Comparaison de radiotraceurs marqués au gallium-68 et au fluor-18 pour l'imagerie TEP de modèles précliniques de neuroblastome, de glioblastome ou de cancer bronchopulmonaire.

Claire Provost

▶ **To cite this version:**

Claire Provost. Comparaison de radiotraceurs marqués au gallium-68 et au fluor-18 pour l'imagerie TEP de modèles précliniques de neuroblastome, de glioblastome ou de cancer bronchopulmonaire.. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS052 . tel-02068454

HAL Id: tel-02068454

https://theses.hal.science/tel-02068454

Submitted on 15 Mar 2019

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.

NNT : 2018SACLS052

Comparaison de radiotraceurs marqués au gallium-68 et au fluor-18 pour l'imagerie TEP de modèles précliniques de neuroblastome, de glioblastome ou de cancer bronchopulmonaire

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée au Laboratoire Imagerie Moléculaire Positonique (LIMP)

École doctorale n°582 : cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 14 mars 2018, par

Claire Provost

Composition du Jury :

M. Bertrand Tavitian, Pr. à l'université Paris Descartes UMR-S970	**Rapporteur**
M. Samuel Valable, Pr. au CNRS ITSTC UMR 6301/équipe CERVOxy	**Rapporteur**
Mme Sona Balogova, Pr. associée à l'AP-HP & à l'université Comenius	**Examinatrice**
M. Benjamin Guillet, Pr. à l'AP-HM & UMR-S1076	**Examinateur**
M. Martin Schlumberger, Pr. à l'Institut Gustave Roussy & à l'université Paris Saclay	**Président**
M. Jean-Noël Talbot, Pr. à l'AP-HP & à l'université P&M Curie	**Directeur de thèse**
M. Cédric Bouteiller, Dr. Chez PETNET Solutions SAS, Encadrant industriel	**Invité**

Thèse de doctorat

Titre: Comparaison de radiotraceurs marqués au gallium-68 et au fluor-18 pour l'imagerie TEP de modèles précliniques de neuroblastome, de glioblastome ou de cancer bronchopulmonaire.

Mots clés : ^{18}F, ^{68}Ga, TEP, édotréotide, peptides RGD, oncologie

Résumé : La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une modalité d'imagerie médicale en pleine expansion depuis une quinzaine d'années. En oncologie, la TEP au ^{18}F-fluorodésoxyglucose (FDG) est devenue un outil essentiel pour la prise en charge des patients souffrant de cancer. Cependant il ne permet pas la détection et le suivi de tous les cancers, de nombreux radiotraceurs sont donc développés, plus ciblés et plus spécifiques que les analogues des substrats métaboliques. Durant ce travail de doctorat, la première étude TEP a été réalisée avec du ^{68}Ga-DOTATOC dans un modèle préclinique de neuroblastome (NB) humain. Cette tumeur, qui présente des analogies avec les tumeurs neuroendocrines, exprime fréquemment des récepteurs de type 2 de la somatostatine (SSTR2). Nous avons comparé, le FDG au ^{68}Ga-DOTATOC dans 3 modèles murins de différents NB humains, exprimant les SSTR2 avec une densité différente. La deuxième étude a comparé et évalué le FDG et un ^{68}Ga-RGD, ligand des intégrines, sur des modèles murins de glioblastome (GB) humain surexpriment l'intégrine αvβ3. L'évaluation s'est faite dans le suivi de 4 groupes d'animaux traités ou non avec un anti-angiogénique et/ou une chimiothérapie. La troisième étude a comparé et évalué le ^{68}Ga-RGD et le ^{18}F-RGD-K5 dans un modèle murin, associant GB humain et carcinome pulmonaire humain, lors du suivi d'un traitement anti-angiogénique. Le ^{68}Ga-DOTATOC et le FDG ont tous deux permis de visualiser les 3 différents modèles de NB. La fixation du FDG s'est avérée corrélée à celle du ^{68}Ga-DOTATOC et, *ex vivo,* à l'expression des SSTR2 et du Ki-67. Le ^{68}Ga-RGD, contrairement au FDG, a permis de discriminer les groupes répondeurs après 6 jours de traitement. Bien que les résultats soient concordants entre le ^{68}Ga-RGD et le ^{18}F-RGD-K5, celui-ci a permis une meilleure visualisation et un meilleur suivi sous traitement des GB.

Title: Comparison of gallium-68 and fluor-18 labelled radiotracers for PET imaging of preclinical models of neuroblastoma, glioblastoma or bronchopulmonary cancer.

Keywords : ^{18}F, ^{68}Ga, PET, edotreotide, RGD peptides, oncology

Abstract: Positron Emission Tomography (PET), a modality of functional medical imaging, has been developing for about 15 years. In oncology, ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) PET has become a main tool for cancer diagnosis. However, FDG cannot detect and monitor all types of cancer. Thus research is continuing, exploring new applications for other documented tracers and developing more specific and targeted tracers than analogues of metabolic substrates. The first study of this doctorate was done with ^{68}Ga-DOTATOC PET in preclinical model of neuroblastoma (NB), which share some biologic properties with neuroendocrine tumours, frequently expressing somatostatin receptors subtype 2 (SSTR2). Our aim was to compare FDG and ^{68}Ga-DOTATOC PET in 3 different mouse models of human NB that express SSTR2 at different levels. The second study compared FDG and ^{68}Ga-RGD, a ligand of integrins, in a mouse model of human glioblastoma (GB) that overexpresses αvβ3 integrin. Both tracers have been evaluated in monitoring 4 groups of animals untreated or treated with an anti-angiogenic agent and/or chemotherapy. The third study compared the ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD in a mouse model bearing human GB and pulmonary carcinoma, which has a low expression of αvβ3 integrin. The potential of those tracers for monitoring an anti-angiogenic treatment was subsequently studied. Both ^{68}Ga-DOTATOC and FDG allowed visualizing the different models of NB. There was a correlation between tumour uptake of FDG and of ^{68}Ga-DOTATOC and, *ex vivo,* with SSTR2 and Ki-67. ^{68}Ga-RGD, unlike FDG, discriminated responders after 6 days of treatment. Results with ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD were concordant, but ^{18}F-RGD-K5 was more efficient than ^{68}Ga-RGD for visualization and treatment monitoring GB.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

Remerciements

En premier lieu, je souhaite exprimer toute ma gratitude aux membres du jury, pour leur bienveillance, leur aptitude à faire partager leurs connaissances et pour s'être rendus disponibles afin de juger ce travail.

Pr. Martin Schlumberger
Pr. Bertrand Tavitian
Pr. Samuel Valable
Dr. Sona Balogova
Pr. Benjamin Guillet

Un grand merci au **Pr. Talbot**, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour. Il y a déjà sept ans, vous m'avez appelée pour un entretien d'apprentissage pour ma licence. Je vous remercie du fond du cœur pour m'avoir permis de grandir dans le domaine de la préclinique, de vous être battu pour me garder si longtemps et de m'avoir écoutée et considérée.

Merci à **Cédric Bouteiller** d'avoir dit oui pour cette thèse CIFRe. Tu m'as permis de voir l'aspect entreprise, formée aux techniques de production et surtout aux pinces… que d'aventures !

Merci à **Aurélie Prignon**, (moment difficile dans l'écriture de cette thèse…) comment avec quelques lignes te remercier pour ce temps partagé ?! Je suis heureuse d'avoir poussé la porte du LIMP, même si ce n'était pas le cas pour toi au départ… Quelle équipe de choc nous avons faite ! J'ai adoré cette expérience, je prends tout et ne jette rien de ces heures de culture cellulaire, d'injections, de marquage, d'analyses d'images, de papotage, de confrontation d'idées et de déplacements dans des congrès. Merci de m'avoir formée à tout ce qui était possible sur cette plateforme et de m'avoir poussée à voir toujours plus loin.

Merci aux personnes du bâtiment recherche de l'hôpital Tenon, de leur aide au quotidien. A toi ma **Brigitte** pour les cafés remotivants et les midis dynamisés et dynamisants. A toi **Louis** pour le partage des connaissances, la multidisciplinarité c'est l'avenir! A vous, **Pr Lacave** et votre équipe, **Virginie** et **Sylvain** pour vos sourires et votre bonne humeur.

Merci à toutes les personnes de chez PETNET Solutions, à ceux qui sont partis et à ceux qui restent. Surtout à vous deux, **Quentin** et **Benoit**, parce qu'il n'y a de travail vraiment efficace qu'avec de bons moments partagés.

Merci à mes proches, famille et amis, qui m'ont soutenue dans ce projet que mon « moi passé » n'aurait pu imaginer.

A toi **Lilou** pour m'avoir toujours regardée avec les yeux d'une grande sœur fière, me donnant plus de force pour faire mieux.
A vous mes parents, **Luc et Christine** pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci maman d'avoir poussé la porte de Necker, me laissant entrevoir le monde de la recherche dans lequel je m'épanouis à présent.
A mes compagnons de vie, toujours présents, m'aidant chacun à leur manière, **Céci**, **Julie**, **Lulu**, **Roussette**, **Sophie**, **Bobby**, **Champo**, **Flo**, **Manu**, **Oli'**.

Je ne pouvais terminer que par celui qui partage ma vie, merci à toi **Florian** pour ton soutien lors de mes très nombreuses remises en questions, merci pour avoir donné de la valeur à mon travail.

Table des matières

Glossaire 6
Tables des illustrations 8
Avant-propos 10
Contexte 13
1. Le cancer, un problème de santé publique 13
1.1. Bref rappel historique 13
1.2. Définition 13
1.3. L'impact des cancers 14
1.4. Méthode de diagnostic et de suivi 15
2. La médecine nucléaire 16
2.1 Définition 16
2.2 Bref rappel historique 17
3. L'imagerie TEP 18
3.1. Principe et fonctionnement 19
3.2. Les radiotraceurs TEP (AMM) 20
3.3. Le développement de radiotraceurs pour la TEP 23
3.3.1. Les Radionucleides 23
3.3.2. Les molécules d'intérêt 26
3.3.3. Fluor-18 et gallium-68 27
Le fluor-18 28
Le gallium-68 28
Générateur : 28
Comparaison du ^{18}F et ^{68}Ga 30
4. Ciblage moleculaire 33
4.1. Les récepteurs de type 2 de la somatostatine 34
4.1.1. Généralités 34
4.1.2. Pourquoi les cibler ? 35
4.1.3. Les radiotraceurs développés et leurs applications 35
4.1.4. Les radiotraceurs pour la radiothérapie 36
4.2. Evaluation de la néoangiogenèse via l'intégrine αvβ3 37
4.2.1.Généralités 37
4.2.2. Pourquoi les cibler ? 37

4.2.3. Les radiotraceur développés et leurs applications: 39
4.2.4. RGD et traitement anti-angiogénique 45
Objectifs du travail de doctorat 49
1. Objectifs généraux 49
2. Méthodologie générale 51
2.1 Radiomarquage au gallium-68 51
2.2 Radiomarquage au fluor-18 54
2.3 Contrôles de qualité des marquages 58
2.4 Modèle animaux : 58
Résultats 60
Partie 1 : Comparaison du ^{68}Ga-DOTATOC et du FDG dans des modèles de neuroblastome. 60
Introduction 61
1er article 63
Discussion et perspectives partie 1 72
Partie 2 : Utilisation de traceurs RGD en TEP 76
Etude 1: Comparer le ^{68}Ga-NODAGA-c(RGDfK) au FDG dans le glioblastome 77
Introduction 77
2ème article 79
Etude 2 : Comparaison et évaluation d'un ^{68}Ga-RGD et du ^{18}F- RGD-K5 pour le suivi d'un traitement par bévacizumab 103
Introduction 103
3ème article 105
Discussion et perspectives Partie 2 119
Conclusion 126
Références 128

Glossaire

Les produits

DOTATOC ou édotréotide : 4,7,10-Tricarboxyméthyl-1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1-yl-acétyl-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-L-thréoninol (DOTA-D-Phe^{1}-Tyr^{3}-octréotide)

c(RGDfK) : acide 2-[(2S,5R,8S,11S)-8-(4-aminobutyl)-5-benzyl-11-[3 (diaminométhylidène-amino) propyl]-3,6,9,12,15-pentaoxo-1,4,7,10,13-pentazacyclopentadéc-2-yl] acétique

DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique

BVZ : Bévacizumab (Avastin ®

TMZ : Témozolomide (Temodal ®)

