette approche *in vivo*. Ainsi, grâce aux travaux effectués sur le modèle murin et exposés dans les parties précédentes, nous pourrions envisager l'inoculation de lymphomes à des souris C57Bl6J. Nous pourrions réaliser des examens de bioluminescence dans les conditions décrites afin de pouvoir quantifier le développement tumoral. L'application d'une telle technique dans le modèle murin nécessite la fixation de ces particules à un anticorps anti CD20. Il serait possible d'envisager d'utiliser la

fonction DOTA du zévalin pour assurer cette fixation à la condition que cela n'altère pas la capacité de liaison de l'anticorps au CD20. Après injection de l'anticorps marqué, l'analyse par IRM pourrait permettre de vérifier la localisation de l'anticorps, au niveau des sites tumoraux en comparaison à l'image de bioluminescence. Il serait alors possible d'évaluer l'efficacité de l'utilisation d'un faisceau de neutrons dans ce modèle.

A plus long terme, une telle stratégie thérapeutique pourrait être envisagée chez l'homme.

CONCLUSION GENERALE

Bien que le rituximab, utilisé seul ou en association avec de la chimiothérapie, ait montré son efficacité dans le traitement des lymphomes de faible et de haute malignité : lorsqu'il est utilisé en monothérapie, 30 à 50% des patients ne répondent pas au traitement. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette variabilité de réponse, parmi lesquelles l'importance de la masse tumorale, un faible niveau d'expression du CD20, la présence de formes solubles de CD20 ou encore de faibles concentrations sériques de rituximab. Les travaux qui ont évalué l'impact des paramètres liés à la tumeur et/ou l'hôte sur l'efficacité du traitement par le rituximab, n'ont pas permis l'individualisation des doses ou de la fréquence d'administration du rituximab ^{327,328}.

Chez l'homme, la réponse clinique après administration de rituximab semble corrélée à l'exposition au médicament, les concentrations de rituximab étant significativement plus élevées dans le groupe des patients répondeurs ¹⁹⁸. Les concentrations sériques de rituximab, représentant la fraction libre circulante, sont par ailleurs inversement corrélées à la masse tumorale. De la même manière, la déplétion lymphocytaire B liée au rituximab est corrélée à la concentration sérique de rituximab et au génotype *FCGR3A* ²⁷¹.

L'exposition au médicament ainsi que la masse tumorale constituent donc des facteurs de variabilité thérapeutique à prendre en compte, pour optimiser le traitement des patients atteints de lymphomes malins non hodgkiniens ²⁰⁶. Nous avons donc tenté dans ce travail d'évaluer l'influence de la masse antigénique sur l'exposition et la réponse thérapeutique au rituximab.

Dans un premier temps nous avons mis au point un modèle murin de lymphome B dans l'objectif d'étudier l'effet thérapeutique d'un traitement par le rituximab. Nous avons d'emblée choisi d'utiliser un modèle murin syngénique, un

tel choix nous a permis de limiter l'apparition de réactions du système immunitaire des animaux contre les cellules tumorales inoculées. De plus, nous avons pu travailler avec des animaux possédant un système immunitaire parfaitement développé et donc plus apte à présenter une réponse au traitement. Nous avons alors choisi d'utiliser la lignée lymphomateuse murine EL4. Cette lignée, utilisée depuis de très nombreuses années, présente outre une grande stabilité cellulaire, une grande facilité de culture et de clonage. Elle a donc constitué un outil de choix dans la création de notre modèle. Cette lignée a été dans un premier temps transduite par le CD20 humain. Nous avons ensuite envisagé un suivi de la progression tumorale. Le suivi classique par des mesures des tailles des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse nécessite de passer par un modèle de tumeur sous cutanée. Un tel modèle n'est pas en adéquation avec la problématique du projet. Nous avons alors envisagé de suivre la progression tumorale par une autre technique : la bioluminescence quantitative. Les progrès dans le domaine des systèmes de détection des photons ainsi que dans le traitement des images ont amené un grand intérêt à cette technique. Les cellules EL4-huCD20 ont été transfectées par un plasmide contenant le gène de la luciférase. Nous avons choisi de suivre à la fois la progression tumorale par imagerie de bioluminescence quantitative et la biodistribution de l'anticorps par scintigraphie. Une telle approche a imposé d'avoir un système d'imagerie insensible à la radioactivité. Nous avons donc utilisé le système Hamamatsu®. Ce système étant qualitatif et non quantitatif nous avons développé notre propre méthode de quantification. Cette dernière étant composée d'une première étape d'élimination des perturbations de l'image, à savoir le bruit de fond et le rayonnement cosmique, et d'une étape de délimitation automatique des régions d'intérêts des images analysées.

Nous avons ensuite défini les conditions expérimentales (nombre de cellules, voie d'administration, dose de luciférine de potassium, fond génétique, périodicité

des examens) permettant de reproduire chez la souris le développement d'un lymphome agressif et disséminé à larges cellules B létal dans un délai de 30 à 40 jours après inoculation. Ainsi nous avons pu montrer l'importance de la voie d'administration sur le développement tumoral et c'est pourquoi, pour des raisons de détection et de suivi des foyers de bioluminescence, la plupart des modèles murins faisant appel à cette technique sont des tumeurs sous cutanées. Quoiqu'il en soit le choix de l'injection des cellules par voie intraveineuse était conditionné par notre volonté de se placer dans un système expérimental proche de la pathologie humaine et nous avons montré qu'il était possible de quantifier de manière fiable et reproductible une maladie disséminée. La dissémination observée en imagerie de bioluminescence a été confirmée par des techniques plus "conventionnelles" comme la PCR ou les examens d'anatomopathologie. Nous avons aussi montré l'importance du moment de l'anesthésie des animaux par rapport à l'injection de la luciférine. Ces résultats souvent observés mais peu décrits ont des conséquences importantes dans le cadre de suivis de l'évolution de cellules bioluminescentes. En effet, la cinétique d'évolution étant modifiée par la taille des foyers étudiés ainsi que par le type même de modèle utilisé, il devient alors nécessaire en pratique d'étudier et d'optimiser ces paramètres avant la mise en place de tels projets. Ces résultats semblent confirmés par des travaux récemment publiés. Les auteurs se sont intéressés aux cinétiques d'émission de lumière dans un modèle de tumeur sous cutanée et ils ont montré la plus grande efficacité de détection lorsque la luciférine était injectée par voie intra veineuse pour des tumeurs de petite taille ^{261,269}. De même nous avons démontré la nécessité de travailler avec des injections de luciférine dont la dose correspond à la moitié de celle couramment utilisée et préconisée par les fournisseurs. A la dose de 80 mg/Kg le substrat de la réaction est tout de même en excès et ne limite pas la réaction mais permet de limiter l'effet cytotoxique de la luciférine vis-à-vis des cellules

tumorales inoculées. Ainsi des injections répétées de fortes doses de luciférine pour les examens d'imagerie de bioluminescence peuvent fausser l'observation de l'effet thérapeutique d'un traitement. Cette observation a été aussi réalisée plus récemment par une autre équipe ²⁶⁹ et pourrait s'agir d'une limite d'utilisation de la bioluminescence. Il serait intéressant de pouvoir étudier l'influence du moment de l'anesthésie et de la dose de luciférine sur un plus grand nombre de modèles animaux et de lignées cellulaires humaines et animales exprimant la luciférase afin d'optimiser l'utilisation de la luciférine. Nous nous sommes aussi intéressés au fond génétique des animaux du modèle ainsi qu'à l'absorption des photons émis par les tissus et la mélanine. Nous avons montré la faible différence d'absorption de la lumière émise entre des animaux C57Bl6J Tyr^{C2-J}, présentant une mutation au niveau du gène de la tyrosinase et étant de phénotype blanc et des animaux C57Bl6J sauvages de phénotype noir scrupuleusement rasés. En effet l'essentiel de la mélanine de ces animaux se trouvant dans les poils, une faible proportion du signal est perdue. De même nous avons pu mettre en évidence lors de l'analyse des images une diffraction de la lumière émise au niveau du pelage des animaux blancs, ce qui peut remettre en cause l'analyse quantitative des images de bioluminescence. Ceci nous a permis de valider, pour l'ensemble des essais et contrairement à ce qui est couramment réalisé, l'usage pour le modèle de bioluminescence d'animaux sauvages noirs. L'obtention de lots homogènes de cette lignée sauvage C57Bl6J constitue aussi un net avantage par rapport aux animaux C57Bl6J Tyr^{C2-J}. Nous avons montré l'importance capitale des différents paramètres d'inoculation tumorale et de suivi de la progression tumorale.

Dans la seconde partie de cette étude nous avons montré l'influence du volume tumoral sur l'exposition à l'anticorps et sur la réponse au traitement. Le modèle de suivi quantitatif de la progression tumorale par examen de

bioluminescence nous a permis d'évaluer l'effet thérapeutique du rituximab. La réalisation d'une seule injection intraveineuse de rituximab à dose progressivement croissante, 13 jours après l'inoculation des cellules lymphomateuses, nous a permis de montrer dans notre modèle murin l'existence d'une relation dose – effet, la totalité des souris étant vivantes à la dose de 40 mg/kg. Cette relation dose – réponse n'est pas clairement établie chez l'homme, peut être du fait de la dose relativement faible d'anticorps utilisée dans les essais de phase I ³²⁹⁻³³¹.

Dans notre étude nous avons pu définir une concentration de rituximab (20 mg/kg) permettant d'obtenir une variabilité de réponse semblable à celle observée chez l'homme ^{198,332,333}. Pour l'ensemble des souris recevant de 20 mg/kg, nous avons déterminé précisément le volume tumoral au moment de l'injection du rituximab et évalué les concentrations de rituximab au décours du traitement. Nous avons montré qu'il existait une relation significative entre le volume tumoral au moment de l'injection et la réponse au rituximab ; les souris présentant les plus faibles volumes tumoraux ayant une meilleure réponse et une survie prolongée. Des résultats similaires ont été observés chez l'homme ^{176,334}. L'analyse des concentrations de rituximab au cours du temps nous a permis de montrer une très grande variabilité d'exposition au rituximab semblable à celle observée chez l'homme ³³⁵. L'évolution de ces concentrations ainsi que la croissance tumorale ont pu être modélisées. Le modèle PK-PD que nous avons construit nous a permis de montrer l'existence d'une relation entre l'efficacité du rituximab et le volume tumoral avant traitement.

Dans la littérature il a été montré que le transfert bidirectionnel des anticorps entre la circulation et les tissus était médié par le FcRn. Ce transfert est saturable. Toutefois la saturation du FcRn n'a lieu que pour des concentrations en IgG très élevées ; il est vraisemblable, pour des concentrations en anticorps thérapeutiques « habituelles », que la saturation du FcRn soit un paramètre

négligeable et que les constantes de transfert d'ordre 1 constituent une approximation suffisante pour la mise en place d'une modélisation PK-PD. Cependant le FcRn murin ne reconnaît que très peu les IgG humaines. Cette observation pourrait expliquer la relative faible demie vie de l'anticorps dans notre modèle. Ceci pourrait être confirmé par la réalisation d'essais identiques en utilisant la forme murine de l'anticorps (le zévalin). Puisque le FcRn semble être au cœur des mécanismes de distribution et d'élimination des IgG, il pourrait être aussi un facteur de variabilité à la réponse. A ce jour, des polymorphismes présents sur les séquences régulatrices de l'expression du *FCGRT*, gène qui code pour le FcRn, ont été identifiés et entraînent des niveaux de transcription différents ³³⁶. Ces polymorphismes pourraient peut être expliquer une part de la variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques. Chez l'homme il est communément admis que l'élimination des Acm-r est d'autant plus lente que leur degré d'humanisation est grand. Cependant, si le $T_{1/2}$ d'élimination des Acm-r murins est très courte (1 à 2 jours), la plupart des anticorps chimériques, humanisés ou complètement humains présentent un $T_{1/2}$ d'élimination similaire, de l'ordre de 21 jours. Ceci s'explique par le fait que c'est la portion Fc de l'anticorps qui interagit avec le FcRn.

Dans notre étude nous avons pu mettre en évidence deux phases dans les cinétiques du rituximab chez les souris : une phase de distribution et une phase d'élimination. Certains auteurs considèrent que le caractère linéaire ou non linéaire de l'élimination terminale d'un anticorps thérapeutique est une caractéristique intrinsèque à cet anticorps ³³⁷. Ainsi, dans certaines études pharmacocinétiques et PK-PD du rituximab, l'élimination est linéaire ^{207,335} alors que d'autres études portant sur le rituximab sont en faveur de la non linéarité de son élimination ^{195,196,198}. Dans notre modèle murin, la non linéarité de l'élimination du rituximab était évidente, et nous avons montré qu'elle était corrélée au volume tumoral. Le fait

que nous ayons observé une non linéarité dans l'élimination du rituximab, alors que cette caractéristique n'est pas confirmée chez l'homme, pourrait s'expliquer par le fait que les cellules tumorales utilisées dans le modèle murin proliféraient beaucoup plus vite que les cellules B dans les lymphomes malins humains. Par conséquent, la linéarité de l'élimination des anticorps thérapeutiques semble être plutôt liée à la variation du nombre de cibles antigéniques, plus qu'elle n'est une caractéristique de l'anticorps.

La mise en place d'un modèle PK à un seul compartiment, nous a permis de décrire la destruction des cellules tumorales par le rituximab chez les souris, où le rituximab était supposé provoquer la destruction des cellules tumorales (k_{drug}) indépendamment de leur destruction endogène (k_{out}). Chez les souris en réponse partielle, la clairance est apparue constante, ce qui pouvait être dû à une saturation des sites antigéniques disponibles ou des fonctions effectrices. Compte tenu de cette hypothèse, un effet maximal des anticorps thérapeutiques serait obtenu en saturant les cibles antigéniques disponibles. Par ailleurs, chez les souris en réponse partielle, nous avons constaté une simultanée du début de l'accélération de l'élimination du rituximab avec la reprise tumorale, ce qui est compatible avec les observations réalisées par divers auteurs ^{338,339}. Ainsi, l'apparition d'une accélération dans l'élimination de l'anticorps pourrait permettre de détecter une réascension de la masse antigénique. Il serait alors intéressant d'établir des schémas de posologies visant à maintenir des concentrations permettant l'obtention d'un effet maximal. Compte tenu des variabilités interindividuelles, ces schémas de posologies devraient donc être adaptés à chaque patient. Or, il paraît très difficile voire même impossible de mesurer la cinétique tumorale en routine, ou de détecter l'amorce de non linéarité de l'élimination terminale des anticorps thérapeutiques, compte tenu des moyens techniques à mettre en œuvre ainsi que du grand nombre de visites et de prélèvements nécessaires.

Les progrès de l'imagerie médicale vont probablement nous permettre un jour d'évaluer en routine le volume tumoral. Il sera alors possible d'adapter le schéma d'administration à ce volume et ainsi améliorer la réponse thérapeutique. En attendant il apparaît utile, au minimum, d'adapter le nombre de perfusions de l'anticorps au stade de la maladie présenté par le patient.

Ce modèle murin pourrait aussi être appliqué à d'autres anticorps anti CD20 (ofatumumab, GA101...) de manière à comparer les effets thérapeutiques et à modéliser leur relations dose – concentration – effet.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons utilisé le modèle cellulaire EL4-huCD20-Luc pour évaluer l'effet des particules hybrides d'oxydes de gadolinium et d'oxydes de gadolinium couplé au bore. Ces dernières particules du fait de leurs propriétés magnétiques et électroniques ont montré une très grande efficacité sur les cellules tumorales. Cependant elles ont aussi montré une toxicité accrue par rapport aux particules "classiques". Bien que leurs effets soient connus depuis longtemps ^{340,341}, ce n'est qu'avec les progrès récents de la chimie de synthèse et d'analyse qu'elles peuvent trouver une réelle application. Elles offrent donc de nouvelles opportunités de traitement. Il serait intéressant avant de passer aux analyses *in vivo*, d'optimiser la concentration et la structure des particules pour limiter ces effets toxiques tout en conservant leurs propriétés d'agent d'imagerie et de thérapie.