EtOH: Ethanol

FDG : [^{18}F]-fluoro-2-désoxy-D-glucose

HCl: Acide chlorhydrique

NaCl: Chlorure de sodium

NODAGA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-N-glutamique -N',N"-diacétique

RGD-K5 : acide 2-((2S,5R,8S,11S)-5-benzyl-8-(4-((2S,3R,4R,5R,6S)-6-((2-(4-(3-[^{18}F] fluoropropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acétamido)méthyl)-3,4,5-trihydroxytétrahydro-2H-pyran-2-carboxamido)butyl)-11-(3-guanidinopropyl)-3,6,9,12,15-pentaoxo-1,4,7,10,13 pentaazacyclopentadécan-2-yl)acétique

TFA : Acide trifluoroacétique

Les techniques

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography - Chromatographie Liquide Haute Pression

IHC: Immunohistochimie

IRM : Imagerie par résonnance magnétique

TDM : Tomodensitométrie

TEMP - SPECT : Tomographie par emission monophotonique – single photon emission computed tomography

TEP : Tomographie par emission de positons

Divers

α : Alpha

β^- : Électron

β^+ : Positon

γ : Gamma

%ID/g : Pourcentage de dose injectée par gramme d'organe

^{68}Ga : Gallium-68

^{18}F : Fluor-18

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication Françaises

CE : Capture Electronique

GBq, MBq : Giga-Becquerel, Mega-Becquerel

GB(M) : Glioblastome (multiforme)

GFR : Growth Factor Receptor - récepteur du facteur de croissance

GMP : Good manufcturing practice / Bonne pratique de fabrication (BPF)

HER : Human Epithelial Receptor - récepteur epithelial humain

IC50: Concentration inhibitrice à 50%

keV : kilo électronvolt

Ki-67 : Indice de prolifération

MIP : Maximum intensity projection

MVD : Microvessel density - densité des microvaisseaux

NSCLC: Non-small cell lung cancer - cancer du poumon non à petites cellules

NB: Neuroblastome

ROI : Region of interest – région d'intérêt

TNE: Tumeur neuroendocrine

p.i.: Post-Injection

SSTR(2): Somatostatine receptor (subtype 2)- récepteur de la somatostatine (de type 2)

SUV (max) : Standardized Uptake Value (maximum) - Valeur normalisée de fixation

$T^{1/2}$: Demi-vie physique

TSH : Thyroid-Stimulating Hormone - thyrostimuline

VEGF(r) : Vascular Endothelial Growth Factor (receptor) - (récepteur du) facteur de croissance endothélial

RCC : Renal Cell Carcinoma - carcinome à cellules rénales

RT : Retention time - temps de rétention

SCCHN : Squamous Cell Carcinoma Head and Neck - carcinome épidermoïde de la tête et du cou

Tables des illustrations

Figures

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses. 14
Figure 2: Principe et fonctionnement de la TEP. 19
Figure 3: Publications dans le domaine de l'imagerie TEP en cancérologie. 20
Figure 4 : Schéma de radiotraceurs et multimérisation de molécules d'intérêt. 27
Figure 5: Générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$ GalliaPharm® 30
Figure 6 : Simulation par méthode de Monte Carlo du parcours d'un positon issu de la décroissance du gallium-68 et du fluor-18. 32
Figure 7 : Processus de l'angiogenèse tumorale 38
Figure 8 : Zoom sur le processus et certains acteurs de la néoangiogenèse tumorale 39
Figure 9 : Représentation chimique de molécules RGD pour l'imagerie TEP 40
Figure 10: Structure chimique des radiotraceurs RGD disponibles pour l'imagerie TEP en clinique. Encadré en bleu les RGD marqués au gallium-68 41
Figure 11 : Types de vascularisation dans une tumeur selon les facteurs angiogéniques. 47
Figure 12 : Aperçu des agents anti-angiogéniques et leurs voies d'action pour la thérapie en cancérologie. 48
Figure 13: Module automatisé 2 réacteurs, SYNCROM Gallium, R&D, de Raytest. 51
Figure 14: ^{68}Ga-DOTA-[Tyr3]-octréotide ou ^{68}Ga-édotréotide 52
Figure 15: Chromatogramme HPLC du ^{68}Ga-DOTATOC 52
Figure 16: Profil d'une élution réalisée par méthode de fractionnement 53
Figure 17 : ^{68}Ga-NODAGA-RGDfK (^{68}Ga-RGD) 54
Figure 18: Chromatogramme HPLC du ^{68}Ga-RGD 54
Figure 19: Schéma des modules Explora et Explora I 55
Figure 20 : Schéma de la cassette de marquage 56
Figure 21 : Schéma de radio-marquage du ^{18}F-RGD-K5 57
Figure 22 : Chromatogramme HPLC du ^{18}F-RGD-K5 après purification 57
Figure 23 : Coupes de tumeurs de patients marquées avec un anticorps anti SSTR2 73
Figure 24 : Mode d'actions du bévacizumab et du témozolomide 78
Figure 25 : Biodistribution en imagerie TEP chez une souris saine. 103

Figure 26 : Imagerie TEP d'un model murin de GB humain avec le FDG, le ^{18}F-RGD-K5 et le ^{68}Ga-RGD. Résultats semi-quantitatifs : SUV max de la fixation des traceurs dans la tumeur de GB issus de la lignée cellulaire U87MG. 104

Tableaux

Tableau 1: Industriels et radiotraceurs pour l'imagerie TEP en Ile de France 23
Tableau 2: Radionucléides candidats pour le radiomarquage d'un radiotraceur TEP 25
Tableau 3: Caractéristiques physiques du ^{68}Ga et du ^{18}F. 31
Tableau 4 : Analogues de la somatostatine marqués au gallium-68 utilisés en clinique 35
Tableau 5: Les différents RGD développés comme agents TEP pour la visualisation des intégrines αvβ3 en cancérologie. 42
Tableau 6 : Contrôles des produits radiomarqués 58

Avant-propos

C'est en décembre 2014 qu'a débuté mon travail de thèse par Convention Industrielle de Formation à la Recherche (CIFRe), grâce à l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), qui articule et subventionne une collaboration de recherche entre une entreprise et un laboratoire public. Le travail doctoral a été réalisé au sein du Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positonique (LIMP) spécialisé dans le radiomarquage, le développement et l'étude préclinique d'agents d'Imagerie de Tomographie par Emission de Positons (TEP). Avant de débuter ce travail doctoral, j'avais eu la chance d'y travailler pendant 4 ans et ainsi de me rapprocher d'industriels du domaine, acteurs importants dans l'imagerie clinique, pour proposer aux deux partenaires un sujet de recherche. C'est l'industriel PETNET Solutions, producteur de radiotraceurs, soucieux d'apporter son savoir faire dans la recherche et le développement de nouveaux agents diagnostiques, qui m'a permis d'associer à mon expérience récente du secteur public, celle du secteur privé. J'ai vécu ces trois années comme une expérience formatrice et enrichissante ; je me suis confrontée aux langages et logiques de différentes disciplines. Il me semble très important d'associer les visions de chacun pour mieux comprendre l'ensemble d'une problématique. J'ai eu la chance de travailler avec les médecins du service de médecine nucléaire de l'hôpital Tenon et ainsi de voir l'application concrète de nos recherches. J'ai travaillé également avec des chimistes et des physiciens de différents horizons, rencontrés chez PETNET Solutions ou au cours des congrès.

Ces objectifs sont étroitement liés à la spécificité du laboratoire LIMP où j'ai effectué mon travail de thèse du fait de sa transversalité avec le service de médecine nucléaire. En clinique, la détection et la stadification d'un cancer doivent se faire le plus précocement possible, afin de prendre en charge le patient dans les meilleures conditions et de lui proposer une prise en charge personnalisée et adéquate. Pour ce travail doctoral consacré à l'imagerie TEP préclinique, nous avons évalué de nouvelles applications pour des radiotraceurs déjà existants, ainsi que le développement de nouveaux radiotraceurs plus ciblés et plus spécifiques.

SIEMENS PETNET Solutions

anrt association nationale recherche technologie

Publications

Présentées dans cette thèse :

Acceptée

^{68}Ga-DOTATOC and FDG PET Imaging of Preclinical Neuroblastoma Models.

Provost C, Prignon A, Cazes A, Combaret V, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Montravers F, Talbot JN. Anticancer Res. 2016 Sep;36(9):4459-66.

Soumises

[^{68}Ga]RGD versus [^{18}F]FDG PET imaging in monitoring treatment response of a mouse model of human glioblastoma tumour with bevacizumab and/or temozolomide.

Provost C, Rozenblum L, Nataf V, Merabtene F, Prignon A, Talbot JN. (En révision dans le journal Molecular Imaging and Biology)

Comparison and evaluation of two RGD peptides labelled with ^{68}Ga or ^{18}F for PET imaging of angiogenesis in animal models of human glioblastoma or lung carcinoma.

Provost C, Prignon A, Rozenblum-Beddok L, Bruyer Q, Dumont S, Merabtene F, Nataf V, Bouteiller C, Talbot JN. (En révision dans le journal Oncotarget)

Réalisées dans la période de doctorat :

Functional Human Beige Adipocytes From Induced Pluripotent Stem Cells.

Guénantin AC, Briand N, Capel E, Dumont F, Morichon R, **Provost C**, Stillitano F, Jeziorowska D, Siffroi JP, Hajjar RJ, Fève B, Hulot JS, Collas P, Capeau J, Vigouroux C. Diabetes. 2017 Jun;66(6):1470-1478.

Liposomes for PET and MR Imaging and for Dual Targeting (Magnetic Field/Glucose Moiety): Synthesis, Properties, and in Vivo Studies.

Malinge J, Géraudie B, Savel P, Nataf V, Prignon A, **Provost C**, Zhang Y, Ou P, Kerrou K, Talbot JN, Siaugue JM, Sollogoub M, Ménager C. Mol Pharm. 2017 Feb 6;14(2):406-414

Apoptosis induction by combination of drugs or a conjugated molecule associating non-steroidal anti-inflammatory and nitric oxide donor effects in medullary thyroid cancer models: implication of the tumor suppressor p73.

Ragot T, **Provost C**, Prignon A, Cohen R, Lepoivre M, Lausson S. Thyroid Res. 2015 Aug 14;8:13.

^{68}Ga-AMBA and ^{18}F-FDG for preclinical PET imaging of breast cancer: effect of tamoxifen treatment on tracer uptake by tumor.

Prignon A, Nataf V, **Provost C**, Cagnolini A, Montravers F, Gruaz-Guyon A, Lantry LE, Talbot JN, Nunn AD. Nucl Med Biol. 2015 Feb;42(2):92-8.

Communications

Affichées

Comparison between ^{18}F-RGD and ^{68}Ga-RGD for PET imaging of angiogenesis in mouse models.

Provost C, Prignon A, Bouteiller C, Talbot JN.
Word Molecular Imaging Congress (WMIC), 2016, New York, USA.

Comparison of ^{18}F-RGD and ^{68}Ga-RGD for PET imaging of angiogenesis in mouse models bearing human glioblastoma.

Provost C, Prignon A, Bouteiller C, J Walsh, Talbot JN.
European Molecular Imaging Meeting (EMIM), 2016, Utrecht, NL.

PET imaging of G-protein coupled receptors using gallium-68 radiolabelled peptides

Prignon A, **Provost C**, Nataf V, Gruaz Guyon A, Talbot JN.
1er Congrès National d'Imagerie du Vivant, Paris, CNIV 2016, Paris, 10-12 février 2016

Orales

La TEP dans des modèles précliniques avec des traceurs marqués au gallium-68, en comparaison à des traceurs marqués au fluor-18.

Rencontre scientifique Cifre, ANRT 41 Bd des Capucines 75002 Paris, 7 novembre 2017

Contexte

1. LE CANCER, UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE

1.1. Bref rappel historique

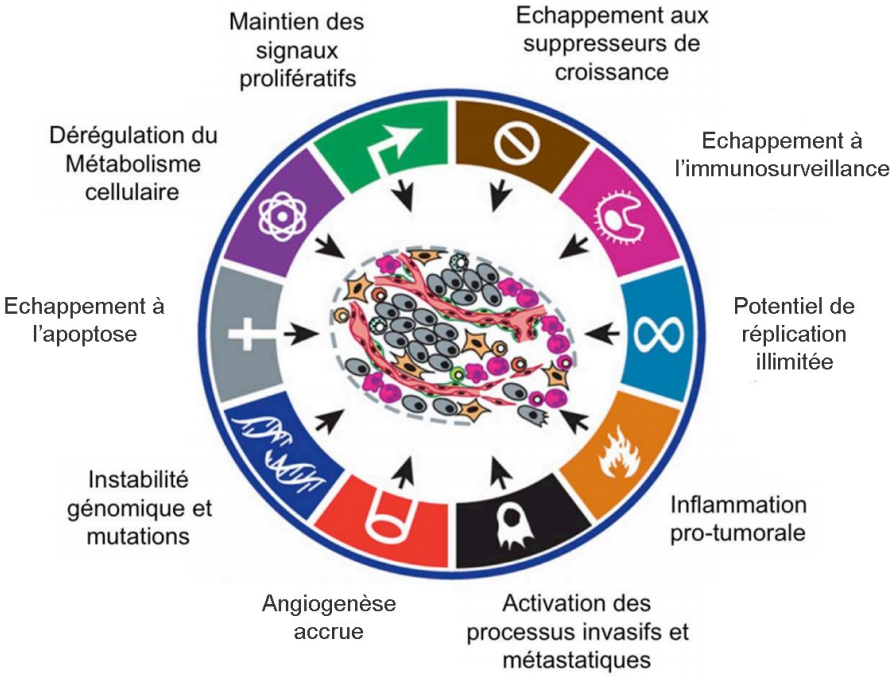
Les cellules cancéreuses ont probablement toujours existé ; les traces les plus anciennes de cancer se trouvent dans des fragments de squelettes humains datant de la préhistoire. Le plus ancien texte connu à ce jour décrivant un cancer semble être le papyrus chirurgical dit d'Edwin Smith (2800 avant J-C). Nous devons probablement le mot cancer à Hippocrate (460-370 av. J.-C.) qui en comparant les tumeurs cancéreuses à un crabe, leur a donné pour la première fois les noms grecs de « karkinos » et « karkinoma ». La comparaison est justifiée par l'aspect de la propagation de certaines tumeurs, dont les prolongements rappellent les pattes de l'animal. Galien (131-201 après J-C) l'a également utilisé dans son traité des tumeurs qui décrit avec beaucoup de précision le cancer du sein. Au Moyen-âge, en France, Henri de Mondeville écrivait en 1320 : « aucun cancer ne guérit, à moins d'être radicalement extirpé tout entier. En effet, si peu qu'il en reste, la malignité augmente dans la racine. ». Henri ne se trompait pas, la chirurgie reste de nos jours la plus efficace des solutions contre les cancers. Par la suite, les médecins Bichat et Laennec introduisirent la conception anatomique de la « maladie cancéreuse » et l'allemand Muller la notion de tissu cancéreux.

Les cellules cancéreuses ont ensuite été largement étudiées, mais la difficulté se trouve dans la complexité et la connexion des mécanismes qu'elles utilisent. L'étude de la biologie des cancers a, sans aucun doute, permis de préciser les voies de signalisations des cellules entre elles ; les cancers montrent le lien étroit entre les différents systèmes de notre organisme. Pour être le mieux comprise, la cellule doit être vue dans son ensemble et dans son environnement, sans négliger l'influence des paramètres visiblement, ou non, impliqués.

1.2. Définition

Notre organisme est constitué de cellules ayant différents rôles. Ces cellules, où qu'elles soient, peuvent subir une ou plusieurs mutations au sein de leur génome. Ces mutations peuvent entraîner un changement de phénotype de la cellule et lui faire acquérir certaines caractéristiques qui caractérisent les cellules cancéreuses. Ces caractéristiques sont récapitulées en figure 1.

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.
Inspiré de Faten El Hage et col. Bulletin du Cancer, Réponse immune et cancer, Volume 95, numéro 1, janvier 2008 Institut Gustave-Roussy.



Les cancers sont donc des maladies qui se déclinent en des centaines de variations possibles, touchant différents organes. En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à des tumeurs de plus en plus grosses qui se développent en envahissant puis en détruisant les tissus sains qui les entourent. Les cellules cancéreuses peuvent également circuler sous forme libre entraînant la formation de métastases. Au vu de leurs différences et de leurs complexités, les cellules cancéreuses répondent très différemment aux différentes formes de traitement.

1.3. L'impact des cancers

Dans le monde, il a été estimé par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) qu'en 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer s'est élevé à 14,1 millions dont 7 427 000 sont des hommes et 6 663 000 des femmes. Le nombre de décès dû au cancer dans le monde s'élevait à 8,2 millions en 2015, dont 4 653 000 sont des hommes et 3 548 000 des femmes. Les causes les plus fréquentes de décès liés au cancer étaient le cancer du poumon (pour les hommes) et le cancer du sein (pour les femmes). Toujours d'après l'IARC, ces effectifs ne peuvent qu'augmenter du fait de l'augmentation de la population mondiale et de son vieillissement.

En France, c'est au milieu du XXe siècle que les cancers sont devenus un problème de santé publique de premier plan. Avec les maladies cardiovasculaires, ce sont les 2 principales causes

de mortalité, chacune à l'origine de près de 30 % des décès. On estime à plus de 350 000 le nombre de nouveaux cas de cancers chaque année et à près de 150 000 le nombre de décès imputables.

Malgré tout, il a été constaté que la mortalité par cancer en France a diminué de 1,5% par an chez les hommes et de 1% par an chez les femmes entre 1980 et 2012. Cette baisse est attribuée à des diagnostics plus précoces, à des traitements plus efficaces et à la diminution globale du risque d'avoir un cancer grâce à la prévention.

Depuis 2003, le gouvernement français a mis en place les plans Cancer pour donner des objectifs précis dans la lutte contre le cancer. De nombreux efforts ont été faits sur la prévention, notamment pour lutter contre le tabagisme, première cause évitable de cancer et responsable à lui seul de 30% des décès par cancer. Depuis 2014, c'est le 3^{e} plan de lutte contre le cancer qui est engagé et qui durera jusqu'en 2019. Pour ce 3^{e} plan, 1,5 milliard d'euros ont été alloués par le gouvernement. Chaque année, des évaluations sont réalisées pour réorienter et améliorer les décisions prises dans cette lutte. En 2017, les objectifs consistent à favoriser des diagnostics plus précoces, à garantir la qualité et la sécurité de la prise en charge, à accompagner les évolutions technologiques et thérapeutiques, à faire évoluer les formations et les métiers de la cancérologie, à accélérer l'émergence de l'innovation au bénéfice des patients et à conforter l'avance de la France dans la médecine personnalisée (http://www.e-cancer.fr).

1.4. Méthode de diagnostic et de suivi

Tout diagnostic commence par un examen clinique attentif, le plus souvent suivi par la prescription de dosages sanguins et d'examens d'imagerie médicale. Les examens sanguins prescrits dans le cadre du diagnostic d'un cancer peuvent comprendre le dosage de marqueurs tumoraux. Les marqueurs tumoraux circulants sont des molécules produites par les cellules cancéreuses et que l'on retrouve en excès dans le plasma. Quelques marqueurs peuvent être utiles au diagnostic, surtout ceux qui sont très spécifiques d'un cancer (calcitonine, sous-unité bêta de la gonadotrophine chorionique, antigène spécifique de la prostate, alpha-foetoprotéine ...) ; ils sont utilisés plus fréquemment pour la détection des récidives. Récemment les cellules cancéreuses circulantes, leur ADN ou les ARN produits sont utilisés comme biomarqueurs.

La biopsie est un élément clé du diagnostic ; elle consiste à prélever un échantillon d'un tissu suspicieux pour en réaliser l'analyse microscopique voire immunohistopathologique. Cette

technique est invasive et permet le diagnostic initial mais elle n'est que rarement utilisée dans le suivi.

L'imagerie médicale, peu invasive, est aujourd'hui un des principaux outils de détection des lésions cancéreuses. Elle permet d'obtenir des images des organes, plus ou moins sensibles et spécifiques selon la technique employée, et de visualiser ainsi les éventuelles tumeurs macroscopiques. Ces images apportent des informations anatomiques et/ou fonctionnelles sur la localisation, la taille, l'activité et le stade évolutif des lésions tumorales. Outre l'orientation du diagnostic et le guidage de la biopsie, elles sont également très utiles à la mise en place d'une stratégie thérapeutique, au suivi de son efficacité et à la détection précoce des récidives au stade infraclinique. Ces diverses techniques d'imagerie peuvent être complémentaires, car certaines donnent des informations uniquement anatomiques et topographiques, comme l'échographie, la radiographie en particulier la TDM (tomodensitométrie ou scanner X) et l'IRM (imagerie par résonnance magnétique) « conventionnelles », alors que d'autres donnent des informations fonctionnelles comme la TEP (tomographie par émission de positons), la scintigraphie et la tomoscintigraphie (TEMP ou SPECT) ou certaines applications fonctionnelles récentes de l'IRM. Pour l'amélioration de la performance diagnostique, les constructeurs de machines d'imagerie médicale se sont concentrés non seulement sur l'amélioration de la résolution et du traitement des images médicales mais également sur l'imagerie bimodale voire multimodale. Ainsi la plupart des équipements récents d'imagerie fonctionnelle sont couplés à une modalité d'imagerie anatomique pour donner le plus d'informations possibles par fusion des images. Lorsque l'on a recours à l'imagerie fonctionnelle en clinique oncologique, elle est effectuée à l'aide de machines « hybrides », TEP/TDM ou SPECT/TDM ou plus récemment TEP/IRM.

La scintigraphie, la SPECT et la TEP font partie de la médecine nucléaire car l'administration d'un radionucléide permet l'imagerie grâce à son émission de photons, par opposition aux autres types d'imageries dites de transmission où la source d'énergie est extérieure au patient.

2. LA MEDECINE NUCLEAIRE

2.1 Définition

La médecine nucléaire regroupe toutes les utilisations des radionucléides chez l'Homme, sous forme de sources non scellées, à des fins de diagnostic ou de thérapie. Ces techniques utilisent des radiotraceurs qui comportent des atomes radioactifs ou radionucléides. Les radionucléides sont des atomes au noyau instable qui libère de l'énergie lors de sa désintégration. Cette énergie

est facilement détectable, surtout lorsqu'elle est émise sous forme de rayons gamma correspondant à des photons dans le modèle particulaire. Ces radionucléides peuvent être utilisés soit seuls, soit liés à un vecteur (molécule du métabolisme énergétique ou intermédiaire, hormone ou analogue d'hormone, anticorps…). La localisation dans l'organisme du radiotraceur administré est réalisée grâce à une machine spécifique comportant des détecteurs de photons et des systèmes électroniques de localisation et d'amplification du signal (simple sonde de détection peropératoire, gamma-caméra ou machine TEP). Dans le domaine de la radiothérapie interne vectorisée, on administre un radiotraceur dont le radionucléide émet des électrons (bêta moins) ou plus récemment des particules alpha ; le parcours de ces particules dans la matière est suffisamment court pour qu'elles déposent leur énergie au sein du tissu cible et entraînent sa nécrose.

2.2 Bref rappel historique

La découverte de la radioactivité naturelle date de 1897 lorsqu'Henri Becquerel a mis en évidence la propriété de l'uranium d'émettre un rayonnement à distance. C'est alors qu'on lui donne sa définition : propriété des nucléides instables de perdre spontanément de leur masse en émettant des particules ou des rayonnements électromagnétiques (Larousse). Par la suite, Pierre et Marie Curie ont isolé le polonium puis le radium à partir du pechblende, un minerai composé de dioxyde d'uranium. Pierre, Marie Curie et Henri Becquerel partagent le prix Nobel de Physique en 1903. Assez rapidement cette radioactivité va être utilisée à des fins scientifiques et médicales. En 1925, Blumgart et Yens utilisent pour la première fois un radiotraceur chez l'homme afin de mesurer la vitesse de circulation du sang entre un bras et l'autre [1]. En parallèle les physiciens travaillent sur la détection de ces radionucléides. En 1928 Geiger et Müller créent le premier compteur de particules chargées et en 1930, Lawrence met au point un accélérateur de particules électromagnétiques de haute fréquence, précurseur des cyclotrons. A l'époque, ce qui freine le développement de la méthode, c'est le petit nombre des radioéléments naturels utilisables. En 1934, Frédéric Joliot-Curie et Irène Joliot-Curie mettent en évidence le phénomène de création artificielle de radioactivité avec la découverte de la transformation nucléaire de l'aluminium-27 en phosphore-30 par le bombardement de particules à haute énergie issues d'une source de polonium. En 1935, Hevesy étudie la circulation sanguine et la formation des os grâce à une solution de phosphate de sodium radioactif.