Cette partie à l'interface entre la chimie, l'imagerie et la biologie nous a permis de mettre en évidence le grand potentiel de ce type de nano particules. En effet ces nano particules pourraient jouer le rôle d'agent d'imagerie lors de la réalisation d'imagerie à résonance magnétique par exemple. Puis une fois la localisation précise des foyers tumoraux réalisée, on pourrait envoyer spécifiquement un faisceau de neutrons et avoir un effet optimal du rayonnement

par le biais de ces particules. La possibilité de cibler ces nano particules à l'aide d'Acm-r ouvre un nouveau champ d'investigation. Quelques auteurs ont récemment montré que la fixation de particules d'oxydes de gadolinium à des structures peptidiques était possible et donnait de très bons résultats en imagerie de contraste ³⁴², il serait très intéressant de vérifier que ce genre de complexe permet de conserver les propriétés magnétiques des complexes de gadolinium. Même si quelques obstacles comme la réalisation d'études *in vivo* (toxicité des particules, efficacité thérapeutique) ou encore la fixation permanente des particules sur les anticorps sans que ne soient modifiées leurs propriétés ne sont pas encore franchis, cette méthodologie est très prometteuse et pourrait venir compléter l'arsenal thérapeutique des stratégies de lutte contre le cancer. De telles applications pourraient, en fonction de leur efficacité, trouver une utilisation dans les tumeurs inopérables du fait de leur localisation anatomique ou résistantes aux traitements plus conventionnels ou encore en complément à divers traitements afin d'améliorer le taux de survie des patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hastings JW. Bioluminescence: from chemical bonds to photons. *Ciba Found Symp.* 1975;125-146.
2. Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:197-230.
3. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 1962;59:223-239.
4. Nasuda-Kouyama A, Nakata M, Iizuka T, Isogai Y. Mechanisms of nitroso compound-induced inhibition of superoxide generation in neutrophils: fluorescence quenching of perylene by nitroso-compounds in the membrane fractions of neutrophils. *J Biochem (Tokyo).* 1997;122:550-555.
5. Karp M, Oker-Blom C. A streptavidin-luciferase fusion protein: comparisons and applications. *Biomol Eng.* 1999;16:101-104.
6. Dunlap JC, Hastings JW. Biochemistry of dinoflagellate bioluminescence: purification and characterization of dinoflagellate luciferin from *Pyrocystis lunula*. *Biochemistry.* 1981;20:983-989.
7. Heller S, Buhler S, Kilz S, Mieschendahl M. Bioluminescence-based detection of genetically engineered microorganisms in nonsterile river water. *Microb Releases.* 1992;1:35-39.
8. Shadel GS, Baldwin TO. Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri* luxR gene. LuxR and autoinducer activate cAMP-catabolite gene activator protein complex-independent and -dependent luxR transcription. *J Biol Chem.* 1992;267:7696-7702.
9. Eckstein JW, Hastings JW, Ghisla S. Mechanism of bacterial bioluminescence: 4a,5-dihydroflavin analogs as models for luciferase hydroperoxide intermediates and the effect of substituents at the 8-position of flavin on luciferase kinetics. *Biochemistry.* 1993;32:404-411.
10. Hart RC, Stempel KE, Boyer PD, Cormier MJ. Mechanism of the enzyme-catalyzed bioluminescent oxidation of coelenterate-type luciferin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978;81:980-986.
11. Srikantha T, Klapach A, Lorenz WW, et al. The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1996;178:121-129.
12. Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:4438-4442.
13. Lorenz WW, Cormier MJ, O'Kane DJ, Hua D, Escher AA, Szalay AA. Expression of the *Renilla reniformis* luciferase gene in mammalian cells. *J Biolumin Chemilumin.* 1996;11:31-37.
14. Dunlap K, Takeda K, Brehm P. Activation of a calcium-dependent photoprotein by chemical signalling through gap junctions. *Nature.* 1987;325:60-62.
15. Deng KZ. [Calmodulin]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.* 1982;13:132-136.

16. Kobatake E, Mitomo K, Haruyama T, Aizawa M, Deng GY, Kato S. On-off switching of enzymatic reaction by recombinant calmodulin on a solid-phase matrix. *Bioconj Chem.* 1996;7:126-130.
17. Kobayashi J, Ishibashi M, Nakamura H, et al. Cytotoxic macrolides from a cultured marine dinoflagellate of the genus *Amphidinium*. *J Nat Prod.* 1989;52:1036-1041.
18. Hastings JW. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J Mol Evol.* 1983;19:309-321.
19. Mittag M, Eckerskorn C, Strupat K, Hastings JW. Differential translational initiation of lbp mRNA is caused by a 5' upstream open reading frame. *FEBS Lett.* 1997;411:245-250.
20. Fogel M, Hastings JW. Bioluminescence: mechanism and mode of control of scintillon activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69:690-693.
21. Li L, Hong R, Hastings JW. Three functional luciferase domains in a single polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:8954-8958.
22. Viviani VR, Arnoldi FG, Ogawa FT, Brochetto-Braga M. Few substitutions affect the bioluminescence spectra of *Phrixotrix* (Coleoptera: Phengodidae) luciferases: a site-directed mutagenesis survey. *Luminescence.* 2007.
23. Wood KV, Lam YA, Seliger HH, McElroy WD. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. *Science.* 1989;244:700-702.
24. McElroy WD, Seliger HH, White EH. Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin. *Photochem Photobiol.* 1969;10:153-170.
25. Baldwin TO. Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure.* 1996;4:223-228.
26. McCapra F. Chemical generation of excited states: the basis of chemiluminescence and bioluminescence. *Methods Enzymol.* 2000;305:3-47.
27. McCapra F. Mechanism and function of bioluminescent systems. *Biochem Soc Trans.* 1979;7:1239-1246.
28. Devine JH, Kutuzova GD, Green VA, Ugarova NN, Baldwin TO. Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1173:121-132.
29. Pelegrin A, Folli S, Buchegger F, Mach JP, Wagnieres G, van den Bergh H. Antibody-fluorescein conjugates for photoimmunodiagnosis of human colon carcinoma in nude mice. *Cancer.* 1991;67:2529-2537.
30. Baggett B, Roy R, Momen S, et al. Thermostability of firefly luciferases affects efficiency of detection by in vivo bioluminescence. *Mol Imaging.* 2004;3:324-332.
31. Ignowski JM, Schaffer DV. Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 2004;86:827-834.
32. Lee KH, Byun SS, Paik JY, et al. Cell uptake and tissue distribution of radioiodine labelled D-luciferin: implications for luciferase based gene imaging. *Nucl Med Commun.* 2003;24:1003-1009.

33. Lee SY, Choe YS, Lee KH, Lee J, Choi Y, Kim BT. Synthesis of 7'-[123I]iodo-D-luciferin for in vivo studies of firefly luciferase gene expression. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:1161-1163.
34. Contag CH, Spilman SD, Contag PR, et al. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol*. 1997;66:523-531.
35. Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia*. 2000;2:41-52.
36. Gross S, Piwnica-Worms D. Real-time imaging of ligand-induced IKK activation in intact cells and in living mice. *Nat Methods*. 2005;2:607-614.
37. Chaudhari AJ, Darvas F, Bading JR, et al. Hyperspectral and multispectral bioluminescence optical tomography for small animal imaging. *Phys Med Biol*. 2005;50:5421-5441.
38. Shinde R, Perkins J, Contag CH. Luciferin derivatives for enhanced in vitro and in vivo bioluminescence assays. *Biochemistry*. 2006;45:11103-11112.
39. Gates BJ, DeLuca M. The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction. *Arch Biochem Biophys*. 1975;169:616-621.
40. Suzuki N. Firefly bioluminescence II. Identification of 2-(6'-hydroxybenzothiazol-2'-yl)-4-hydroxythiazole as a product in the bioluminescence of firefly lanterns and as a product in the chemiluminescence of firefly luciferin in DMSO. *Tetrahedron Letters*. 1971;Volume 12:2021-2024.
41. Gomi K, Kajiyama N. Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. *J Biol Chem*. 2001;276:36508-36513.
42. Gomi K, Hirokawa K, Kajiyama N. Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding luciferin-regenerating enzyme from *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis*. *Gene*. 2002;294:157-166.
43. Day JC, Bailey MJ. Structure and evolution of the luciferin-regenerating enzyme (LRE) gene from the firefly *Photinus pyralis*. *Insect Mol Biol*. 2003;12:365-372.
44. Seliger HH, Mc EW. Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch Biochem Biophys*. 1960;88:136-141.
45. Seliger HH, Mc EW. Pathways of energy transfer in bioluminescence. *Radiat Res*. 1960;Suppl 2:528-538.
46. Lundin A, Jaderlund B, Lovgren T. Optimized bioluminescence assay of creatine kinase and creatine kinase B-subunit activity. *Clin Chem*. 1982;28:609-614.
47. Campbell AK, Patel AK, Razavi ZS, McCapra F. Formation of the Ca²⁺-activated photoprotein obelin from apo-obelin and mRNA inside human neutrophils. *Biochem J*. 1988;252:143-149.
48. de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M. Cloning firefly luciferase. *Methods Enzymol*. 1986;133:3-14.
49. DeLuca M, McElroy WD. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry*. 1974;13:921-925.
50. DeLuca M, Wannlund J, McElroy WD. Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luciferase. *Anal Biochem*. 1979;95:194-198.

51. DeLuca M, McElroy WD. Two kinetically distinguishable ATP sites in firefly luciferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123:764-770.
52. de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:7870-7873.
53. de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1987;7:725-737.
54. Engebrecht J, Neelson K, Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.* 1983;32:773-781.
55. Alipour BS, Hosseinkhani S, Nikkhah M, Naderi-Manesh H, Chaichi MJ, Osaloo SK. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyrus turkestanicus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325:215-222.
56. Viviani VR, Bechara EJ, Ohmiya Y. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry.* 1999;38:8271-8279.
57. Emamzadeh AR, Hosseinkhani S, Sadeghizadeh M, Nikkhah M, Chaichi MJ, Mortazavi M. cDNA cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the firefly *Lampyroidea maculata*. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39:578-585.
58. O'Kane DJ, Woodward B, Lee J, Prasher DC. Borrowed proteins in bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:1100-1104.
59. Barros MP, Bechara EJ. Luciferase and urate may act as antioxidant defenses in larval *Pyrearinus termitilluminans* (Elateridae: Coleoptera) during natural development and upon 20-hydroxyecdysone treatment. *Photochem Photobiol.* 2000;71:648-654.
60. Branchini BR, Magyar RA, Murtiashaw MH, Magnasco N, Hinz LK, Stroh JG. Inactivation of firefly luciferase with N-(iodoacetyl)-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylenediamine (I-AEDANS). *Arch Biochem Biophys.* 1997;340:52-58.
61. Viviani VR, Silva AC, Perez GL, Santelli RV, Bechara EJ, Reinach FC. Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. *Photochem Photobiol.* 1999;70:254-260.
62. Wood KV. Luc genes: introduction of colour into bioluminescence assays. *J Biolumin Chemilumin.* 1990;5:107-114.
63. Airth RL, Rhodes WC, Mc EW. The function of coenzyme A in luminescence. *Biochim Biophys Acta.* 1958;27:519-532.
64. Ford SR, Buck LM, Leach FR. Does the sulfhydryl or the adenine moiety of CoA enhance firefly luciferase activity? *Biochim Biophys Acta.* 1995;1252:180-184.
65. Viviani VR. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1833-1850.
66. Fisher AJ, Raushel FM, Baldwin TO, Rayment I. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4 Å resolution. *Biochemistry.* 1995;34:6581-6586.

67. Conti E, Lloyd LF, Akins J, Franks NP, Brick P. Crystallization and preliminary diffraction studies of firefly luciferase from *Photinus pyralis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1996;52:876-878.
68. Conti E, Franks NP, Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*. 1996;4:287-298.
69. Mathieu M, Zeelen JP, Paupit RA, Erdmann R, Kunau WH, Wierenga RK. The 2.8 Å crystal structure of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: a five-layered alpha beta alpha beta alpha structure constructed from two core domains of identical topology. *Structure*. 1994;2:797-808.
70. Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol*. 1989;108:1657-1664.
71. Pavela-Vrancic M, Pfeifer E, van Liempt H, Schafer HJ, von Dohren H, Kleinkauf H. ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. *Biochemistry*. 1994;33:6276-6283.
72. White EH, Branchini BR. Letter: Modification of firefly luciferase with a luciferin analog. A red light producing enzyme. *J Am Chem Soc*. 1975;97:1243-1245.
73. Jenner DE, Holt ME, Campbell AK. Luminol dependent chemiluminescence and thiol group oxidation provoked by neutrophils is attributable to different oxidizing species. *J Biolumin Chemilumin*. 1987;1:165-171.
74. Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol*. 1999;58:749-757.
75. Kemp DM, George SE, Bungay PJ, Naylor LH. Partial agonism at serotonin 5-HT_{1B} and dopamine D_{2L} receptors using a luciferase reporter gene assay. *Eur J Pharmacol*. 1999;373:215-222.
76. Greer LF, 3rd, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence*. 2002;17:43-74.
77. Edinger M, Cao YA, Hornig YS, et al. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer*. 2002;38:2128-2136.
78. Dalgarno A. The galactic cosmic ray ionization rate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:12269-12273.
79. Mewaldt RA. Galactic cosmic ray composition and energy spectra. *Adv Space Res*. 1994;14:737-747.
80. Townsend LW, Wilson JW, Cucinotta FA, Shinn JL. Galactic cosmic ray transport methods and radiation quality issues. *Int J Rad Appl Instrum D*. 1992;20:65-72.
81. Silberberg R, Tsao CH, Letaw JR. Transport of cosmic ray nuclei in various materials. *Trans Am Nucl Soc*. 1988;56:275-276.
82. Zhou D, O'Sullivan D, Xu B, Flood E. Cosmic ray measurements at aircraft altitudes and comparison with predictions of computer codes. *Adv Space Res*. 2003;32:47-52.
83. Anchordoqui LA, Beacom JF, Goldberg H, Palomares-Ruiz S, Weiler TJ. TeV gamma rays from photodisintegration and daughter deexcitation of cosmic-ray nuclei. *Phys Rev Lett*. 2007;98:121101.