Dès 1956, le premier scintigraphe européen sert à l'exploration de la glande thyroïde. De l'iode radioactif est ingéré par le patient dont une partie se fixe dans la glande thyroïde.

Le concept de la TEP a été présenté par Kuhl et Edwards vers la fin des années 50 mais les premières expérimentations tomographiques n'ont débuté qu'en 1963 à l'université de Pennsylvanie [2]. C'est Anger qui a démontré le premier la possibilité de détecter des photons issus de l'annihilation du positon, en utilisant deux caméras à scintillations reliées électroniquement [3]. Brownell développa par la suite les outils permettant de travailler en coïncidence sur un système de gamma caméra à deux têtes et a présenté ses résultats lors d'un symposium à Vienne en 1968. Il faut cependant attendre 1973 pour voir fonctionner le premier TEP développé à l'université de Washington, à Saint Louis, par Hoffman et Phelps. Le premier prototype a été publié dans le Journal of Nuclear Medicine en 1975 [4]. En France, c'est le service de médecine nucléaire dirigé par le Pr. Talbot à l'hôpital Tenon qui a été le 1er hôpital français civil à être équipé d'une TEP pour la routine clinique en 1999. A partir des années 2000, les premières machines d'imagerie multimodale TEP/TDM ont été construites puis commercialisées. Ces machines sont dorénavant le standard en TEP clinique ; les grands constructeurs (Philips, Siemens et GE) ne fabriquent plus que ce type de machine et la quasi-totalité des services cliniques les utilisent. Plus récemment, des machines TEP ont été couplées à l'IRM. La première en France a été implantée en 2013 à Lyon au centre d'imagerie in vivo multimodale dédié à la recherche fondamentale et clinique (CERMEP).

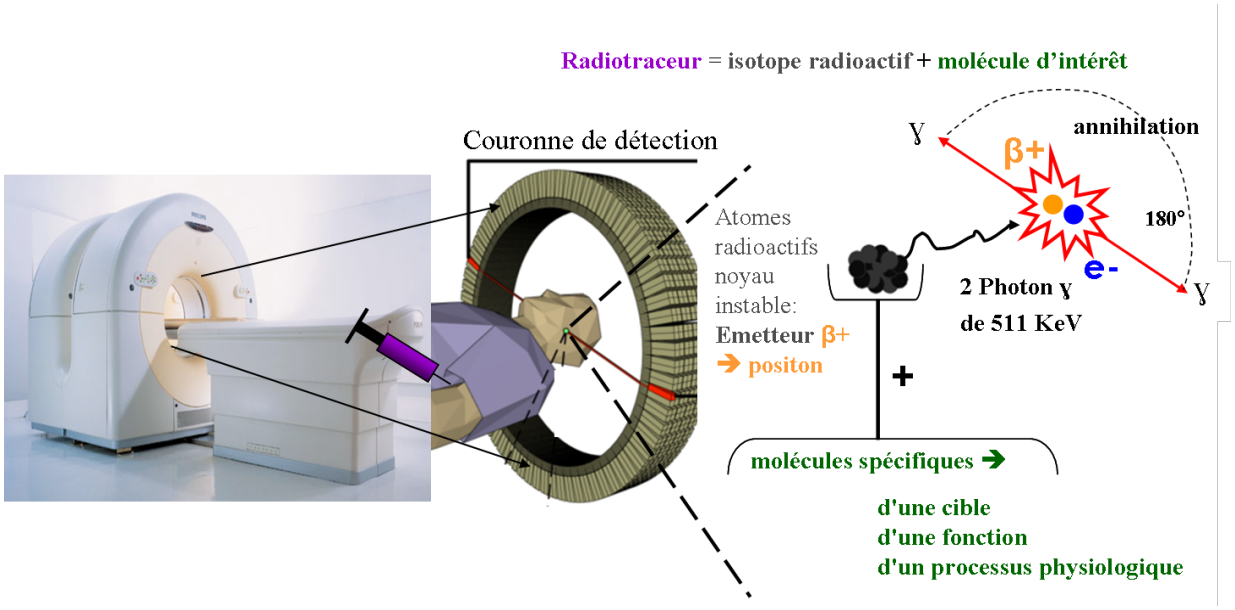
C'est la TEP, une des techniques d'imagerie de médecine nucléaire, qui a été utilisée pour mener à bien les recherches précliniques de ce travail doctoral, grâce à une version de machine TEP adaptée à l'imagerie du petit animal de laboratoire.

3. L'IMAGERIE TEP

3.1. Principe et fonctionnement

Son principe repose sur l'administration d'une molécule d'intérêt marquée par un radionucléide. Ces molécules sont spécifiques d'une cible, d'une fonction ou d'un processus physiologique. La détection du signal se fait suite à la désintégration des radionucléides, qui émettent des positons dont l'annihilation avec les électrons de la matière produit deux photons de même énergie 511 keV émis dans des directions opposées (rayons ɣ). La détection de ces photons en coïncidence à l'aide d'une caméra TEP permet de localiser le lieu de leur émission et donc la concentration du traceur dans chaque volume élémentaire, appelé voxel. En TEP clinique, la translation de la table supportant le patient permet de couvrir l'ensemble ou une partie de l'organisme (Figure 2).

Figure 2: Principe et fonctionnement de la TEP.



La reconstruction des images se fait grâce à un progiciel spécifique qui permet de représenter la biodistribution du radionucléide selon des coupes tomographiques ainsi que selon un mode tridimensionnel. L'interprétation se fait en visualisant les images sur une console de traitement. Les coupes TEP coronales, sagittales et transaxiales sont affichées corrigées et non corrigées de l'atténuation qui est différente selon les organes traversés entre le point d'annihilation du positon et le détecteur qui entoure le patient. Sans correction d'atténuation et en mode 2D ou 3D, les coupes axiales sont reconstruites soit par rétroprojection filtrée dans une matrice 128 x 128 ou 256 x 256 avec un filtre approprié (Haming avec seuillage à 8,5 mm/pixel) ou mieux par des méthodes itératives OSEM ou EMML dont le nombre d'itérations dépend du nombre d'événements détectés et l'expérience du constructeur et de l'utilisateur. Pour réaliser la correction d'atténuation, on doit avoir acquis, pour chaque examen, des cartes d'atténuation (soit grâce à une source externe au patient, option abandonnée en TEP clinique, soit par TDM) qui permettent de modifier les données d'émission pour élaborer des coupes corrigées de l'atténuation. La correction d'atténuation est essentielle en TEP clinique mais joue peu en pratique pour l'imagerie du petit animal.

En TEP/TDM clinique, des coupes « hybrides » sont visualisées associant l'image TDM en échelle de gris selon la densité des tissus et l'image TEP en échelle de couleur selon l'intensité de fixation du radiotraceur. Cette représentation permet de localiser les foyers hyperactifs.

Par contre, la machine µTEP du LIMP ne comporte pas de TDM associée, ce qui n'est pas trop gênant pour l'application que nous en avons faite où la localisation des tumeurs greffées dans le modèle animal est connue et où c'est l'intensité des foyers hyperactifs qui importe.

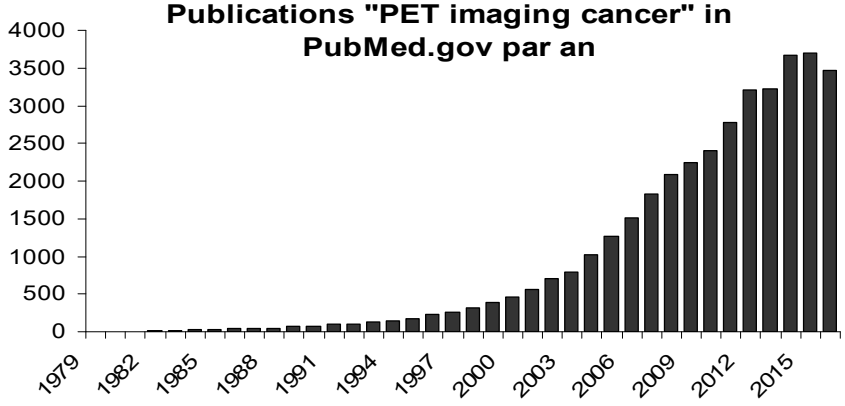
La quantification de la fixation du radiotraceur par un organe ou une partie d'organe se fait actuellement en pratique clinique par la détermination de la valeur maximale au sein d'un foyer de fixation des valeurs standardisées de fixation ou SUVmax [5].

$$\text{Le SUV vaut : } \frac{\text{concentration radioactive (kBq/mL) x masse du patient (g)}}{\text{activité injectée (kBq)}}$$

Si le traceur se répartit uniformément dans le patient, le SUV est alors égal à 1 g/mL dans tous les voxels et le SUVmax aussi. On estime donc que si sa valeur est supérieure à 1 il existe une hyperfixation. Le SUVmax a pour but essentiel de faciliter la comparaison des images ; c'est un indice dit semi-quantitatif. D'autres indices sont proposés pour réaliser une quantification qui reflète mieux l'activité fonctionnelle de tout le volume tumoral et pour améliorer l'interprétation des images [6, 7].

Depuis une décennie, la TEP est devenue la modalité de médecine nucléaire de référence pour l'évaluation du cancer, du fait de sa supériorité technique sur la scintigraphie. Elle vise à caractériser les tumeurs solides en utilisant des radiotraceurs servant de révélateur des anomalies fonctionnelles liées au cancer. Cette technique est en pleine expansion et voit son nombre d'examens et la production scientifique reliée presque doubler en 10 ans (Figure 3).

Figure 3: Publications dans le domaine de l'imagerie TEP en cancérologie.
Données fournies par le site PubMed.gov (incomplètes pour 2017)



3.2. Les radiotraceurs TEP (AMM)

Depuis la loi 92-1279 du 11 Décembre 1992, les traceurs utilisés en médecine nucléaire sont devenus des médicaments à part entière, et à ce titre ils sont soumis aux mêmes exigences que les autres médicaments. Il est donc nécessaire d'obtenir une autorisation de mise sur le marché

(AMM) délivrée par l'agence nationale de sûreté du médicament (actuellement ANSM) permettant l'utilisation des radiotraceurs en routine clinique.

Voici les radiotraceurs pour la TEP disposant d'une AMM en France en 2017 :

- Le fluoro-2-désoxy-D-glucose (**FDG)** enregistré depuis 1998, est le traceur le plus utilisé en TEP. Il représente environ 90% de l'utilisation de la TEP en oncologie, cardiologie et neurologie. Le FDG est un analogue du glucose. C'est un traceur qui est capté par la plupart des cellules cancéreuses, ayant une augmentation significative de l'activité métabolique glucidique lors de leur prolifération. Mais sa non-spécificité le limite, avec des résultats de faux positifs en cas de processus inflammatoire. Il ne permet pas la détection de certains cancers bien différenciés comme ceux de la prostate, du foie, tumeurs neuroendocrines, ou situés dans des organes à forte activité physiologique de FDG comme les tumeurs du système nerveux, du rein, de la vessie. L'utilisation de la TEP au FDG en cancérologie a fait l'objet d'un Standards, Options et Recommandations en 2003, sous l'égide de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer. Un « Guide du bon usage des examens d'imagerie médicale » a été élaboré par les sociétés savantes concernées avec le soutien de la Direction générale de la sûreté nucléaire et de la radioprotection (DGSNR) et de l'Anaes ; il a été mis à la disposition du corps médical en janvier 2005 et remis à jour depuis.

- La fluorodihydroxyphénylalanine (**FDOPA)** enregistrée depuis 2006 est un analogue de l'acide aminé dihydroyxphénylalanine. Elle est captée essentiellement par des cellules endocrines, puis décarboxylée en FDOPAMINE. Ce radiotraceur est utilisé en oncologie dans la détection des tumeurs endocrines et des tumeurs cérébrales.

- Le fluorure de sodium (**F Na)** est enregistré depuis 2008 pour l'imagerie du squelette et en particulier en oncologie pour la détection de métastases osseuses.

- La fluorocholine (**FCH)**, enregistrée depuis 2010, reflète l'intensité du métabolisme lipidique membranaire et permet la détection des cancers de la prostate, des cancers primitifs du foie et de nombreuses tumeurs peu agressives voire bénignes comme les adénomes parathyroïdiens.