84. Charman WN, Rowlands CM. Visual sensations produced by cosmic ray muons. *Nature*. 1971;232:574-575.
85. Babson J, Barish B, Becker-Szendy R, et al. Cosmic-ray muons in the deep ocean. *Phys Rev D Part Fields*. 1990;42:3613-3620.
86. Delorme J, Ericson M, Ericson T, Vogel P. Pion and neutron production by cosmic-ray muons underground. *Phys Rev C Nucl Phys*. 1995;52:2222-2230.
87. Borozdin KN, Hogan GE, Morris C, et al. Surveillance: Radiographic imaging with cosmic-ray muons. *Nature*. 2003;422:277.
88. Karger AE, Weiss R, Gesteland RF. Line scanning system for direct digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots. *Anal Chem*. 1993;65:1785-1793.
89. Day PK, LeDuc HG, Mazin BA, Vayonakis A, Zmuidzinas J. A broadband superconducting detector suitable for use in large arrays. *Nature*. 2003;425:817-821.
90. Tilbury RN, Quickenden TI. The effect of cosmic-ray shielding on the ultraweak bioluminescence emitted by cultures of *Escherichia coli*. *Radiat Res*. 1987;112:398-402.
91. Aikens RS, Agard DA, Sedat JW. Solid-state imagers for microscopy. *Methods Cell Biol*. 1989;29:291-313.
92. Kakehashi A, Kado M, Akiba J, Hirokawa H. Biomicroscopic vitreous videography. *Retina*. 1995;15:508-512.
93. Seville M. A whole new way of looking at things: the use of Dark Reader technology to detect fluorophors. *Electrophoresis*. 2001;22:814-828.
94. Berber E, Siperstein AE. Understanding and optimizing laparoscopic videosystems. *Surg Endosc*. 2001;15:781-787.
95. Yanagisawa E, Godley F, Muta H. Selection of video cameras for stroboscopic videolaryngoscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1987;96:578-585.
96. Alexander GM, Schwartzman RJ. Quantitative computer analysis of autoradiographs utilizing a charge-coupled device solid-state camera. *J Neurosci Methods*. 1984;12:29-36.
97. Pahl R, Densau FP, Heilmeyer CF, Schroder T, Hellige G. [Use of a charge-coupled device array camera in reflectance spectroscopy of the blood. 2: Determination of the indocyanine green concentration]. *Biomed Tech (Berl)*. 1988;33:255-260.
98. Chan WS, MacRobert AJ, Phillips D, Hart IR. Use of charge coupled device camera for imaging of intracellular phthalocyanines. *Photochem Photobiol*. 1989;50:617-624.
99. Holdsworth DW, Gerson RK, Fenster A. A time-delay integration charge-coupled device camera for slot-scanned digital radiography. *Med Phys*. 1990;17:876-886.
100. Chan WS, Hart IR. Potential use of a charge-coupled device camera for imaging fluorescent dyes in vivo. *J Photochem Photobiol B*. 1991;8:440-442.
101. Karger AE, Weiss R, Gesteland RF. Digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots using a charge-coupled device camera. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:6657-6665.
102. Heemskerk JW, Westra AH, Linotte PM, Ligtoet KM, Zbijewski W, Beekman FJ. Front-illuminated versus back-illuminated photon-counting CCD-based gamma camera:

important consequences for spatial resolution and energy resolution. *Phys Med Biol.* 2007;52:N149-162.

103. Samant SS, Gopal A. Study of a prototype high quantum efficiency thick scintillation crystal video-electronic portal imaging device. *Med Phys.* 2006;33:2783-2791.

104. Speidel MA, Wilfley BP, Star-Lack JM, Heanue JA, Betts TD, Van Lysel MS. Comparison of entrance exposure and signal-to-noise ratio between an SBDX prototype and a wide-beam cardiac angiographic system. *Med Phys.* 2006;33:2728-2743.

105. Martin T, Koch A. Recent developments in X-ray imaging with micrometer spatial resolution. *J Synchrotron Radiat.* 2006;13:180-194.

106. Shaw SL, Yeh E, Bloom K, Salmon ED. Imaging green fluorescent protein fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol.* 1997;7:701-704.

107. Sander B, Golas MM, Stark H. Advantages of CCD detectors for de novo three-dimensional structure determination in single-particle electron microscopy. *J Struct Biol.* 2005;151:92-105.

108. Wehrmeyer JA, Boll DE, Smith R. Emission spectroscopy for coal-fired cyclone furnace diagnostics. *Appl Spectrosc.* 2003;57:1020-1026.

109. Jaggi B, Poon SS, MacAulay C, Palcic B. Imaging system for morphometric assessment of absorption or fluorescence in stained cells. *Cytometry.* 1988;9:566-572.

110. Ning R, Kruger RA. Image intensifier-based computed tomography volume scanner for angiography. *Acad Radiol.* 1996;3:344-350.

111. Kirby MC, Williams PC. The use of an electronic portal imaging device for exit dosimetry and quality control measurements. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;31:593-603.

112. Yasui T, Yoda K. Imaging of *Lactobacillus brevis* single cells and microcolonies without a microscope by an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay with a photon-counting television camera. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:4528-4533.

113. Bab R, Ueda K, Kuba A, Kohda E, Shiraga N, Sanmiya T. Development of a subject-standing-type cone-beam computed tomography for chest and orthopedic imaging. *Front Med Biol Eng.* 2001;11:177-189.

114. Coates CG, Denvir DJ, McHale NG, Thornbury KD, Hollywood MA. Optimizing low-light microscopy with back-illuminated electron multiplying charge-coupled device: enhanced sensitivity, speed, and resolution. *J Biomed Opt.* 2004;9:1244-1252.

115. Snyder DL, Hammoud AM, White RL. Image recovery from data acquired with a charge-coupled-device camera. *J Opt Soc Am A.* 1993;10:1014-1023.

116. Ning R, Kruger RA. Computer simulation of image intensifier-based computed tomography detector: vascular application. *Med Phys.* 1988;15:188-192.

117. Desgranges C. [Monoclonal antibodies and therapeutics]. *Pathol Biol (Paris).* 2004;52:351-364.

118. Sharifi J, Khawli LA, Hu P, King S, Epstein AL. Characterization of a phage display-derived human monoclonal antibody (NHS76) counterpart to chimeric TNT-1 directed against necrotic regions of solid tumors. *Hybrid Hybridomics.* 2001;20:305-312.

119. Liu HL, Parkes DL, Langton BC, et al. Construction of a chimeric antibody with therapeutic potential for cancers which overexpress c-erbB-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;211:792-803.
120. Sun LK, Curtis P, Rakowicz-Szulczynska E, et al. Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:214-218.
121. Shaw DR, Khazaeli MB, LoBuglio AF. Mouse/human chimeric antibodies to a tumor-associated antigen: biologic activity of the four human IgG subclasses. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:1553-1559.
122. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature.* 1994;368:856-859.
123. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;38:17-23.
124. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG, Jakobovits A. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res.* 1999;59:1236-1243.
125. Press OW, Corcoran M, Subbiah K, et al. A comparative evaluation of conventional and pretargeted radioimmunotherapy of CD20-expressing lymphoma xenografts. *Blood.* 2001;98:2535-2543.
126. Press OW. Radiolabeled antibody therapy of B-cell lymphomas. *Semin Oncol.* 1999;26:58-65.
127. Salles G, Herbrecht R, Tilly H, et al. Aggressive primary gastrointestinal lymphomas: review of 91 patients treated with the LNH-84 regimen. A study of the Groupe d'Etude des Lymphomes Agressifs. *Am J Med.* 1991;90:77-84.
128. Boerman OC, Koppe MJ, Postema EJ, Corstens FH, Oyen WJ. Radionuclide therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7:335-343.
129. Kalofonos HP, Grivas PD. Monoclonal antibodies in the management of solid tumors. *Curr Top Med Chem.* 2006;6:1687-1705.
130. DeNardo GL, O'Donnell RT, Kroger LA, et al. Strategies for developing effective radioimmunotherapy for solid tumors. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3219s-3223s.
131. Salles G, Shipp MA, Coiffier B. Chemotherapy of non-Hodgkin's aggressive lymphomas. *Semin Hematol.* 1994;31:46-69.
132. Meredith RF. Logistics of therapy with the ibritumomab tiuxetan regimen. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66:S35-38.
133. Srivastava SC. Criteria for the selection of radionuclides for targeting nuclear antigens for cancer radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 1996;11:43-50.
134. Probst A, Cartron G, Watier H. Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux recombinants utilisés en oncologie. *Bulletin du cancer.* 2006;93:107-112.
135. Sato N, Yabuki Y, Toh K, Ishii Y, Kikuchi K. Separation of cell-dependent antibody (CDA) and inhibitory antibody by protein-A affinity chromatography and the effect of fractions on antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *Immunology.* 1979;36:421-426.

136. Cardarelli PM, Quinn M, Buckman D, et al. Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother.* 2002;51:15-24.
137. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.* 2002;99:754-758.
138. Genestier L, Bonnefoy-Berard N, Rouault JP, Flacher M, Revillard JP. Tumor necrosis factor-α up-regulates Bcl-2 expression and decreases calcium-dependent apoptosis in human B cell lines. *Int Immunol.* 1995;7:533-540.
139. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26:133-143.
140. Ceze N, Causse X, Metois D, Michenet P, Maitre F. [Metastatic appendiceal adenocarcinoid]. *Gastroenterol Clin Biol.* 2006;30:330-331.
141. Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Choudhury A, Batra SK. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q J Nucl Med.* 1998;42:225-241.
142. Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, Clark EA, Ledbetter JA. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *Embo J.* 1988;7:711-717.
143. Polyak MJ, Deans JP. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood.* 2002;99:3256-3262.
144. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:208-212.
145. Liang Y, Buckley TR, Tu L, Langdon SD, Tedder TF. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenetics.* 2001;53:357-368.
146. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today.* 1994;15:450-454.
147. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 2003;101:949-954.
148. Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, et al. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001;98:1326-1331.
149. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol.* 2006;176:2600-2609.
150. Giles FJ, Vose JM, Do KA, et al. Circulating CD20 and CD52 in patients with non-Hodgkin's lymphoma or Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 2003;123:850-857.
151. Tedder TF, Klejman G, Disteché CM, Adler DA, Schlossman SF, Saito H. Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen,

homologous to the human B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19. *J Immunol.* 1988;141:4388-4394.

152. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol.* 2004;16:119-129.

153. Bourget I, Breittmayer JP, Grenier-Brossette N, Cousin JL. CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells. *Eur J Immunol.* 1993;23:768-771.

154. Bourget I, Di Berardino W, Breittmayer JP, et al. CD20 monoclonal antibodies stimulate extracellular cleavage of the low affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) in Epstein-Barr-transformed B cells. *J Biol Chem.* 1994;269:6927-6930.

155. Bourget I, Di Berardino W, Breittmayer JP, et al. CD20 monoclonal antibodies decrease interleukin-4-stimulated expression of the low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) in human B cells by increasing the extent of its cleavage. *Eur J Immunol.* 1995;25:1872-1876.

156. Clark EA, Shu G. Activation of human B cell proliferation through surface Bp35 (CD20) polypeptides or immunoglobulin receptors. *J Immunol.* 1987;138:720-725.

157. Valentine MA, Licciardi KA. Rescue from anti-IgM-induced programmed cell death by the B cell surface proteins CD20 and CD40. *Eur J Immunol.* 1992;22:3141-3148.

158. Holder M, Grafton G, MacDonald I, Finney M, Gordon J. Engagement of CD20 suppresses apoptosis in germinal center B cells. *Eur J Immunol.* 1995;25:3160-3164.

159. Grafton G, Thwaite L. Calcium channels in lymphocytes. *Immunology.* 2001;104:119-126.

160. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood.* 2001;98:3383-3389.

161. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood.* 2002;99:1038-1043.

162. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4027-4035.

163. Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, et al. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2327-2336.

164. Kawai S, Koishihara Y, Iida S, et al. Construction of a conventional non-radioisotope method to quantify HM1.24 antigens: correlation of HM1.24 levels and ADCC activity of the humanized antibody against HM1.24. *Leuk Res.* 2006;30:949-956.

165. Salles G, Coiffier B. Inherited cytokine response and risk of lymphoma. *Lancet Oncol.* 2006;7:3-4.

166. Dancescu M, Wu C, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. IL-4 induces conformational change of CD20 antigen via a protein kinase C-independent pathway. Antagonistic effect of anti-CD40 monoclonal antibody. *J Immunol.* 1992;148:2411-2416.

167. Venugopal P, Sivaraman S, Huang XK, Nayini J, Gregory SA, Preisler HD. Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2000;24:411-415.
168. Sivaraman S, Venugopal P, Ranganathan R, et al. Effect of interferon-alpha on CD20 antigen expression of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytokines Cell Mol Ther.* 2000;6:81-87.
169. Treon SP, Agus DB, Link B, et al. CD20-Directed Antibody-Mediated Immunotherapy Induces Responses and Facilitates Hematologic Recovery in Patients With Waldenstrom's Macroglobulinemia. *J Immunother.* 2001;24:272-279.
170. Friedberg JW, Neuberg D, Gribben JG, et al. Combination immunotherapy with rituximab and interleukin 2 in patients with relapsed or refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 2002;117:828-834.
171. Hudson PJ. Design, production and evaluation of novel diagnostic and therapeutic reagents. 6-9 December 1999, La Jolla, CA, USA. *IDrugs.* 2000;3:262-264.
172. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood.* 2004;104:2635-2642.
173. Hainsworth JD, Litchy S, Morrissey LH, et al. Rituximab plus short-duration chemotherapy as first-line treatment for follicular non-Hodgkin's lymphoma: a phase II trial of the minnie pearl cancer research network. *J Clin Oncol.* 2005;23:1500-1506.
174. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood.* 2005;105:1417-1423.
175. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood.* 2005;106:3725-3732.
176. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood.* 2001;97:101-106.
177. Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non-Hodgkin lymphoma: an update. *Lancet Oncol.* 2004;5:341-353.
178. Cosset JM, Henry-Amar M, Vuong T, et al. Alternating chemotherapy and radiotherapy combination for bulky stage I and II intermediate and high grade non-Hodgkin lymphoma: an update. *Radiother Oncol.* 1991;20:30-37.
179. Grillo-Lopez AJ. Rituximab (Rituxan/MabThera): the first decade (1993-2003). *Expert Rev Anticancer Ther.* 2003;3:767-779.
180. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood.* 2003;101:1045-1052.
181. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol.* 2004;172:3280-3288.
182. Williams ME, Densmore JJ, Pawluczko AW, et al. Thrice-weekly low-dose rituximab decreases CD20 loss via shaving and promotes enhanced targeting in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol.* 2006;177:7435-7443.

183. Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood*. 2001;97:1392-1398.
184. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, et al. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol*. 2003;21:1466-1471.
185. Vega MI, Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol*. 2005;175:2174-2183.
186. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83:435-445.
187. van der Kolk LE, de Haas M, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, van Oers MH. Analysis of CD20-dependent cellular cytotoxicity by G-CSF-stimulated neutrophils. *Leukemia*. 2002;16:693-699.
188. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*. 2003;171:1581-1587.
189. Gong Q, Ou Q, Ye S, et al. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol*. 2005;174:817-826.
190. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6:443-446.
191. Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, et al. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62:34-42.
192. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 2004;64:4664-4669.
193. Watier H. Variability factors in the clinical response to recombinant antibodies and IgG Fc-containing fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5 Suppl 1:S29-36.
194. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2457-2466.
195. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:2188-2195.
196. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, et al. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1997;15:3266-3274.
197. Maloney DG. Preclinical and phase I and II trials of rituximab. *Semin Oncol*. 1999;26:74-78.
198. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995-1001.

199. Crump M, Shepherd L, Lin B. A randomized phase III study of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin as salvage chemotherapy followed by posttransplantation rituximab maintenance therapy versus observation for treatment of aggressive B-Cell and T-Cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2005;6:56-60.
200. Herold M, Dolken G, Fiedler F, et al. Randomized phase III study for the treatment of advanced indolent non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and mantle cell lymphoma: chemotherapy versus chemotherapy plus rituximab. *Ann Hematol*. 2003;82:77-79.
201. Gibson AD. Updated results of a Phase III trial comparing ibritumomab tiuxetan with rituximab in previously treated patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2002;3:87-89.
202. Gordan LN, Grow WB, Pusateri A, Douglas V, Mendenhall NP, Lynch JW. Phase II trial of individualized rituximab dosing for patients with CD20-positive lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol*. 2005;23:1096-1102.
203. Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M, et al. Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. The IDEC-C2B8 Study Group. *Ann Oncol*. 1998;9:527-534.
204. Schomacker K, Dietlein M, Schnell R, et al. [Radioimmunotherapy with yttrium-90 ibritumomab tiuxetan. Clinical considerations, radiopharmacy, radiation protection, perspectives]. *Nuklearmedizin*. 2005;44:166-177.
205. Dietlein M, Pels H, Schulz H, et al. Imaging of central nervous system lymphomas with iodine-123 labeled rituximab. *Eur J Haematol*. 2005;74:348-352.
206. Cartron G, Blasco H, Piantaud G, Watier H, Le Guellec C. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62:43-52.
207. Iacona I, Lazzarino M, Avanzini MA, et al. Rituximab (IDEC-C2B8): validation of a sensitive enzyme-linked immunoassay applied to a clinical pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit*. 2000;22:295-301.
208. Manshoury T, Do KA, Wang X, et al. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood*. 2003;101:2507-2513.
209. Regazzi MB, Iacona I, Avanzini MA, et al. Pharmacokinetic behavior of rituximab: a study of different schedules of administration for heterogeneous clinical settings. *Ther Drug Monit*. 2005;27:785-792.
210. Mangel J, Buckstein R, Imrie K, et al. Pharmacokinetic study of patients with follicular or mantle cell lymphoma treated with rituximab as 'in vivo purge' and consolidative immunotherapy following autologous stem cell transplantation. *Ann Oncol*. 2003;14:758-765.
211. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
212. Scheidhauer K, Wolf I, Baumgartl HJ, et al. Biodistribution and kinetics of (131)I-labelled anti-CD20 MAB IDEC-C2B8 (rituximab) in relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29:1276-1282.

213. Miescher S, Spycher MO, Amstutz H, et al. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcgammaRIIA and FcgammaRIIA genes. *Blood*. 2004;103:4028-4035.
214. Louis EJ, Watier HE, Schreiber S, et al. Polymorphism in IgG Fc receptor gene FCGR3A and response to infliximab in Crohn's disease: a subanalysis of the ACCENT I study. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16:911-914.
215. Louis E, El Ghouli Z, Vermeire S, et al. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;19:511-519.
216. Anolik JH, Barnard J, Cappione A, et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50:3580-3590.
217. Jones EA, Waldmann TA. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J Clin Invest*. 1972;51:2916-2927.
218. Medesan C, Radu C, Kim JK, Ghetie V, Ward ES. Localization of the site of the IgG molecule that regulates maternofetal transmission in mice. *Eur J Immunol*. 1996;26:2533-2536.
219. Ellinger I, Rothe A, Grill M, Fuchs R. Apical to basolateral transcytosis and apical recycling of immunoglobulin G in trophoblast-derived BeWo cells: effects of low temperature, nocodazole, and cytochalasin D. *Exp Cell Res*. 2001;269:322-331.
220. Ellinger I, Schwab M, Stefanescu A, Hunziker W, Fuchs R. IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta. *Eur J Immunol*. 1999;29:733-744.
221. Roberts DM, Guentert M, Rodewald R. Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat. *J Cell Biol*. 1990;111:1867-1876.
222. Benlounes N, Chedid R, Thuillier F, Desjeux JF, Rousselet F, Heyman M. Intestinal transport and processing of immunoglobulin G in the neonatal and adult rat. *Biol Neonate*. 1995;67:254-263.
223. Kleinman RE, Walker WA. Antigen processing and uptake from the intestinal tract. *Clin Rev Allergy*. 1984;2:25-37.
224. Brambell FW, Hemmings WA, Morris IG. A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature*. 1964;203:1352-1354.
225. Brambell FW. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet*. 1966;2:1087-1093.
226. Liu Z, Roopenian DC, Zhou X, et al. Beta2-microglobulin-deficient mice are resistant to bullous pemphigoid. *J Exp Med*. 1997;186:777-783.
227. Mozes E, Kohn LD, Hakim F, Singer DS. Resistance of MHC class I-deficient mice to experimental systemic lupus erythematosus. *Science*. 1993;261:91-93.
228. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med*. 1999;189:1639-1648.
229. Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*. 1989;337:184-187.

230. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *J Immunol.* 2005;174:6-19.
231. Joyce S, Woods AS, Yewdell JW, et al. Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science.* 1998;279:1541-1544.
232. Story CM, Mikulska JE, Simister NE. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J Exp Med.* 1994;180:2377-2381.
233. Raghavan M, Bonagura VR, Morrison SL, Bjorkman PJ. Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry.* 1995;34:14649-14657.
234. Medesan C, Matesoi D, Radu C, Ghetie V, Ward ES. Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. *J Immunol.* 1997;158:2211-2217.
235. Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature.* 1994;372:379-383.
236. Hobbs SM, Jackson LE, Peppard JV. Binding of subclasses of rat immunoglobulin G to detergent-isolated Fc receptor from neonatal rat intestine. *J Biol Chem.* 1987;262:8041-8046.
237. Dima S, Medesan C, Mota G, Moraru I, Sjoquist J, Ghetie V. Effect of protein A and its fragment B on the catabolic and Fc receptor sites of IgG. *Eur J Immunol.* 1983;13:605-614.
238. Duncan AR, Winter G. The binding site for C1q on IgG. *Nature.* 1988;332:738-740.
239. Duncan AR, Woof JM, Partridge LJ, Burton DR, Winter G. Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature.* 1988;332:563-564.
240. Wright A, Morrison SL. Effect of altered CH2-associated carbohydrate structure on the functional properties and in vivo fate of chimeric mouse-human immunoglobulin G1. *J Exp Med.* 1994;180:1087-1096.
241. Maxwell KF, Powell MS, Hulett MD, et al. Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat Struct Biol.* 1999;6:437-442.
242. Sondermann P, Huber R, Jacob U. Crystal structure of the soluble form of the human fcgamma-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *Embo J.* 1999;18:1095-1103.
243. Gallowitsch HJ, Kresnik E, Gasser J, et al. F-18 fluorodeoxyglucose positron-emission tomography in the diagnosis of tumor recurrence and metastases in the follow-up of patients with breast carcinoma: a comparison to conventional imaging. *Invest Radiol.* 2003;38:250-256.
244. Berger F, Paulmurugan R, Bhaumik S, Gambhir SS. Uptake kinetics and biodistribution of (14)C-D: -luciferin-a radiolabeled substrate for the firefly luciferase catalyzed bioluminescence reaction: impact on bioluminescence based reporter gene imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008.

245. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20:733-744.
246. Moorin RE, Davison A, Turner JH. Optimization of technetium-99m Sestamibi single-photon emission tomography to define multidrug resistance with confidence. *Nucl Med Commun*. 2004;25:1039-1048.
247. Alexandrakis G, Rannou FR, Chatziioannou AF. Effect of optical property estimation accuracy on tomographic bioluminescence imaging: simulation of a combined optical-PET (OPET) system. *Phys Med Biol*. 2006;51:2045-2053.
248. Budzanowski M, Olko P, Marczewska B, et al. Dose distribution around a needle-like anode X-ray tube: dye-film vs. planar thermoluminescent detectors. *Radiat Prot Dosimetry*. 2006;120:117-120.
249. Shinji S, Ishiwata T, Tajiri T, et al. External whole-body image of EGFP gene expression. *J Nippon Med Sch*. 2003;70:462-463.
250. Leners N, Ferrant A, Jamar F. Evaluation of two ¹¹¹In-oxinate formulations for labelling of white blood cells. *Int J Rad Appl Instrum B*. 1991;18:727-733.
251. Lerondel S, Le Pape A, Sene C, et al. Radioisotopic imaging allows optimization of adenovirus lung deposition for cystic fibrosis gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2001;12:1-11.
252. Shibata M, Hariya T, Hatao M, Ashikaga T, Ichikawa H. Quantitative polymerase chain reaction using an external control mRNA for determination of gene expression in a heterogeneous cell population. *Toxicol Sci*. 1999;49:290-296.
253. Basden A, Geng D, Guzman D, Morris T, Myers R, Saunter C. Shack-Hartmann sensor improvement using optical binning. *Appl Opt*. 2007;46:6136-6141.
254. Fitzpatrick MJ, Starkschall G, Antolak JA, et al. Displacement-based binning of time-dependent computed tomography image data sets. *Med Phys*. 2006;33:235-246.
255. Srinivas Y, Wilson DL. Quantitative image quality evaluation of pixel-binning in a flat-panel detector for x-ray fluoroscopy. *Med Phys*. 2004;31:131-141.
256. Cittera E, Onofri C, D'Apolito M, et al. Rituximab induces different but overlapping sets of genes in human B-lymphoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:273-286.
257. Farstad BS, Sundrehagen E, Opdahl H, Benestad HB. Pulmonary, hepatic and splenic sequestration of technetium-99m labelled autologous rabbit granulocytes: scintigraphic cell distributions after intravenous and intraarterial injections, exsanguination and intraarterial injection of cells passed through an intermediary host. *Acta Physiol Scand*. 1991;143:211-222.
258. Chow TW, Takeshita S, Honjo K, et al. Comparison of manual and semi-automated delineation of regions of interest for radioligand PET imaging analysis. *BMC Nucl Med*. 2007;7:2.
259. Zhang T, Chi Y, Meldolesi E, Yan D. Automatic delineation of on-line head-and-neck computed tomography images: toward on-line adaptive radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68:522-530.
260. Rinchik EM, Stoye JP, Frankel WN, Coffin J, Kwon BS, Russell LB. Molecular analysis of viable spontaneous and radiation-induced albino (c)-locus mutations in the mouse. *Mutat Res*. 1993;286:199-207.

261. Paroo Z, Bollinger RA, Braasch DA, et al. Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. *Mol Imaging*. 2004;3:117-124.
262. Keyaerts M, Verschueren J, Bos TJ, et al. Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D: -luciferin: effect on intensity, time kinetics and repeatability of photon emission. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:999-1007.
263. Ueda I, Kamaya H. Kinetic and thermodynamic aspects of the mechanism of general anesthesia in a model system of firefly luminescence in vitro. *Anesthesiology*. 1973;38:425-436.
264. Franks NP, Lieb WR. Seeing the light: protein theories of general anesthesia. 1984. *Anesthesiology*. 2004;101:235-237.
265. Ueda I, Kamaya H, Eyring H. Molecular mechanism of inhibition of firefly luminescence by local anesthetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73:481-485.
266. Zhang Y, Stabernack CR, Dutton R, et al. Luciferase as a model for the site of inhaled anesthetic action. *Anesth Analg*. 2001;93:1246-1252.
267. Collaco AM, Rahman S, Dougherty EJ, Williams BB, Geusz ME. Circadian regulation of a viral gene promoter in live transgenic mice expressing firefly luciferase. *Mol Imaging Biol*. 2005;7:342-350.
268. Heydarpour F, Amini B, Kalantari S, Rostami A, Heydarpour P. Determination of sensitivity of male Wistar rats to an equal dose of ketamine/xylazine injection at anesthetic dose in a chronic model of hypernatremia in comparison with control group. *Saudi Med J*. 2007;28:1485-1488.
269. Keyaerts M, Verschueren J, Bos TJ, et al. Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D: -luciferin: effect on intensity, time kinetics and repeatability of photon emission. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008.
270. Igarashi T, Kobayashi Y, Ogura M, et al. Factors affecting toxicity, response and progression-free survival in relapsed patients with indolent B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma treated with rituximab: a Japanese phase II study. *Ann Oncol*. 2002;13:928-943.
271. Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, et al. The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2003;48:455-459.
272. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;98:754-758.
273. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non- Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995-1001.
274. Manshouri T, Do KA, Wang X, et al. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood*. 2003;101:2507-2513.

275. Witzig TE, Vukov AM, Habermann TM, et al. Rituximab therapy for patients with newly diagnosed, advanced-stage, follicular grade I non-Hodgkin's lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:1103-1108.
276. Hainsworth JD, Burris HA, 3rd, Morrissey LH, et al. Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000;95:3052-3056.
277. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*. 2001;97:101-106.
278. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
279. Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M, et al. Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. The IDEC-C2B8 Study Group. *Ann Oncol*. 1998;9:527-534.
280. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*. 2003;171:1581-1587.
281. Ternant D, Mulleman D, Degenne D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit*. 2006;28:169-174.
282. Blasco H, Lalmanach G, Godat E, et al. Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *J Immunol Methods*. 2007.
283. Maloney DG. Follicular NHL: From Antibodies and Vaccines to Graft-versus-Lymphoma Effects. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;2007:226-232.
284. Shipp MA. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood*. 1994;83:1165-1173.
285. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, et al. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1997;15:3266-3274.
286. Kim S, Fridlender ZG, Dunn R, et al. B-cell depletion using an anti-CD20 antibody augments antitumor immune responses and immunotherapy in nonhematopoietic murine tumor models. *J Immunother*. 2008;31:446-457.
287. Lopes de Menezes DE, Denis-Mize K, Tang Y, et al. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother*. 2007;30:64-74.
288. Warren TL, Weiner GJ. Synergism between cytosine-guanine oligodeoxynucleotides and monoclonal antibody in the treatment of lymphoma. *Semin Oncol*. 2002;29:93-97.
289. Mathe G. [Chemiotherapy of cancers (operational research of its efficiency and its place in therapeutic strategy of neoplastic diseases)]. *Presse Med*. 1969;77:383-384.
290. Levin WP, Kooy H, Loeffler JS, DeLaney TF. Proton beam therapy. *Br J Cancer*. 2005;93:849-854.
291. Orecchia R, Luini A, Veronesi P, et al. Electron intraoperative treatment in patients with early-stage breast cancer: data update. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6:605-611.

292. Brahme A, Nilsson J, Belkic D. Biologically optimized radiation therapy. *Acta Oncol.* 2001;40:725-734.
293. Locke J, Karimpour S, Young G, Lockett MA, Perez CA. Radiotherapy for epithelial skin cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:748-755.
294. Meyns M, Jansen N, Deneufbourg JM. [Place of radiation-therapy of breast cancer treatment--current and future indications]. *Rev Med Liege.* 2006;61:623-631.
295. Schulz U, Gokel JM, Poleska W. Soft tissue sarcomas after radiation treatment for breast cancer. Three case studies and review of literature. *Strahlenther Onkol.* 2000;176:144-149.
296. Ma CM, Pawlicki T, Lee MC, et al. Energy- and intensity-modulated electron beams for radiotherapy. *Phys Med Biol.* 2000;45:2293-2311.
297. Habrand JL, Schlienger P, Schwartz L, et al. Clinical applications of proton therapy. Experiences and ongoing studies. *Radiat Environ Biophys.* 1995;34:41-44.
298. Wenz F, Lohr F, Peschke P, Wolber G, Hover KH, Hahn EW. [The relative biological effectiveness (RBE) of fast neutrons on the Dunning rat prostate carcinoma R3327-HI]. *Strahlenther Onkol.* 1993;169:412-417.
299. Allen BJ. Internal high linear energy transfer (LET) targeted radiotherapy for cancer. *Phys Med Biol.* 2006;51:R327-341.
300. Auberger T, Reuschel W. The role of fast neutrons in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck: The European experience. *Recent Results Cancer Res.* 1998;150:137-147.
301. Lindsley KL, Cho P, Stelzer KJ, et al. Fast neutrons in prostatic adenocarcinomas: worldwide clinical experience. *Recent Results Cancer Res.* 1998;150:125-136.
302. Covelli V, Coppola M, Di Majo V, Rebessi S. The dose-response relationships for tumor induction after high-LET radiation. *J Radiat Res (Tokyo).* 1991;32 Suppl 2:110-117.
303. Madoc-Jones H, Wazer DE, Zamenhof RG, Harling OK, Bernard JA, Jr. Clinical considerations for neutron capture therapy of brain tumors. *Basic Life Sci.* 1990;54:23-35.
304. Koh WJ, Laramore G, Griffin T, et al. Fast neutron radiation for inoperable and recurrent salivary gland cancers. *Am J Clin Oncol.* 1989;12:316-319.
305. Austin-Seymour M, Griffin T, Laramore G, Maor M, Parker R. High-LET radiation therapy of non-small cell lung cancer. *Chest.* 1989;96:72S-73S.
306. Richter MP, Laramore GE, Griffin TW, Goodman RL. Current status of high linear energy transfer irradiation. *Cancer.* 1984;54:2814-2822.
307. Fowler JF. Developing aspects of radiation oncology. *Med Phys.* 1981;8:427-434.
308. Mercado R, Jr., Deutsch M. Cancer of the breast. Radiation therapy. *Major Probl Clin Surg.* 1979;5:350-360.
309. Carlsson J, Forssell-Aronsson E, Glimelius B. Radiation therapy through activation of stable nuclides. *Acta Oncol.* 2002;41:629-634.
310. Shih JL, Brugger RM. Gadolinium as a neutron capture therapy agent. *Med Phys.* 1992;19:733-744.