- Les traceurs des **plaques β amyloïdes**, enregistrés depuis 2013, visent à estimer la densité de ces plaques dans le cerveau de patients adultes ayant une déficience cognitive, suspects de maladie d'Alzheimer ou d'autres causes de déficience cognitive.

- Le fluoroéthyl-L-tyrosine (**FET**), enregistrée depuis 2015, est un analogue d'acide aminé, dont il trace le transport intracellulaire. Il est surtout utilisé dans les gliomes pour la caractérisation de lésions cérébrales, le guidage des biopsies, la classification en grade de ces tumeurs, la délimitation précise des tissus tumoraux viables avant radiothérapie et la recherche de persistance ou de récidive après traitement.

- L'édotréotide (**DOTATOC**) marqué par le ^{68}Ga, enregistré depuis 2016, est un analogue de la somatostatine indiqué pour visualiser l'augmentation de l'expression des récepteurs de la somatostatine. Il est surtout utilisé dans la détection des tumeurs neuroendocrines (TNE), pour leur caractérisation, leur stadification initiale, la détection en cas de récidive biologique et la restadification. Il est utilisé dans l'imagerie des TNE bien différenciées de l'intestin supérieur (notion fonctionnelle qui inclut le pancréas) ou de l'intestin moyen lorsque la FDOPA n'est pas disponible ou que ses résultats ne sont pas concluants.

- Le fluoroestradiol (**FES**), enregistré depuis 2016, est un analogue de l'oestradiol qui se fixe sur les récepteurs des œstrogènes. Il est indiqué comme agent diagnostique pour la caractérisation des lésions métastatiques dans le cancer du sein exprimant initialement le récepteur des oestrogènes.

Les industriels ont rapidement occupé ce marché pour assurer une livraison journalière dans les hôpitaux. Pour un radiotraceur comme le FDG, plusieurs AMM ont été délivrées selon plusieurs dénominations, bien qu'il s'agisse du même principe actif. Par exemple en Ile de France, on peut ou se faire livrer du MetaTrace FDG (PETNET Solutions), du GLUSCAN (AAA) ou encore du FLUDESOXYGLUCOSE (Cyclopharma). Pour utiliser chez l'Homme des médicaments radio-pharmaceutiques ne disposant pas d'une AMM, il existe d'autres possibilités comme les autorisations temporaires d'utilisation (ATU) délivrées par l'ANSM au vu d'un dossier ou l'évaluation dans une étude clinique.

Le tableau 1 est un récapitulatif des acteurs industriels du monde de la radiopharmacie et de leur portfolio pour l'imagerie TEP en France. (Informations récupérées des différents sites internet des industriels et de l'ANSM ainsi que de radiopharmacie et médicaments radiopharmaceutiques par GALY Gérard et col. Lavoisier Edition, 2012).

Tableau 1: Industriels et radiotraceurs pour l'imagerie TEP en Ile de France

Industriels détenteur de l'AMM	Nom du produit	Date de l'AMM
Advanced Accelerator Applications	GLUSCAN (FDG) FLUOROCHOL (FCH) DOPAVIEW (FDOPA) SOMAKIT TOC (Octréotide)	2005 2015 2015 2016
CURIUM LIFE FORWARD (Iba ; CIS-bio, Mallinckrodt Nuclear Medicine)	FDG-IBA (FDG) DOPACIS(FDOPA) CISNAF (FNa) Fluorocholine (FCH)	2009 2010 2010 2014
CYCLOPHARMA	GLUCOTEP (FDG) FLUDESOXYGLUCOSE (FDG) ESTROTEP (FES) PROSTATEP (FCH)	2009 2015 2016 2016
IASON	EFDEGÉ (FDG) IASOdopa (FDOPA) IASOcholine (FCH) IASOflu (FNa) IASOglio (FET) IASOtoc (Octréotide)	2003 2006 2010 2008 2015 2016
PETNET Solutions SIEMENS HEALTHCARE	METATRACE FDG (FDG) NaF MetaTrace (FNa) FLUOROCHOLINE (FCH)	2016 2016 2017
ELI LILLY	AMYVID (β-amyloïdes)	2013
PIRAMAL IMAGING	Neuraceq (β-amyloïdes)	2014

3.3. Le développement de radiotraceurs pour la TEP

3.3.1. LES RADIONUCLEIDES

Aujourd'hui, les radionucléides utilisés en médecine sont tous artificiels, le nombre de radionucléides d'intérêt clinique reste cependant restreint ; ils font l'objet d'une recherche intensive dans l'élargissement de leur utilisation ou pour tester d'autres radionucléides innovants.

En clinique le fluor-18 est de loin le radionucléide le plus utilisé. Sa production nécessite un cyclotron et une installation importante en particulier pour assurer la radioprotection car de fortes activités sont mises en jeu. Les seuls facteurs limitant une utilisation plus étendue sont sa demi-vie courte et sa chimie de marquage assez difficile. En France, le fluor-18 est resté pendant 18 ans le seul radionucléide enregistré pour l'imagerie TEP en routine clinique. Cependant un autre radionucléide a été utilisé depuis 2008 à l'hôpital Tenon, le gallium-68. Ce radionucléide peut être disponible sur site grâce à un générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$.

Les efforts de recherche se sont concentrés sur le développement de nouveaux radiotraceurs pour la TEP, mais également sur leur radiomarquage et donc le choix le plus adéquat du radionucléide émetteur β^+. Le développement pharmaceutique d'un radiotraceur est un processus long et coûteux. Il est donc nécessaire de disposer des critères de sélection capables d'identifier les radionucléides qui, tout en répondant aux attentes des cliniciens pour les examens d'imagerie, pourront être produits selon des processus reproductibles et rentables. De nombreux radionucléides ont déjà été utilisés, cependant tous doivent présenter un certain nombre de caractéristiques:

- Le type de désintégration. Ils doivent être émetteurs de positons β^+ qui s'annihilent, le plus souvent en fin de parcours, pour donner deux photons gamma de 511keV détectables par la caméra TEP. Après son émission (fig. 6), le positon parcourt une distance qui dépend de son énergie cinétique, avant de s'annihiler avec un électron de la matière. Le parcours du positon dépend aussi du milieu dans lequel il se trouve, plus le parcours est court plus la localisation de la source est précise. L'énergie cinétique maximale du positon est donc un critère important qui influe, de façon inverse, sur la résolution de l'image. Le pourcentage d'émission de positons β^+ ($\%\beta^+$) représente le rapport de désintégration découlant en 2 photons gamma sur le reste des désintégrations (β^+ et électrons). Les radionucléides peuvent également émettre des monophotons qui selon leurs énergies d'émission peuvent être détectés par la gamma caméra TEP. Ces deux derniers critères vont jouer sur la sensibilité de détection.

- La période physique ou demi-vie (noté t ½). C'est la durée à l'issue de laquelle l'activité du radionucléide est divisée par deux. Elle doit être compatible avec la pharmacocinétique du traceur et la durée du phénomène biologique observé tout en minimisant la radioexposition du patient.

- La pureté radionucléique. Selon son mode de production, le radionucléide est obtenu à l'état pur ou sous forme d'un mélange d'isotopes comportant entre autres des nucléides stables (ou appelé aussi entraîneur) qui peuvent interférer dans le marquage du radiotraceur.

- La pureté radiochimique. Permet d'évaluer la présence d'autres radioéléments qui peuvent gêner le marquage ou avoir une biodistribution différente et toxique.

- La radioactivité spécifique. C'est le nombre de désintégration par unité de masse. Plus cette radioactivité spécifique est importante moins on aura à mettre de quantité de l'élément radioactif.

- La nature de l'isotope fils après désintégration. Il faut tenir compte des caractéristiques de l'élément formé par décroissance du radionucléide père. Il peut être stable ou radioactif et, dans ce cas, les particules émises par l'élément fils doivent être prises en compte dans le choix du radionucléide père, en particulier dans l'évaluation de la dose absorbée.

Ces nombreuses contraintes limitent les radionucléides pouvant être utilisés. Elles permettent également de choisir les plus adaptés à la molécule d'intérêt à marquer. Les quatre premiers radionucléides dans le tableau 2 que sont le rubidium-82, l'oxygène-15, l'azote-13 et le carbone-11 ont des demi-vies très courtes et sont utilisés surtout en cardiologie ou en neurologie [8, 9]. Les cuivre-64, brome-76 et zirconium-89 dont la demi-vie est longue permettent de marquer des molécules dont l'accumulation au niveau des lésions cibles dans l'organisme est plus lente. Par exemple des anticorps qui vont mettre plus de temps que des petites molécules comme des peptides, pour arriver à leur cible. (Roberto Pasqualini, TEP : quels sont les radionucléides utilisables ? CIS bio international, Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique - 2005 - vol.29 - n°4).

Tableau 2: Radionucléides candidats pour le radiomarquage d'un radiotraceur TEP

Radionucléides émetteurs de positons					
Radionucléide utilisé	**fils**	**Demi-vie**	**%β+**	**Emax β+ (MeV)**	**production**
^{82}Rb	^{82}Kr	78 sec	96	3.15	générateur
^{15}O	^{15}N	123 sec	100	1.74	cyclotron
^{13}N	^{13}C	9.96 min	100	1.20	cyclotron
^{11}C	^{11}B	20.4 min	99	0.96	cyclotron
^{68}Ga	**^{68}Zn**	**68.3 min**	**88**	**1.83**	**générateur**
^{18}F	**^{18}O**	**110 min**	**97**	**0.63**	**cyclotron**
^{44}Sc	^{44}Ca	3.97 h	95	1.47	générateur/ cyclotron
^{64}Cu	^{64}Zn	12.7 h	19	0.65	cyclotron
^{76}Br	^{62}Cu	16.1 h	100	1.90	cyclotron
^{89}Zr	^{89}Y	3.27 j	99	0.91	cyclotron
^{124}I	^{62}Cu	4.18 j	22	1.50	cyclotron

3.3.2. LES MOLECULES D'INTERET

Le développement d'un radiotraceur passe par l'élaboration de la molécule d'intérêt qui doit venir se fixer sur sa cible. Pour cela plusieurs conditions spécifiques doivent être réunies pour que cette molécule d'intérêt devienne, après son radiomarquage, un bon radiotraceur pour la TEP [10-12]:

- L'affinité et la spécificité in vivo de la molécule d'intérêt vis-à-vis de la cible visée doivent rester élevées après le radiomarquage, afin d'avoir une interaction stable pour une seule cible moléculaire. Les paramètres les plus souvent utilisés pour quantifier l'affinité sont la concentration inhibitrice 50 (IC50), qui correspond à la concentration nécessaire de ligand froid pour déplacer 50 % du ligand marqué (plus elle est faible plus le ligand a une forte affinité). Le Kd est la constante de dissociation à l'équilibre, elle représente la concentration de ligand qui occupe à l'équilibre 50 % des récepteurs, elle permet de calculer le nombre total de récepteurs (Bmax).

- Avoir une structure chimique compatible avec le radiomarquage. Pour les radiomarquages par substitution nucléophile au fluor-18, il faut que le précurseur puisse comporter dans sa structure chimique un groupe dit partant (cf § fluor-18). Pour le marquage au gallium-68 il faut que la molécule comporte un chélate (cf § gallium-68).

- Le radiotraceur doit avoir une cinétique de liaison aux cibles compatible avec la durée entre injection et imagerie (0 min à 2 demi-vies physique du radionucléide) et avec la durée d'acquisition des images (de l'ordre de 30 min). La concentration maximale du radiotraceur sur sa cible doit être atteinte rapidement.

- La dégradation de la molécule d'intérêt in vivo ne doit pas, aboutir à des métabolites radioactifs et ne doit pas non plus entrer en compétition avec le radiotraceur [12].