311. Allen BJ. Neutron capture therapy research in Australia. *Pigment Cell Res.* 1989;2:235-239.
312. Spinosa DJ, Kaufmann JA, Hartwell GD. Gadolinium chelates in angiography and interventional radiology: a useful alternative to iodinated contrast media for angiography. *Radiology.* 2002;223:319-325; discussion 326-317.
313. de Haen C, Cabrini M, Akhnana L, Ratti D, Calabi L, Gozzini L. Gadobenate dimeglumine 0.5 M solution for injection (MultiHance) pharmaceutical formulation and physicochemical properties of a new magnetic resonance imaging contrast medium. *J Comput Assist Tomogr.* 1999;23 Suppl 1:S161-168.
314. Knopp MV, von Tengg-Kobligk H, Floemer F, Schoenberg SO. Contrast agents for MRA: future directions. *J Magn Reson Imaging.* 1999;10:314-316.
315. Earls JP, Bluemke DA. New MR imaging contrast agents. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 1999;7:255-273.
316. Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomed.* 2007;2:23-39.
317. Forouzannia A, Richards GM, Khuntia D, Mehta MP. Motexafin gadolinium: a novel radiosensitizer for brain tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007;7:785-794.
318. Strijkers GJ, Mulder WJ, van Tilborg GA, Nicolay K. MRI contrast agents: current status and future perspectives. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7:291-305.
319. Masunaga SI, Ono K, Kirihata M, et al. Evaluation of the potential of p-boronophenylalaninol as a boron carrier in boron neutron capture therapy, referring to the effect on intratumor quiescent cells. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:996-1007.
320. Masunaga S, Ono K, Sakurai Y, et al. Evaluation of apoptosis and micronucleation induced by reactor neutron beams with two different cadmium ratios in total and quiescent cell populations within solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:828-839.
321. Reynolds RC, Campbell SR, Fairchild RG, et al. Novel boron-containing, nonclassical antifolates: synthesis and preliminary biological and structural evaluation. *J Med Chem.* 2007;50:3283-3289.
322. Broerse JJ, Battermann JJ. Fast neutron radiotherapy: for equal or for better? *Med Phys.* 1981;8:751-760.
323. Azria D, Bibeau F, Barbier N, et al. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer.* 2005;5:62.
324. Larbouret C, Robert B, Linard C, et al. Radiocurability by targeting tumor necrosis factor-alpha using a bispecific antibody in carcinoembryonic antigen transgenic mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;69:1231-1237.
325. Hedges MJ, Hornsey S. The effect of X-rays and neutrons on lymphocyte death and transformation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1978;33:291-300.
326. Nitta Y, Hoshi M. Relationship between oocyte apoptosis and ovarian tumours induced by high and low LET radiations in mice. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:241-250.

327. Congy-Jolivet N, Probst A, Watier H, Thibault G. Recombinant therapeutic monoclonal antibodies: mechanisms of action in relation to structural and functional duality. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;64:226-233.
328. Ceze N, Probst A, Lecomte T, Ohresser M, Paintaud G, Watier H. [Target antigens for therapeutic antibodies in oncology: many candidates, few successes]. *Bull Cancer*. 2007;94:F129-136.
329. Kang TY, Rybicki LA, Bolwell BJ, et al. Effect of prior rituximab on high-dose therapy and autologous stem cell transplantation in follicular lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40:973-978.
330. Hess G, Flohr T, Kolbe K, et al. Effect of rituximab on the long-term outcome after high-dose therapy for relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*. 2006;85:769-779.
331. Taube T, Schmid H, Reinhard H, von Stackelberg A, Overberg US. Effect of a single dose of rituximab in chronic immune thrombocytopenic purpura in childhood. *Haematologica*. 2005;90:281-283.
332. Srock S, Schriever F, Neubauer A, Herold M, Huhn D. Long-term treatment with rituximab is feasible in selected patients with B-CLL: response-adjusted low-dose maintenance treatment with rituximab in patients with relapsed B-CLL, who achieved a partial or minimal response to prior rituximab therapy. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:905-911.
333. Foran JM, Cunningham D, Coiffier B, et al. Treatment of mantle-cell lymphoma with Rituximab (chimeric monoclonal anti-CD20 antibody): analysis of factors associated with response. *Ann Oncol*. 2000;11 Suppl 1:117-121.
334. Solal-Celigny P. Rituximab as first-line monotherapy in low-grade follicular lymphoma with a low tumor burden. *Anticancer Drugs*. 2001;12 Suppl 2:S11-14.
335. Ng CM, Bruno R, Combs D, Davies B. Population pharmacokinetics of rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in rheumatoid arthritis patients during a phase II clinical trial. *J Clin Pharmacol*. 2005;45:792-801.
336. Sachs UJ, Socher I, Braeunlich CG, Kroll H, Bein G, Santoso S. A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter. *Immunology*. 2006;119:83-89.
337. Mould DR, Sweeney KR. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies--mechanistic modeling applied to drug development. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2007;10:84-96.
338. Ng CM, Stefanich E, Anand BS, Fielder PJ, Vaickus L. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (TRX1) in healthy human volunteers. *Pharm Res*. 2006;23:95-103.
339. Koon HB, Severy P, Hagg DS, et al. Antileukemic effect of daclizumab in CD25 high-expressing leukemias and impact of tumor burden on antibody dosing. *Leuk Res*. 2006;30:190-203.
340. Felber J, Gahler R, Golub R. Comment on "giant absorption cross section of ultracold neutrons in gadolinium". *Phys Rev Lett*. 2000;85:5667-5668.
341. Masunaga S, Ono K, Sakurai Y, et al. Responses of total and quiescent cell populations in solid tumors to boron and gadolinium neutron capture reaction using neutrons with two different energy spectra. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89:81-88.

342. Vaccaro M, Mangiapia G, Paduano L, et al. Structural and relaxometric characterization of peptide aggregates containing gadolinium complexes as potential selective contrast agents in MRI. *Chemphyschem*. 2007;8:2526-2538.

ANNEXES (systèmes d'imagerie et macros d'analyse d'images)

- Annexe N°01 : Documentation Xenogen® IVIS Lumina.
- Annexe N°02 : Documentation ORCA 2-BTL Hamamatsu Electronics®.
- Annexe N°03 : Macro de traitement de l'image "Elimination des perturbations du signal dues au bruit de fond de l'image et au rayonnement cosmique".
- Annexe N°04 : Macro d'analyse de l'image "Détermination des régions d'intérêt par segmentation de l'image".

→ Annexe N°01 : Documentation Xenogen® IVIS Lumina.



IVIS® Lumina Imaging System



IVIS® Lumina Imaging System R&D Applications

- Tracking and monitoring
- High-quality data on treatment efficacy
- Drug metabolism and toxicological screening for pharmaceutical and biotechnology companies

IVIS® Lumina Components: CCD Camera and Imaging Chamber, Acquisition Computer, High-Resolution Monitor, Integrated Fluorescence Capability, and Living Image® Software, shown with workstation option

The IVIS Lumina imaging system allows researchers to perform in vivo optical imaging — a novel technology from Xenogen that uses real-time imaging to monitor and record cellular and genetic activity within a living organism — using fluorescent and/or bioluminescent reporters.

Contact Information

Please call 1.877.936.6436 or
E-mail: imaging@xenogen.com
Xenogen Corporation
860 Atlantic Avenue,
Alameda, California 94501
www.xenogen.com

The IVIS® Lumina from Xenogen provides high sensitivity, ease of use, and the flexibility to image fluorescent and/or bioluminescent reporters both *in vivo* and *in vitro*.

The system includes a highly sensitive CCD camera, a light-tight imaging chamber with complete computer automation, and the Living Image® software package for image acquisition and analysis.

An adjustable field of view from 5–12.5 cm allows imaging of up to 3 mice or a medium size rat and also accommodates standard microtiter plates for *in vitro* imaging. The system includes premium animal handling features such as a heated sample shelf, gas anesthesia connections and manifold, and an optional full gas anesthesia option.



IVIS[®] Lumina Imaging System

Page 3

CCD Camera

- The IVIS Lumina CCD is 13 x 13 mm square, with 1024 x 1024 pixels 13 micron in width, yields higher imaging resolution
- Back-thinned, back-illuminated grade 1 CCD provides high quantum efficiency over the entire visible to near-infrared spectrum
- 16 bit digitizer delivers broad dynamic range
- The CCD is thermoelectrically (Peltier) cooled to -90°C ensuring low dark current and low noise

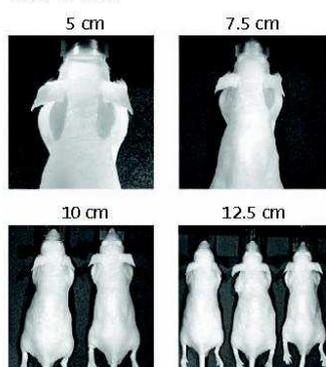
Imaging Chamber

- Light-tight imaging chamber
- High light collection lens, $f/0.95 - f/16$
- 8 position emission filter wheel
- LED lamps for photographic images
- Heated stage to maintain optimum body temperature
- Motor controlled stage, filter wheel, lens position, and f-stop

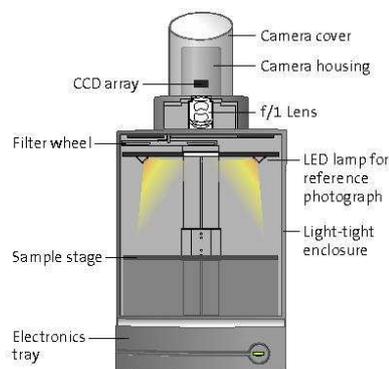
Integrated Gas Anesthesia

- Gas anesthesia ports and 5 position manifold within imaging chamber allow anesthesia to be maintained during imaging sessions

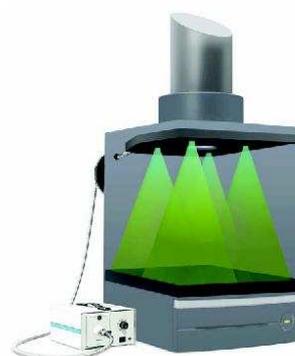
Field of View



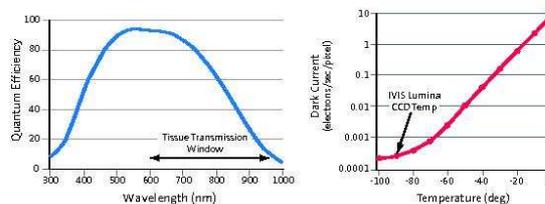
The IVIS Lumina Imaging system provides 4 fields of view



Cross sectional view of IVIS[®] Lumina Imaging System



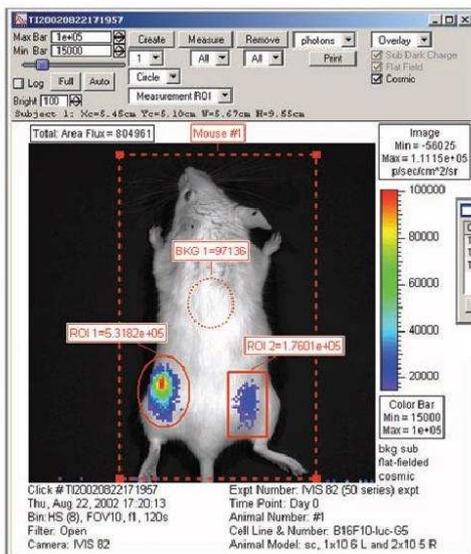
Fluorescence features include a tungsten halogen lamp, 12-position excitation filter wheel, and 8-position emission filter wheel. Specimen illumination is from above in reflectance mode.



High quantum efficiency (left) and low dark current (right) provide excellent sensitivity for imaging at low light levels

IVIS® Lumina Imaging System
Page 5

Living Image® Imaging Software Control and Analysis



Living Image® Software

Living Image software from Xenogen controls image acquisition, analysis, and archiving. Data analysis versions of Living Image software run on both Windows® and Macintosh® platforms.

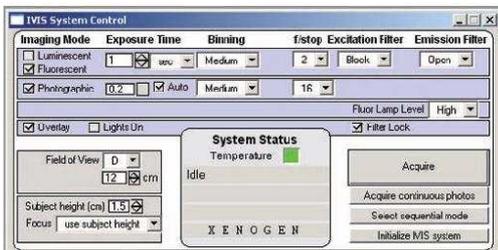
Image Analysis Panel

- Photo brightness and color bar adjustment
- Image annotation tools
- Region of interest (ROI) measurements
 - Subject, background, measurement ROIs
 - ROI measurements are organized in a measurements table
- Absolute calibration of image intensity against NIST radiance standards
- Corrections for cosmic rays, dark charge, and flat field
- Printing, layout, and image export functions

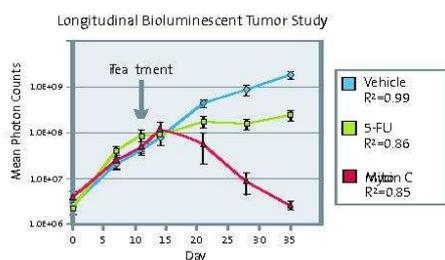
IVIS System Control Panel

- Controls for both fluorescence and bioluminescence imaging
- Manual and auto focus
- Setting of exposure time, binning, f/stop, and field of view
- Fluorescence lamp and filter controls
- Acquisition setup of a single image or an image sequence

Between one and three subjects can be imaged per session



Imaging Controls – Living Image® software controls both fluorescent and bioluminescent options



The wide range of IVIS system instrument settings, combined with absolute calibration of each setting, allows users to track signals during longitudinal studies that vary by many orders of magnitude. In this drug study, tumor signals vary by three orders of magnitude during the course of a 35 day experiment. The capability of Living Image software makes this type of analysis simple for the user in both fluorescent and bioluminescent modes.

→ Annexe N°02 : Documentation ORCA 2-BTL Hamamatsu Electronics®.

HAMAMATSU

DATA SHEET

512 × 512 pixels BT(back-thinned) CCD

BT(Back-thinned)-CCD Cooled Digital Camera ORCA II-BT-512



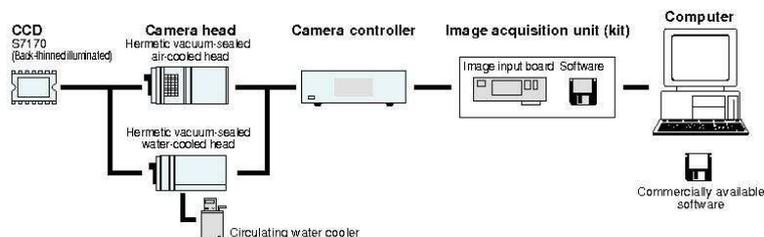
▲ Hermetic vacuum sealed air-cooled head type

The ORCA II-BT-512 features an original and unique Hamamatsu S7170 CCD chip packaged in a proprietary permanently sealed vacuum chamber evacuated to 10^{-7} Torr. This high resolution, back thinned, back illuminated CCD offers very high quantum efficiency over the spectrum from 200 nm to 1000 nm. With a huge full well capacity, low read noise and MPP (Multi-Pinned Phase) technology in the drive circuits to reduce dark current, this camera will produce rapid exposures and very high dynamic range images. Dual mode digitization offers a software selectable choice of speed or very low noise readout methods with 12 bit to 16 bit precision. Special analog contrast enhancement circuits increase versatility for even the most difficult imaging conditions.

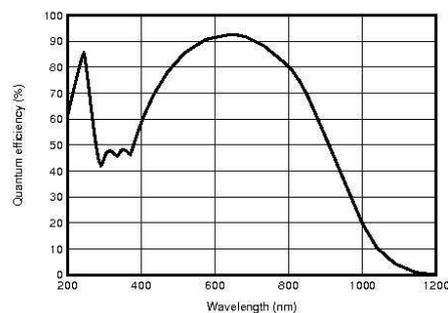
APPLICATIONS

- Luminescence and Fluorescence
- Video microscopy
- Semiconductor imaging
- X-ray applications
- Neutron radiography
- Scintillator readout

SYSTEM CONFIGURATION



SPECTRAL RESPONSE CHARACTERISTIC



* This is typical, not guaranteed.

FEATURES

- High resolution format (512 × 512 pixels)
- High quantum efficiency from UV to NIR
- Very large full well capacity (230000 electrons typ.)
- Low readout noise design (8 electrons r.m.s. typ.)
- Software selectable dual digitizers
- Analog contrast enhancement

TYPE NUMBER

C4742-98-26L

Cooling method
A: Air-cooling
W: Water-cooling

SPECIFICATIONS

Type number	C4742-98-26LA	C4742-98-26LW
Camera head type	Hermetic vacuum sealed air-cooled head	Hermetic vacuum sealed water-cooled head
Circulating water cooler (sold separately)	—	Required
Mechanical shutter	Built-in (Control: OPEN / CLOSE / AUTO)	
Imaging device	S7170 full-frame transfer CCD	
Effective no. of pixels	512 (H) × 512 (V)	
Cell size	24 μm (H) × 24 μm (V)	
Effective area	12.29 mm (H) × 12.29 mm (V)	
Pixel clock rate	156 kHz/pixel (High-precision readout) / 2.5 MHz/pixel (High-speed readout)	
Frame rate	0.5 frame/sec (High-precision readout) / 7.0 frame/sec (High-speed readout)	
Readout noise (r.m.s.) (High-precision readout)	8 electrons (typ.) / 6 electrons (min.)	
Full well capacity	230000 electrons	
Dynamic range* (High-precision readout)	28750 : 1 (typ.) / 38333 : 1 (max.)	
Cooling method	Peltier cooling / forced-air-cooling + hermetic sealing	Peltier cooling / water-cooling + hermetic sealing
Cooling temperature	-55 °C	-60 °C
Dark current	0.8 electrons/pixels	0.3 electrons/pixels
A/D converter (High-precision readout)	16 bit	
Output signal (High-precision readout)	RS-422A 16 bit parallel output	
Exposure time	20 ms or more	
External control	RS-232C	
Sub-array	Yes	
External trigger	Yes	
Contrast enhancement	1, 4, 16 times (High-precision readout) / 1 to 6 times (High-speed readout)	
Lens mount	C-mount	
Line voltage	AC 100 V / AC 117 V / AC 220 V / AC 240 V, 50 Hz/60 Hz	
Power consumption	approx. 220 W/A	
Ambient storage temperature	-10 °C to +50 °C	
Ambient operating temperature	0 °C to +40 °C	
Ambient operating/storage humidity	70 % max. (with no condensation)	

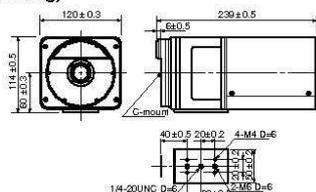
Binning		Subarray			
		1 × 1	2 × 2	4 × 4	8 × 8
Frame rate	High-precision readout	6.34 frame/s	9.84 frame/s	13.6 frame/s	16.8 frame/s
	High-speed readout	0.55 frame/s	1.07 frame/s	2.05 frame/s	3.75 frame/s

Subarray		256 × 256		128 × 128	
		High-precision readout	9.84 frame/s	13.6 frame/s	High-precision readout
Frame rate	High-speed readout	1.86 frame/s	5.17 frame/s		

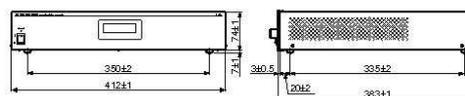
* Calculated from the ratio of the full well capacity and the readout noise.

DIMENSIONAL OUTLINES (Unit: mm)

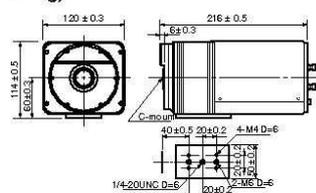
- Hermetic vacuum sealed air-cooled head (approx. 2.5 kg)



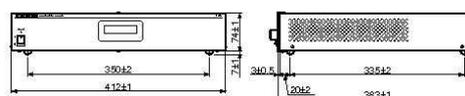
- Camera controller (approx. 8.5 kg)



- Hermetic vacuum sealed water-cooled head (approx. 2.5 kg)



- Camera controller (approx. 8.5 kg)



- Product and software package names noted in this documentation are trademarks or registered trademarks of their respective manufacturers.
- Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office.
- Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions.

Specifications and external appearance are subject to change without notice.

© 2001 Hamamatsu Photonics K.K.

HAMAMATSU

Homepage Address <http://www.hamamatsu.com>

HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Systems Division

812 Joko-cho, Hamamatsu City, 431-3198, Japan, Telephone: (81)53-431-0124, Fax: (81)53-435-1574, E-mail: export@sys.hpk.co.jp

U.S.A. and Canada: Hamamatsu Photonics Systems, 380 Foothill Road, Bridgewater, N.J. 08807-0910, U.S.A., Telephone: (1)908-231-1116, Fax: (1)908-231-0652, E-mail: usa@hamamatsu.com

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Azbergstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49)8152-375-0, Fax: (49)8152-2656, E-mail: info@hamamatsu.de

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L., 8, Rue du Saule Tiapu, Parc du Moulin de Massay, 91862 Massay Cedex, France, Telephone: (33)1 69 53 71 00, Fax: (33)1 69 53 71 10, E-mail: info@hamamatsu.fr

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited, 2 Howard Court, 10 Tewin Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 1BW, U.K., Telephone: (44)1707-294888, Fax: (44)1707-325777, E-mail: info@hamamatsu.co.uk

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB, Smidesvägen 12, SE-171-41 Solna, Sweden, Telephone: (46)8-509-031-00, Fax: (46)8-509-031-01, E-mail: info@hamamatsu.se

Italy: Hamamatsu Photonics Italia S.R.L., Strada della Moia, 1/E 20020 Arese (Milano), Italy, Telephone: (39)02-935 81 733, Fax: (39)02-935 81 741, E-mail: info@hamamatsu.it

Cat. No. SICS1091E04

SEP/2004 HPK

Created in Japan (PDF)

➔ Annexe N°03 : Macro de traitement de l'image "Elimination des perturbations du signal dues au bruit de fond de l'image et au rayonnement cosmique".

```
function varargout = interface_utilisateur(varargin)
% INTERFACE_UTILISATEUR M-file for interface_utilisateur.fig
%   INTERFACE_UTILISATEUR, by itself, creates a new INTERFACE_UTILISATEUR or raises the existing
%   singleton*.
%   H = INTERFACE_UTILISATEUR returns the handle to a new INTERFACE_UTILISATEUR or the handle to
%   the existing singleton*.
%   INTERFACE_UTILISATEUR('CALLBACK',hObject,eventData,handles,...) calls the local
%   function named CALLBACK in INTERFACE_UTILISATEUR.M with the given input arguments.
%   INTERFACE_UTILISATEUR('Property','Value',...) creates a new INTERFACE_UTILISATEUR or raises the
%   existing singleton*. Starting from the left, property value pairs are
%   applied to the GUI before interface_utilisateur_OpeningFunction gets called. An
%   unrecognized property name or invalid value makes property application
%   stop. All inputs are passed to interface_utilisateur_OpeningFcn via varargin.
%   *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI allows only one
%   instance to run (singleton)".
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES
% Copyright 2002-2003 The MathWorks, Inc.
% Edit the above text to modify the response to help interface_utilisateur
% Last Modified by GUIDE v2.5 12-Apr-2007 09:08:55
% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',    mfilename, ...
    'gui_Singleton',  gui_Singleton, ...
    'gui_OpeningFcn', @interface_utilisateur_OpeningFcn, ...
    'gui_OutputFcn',  @interface_utilisateur_OutputFcn, ...
    'gui_LayoutFcn',  [], ...
    'gui_Callback',   []);
if nargin && ischar(varargin an nombre de)
    gui_State.gui_Callback = str2func(vararginâ);
end
if nargin
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code - DO NOT EDIT
% --- Executes just before interface_utilisateur is made visible.
function interface_utilisateur_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin   command line arguments to interface_utilisateur (see VARARGIN)
% Choose default command line output for interface_utilisateur
handles.output = hObject;
% Update handles structure
guidata(hObject, handles);
% UIWAIT makes interface_utilisateur wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);
% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = interface_utilisateur_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout  cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet de charger les différentes images (2 images
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%de bruit de fond et 2 images de bioluminescence%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Variables de sortie: image_bdf1 (image de bruit de fond n°1)
%       FileName_bdf1 (nom de l'image de bruit de fond n°1)
%       image_bdf2 (image de bruit de fond n°2)
%       FileName_bdf2 (nom de l'image de bruit de fond n°2)
%       image_bio1 (image de bioluminescence n°1)
%       FileName_bio1 (nom de l'image de bioluminescence n°1)
%       image_bio2 (image de bruit de fond n°2)
%       FileName_bio2 (nom de l'image de bioluminescence n°2)
% --- Executes on selection change in popup_chargement.
function popup_chargement_Callback(hObject, eventdata, handles)
```

```

% hObject handle to popup_chargement (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: contents = get(hObject,'String') returns popup_chargement contents as cell array
% contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from popup_chargement
select = get(hObject, 'Value'); %retourne une valeur correspondant au menu sélectionné
switch select
    case 1 %cas où le premier menu est sélectionné c'est à dire "image de bruit de fond n°1"
        [FileName_bdf1,PathName_bdf1]=uigetfile('.tif','Sélectionnez la première image de bruit de fond') %Sélection de
l'image par l'utilisateur n'importe où dans l'ordinateur
        name=[PathName_bdf1,FileName_bdf1]
        %Lecture et affichage de l'image sélectionnée
        bdf1=imread(name); %Lecture de l'image sélectionnée par l'utilisateur
        axes(handles.axes_bdf1); %sélection du premier graphique
        imagesc(bdf1,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
        colormap(gray)

        set(handles.edit_cheminbdf1,'String',name) %Affiche le chemin de l'image sélectionnée
        handles.image_bdf1=bdf1; %enregistre la variable bdf1 dans un champ de la structure handles pour réutiliser
la variable dans d'autres fonctions
        handles.FileName_bdf1=FileName_bdf1; %enregistre la variable FileName_bdf1 dans un champ de la structure
handles pour la réutiliser dans la fonction comp afin de vérifier que les images à comparer ont les même
paramètres
        guidata(hObject, handles);
    case 2 %cas où le deuxième menu est sélectionné c'est à dire "image de bruit de fond n°2"
        [FileName_bdf2,PathName_bdf2]=uigetfile('*.tif','Sélectionnez la deuxième image de bruit de fond') %Sélection
de l'image par l'utilisateur
        name=[PathName_bdf2,FileName_bdf2]
        %Lecture et affichage de l'image sélectionnée
        bdf2=imread(name); %Lecture de l'image sélectionnée par l'utilisateur
        axes(handles.axes_bdf2); %sélection du deuxième graphique
        imagesc(bdf2,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
        colormap(gray)
        set(handles.edit_cheminbdf2,'String',name) %Affiche le chemin d'accès de l'image sélectionnée
        handles.image_bdf2=bdf2; %enregistre la variable bdf2 dans un champ de la structure handles
        handles.FileName_bdf2=FileName_bdf2;
        guidata(hObject, handles);
        %Affichage d'un message d'erreur si les deux images de bruit de fond
        %sélectionnées par l'utilisateur n'ont pas le même binning ou le
        %même temps d'acquisition
        A=[handles.FileName_bdf1];
        B=[handles.FileName_bdf2];
        for i=5 %Comparaison du titre des images de bruit de fond sélectionnées pour savoir si elles ont les mêmes
paramètres
            if
(A(1,i)~=B(1,i) | A(1,i+1)~=B(1,i+1) | A(1,i+2)~=B(1,i+2) | A(1,i+3)~=B(1,i+3) | A(1,i+4)~=B(1,i+4) | A(1,i+5)~=B(1,i+5) | A(1,i
+6)~=B(1,i+6) | A(1,i+7)~=B(1,i+7) | A(1,i+8)~=B(1,i+8) | A(1,i+9)~=B(1,i+9))
                errordlg('les deux images de bruit de fond sélectionnées ont pas le même binning ou le même temps d
acquisition et ne peuvent donc pas être corrigées','erreur')
            end
        end
    case 3 %cas où le troisième menu est sélectionné c'est à dire "image de bioluminescence n°1"
        [FileName_bio1,PathName_bio1]=uigetfile('*.tif','Sélectionnez la première image de bioluminescence')
%Sélection de l'image par l'utilisateur
        name=[PathName_bio1,FileName_bio1]
        %Lecture et affichage de l'image sélectionnée
        bio1=imread(name); %Lecture de l'image sélectionnée par l'utilisateur
        axes(handles.axes_bio1); %sélection du troisième graphe
        imagesc(bio1,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
        colormap(gray)
        set(handles.edit_cheminbio1,'String',name) %Affiche le chemin d'accès de l'image sélectionnée
        handles.image_bio1=bio1; %Enregistre la variable bio1 dans un champ de la structure handles
        handles.FileName_bio1=FileName_bio1;
        guidata(hObject, handles);
    case 4 %cas où le troisième menu est sélectionné c'est à dire "image de bioluminescence n°2"
        [FileName_bio2,PathName_bio2]=uigetfile('*.tif','Sélectionnez la deuxième image de bioluminescence')
%Sélection de l'image par l'utilisateur
        name=[PathName_bio2,FileName_bio2,]
        %Lecture et affichage de l'image sélectionnée
        bio2=imread(name); %Lecture d'une image de bioluminescence
        axes(handles.axes_bio2); %sélection du quatrième graphe
        imagesc(bio2,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
        colormap(gray)
        set(handles.edit_cheminbio2,'String',name) %Affiche le chemin d'accès de l'image sélectionnée