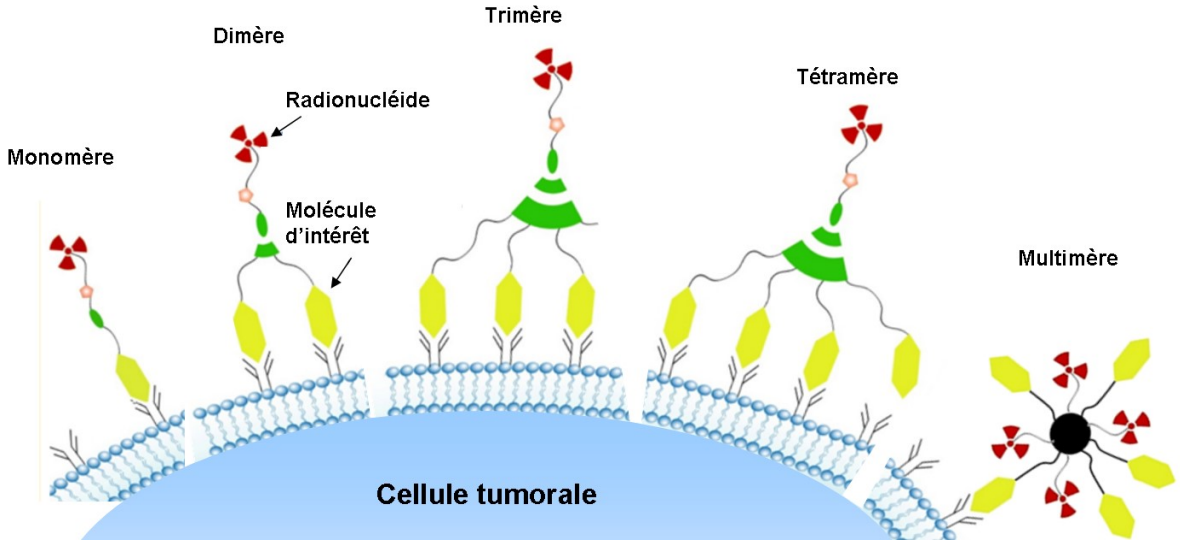
- La fixation non spécifique, doit être minimale, de manière à ce que le rapport « signal sur bruit » soit le plus élevé possible.

Dans le cas où les molécules d'intérêt sont des ligands de récepteurs, il est important de prendre en compte le potentiel de liaison pour son récepteur. Ce potentiel est une mesure combinée entre la densité de récepteur disponible et l'affinité du ligand. Les premières molécules d'intérêt développées étaient des agonistes. Maintenant ce sont préférentiellement des antagonistes qui sont développés. La fixation aux récepteurs est généralement plus importante que celle avec un agoniste, en effet les antagonistes se fixent même si leur récepteur n'est pas actif, ce qui n'est

pas le cas des agonistes. De plus, bien que la molécule d'intérêt des radiotraceurs soit administrée en quantité extrêmement faible, dans la plupart des cas l'antagoniste ne permet pas l'activation d'une cascade de signalisation comparé à l'agoniste qui lui est internalisé. En revanche l'affinité des antagonistes est souvent moins bonne que celle des agonistes du fait d'une modification plus importante du ligand naturel [13].

Pour améliorer l'affinité de liaison et la rétention tumorale, des peptides dit multimériques ont été introduits (Figure 4). La multimérisation entraîne une augmentation de la captation tumorale, de l'affinité de liaison et de la rétention tumorale par rapport à des molécules d'intérêt monomériques, et peut donc améliorer les performances de l'imagerie [14-16]. Cependant, une fixation tumorale plus élevée des traceurs multimériques n'entraîne pas nécessairement une meilleure qualité d'image étant donné que le bruit de fond peut être augmenté [17].

Figure 4 : Schéma de radiotraceurs et multimérisation de molécules d'intérêt.
Adaptation de la figure de Zhide Guo et col. dans Mol Pharm. 2017.



3.3.3. FLUOR-18 ET GALLIUM-68

Ces deux radionucléides sont utilisés en TEP clinique, comme vu précédemment, et ont un mode d'obtention et une chimie bien différents. L'élément fluor a été découvert en 1886 par le Français Henri Moissan, son nom vient du latin *fluere* qui signifie écoulement; en lien avec la fluorite utilisée pour liquéfier les résidus lors de la production des métaux. L'élément gallium a été découvert en 1875 par le Français Paul-Émile Lecoq de Boisbaudran, son nom vient pour certains du latin *Gallia*, France, en l'honneur au pays dans lequel il a été découvert; ou pour d'autres du latin *gallus*, coq, pour le nom à l'origine de la découverte.

Le fluor-18

Le fluor-18 a une demi-vie de 110 minutes, il se désintègre par désintégration β+ (97%) et accessoirement par capture électronique (3%). Les β+ ont une énergie moyenne de 250 keV et maximale de 634 keV. L'activité massique du fluor-18 est de 3.52 x 10^{18} Bq/g. Il est produit grâce à un cyclotron.

La France compte plus d'une vingtaine de cyclotrons dédiés à la production de radionucléides pour la médecine nucléaire et la recherche. Dans le monde, il y a plus de 650 cyclotrons à visée médicale répertoriés. (International Atomic Energy Agency. radioisotope products and their availability. Nuclear Technologies Review. 2010; 36-8.).

Plusieurs réactions nucléaires peuvent permettre d'obtenir le fluor-18. La réaction nucléaire la plus utilisée actuellement consiste en l'irradiation d'une cible d'eau enrichie en oxygène-18 par un faisceau de protons. La réaction produit le fluor-18 sous forme nucléophile, [^{18}F]- F^-, selon la réaction ^{18}O + (p,n) ^{18}F: ${}^{18}_{8}O + {}^{1}_{1}H \rightarrow {}^{18}_{9}F + {}^{1}_{0}n$.

Le gallium-68

Le gallium-68 a une demi-vie de 68 minutes, il se désintègre par émission β+ (~89%) et par capture électronique (~11%). Les β+ ont une énergie moyenne 836 keV et maximum de 1899 keV. L'activité massique du gallium-68 est de 1.51 x 10^{18} Bq/g. Il est disponible sur site hospitalier grâce à des générateurs ^{68}Ge/^{68}Ga et peut également être produit par cyclotron mais ce type de production est encore très peu réalisé [18].

Générateur :

Un générateur radioactif repose sur la séparation radiochimique entre l'élément père de période radioactive longue et son fils de période plus courte qui est utilisé pour le marquage des radiotraceurs. Cette séparation est possible car les deux éléments ne possèdent pas les mêmes propriétés chimiques. Plusieurs techniques de récupération du radioélément fils ont été étudiées, comme l'extraction par solvant, l'échange d'ions, l'électrochimie, la sublimation ou encore la chromatographie d'adsorption (Tucker W. Radioisotopic Cows. J. Nucl. Med. 1960;1(1):60.). La récupération du radionucléide fils nécessite d'éluer le générateur afin d'en isoler un éluat à forte concentration.

Dans le monde, plusieurs générateurs délivrant un radionucléide émetteur de positons sont commercialisés et certains pays les utilisent en routine [19]. En France, l'emploi de tels générateurs était limité à la recherche jusqu'à l'arrivé du générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$ GalliaPharm® commercialisé par Eckert&Ziegler. Ce générateur a obtenu une AMM dans l'UE en juin 2015, ouvrant ainsi les portes à l'utilisation en routine clinique de radiotraceurs marqués au gallium-68.

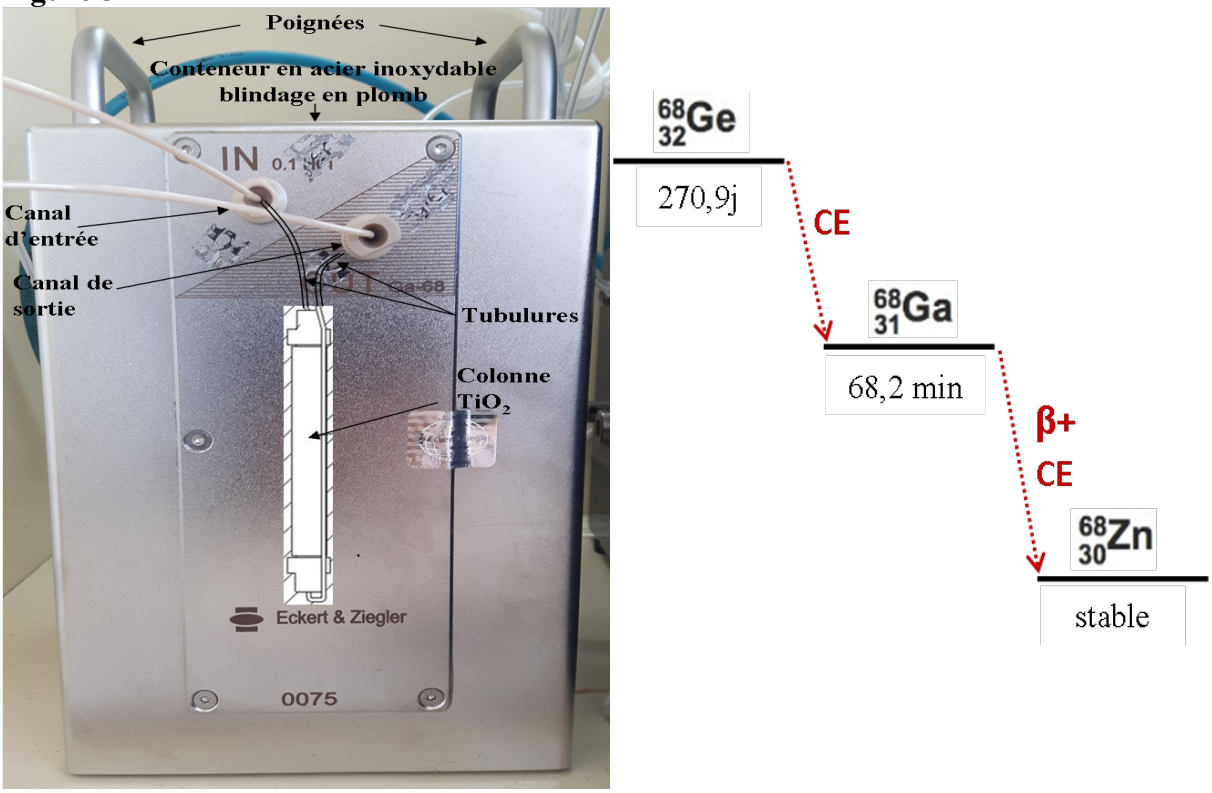
Un cyclotron est nécessaire pour obtenir le ^{68}Ge, élément père du générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$. Seuls quelques cyclotrons dans le monde ont la capacité de le produire, car le flux de protons doit être intense et prolongé nécessitant un courant allant de 40 µA à 100 µA et une période d'irradiation de plusieurs jours. Le germanium-68 obtenu est ensuite adsorbé sur une résine. Cette résine appelée aussi support chromatographique peut être constituée d'oxyde de titane, de dioxyde d'étain ou encore d'un composant organique [20]. Le type de résine définit le type d'éluent utilisé pour éluer le gallium-68.

La performance d'un générateur repose principalement sur :

- La spécificité de séparation chimique
- La résistance et la stabilité chimique de la colonne où est adsorbé le germanium-68
- La pureté de l'éluat (pourcentage minimal de germanium-68 et autres métaux)
- Le type d'élution (éluant et méthode d'élution, fractionnée/avec prépurification).

Le générateur Galliapharm® contient du germanium-68 greffé sous forme de chlorure sur une résine d'oxyde de titane, qui se désintègre en gallium-68, nucléide fils (Figure 5). Pour limiter la contamination de l'éluat en germanium-68, la pharmacopée européenne définit un maximum de 0,001% de l'activité de germanium-68 contenu dans l'éluat totale. Avec le Galliapharm®, en utilisant les bonnes pratiques d'utilisation, l'éluat récupéré répond à la pharmacopée européenne. Le générateur peut être utilisé ainsi pendant 12 mois. Pour la recherche, d'autres générateurs peuvent être utilisés.

Figure 5: Générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$ GalliaPharm®



Pour marquer une molécule d'intérêt avec le gallium-68, il faut que celle-ci possède un chélateur. Ce chélateur complexe le métal. Pour que le radiomarquage soit efficace, le chélateur idéal doit avoir une complexation au radionucléide rapide. Il doit être sélectif du métal gallium-68 afin de ne pas se complexer avec le zinc (nucléide fils stable). De plus la complexation molécule d'intérêt chélateur doit être stable. De nombreux chélateurs sont proposés, DOTA, NOTA, NODAGA, HBED-CC, EDTA, DTPA [21, 22]. Le choix de l'un d'eux se fait selon la molécule d'intérêt, sensible ou non à certains paramètres du radiomarquage comme la température de marquage, le pH ou encore sa polarité.