```

```

handles.image_bio2=bio2; %Enregistre la variable bio2 dans un champ de la structure handles
handles.FileName_bio2=FileName_bio2;
guidata(hObject, handles);
end
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function popup_chargement_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to popup_chargement (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%    See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet de changer l'image de bruit de fond 1 en
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%indiquant son chemin%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function edit_cheminbdf1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit_cheminbdf1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_cheminbdf1 as text
%    str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_cheminbdf1 as a double
%Récupération du chemin écrit dans edit_chemin lors de la sélection de
%l'image par l'utilisateur comme du texte
recup=get(hObject,'String')
image=imread(recup) %Lecture du nouveau chemin
axes(handles.axes_bdf1); %selection du premier graphe
imagesc(image,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image correspondant au chemin d'accès modifié par
l'utilisateur
colormap(gray)
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_cheminbdf1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit_cheminbdf1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%    See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet de changer l'image de bruit de fond 2 en
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%indiquant son chemin%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function edit_cheminbdf2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit_cheminbdf2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_cheminbdf2 as text
%    str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_cheminbdf2 as a double
%Récupération du chemin écrit dans edit_chemin lors de la sélection de
%l'image par l'utilisateur comme du texte
recup=get(hObject,'String')
image=imread(recup); %Lecture du nouveau chemin
axes(handles.axes_bdf2); %selection du deuxième graphe
imagesc(image,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image correspondant au chemin d'accès modifié par
l'utilisateur
colormap(gray)
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_cheminbdf2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit_cheminbdf2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%    See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet de changer l'image de bioluminescence 1 en
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%indiquant son chemin%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

function edit_cheminbio1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_cheminbio1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_cheminbio1 as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_cheminbio1 as a double
%Récupération du chemin écrit dans edit_chemin lors de la sélection de
%l'image par l'utilisateur comme du texte
recup=get(hObject,'String');
image=imread(recup); %Lecture du nouveau chemin
axes(handles.axes_bio1); %selection du troisième graphe
imagesc(image,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image correspondant au chemin d'accès modifié par
l'utilisateur
colormap(gray)
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_cheminbio1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_cheminbio1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet de changer l'image de bioluminescence 2 en
%%%%%%%%%%%%indiquant son chemin%%%%%%%%%%%%
function edit_cheminbio2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_cheminbio2 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_cheminbio2 as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_cheminbio2 as a double
%Récupération du chemin écrit dans edit_chemin lors de la sélection de
%l'image par l'utilisateur comme du texte
recup=get(hObject,'String');
image=imread(recup) %Lecture du nouveau chemin
axes(handles.axes_bio2); %selection du quatrième graphe
imagesc(image,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image correspondant au chemin d'accès modifié par
l'utilisateur
colormap(gray)
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_cheminbio2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_cheminbio2 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet de changer l'échelle d'intensité de la première
%%%%%%%%%%%%image de bruit de fond à l'aide d'un slider%%%%%%%%%%%%
% --- Executes on slider movement.
function slider_imagebdf1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to slider_imagebdf1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'Value') returns position of slider
% get(hObject,'Min') and get(hObject,'Max') to determine range of slider
valeur=get(hObject,'Value');
min=get(hObject,'Min');
if valeur==min
    axes(handles.axes_bdf1);%selection du premier graphique
    imagesc(handles.image_bdf1,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.2
    axes(handles.axes_bdf1);%selection du premier graphique
    imagesc(handles.image_bdf1,[0,1.2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)

```

```

end
if valeur==min+0.4
    axes(handles.axes_bdf1);%selection du premier graphique
    imagesc(handles.image_bdf1,[0,1.6*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.6
    axes(handles.axes_bdf1);%selection du premier graphique
    imagesc(handles.image_bdf1,[0,2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.8
    axes(handles.axes_bdf1);%selection du premier graphique
    imagesc(handles.image_bdf1,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+1
    axes(handles.axes_bdf1);%selection du premier graphique
    imagesc(handles.image_bdf1,[0,2.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function slider_imagebdf1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to slider_imagebdf1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: slider controls usually have a light gray background, change
%   'usewhitebg' to 0 to use default. See ISPC and COMPUTER.
usewhitebg = 1;
if usewhitebg
    set(hObject,'BackgroundColor',[.9 .9 .9]);
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% --- Executes on slider movement.
function slider_imagebdf2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to slider_imagebdf2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'Value') returns position of slider
%   get(hObject,'Min') and get(hObject,'Max') to determine range of slider
valeur=get(hObject,'Value');
min=get(hObject,'Min');
if valeur==min
    axes(handles.axes_bdf2);%selection du deuxième graphique
    imagesc(handles.image_bdf2,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.2
    axes(handles.axes_bdf2);%selection du deuxième graphique
    imagesc(handles.image_bdf2,[0,1.2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.4
    axes(handles.axes_bdf2);%selection du deuxième graphique
    imagesc(handles.image_bdf2,[0,1.6*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.6
    axes(handles.axes_bdf2);%selection du deuxième graphique
    imagesc(handles.image_bdf2,[0,2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.8
    axes(handles.axes_bdf2);%selection du deuxième graphique
    imagesc(handles.image_bdf2,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end
if valeur==min+1
    axes(handles.axes_bdf2);%selection du deuxième graphique
    imagesc(handles.image_bdf2,[0,2.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bruit de fond
    colormap(gray)
end

```

```

end
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function slider_imagebio2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to slider_imagebio2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: slider controls usually have a light gray background, change
%         'usewhitebg' to 0 to use default. See ISPC and COMPUTER.
usewhitebg = 1;
if usewhitebg
    set(hObject,'BackgroundColor',[.9 .9 .9]);
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%Fonction qui permet de changer l'échelle d'intensité de la première
%%%%%%%%image de bioluminescence à l'aide d'un slider%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% --- Executes on slider movement.
function slider_imagebio1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to slider_imagebio1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'Value') returns position of slider
%         get(hObject,'Min') and get(hObject,'Max') to determine range of slider
valeur=get(hObject,'Value');
min=get(hObject,'Min');
if valeur==min
    axes(handles.axes_bio1);%selection du troisième graphique
    imagesc(handles.image_bio1,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.2
    axes(handles.axes_bio1);%selection du troisième graphique
    imagesc(handles.image_bio1,[0,1.2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.4
    axes(handles.axes_bio1);%selection du troisième graphique
    imagesc(handles.image_bio1,[0,1.6*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.6
    axes(handles.axes_bio1);%selection du troisième graphique
    imagesc(handles.image_bio1,[0,2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.8
    axes(handles.axes_bio1);%selection du troisième graphique
    imagesc(handles.image_bio1,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+1
    axes(handles.axes_bio1);%selection du troisième graphique
    imagesc(handles.image_bio1,[0,2.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function slider_imagebio1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to slider_imagebio1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: slider controls usually have a light gray background, change
%         'usewhitebg' to 0 to use default. See ISPC and COMPUTER.
usewhitebg = 1;
if usewhitebg
    set(hObject,'BackgroundColor',[.9 .9 .9]);
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%Fonction qui permet de changer l'échelle d'intensité de la deuxième
%%%%%%%%image de bioluminescence à l'aide d'un slider%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% --- Executes on slider movement.
function slider_imagebio2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to slider_imagebio2 (see GCBO)

```

```

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'Value') returns position of slider
%      get(hObject,'Min') and get(hObject,'Max') to determine range of slider
valeur=get(hObject,'Value');
min=get(hObject,'Min');
if valeur==min
    axes(handles.axes_bio2);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_bio2,[0,0.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.2
    axes(handles.axes_bio2);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_bio2,[0,1.2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.4
    axes(handles.axes_bio2);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_bio2,[0,1.6*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.6
    axes(handles.axes_bio2);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_bio2,[0,2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.8
    axes(handles.axes_bio2);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_bio2,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+1
    axes(handles.axes_bio2);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_bio2,[0,2.8*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function slider_imagebio2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to slider_imagebio2 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: slider controls usually have a light gray background, change
%      'usewhitebg' to 0 to use default. See ISPC and COMPUTER.
usewhitebg = 1;
if usewhitebg
    set(hObject,'BackgroundColor',[.9 .9 .9]);
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%Fonction qui permet à l'utilisateur de rentrer le pourcentage
%%%%%%%%%d'erreur qu'il souhaite pour la comparaison des pixels des images à
%%%%%%%%%comparer%%%%%%%%%
%%%%%%%%%Variable de sortie: taux_erreur
function edit_erreur_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_erreur (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_erreur as text
%      str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_erreur as a double
user_entry = str2double(get(hObject,'string')); %convertit le caractère inscrit en nombre
if isnan(user_entry) %message d'erreur si le caractère entré n'est pas un nombre
    errordlg('Vous devez entrer une valeur numérique','Erreur')
end
if (user_entry <0 | user_entry >100) %message d'erreur si lenombre inscrit ne peut pas être en pourcentage
    errordlg('La valeur entrée est fausse','Erreur')
end
handles.taux_erreur=user_entry; %Enregistre la variable entrée par l'utilisateur dans un champ de la structure
handles
guidata(hObject, handles);
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_erreur_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_erreur (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB

```

```

% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet la corection des images sélectionnées ainsi que
%%%%%%%%%%%%du calcul de l'image finale%%%%%%%%%%%%
% Variable de sortie: image_finale
% --- Executes on button press in pushbutton_validation.
function pushbutton_validation_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to pushbutton_validation (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
%definition de l'erreur pour la comparaison des images
x=handles.taux_erreur/100;
%Calcul de la taille des images
H=size(handles.image_bdf1);
J=size(handles.image_bio1);
%Appel de la fonction correction qui compare et corrige les images de bruit de fond
[image_bdf1cor,image_bdf2cor,nbr_pixel_corrige_bdf1,nbr_pixel_corrige_bdf2]=correction_bdf(handles.image_bdf1,handles.image_bdf2,x,H);
[image_bio1cor,image_bio2cor,nbr_pixel_corrige_bio1,nbr_pixel_corrige_bio2]=correction(handles.image_bio1,handles.image_bio2,x,J);
%Retourne le nombre de pixels corrigés pour chaque image à l'utilisateur
set(handles.edit_bdf1,'string',nbr_pixel_corrige_bdf1) %Retourne le nombre de pixel corrigé sur l'image de bruit de fond 1 dans le cadre edit_bdf1
set(handles.edit_bdf2,'string',nbr_pixel_corrige_bdf2)
set(handles.edit_bio1,'string',nbr_pixel_corrige_bio1)
set(handles.edit_bio2,'string',nbr_pixel_corrige_bio2)
%Addition des images des deux images de bruit de fond corrigées pour
%obtenir une image de bruit de fond corrigée finale
bdfcorrige=(image_bdf1cor+image_bdf2cor);
%Addition des images des deux images de bioluminescence corrigées pour
%obtenir une image de bioluminescence corrigée finale
biocorrige=(image_bio1cor+image_bio2cor);
%Différence de l'image de bioluminescence par l'image de bruit de fond
image_finale=abs(biocorrige-bdfcorrige);
axes(handles.axes_finale); %selection du quatrième graphe
imagesc(image_finale,[0,2.4*10^3]),colorbar %Visualisation de l'image finale
colormap(gray)
handles.image_finale=image_finale;
guidata(hObject, handles);
function edit_bdf1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_bdf1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_bdf1 as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_bdf1 as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_bdf1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_bdf1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
% See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
function edit_bdf2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_bdf2 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_bdf2 as text
% str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_bdf2 as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_bdf2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to edit_bdf2 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles empty - handles not created until after all CreateFcns called

```

```

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%   See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
function edit_bio1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject   handle to edit_bio1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_bio1 as text
%   str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_bio1 as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_bio1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject   handle to edit_bio1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%   See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
function edit_bio2_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject   handle to edit_bio2 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit_bio2 as text
%   str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit_bio2 as a double
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit_bio2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject   handle to edit_bio2 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%   See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% --- Executes on slider movement.
function slider_imagefinale_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject   handle to slider_imagefinale (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles   structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'Value') returns position of slider
%   get(hObject,'Min') and get(hObject,'Max') to determine range of slider
%
valeur=get(hObject,'Value');
min=get(hObject,'Min');
if valeur==min
    axes(handles.axes_finale);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_finale,[0,2.4*10^3]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.2
    axes(handles.axes_finale);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_finale,[0,6.7*10^3]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.4
    axes(handles.axes_finale);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_finale,[0,1.1*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+0.6
    axes(handles.axes_finale);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_finale,[0,1.5*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)

```

```

end
if valeur==min+0.8
    axes(handles.axes_finale);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_finale,[0,2*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
if valeur==min+1
    axes(handles.axes_finale);%selection du quatrième graphique
    imagesc(handles.image_finale,[0,2.4*10^4]),colorbar %Visualisation de l'image de bioluminescence
    colormap(gray)
end
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function slider_imagefinale_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to slider_imagefinale (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: slider controls usually have a light gray background, change
%   'usewhitebg' to 0 to use default. See ISPC and COMPUTER.
usewhitebg = 1;
if usewhitebg
    set(hObject,'BackgroundColor',[.9 .9 .9]);
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Fonction qui permet de visualiser l'image finale dans une fenêtre
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%seule pour pouvoir par la suite l'analyser avec d'autres logiciels si
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%nécessaire
% --- Executes on button press in pushbutton_chargement_image.
function pushbutton_chargement_image_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pushbutton_chargement_image (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
figure
imagesc(handles.image_finale,[0,2.4*10^3]),colorbar %Affichage de la différence de l'image de bioluminescence par
l'image de bruit de fond
colormap(gray)
title('image finale')
imwrite(handles.image_finale,'image_finale_utilisateur.tif')
function Edit_Fichier_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to Edit_Fichier (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% Hints: get(hObject,'String') returns contents of Edit_Fichier as text
%   str2double(get(hObject,'String')) returns contents of Edit_Fichier as a double
recup=get(hObject,'String')
imwrite(handles.image_finale,char(recup))
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function Edit_Fichier_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to Edit_Fichier (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%   See ISPC and COMPUTER.
if ispc
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
    set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
% --- Executes on button press in edit_infos.
function edit_infos_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit_infos (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
string={'Auteur : Aurélie Sergent', 'Institution : IFIPS Optronique, Orsay (91)', 'David Daydé, IPGA EA3853', 'Sabrina
Pesnel, Service d'imagerie', 'Dr Alain Le Pape, Service d'Imagerie, CDTA-CNRS Orléans','Dr Stéphanie Lerondel,
Service d'Imagerie, CDTA-CNRS Orléans','Christophe Hecquet,Doctorant au laboratoire Charles Fabry de l'institut
d'optique','Dr René Farcy, Enseignant IFIPS optronique',' ','Octobre 2006 - Janvier 2007',' ','Version 9 modifiée le
13-09-07 '};
msgbox(string,'Infos')
% --- Executes on button press in aide.
function aide_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to aide (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

```

string='{ Etapes à suivre pour utiliser ce programme de correction des cosmiques :','1. Dans le menu déroulant cliquer sur "Image de bruit de fond n°1" : Sélectionner la 1ère image de bruit de fond puis cliquer sur Ouvrir','2. Dans le menu déroulant cliquer sur le bouton "Image de bruit de fond n°2" : Sélectionner la 2ème image de bruit de fond puis cliquer sur Ouvrir','3. Dans le menu déroulant cliquer sur le bouton "Image de bioluminescence n°1" : Sélectionner la 1ère image de bioluminescence puis cliquer sur Ouvrir','4. Dans le menu déroulant cliquer sur le bouton "Image de bioluminescence n°2" : Sélectionner la 2ème image de bioluminescence puis cliquer sur Ouvrir','5. Taper le pourcentage d'écart autorisé entre les 2 valeurs de pixels (en général 10%) puis cliquer dans la fenêtre pour valider','6. Cliquer sur le bouton "Valider"','7. Taper le nom de l'image suivi de l'extension .tif dans le cadre prévu à cet effet','8. Cliquer dans la fenêtre pour enregistrer l'image','');
msgbox(string,'Aide')

➔ Annexe N°04 : Macro d'analyse de l'image "Détermination des régions d'intérêt par segmentation de l'image".

```

macro "AutoRun" {
run("Common Toolbar");
print("\n Déplacer cette fenêtre vers le haut à droite de l'écran \n
avant de lancer le programme Imagerie \n Ne pas la fermer !!!");
}
macro "Programme imagerie" {
Dialog.create("Information");
Dialog.addMessage("Cliquer sur 'Cancel' si des images sont déjà
ouvertes, et les fermer. Puis recommencer. \n Sinon cliquer sur
'OK'");
Dialog.show();
print("\n Programme d'imagerie");
do{
Dialog.create("Sélection du programme");
Dialog.addMessage(" Bioluminescence :\n 1 : Soustraction du
bruit de fond \n 2 : Fusion bioluminescence-optique \n 3 :
Quantification automatique \n 4 : Quantification avec binarisation
de l'image \n \n Choisir un programme");
Dialog.addNumber("n° du programme",3);
Dialog.addMessage("Les instructions seront affichées dans la
fenêtre 'Log'");
Dialog.show();
p=Dialog.getNumber();
if (p==1) {
print("\n Soustraction du bruit de fond");
print("Ouvrir l'image de bioluminescence");
run("Open...");
rename("lum");
print("Ouvrir l'image de bruit de fond");
run("Open...");
rename("bdf");
imageCalculator("Subtract create", "lum","bdf");
print("Enregistrer l'image \n Attention au '.tif'");
saveAs("Tiff");
close();
close();
close();
}
else if (p==2) {
print("\n Fusion Bioluminescence-Optique");
print("Ouvrir l'image optique");
run("Open...");
print("Ouvrir l'image de bioluminescence");
run("Open...");
run("Ratio ");
run("Size...", "width=512 height=512 constrain interpolate");
run("Colour merge","keep %=0 title=Ch1");
Dialog.create("Enregistrement");
Dialog.addMessage("Cocher la case si vous voulez enregistrer
l'image obtenue \n (Attention à l'extension .tif)");
Dialog.addCheckbox("Enregistrer ",1);
Dialog.show();
e=Dialog.getCheckbox();
if (e==1){
saveAs("Tiff");
}
close();
close();
close();
}
else if (p==3) {
Dialog.create("Choix du binning");
Dialog.addMessage(" A quel binning travaillez vous? :\n 1 :
binning 8x8 \n 2 : binning 4x4 \n 3 : binning 2x2 \n 4 :
binning 1x1 \n \n Choisissez votre résolution");
Dialog.addNumber("n° du programme",2);
Dialog.addMessage("Le choix du binning permet un paramétrage
automatique des limites de la segmentation");
Dialog.show();
p=Dialog.getNumber();
if (p==1) {
print("\n Quantification d'une image binning 8x8");
print("Ouvrir l'image à quantifier");
}
}
}
}

```

```

run("Open...");
run("8-bit");
setTool(11);
print("\nVous pouvez zoomer en cliquant sur l'image");
run("Brightness/Contrast...");
print("\nCliquez sur 'Auto' jusqu'à ce que l'image soit plus claire");
print("Diminuer un peu la luminosité (Brightness) pour \n avoir des contours
nets");

print("Cliquez sur 'Apply' (10 secondes)");
wait(10000);
run("Close");
run("Maximum Entropy Threshold");
run("Nucleus Counter", "smallest=2 largest=10000000000000000
threshold=Otsu smooth=None add");
setThreshold(1, 255);
print("\nCliquez sur 'Select all' , puis sur 'Delete' \n Cliquez sur 'Add Particles'
(10 secondes)");

wait(10000);
run("Clear Results");
close();
close();
print("Ré-ouvrir l'image");
run("Open...");
run("Properties...", "width=64 height=64 channels=1 depth=1 frames=1 unit=[ ]
pixel_width=1 pixel_height=1 voxel_depth=1.00000 frame=0 origin=0,0");
print("Cliquez sur 'Select All' puis 'Measure'");
print("Le résultat peut être enregistré sous format Excel\n(File > Save as)");
wait(5000);
saveAs("Measurements");
do{
    Dialog.create("Fin du programme");
    Dialog.addMessage("Avez-vous fini ? Tapez 1 pour oui, 2 pour non");
    Dialog.addNumber("Réponse : ",2);
    Dialog.show();
    r=Dialog.getNumber();
    if (r==1) {
        close();
        close();
    }
    else wait(20000);
} while (r==2);
}

else if (p==2) {
print("\n Quantification d'une image binning 4x4");
print("Ouvrir l'image à quantifier");
run("Open...");
run("8-bit");
setTool(11);
print("\nVous pouvez zoomer en cliquant sur l'image");
run("Brightness/Contrast...");
print("\nCliquez sur 'Auto' jusqu'à ce que l'image soit plus claire");
print("Diminuer un peu la luminosité (Brightness) pour \n avoir des contours
nets");

print("Cliquez sur 'Apply' (10 secondes)");
wait(10000);
run("Close");
run("Maximum Entropy Threshold");
run("Nucleus Counter", "smallest=4 largest=10000000000000000
threshold=Otsu smooth=None add");
setThreshold(1, 255);
print("\nCliquez sur 'Select all' , puis sur 'Delete' \n Cliquez sur 'Add Particles'
(10 secondes)");

wait(10000);
run("Clear Results");
close();
close();
print("Ré-ouvrir l'image");
run("Open...");
run("Properties...", "width=128 height=128 channels=1 depth=1 frames=1
unit=1 pixel_width=1 pixel_height=1 voxel_depth=1.00000 frame=0 origin=0,0");
print("Cliquez sur 'Select All' puis 'Measure'");
print("Le résultat peut être enregistré sous format Excel\n(File > Save as)");
wait(5000);
saveAs("Measurements");

```

CURRICULUM VITAE

David DAYDE
 82 Chemin de la Métairie Neuve
 81100 CASTRES
 ✉ : david.dayde@laposte.net
 ☎ : +33 (0)6 64 42 87 80

28 ans (22-04-1980)

« INGENIEUR DOCTORANT »

FORMATION :

- 2004-2008** **Doctorat en Sciences de la Vie**
- Spécialité : Immunologie, cancérologie.
 - Allocation de recherche région Centre.
 - Bourse Société Française d'Hématologie.
 - Université François Rabelais, Tours.
- 2000-2003** **Ingénieur INP – ENSAT (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse)**
- Formation d'ingénieur généraliste.
 - Spécialisation de 3^{ème} année en Biotechnologies.
 - Validation du DEA : Biologie, santé et biotechnologies.
- 1998-2000** **Classe préparatoire aux Grandes Ecoles (Technologie – Biologie)**
- Admis au concours national vétérinaire.
 - Admis au concours agro ENITA – ENSA – INA.

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE :

- Oct. 2004 - Sept. 2008** **Projet de thèse : Analyse de l'influence du volume tumoral sur la réponse au traitement par un anticorps monoclonal, le rituximab par bioluminescence quantitative dans un modèle murin syngénique de lymphome exprimant le CD20 humain.**
 EA3853 IPGA "Immuno Pharmaco Génétique des Anticorps → " GICC "Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer" UMR 6239, Tours.
- Nov. 2002 - Sept. 2003** **Ingénieur d'études en biotechnologies stagiaire pour les Laboratoires Pierre Fabre "Caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques du cancer colorectal (CCR) à l'aide d'une approche protéomique."**
 CIPF Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint Julien en Genevois.
- Avr. 2002 - Aoû. 2002** **Ingénieur d'études stagiaire pour la Chambre d'Agriculture du Morbihan "Conception d'un outil multimédia de formation à distance pour divers publics".** CAM, Vannes.
- 2002** **Conduite d'un projet de saisie informatique** pour la société SEDE Environnement, Toulouse.
- 2000-2002** **Poste de moniteur étudiant** pour l'INP.
- 2001** **Chef de projet d'études** pour le BIP.
- 2000** **Stage au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques humaines** des Docteurs Decorsière et Fauré.

.../...

1999 **Stage au laboratoire d'analyses biologiques médicales** des docteurs Plumerault, Ferrer et Carnot.

QUALITES ET COMPETENCES :

Qualités humaines	Rigueur et intégrité, esprit d'équipe, sens de l'initiative, diplomatie, autonomie.
Immunologie cellulaire moléculaire	Culture et transfection de cellules lymphomateuses, isolement de cellules mononuclées et polynucléaires du sang (Ficoll), colorations (histologiques, cytologiques, vitales), immunosélection (positive/négative Dynabeads), ELISA.
Imagerie cellulaire, tissulaire et animale	Imagerie de bioluminescence (in vitro/in vivo) imagerie de fluorescence (filtres, IVIS), imagerie à résonance magnétique, scintigraphie, autoradiographie, microscopie confocale, cytométrie en flux, immunohistochimie.
Biologie moléculaire	Extractions d'ADN et d'ARN, PCR, RT-PCR, clonage moléculaire, génotypage, Western-Blot, Southern-Blot.
Modèles murins	Tumeur diffuse, tumeur sous cutanée, prélèvements.
Bioinformatique	Bases de données et outils divers (HapMap, Ensembl, IMGT, PDB, EXPASY, Webcutter, esp@cenet, Endnote), statistiques (SigmaPlot 9.0, SigmaStat 3.1), analyses de séquences (Blast, Fasta, Genetix, Haploview, Clustal, BoxShade), visualisation moléculaire (VMD, RasMol, Cn3D).
Informatique	Pack Office, pratique de la veille scientifique, de la recherche bioinformatique, bibliographique et technologique sur internet, notions de Visual basic, Director, Java, programmation http, macros d'exécutions.
Langues	Anglais scientifique (lu, écrit, parlé), Espagnol (lu).

TRAVAUX SCIENTIFIQUES ET PRESENTATIONS :

En cours de publication	Bridot JL, Daydé D , Rivière C, Billotey C, Lerondel S, Sabattier R, Cartron G, Lepape A, Blondiaux G, Janier M, Perriat P, Roux S, Tillement O, <i>Hybrid gadolinium oxide nanoparticles combining imaging and therapy.</i>
En cours de publication	Daydé D , Dommange F, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Golay J, Lepape A, Paintaud G, Bardos P, Watier H, Cartron G, <i>Bioluminescent method appropriate for bimodal imaging investigation on a syngenic murine model of B-cell lymphoma expressing human CD20.</i>
En cours de publication	Daydé D , Ternant D, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Watier H, Lepape A, Bardos P, Paintaud G, , Cartron G, <i>Tumor burden influences individual exposure and response to rituximab: pharmacokinetic – pharmacodynamic approach using a syngenic bioluminescent murine model expressing human CD20.</i>

.../...

- Jan. 2007** Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, **Daydé D**, Berthou C, Cartron G, Watier H. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Apr;62(1):34-42.
- Jui. 2006** **Daydé D**, Dommange F, Ohresser M, Lerondel S, Lepape A, Bardos P, Watier H, Cartron G, *Immunothérapie par anticorps monoclonaux : mise en place et optimisation d'un modèle syngénique murin de lymphome humain en bioluminescence*. GDR CNRS 2352, Saint Julien en Genevois (communication orale)
- Déc. 2007** **Daydé D**, Dommange F, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Golay J, Lepape A, Paintaud G, Bardos P, Watier H, Cartron G, *Quantitative Bioluminescent Method Appropriate for Bimodality Analysis to Improve and Follow a Syngenic Murine Model of B-cell Lymphoma Expressing CD20*. ASH 49th meeting, Atlanta (abstract, poster)
- Déc. 2007** **Daydé D**, Ternant D, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Watier H, Lepape A, Bardos P, Paintaud G, , Cartron G, *Tumor burden influences individual exposure and response to rituximab: pharmacokinetic – pharmacodynamic approach using a syngenic bioluminescent murine model expressing human CD20*. ASH 49th meeting, Atlanta (abstract, poster)
- Mar. 2008** **Daydé D**, Dommange F, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Golay J, Lepape A, Paintaud G, Bardos P, Watier H, Cartron G, *Mise au point d'un modèle murin de lymphome B, exprimant le CD20 humain et la luciférase, permettant un suivi quantitatif de la mesure du volume tumoral*. Congrès de la SFH 2008, Paris (abstract, poster).
- Mar. 2008** **Daydé D**, Ternant D, Ohresser M, Lerondel S, Pesnel S, Watier H, Lepape A, Bardos P, Paintaud G, , Cartron G, *Influence du volume tumoral sur l'exposition et la réponse au rituximab : approche pharmacocinétique pharmacodynamique utilisant un modèle murin syngénique bioluminescent de lymphome*. Congrès de la SFH 2008, Paris (communication orale).

LOISIRS ET PASSIONS :

- Animateur de soirées.
- Arrangement de musiques.
- Réalisation de maquettes de virus.
- Réalisation de BD éducatives de biologie.
- Lecture, modérateur forums internet.
- VTT, Course à pied, Cross, Natation, Golf.
- Sports de combat, Rugby...

VIE ASSOCIATIVE :

- 2001-2003** Organisateur du rallye ENSAT.

- 1998-2002** Responsable du club informatique de Ponsan Bellevue (Toulouse).
- 2000-2001** Trésorier de l'ASS.E.R.P. (association d'étudiants).
- 2000-2003** Secrétaire / Président de l'A.P.S. (junior entreprise).
- 2001-2005** Président de l'A.J.E.M. (association d'étudiants).
- 2007-2008** Organisateur de la randonnée de Bacchus.

Analyse de l'influence du volume tumoral sur la réponse au traitement par un anticorps monoclonal, le rituximab par bioluminescence quantitative dans un modèle murin syngénique de lymphome exprimant le CD20 humain.

L'objectif général du travail de thèse a donc été d'analyser le rôle respectif du volume tumoral et des paramètres pharmacocinétiques dans la réponse au rituximab en utilisant des moyens d'imagerie adaptés aux modèles murins et à la cancérologie.

Dans une première partie nous avons utilisé une lignée lymphomateuse T (E14) syngénique de souris C57Bl6J, transduite par le CD20 humain et transfectée avec le gène de la luciférase.

Dans une seconde partie une seule injection de rituximab a été réalisée et la concentration a été évaluée par une méthode ELISA. L'analyse des concentrations au cours du temps nous a permis de montrer une très grande variabilité d'exposition au rituximab semblable à l'observation faite chez l'homme. Nous avons pu modéliser les concentrations de rituximab et la progression des foyers tumoraux par la construction d'un modèle concentration/effet nous permettant de démontrer l'existence d'une relation entre l'efficacité du rituximab et le volume tumoral.

Enfin dans un troisième volet nous avons utilisé le modèle cellulaire afin d'évaluer in vitro l'usage de particules d'oxydes de gadolinium ou de bore.

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé.

Mots-clés : rituximab, CD20, bioluminescence quantitative, modèle murin, variabilité thérapeutique, lymphome non hodgkinien, volume tumoral, nano-particules d'oxydes hybrides.

Laboratoire : Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer (GICC), UMR CNRS 6239, Equipe 7 Pharmacologie des anticorps thérapeutiques et investigations cliniques, UFR Médecine, Bâtiment Vialle, BP3223, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex.

Tumor burden influence on individual response to treatment with a monoclonal antibody: the rituximab, by quantitative bioluminescence imaging in a syngenic murine model of lymphoma expressing human CD20.

The overall objective of this work of thesis was to analyze the respective role of tumor burden and pharmacokinetic parameters in the response to the rituximab by using systems of imagery adapted to murine models and to cancerology.

In a first part of development of the model we used a T lymphoma cell line (E14) syngenic of mouse C57Bl6J, transduced by the human CD20 and transfected with luciferase gene.

In a second part, one injection of rituximab was carried out and the circulating concentration was evaluated by an ELISA method. The analysis of the rituximab concentrations in the course of time enabled us to show a very important variability of exposure to the rituximab similar to the observation made for the human. We realized a model of the rituximab concentrations and of the tumors evolution by the construction of a concentration/effect model allowing us to show the existence of a relation between the effectiveness of the rituximab and tumor burden before treatment.

Finally in a third part we used the cellular model E14-huCD20-Luc in order to evaluate in vitro the use of gadolinium oxide particles or boron and gadolinium oxide particles.

Discipline: Health and life sciences.

Keywords: rituximab, CD20, quantitative bioluminescence, murine model, therapeutic variability, non hodgkin's lymphoma, tumor burden, gadolinium oxide particles.

Laboratory: Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer (GICC), UMR CNRS 6239, Team 7 : Pharmacology of antibodies, clinical and therapeutic investigations directory, UFR Médecine, Bâtiment Vialle, BP3223, 10 boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex, France