Comparaison du ^{18}F et ^{68}Ga

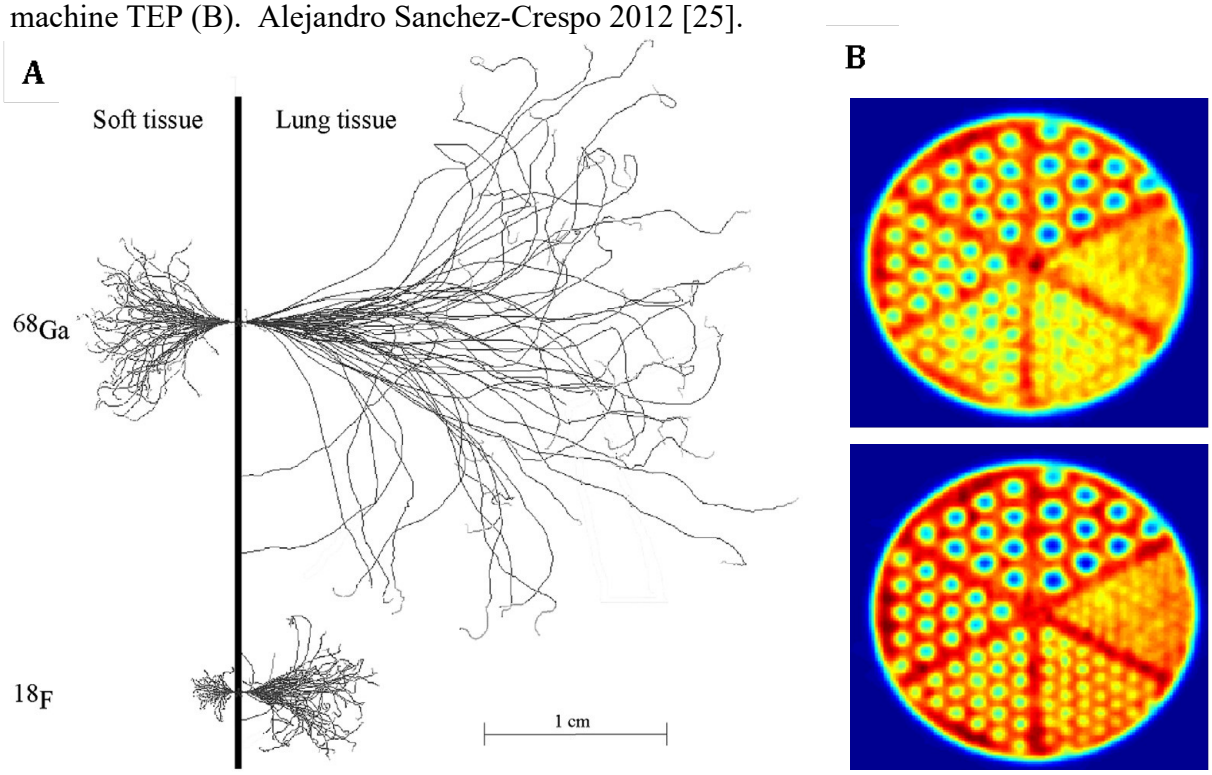
Comme vu précédemment dans le paragraphe sur les radionucléides utilisés en TEP, le fluor-18 et le gallium-68 ont des caractéristiques physiques différentes (Tableau 3).

Tableau 3: Caractéristiques physiques du ^{68}Ga et du ^{18}F.
Données du Bureau international des poids et des mesures BIPM, 2012, Tableau adapté de Alejandro Sanchez-Crespo Applied Radiation and Isotopes Volume 76, June 2013, Pages 55-62

	^{18}F	**^{68}Ga**
Energie maximum des β^+ (keV)	633.5	1899.1
Energie moyenne des β^+ (keV)	243.3	836.0
Rendement de positon pour 100 désintégeations	96.86	89.14
Principales émissions monophotoniques en (keV) avec entre parenthèse leur rendement pour 100 désintégrations	/	578.52 (0.034) ; 805.83 (0.094) ; 1077.35 (3.22) ; 1261.08 (0.094) ; 1883.16 (0.137)

La différence physique de ces deux radionucléides se trouve principalement dans l'énergie maximum des β^+. En effet comme vu précédemment, le parcours du positon dans la matière sera plus important si l'énergie cinétique de l'émission du β^+ est importante induisant une moins bonne résolution. La valeur du parcours moyen du β^+ du fluor-18 dans l'eau est de 0.6 mm et celui du gallium-68 est de 3.5 mm (d'après le NIST: National Institute of Standards and Technology) [23]. En outre, le bruit de fond des images avec le ^{68}Ga est légèrement augmenté en raison des émissions monophotoniques d'énergie se trouvant dans la fenêtre de détection de la caméra TEP [24]. Alejandro Sanchez-Crespo dans sa publication de 2012, étudie l'impact de ces différences sur les images. La figure 6 montre une simulation du parcours de positons issus d'une désintégration de gallium-68 et de fluor-18. Ce parcours est simulé dans le poumon et dans du tissu mou. La deuxième figure met en évidence la différence de résolution spatiale des images avec l'un ou l'autre des deux radionucléides.

Figure 6 : Simulation par méthode de Monte Carlo du parcours d'un positon issu de la décroissance du gallium-68 et du fluor-18.
(A) Différences de qualité d'image et résolution spatiale d'un phantom de Jaszczak avec une machine TEP (B). Alejandro Sanchez-Crespo 2012 [25].



En général l'activité spécifique est plus élevée lorsque le radiomarquage est effectué avec du fluor-18. Cette différence s'explique par une plus grande activité de radionucléide disponible pour le marquage au ^{18}F, obtenu à partir d'un cyclotron, par rapport à celle de ^{68}Ga, éluée d'un générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$. Une activité spécifique élevée favorise une meilleure visualisation des cibles, avec un rapport de fixation de la tumeur sur le bruit de fond plus élevé. D'autre part, le marquage au ^{18}F nécessite un environnement plutôt exigeant, qui n'est disponible que dans les centres industriels ou les centres TEP équipés de leur propre cyclotron. Il consiste en un processus plus compliqué impliquant plus d'étapes de marquage par rapport au marquage avec le ^{68}Ga nécessitant un chélate métallique [26]. Cela implique un risque plus élevé d'échec dans l'obtention d'un traceur fluor-18.

Pour réaliser les radiomarquages, que ce soit au fluor-18 ou au gallium-68, deux paramètres sont importants à prendre en compte, la radioprotection et la stérilité du produit. En recherche préclinique, les activités utilisées peuvent être assez faibles, en rapport avec la masse corporelle des modèles animaux, et donc leur manipulation nécessite des précautions de radioprotection limitées. En revanche dès lors que l'activité est importante (> 50 MBq) des modules de synthèse automatisés sont nécessaires pour minimiser la radioexposition lors des manipulations proches de la source radioactive. Pour ce qui est de la stérilité, en recherche le produit est marqué avec le

plus de soin possible. Dans le cas d'une administration chez l'Homme, la stérilité du radiotraceur est primordiale. En France, il y a obligation d'employer des modules de marquages automatisés avec un maximum de consommables à utilisation unique, pour garantir la stérilité du radiotraceur. Elle est suivie par des contrôles microbiologiques réguliers. Avec le gallium-68, l'utilisation de trousses de radiomarquage prêtes à l'emploi se développe, l'une étant déjà enregistrée pour le marquage de l'édotrotide, sur le modèle des trousses de marquage au technétium-99m utilisées pour les radiotraceurs en scintigraphie.

4. CIBLAGE MOLECULAIRE

En cancérologie, les études de protéomique et de génomique ont augmenté considérablement les connaissances sur les molécules d'intérêt et leurs cibles. La recherche en biologie fondamentale des récepteurs, des antigènes, des activités enzymatiques mais aussi des systèmes de transport, de prolifération, d'apoptose, d'hypoxie, de glycolyse, d'angiogenèse fournit des informations inestimables pour le développement d'agents diagnostiques.

Les substrats métaboliques ont été considérés rapidement comme de bonnes cibles étant donné leur accumulation dans les cellules cancéreuses. Ainsi des radiotraceurs du métabolisme glucidique (FDG), lipidique (FCH) et des acides aminés (FDOPA, FET) sont utilisés en routine clinique. D'autres radiotraceurs sont en développement voire presque acceptés, comme le ^{18}F-FACBC (anti-1-amino-3-18F-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid) appelé aussi Fluciclovine, qui est un analogue d'un acide aminé, la leucine, ce radiotraceur est accepté en Europe avec un avis favorable pour l'obtention de l'AMM par l'ANSM dans le cancer de la prostate. Le ^{18}F-glutamine, moins avancé traçant le métabolisme glucidique, tout comme le FDG. La limite de tels radiotraceurs, est de ne pas être spécifiques d'un cancer primitif puisqu'ils ciblent un métabolisme commun à la plupart des cellules de l'organisme.

Un autre ciblage important est celui des récepteurs [27, 28]. Certains récepteurs sont surexprimés dans les cellules cancéreuses, leur identification par des études anatomopathologiques permet de sélectionner le ligand radiomarqué adéquat [29-32]. Ils appartiennent à différentes familles. Une des familles de récepteurs la plus étudiée est celle des récepteurs couplés aux protéines G [33]. Elle comprend un grand nombre de récepteurs, comme les GRPR (gastrin-realising peptide receptor), les récepteurs de la bombésine, de la neurotensine ou encore de la somatostatine. La grande famille des intégrines a également été décrite comme jouant un rôle clef dans l'évolution des cancers [34].

Une autre approche a été d'utiliser des molécules d'intérêt de taille plus importante comme des anticorps monoclonaux intacts, des fragments d'anticorps, des protéines ou encore des oligonucléotides. Le problème rencontré est souvent le temps trop long de la biodistribution de la molécule d'intérêt. Des radionucléides avec une demi-vie trop courte sont donc inadaptés pour l'imagerie TEP de ces molécules d'intérêt. Cependant des études ont été réalisées sur l'approche par préciblage dans le cas d'anticorps [35]. Le principe repose sur le préciblage de la tumeur par un vecteur immunologique de taille importante. Ce vecteur est fonctionnalisé de telle sorte qu'il puisse reconnaître également une petite molécule. Ainsi, une fois que la grosse molécule injectée a atteint sa cible, il ne reste plus qu'à administrer la petite molécule marquée qui se lie rapidement au vecteur pré-localisé sur la tumeur pour caractériser celle-ci.

Ces dernières années, l'importance de l'immunogénicité des tumeurs et de l'environnement tumoral a été mieux comprise. Par exemple, certaines équipes essayent de marquer des cellules comme les cellules CD19 ou encore les cellules PDL1 positives [36, 37].

Dans cette étude, nous avons étudié un des traceurs spécifiques des récepteurs de type 2 de la somatostatine, qui sont couplés aux protéines G, et deux traceurs spécifiques de l'intégrine αvβ3.

4.1. Les récepteurs de type 2 de la somatostatine

4.1.1. GENERALITES

La somatostatine est une hormone régulatrice sécrétée de façon physiologique par de nombreux systèmes neuro-endocriniens comme le tube digestif. Elle existe sous 2 formes biologiquement actives, la somatostatine-14 et la somatostatine-28. La somatostatine inhibe non seulement la libération de l'hormone de croissance (GH) à partir de l'hypophyse antérieure mais aussi la libération de diverses hormones comme la prolactine et la TSH (thyrotrophine) de l'hypophyse, l'insuline et le glucagon des cellules β et α du pancréas. Ces actions sont médiées par l'expression des récepteurs couplés aux protéines G. Il a été décrit cinq sous-types de récepteurs de la somatostatine (SSTR) [38]. Ces sous-types appartiennent à 2 sous-familles: SRIF1 (comprenant les sous-types SST2A/B, SST3 et SST5) et SRIF2 (comprenant les sous-types SST1 et SST4) [39, 40]. Les récepteurs de la somatostatine sont exprimés non seulement par les cellules de l'encéphale, des méninges et de l'antéhypophyse mais également par les cellules du pancréas, du tube digestif et certaines cellules du système immunitaire [38].

4.1.2. POURQUOI LES CIBLER ?

Une forte densité d'expression des SSTR a été découverte dans certaines néoplasies avec une prédominance du SSTR-2. Les premières tumeurs identifiées surexprimant le SSTR-2 sont les tumeurs neuroendocrines (TNE). D'autres études montrent maintenant que ce récepteur serait également surexprimé dans divers cancers et d'autres maladies.

4.1.3. LES RADIOTRACEURS DEVELOPPES ET LEURS APPLICATIONS

Le développement des radiotraceurs, ciblant les SSTR et plus particulièrement les SSTR de type 2, s'est fait autant sur le choix de la séquence peptidique que sur les chélates et le type de radiométal [41]. Les principaux radiotraceurs agonistes étudiés dans la littérature en clinique sont le ^{68}Ga-DOTA-TATE, le ^{68}Ga-DOTA-TOC ou édotrotide et le ^{68}Ga-DOTA-1-Nal3-octreotide (^{68}Ga-DOTA-NOC) [42]. Des équipes continuent de mettre au point des antagonistes dont la valeur diagnostic serait supérieure à celle des agonistes [43]. Les différents radiotraceurs agonistes ou antagonistes sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Analogues de la somatostatine marqués au gallium-68 utilisés en clinique

	Analogue de la somatostatine	Structure chimique	Statut	référence
Agoniste	Ga-DOTATOC (édotréotide)	68Ga-DOTA-D-Phe-cyclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys Thr(ol)	Approuvé en France puis en UE, usage bien établi	[44, 45]
	Ga-DOTATATE	68Ga-DOTA-D-Phe-cyclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)Thr	Approuvé aux USA par la FDA	[44]
	Ga-DOTANOC	68Ga-DOTA-D-Phe-cyclo(Cys-1-Nal-D-Trp-Lys Thr-Cys) Thr(ol)	Etude de phase 2	[46]
Antagoniste	Ga-DOTA-JR11jj (Ga-OPS201)	68Ga-DOTA-Cpa-cyclo[D-Cys-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-D-Tyr-NH2	Essai clinique	[47]
	Ga-NODAGA-JR11jj (Ga-OPS202)	68Ga-NODAGA-Cpa-cyclo[D-Cys-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-D-Tyr-NH2	Etude de phase 1 et 2	[47]

Ces radiotraceurs montrent tous une distribution rapide à la cible, avec un bon rapport tumeur sur bruit de fond, une bonne clairance dans le sang, et une excrétion par voie urinaire. Il a été prouvé que les récepteurs de la somatostatine étaient exprimés physiologiquement dans certains organes sains. L'étude de cette fixation physiologique a été cruciale dans l'interprétation correcte des examens, et également dans la mise en évidence des faux négatifs ou faux positifs.

Les analogues de la somatostatine marqués au gallium-68 ont largement fait leurs preuves dans la localisation des TNE. De nombreuses études montrent leurs supériorités en terme de spécificité, de sensibilité, d'exactitude, de taux de détection, de quantification et de temps d'acquisition face aux autres radiotraceurs tels que le FDG et la ^{18}F-FDOPA [48-53] ainsi que face à la SPECT au ^{123}I-MIBG [54]. Bien qu'utilisés en majorité dans la détection des TNE pour leur caractérisation, leur stadification initiale, la détection en cas de récidive biologique et la restadification [30, 55], ils sont évalués dans d'autres indications [30, 56]. Des études cliniques ont montré leur intérêt dans différents autres cancers comme celui du sein [57], le carcinome nasopharyngé [58], le lymphome et le méningiome [59] ou encore le neuroblastome (NB) [50].

4.1.4. LES RADIOTRACEURS POUR LA RADIOTHERAPIE

Les agents développés pour le diagnostic peuvent ouvrir la voie à des agents pour la radiothérapie interne vectorisée [60]. Il convient de radiomarquer la molécule d'intérêt avec un radionucléide émetteur de rayonnement β- ou α. Ces rayonnements vont irradier plus intensément et sur un parcours beaucoup plus court, que ceux utilisés pour l'imagerie, les cibles tumorales. Le but est d'utiliser l'imagerie TEP des analogues des SSTR pour sélectionner les patients qui pourront bénéficier de la radiothérapie interne vectorisée ciblant les mêmes récepteurs [61], dans une approche de traitement personnalisé, appelée théranostique. Depuis 2011, une quinzaine d'essais cliniques utilisent des agonistes des SSTR pour la radiothérapie, essentiellement dans les tumeurs neuroendocrines [62]. (ClinicalTrials.gov). Un des produits utilisés est le ^{177}Lu-DOTA0-Tyr3-Octreotate (^{177}Lu-DOTATATE) commercialisé sous le nom LUTATHERA®. En France, il a bénéficié durant plusieurs années d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) de cohorte, avant d'obtenir une AMM dans l'UE. Pour le moment il est indiqué chez l'adulte pour le traitement des tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques bien différenciées au stade métastatique ou inopérable, surexprimant des récepteurs de la somatostatine. Ce traitement ne peut être utilisé qu'en cas d'échec des traitements par les analogues non radiomarqués de la somatostatine. La principale limite de cette méthode thérapeutique est l'activité cumulée dans les tissus sains : l'activité administrée est, en effet,

limité par la radiotoxicité sur les tissus normaux, en particulier les reins et la moelle osseuse. Si cette toxicité limite trop l'activité administrée, l'irradiation des cellules tumorales peut s'avérer insuffisante [63].

4.2. Evaluation de la néoangiogenèse via l'intégrine αvβ3

4.2.1. GENERALITES

Les intégrines constituent une famille importante de glycoprotéines transmembranaires responsables des interactions cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire et cellule-agent pathogène. Elles sont composées de sous-unités α et β qui forment un hétérodimère non covalent. Elles jouent un rôle dans le rattachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire. Les intégrines sont également impliquées dans le transfert de signaux à travers la membrane plasmique et régulent de nombreuses fonctions dont la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou la cicatrisation.

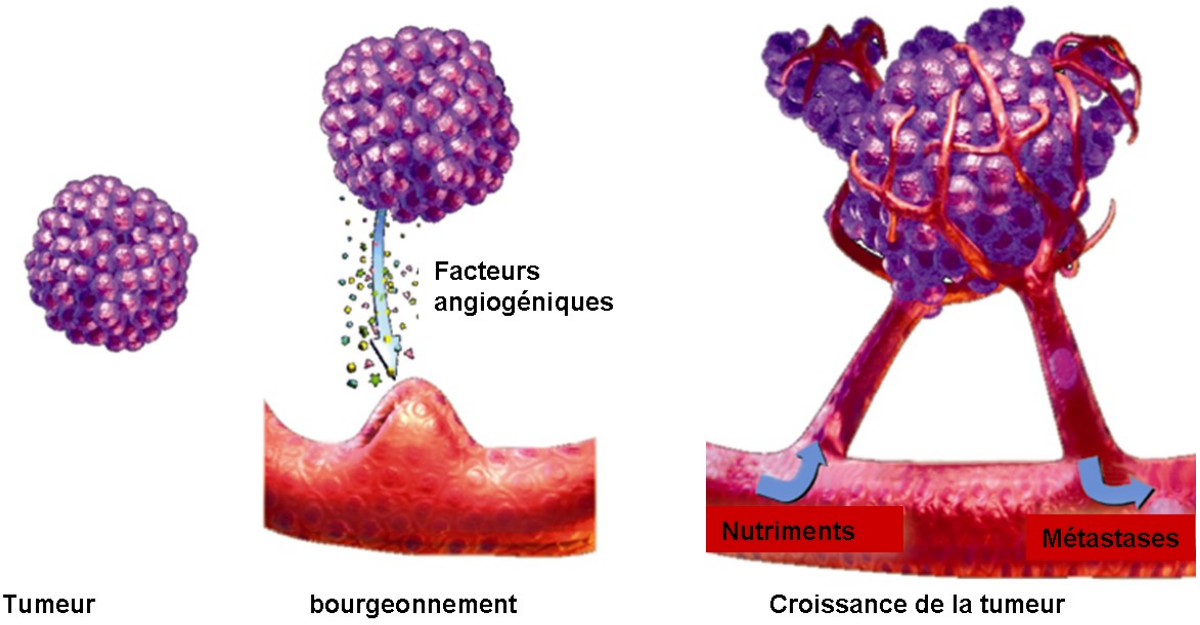
4.2.2. POURQUOI LES CIBLER ?

Certaines intégrines sont impliquées dans la modulation de la néoangiogenèse comme l'intégrine α3β1 mais le principal marqueur de l'endothélium angiogénique est l'intégrine αvβ3 [64].

- L'angiogenèse :

Le concept d'angiogenèse dans le processus de croissance tumorale a été décrit pour la première fois par Folkman en 1971 [65]. Au-delà de 2 mm, le nodule dormant cancéreux ne peut plus se développer de façon autonome et nécessite l'apport d'oxygène et de nutriments. Pour ce faire, plusieurs voies de signalisation sont activées entraînant la formation de nouveaux vaisseaux, c'est ce qu'on appelle le switch angiogénique. Ce processus a également un rôle important dans la progression de la tumeur cancéreuse. Il favorise la transition d'hyperplasie à néoplasie, c'est-à-dire le passage d'un état de multiplication cellulaire à un état de prolifération non contrôlée de cellules de tumeur. La néovascularisation influence aussi la dissémination des cellules cancéreuses dans l'ensemble de l'organisme, favorisant la formation de métastases. (Figure 7).

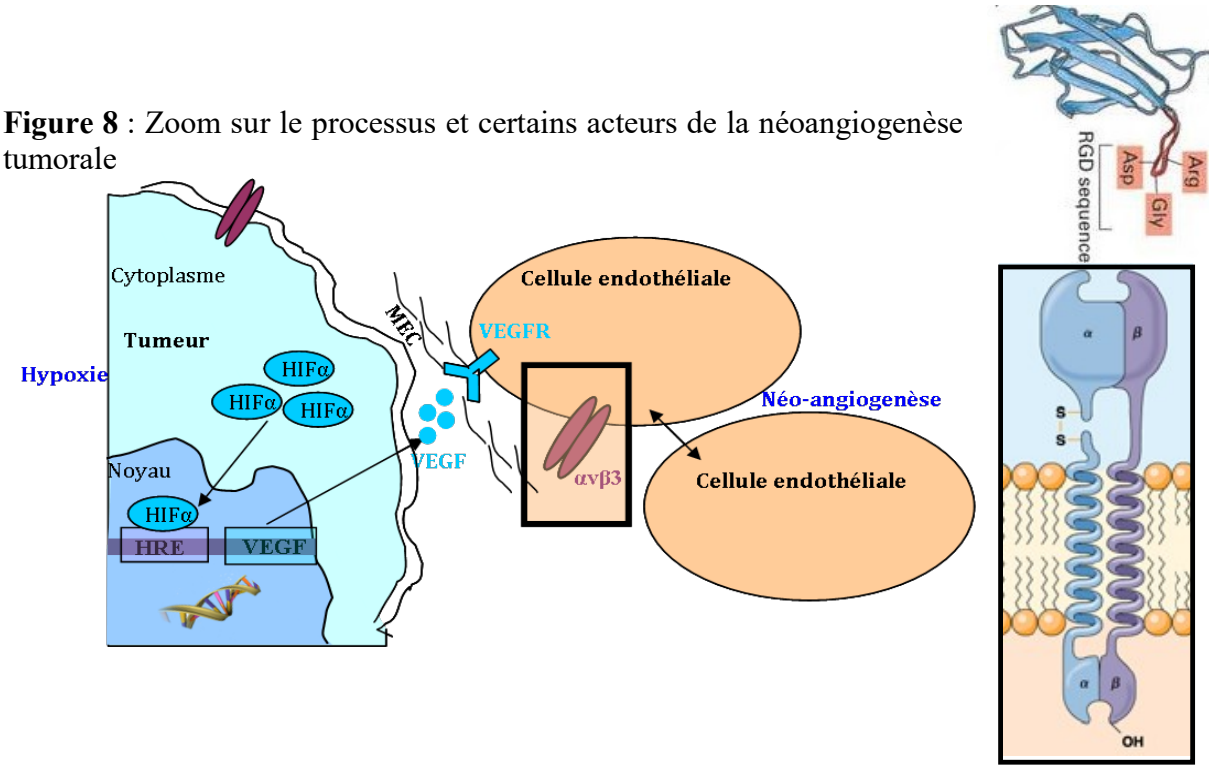
Figure 7 : Processus de l'angiogenèse tumorale. Source: http://www.angioworld.com



La néovascularisation issue de l'angiogenèse tumorale présente un état d'activation cellulaire maximum pour une efficacité de perfusion médiocre. Elle est très hétérogène en densité, par sa maturation phénotypique d'une zone tumorale à l'autre et d'une tumeur à l'autre. La vasculogenèse est une prolifération vasculaire due à la différenciation de cellules précurseurs en cellules endothéliales qui se répandent, s'associent et établissent un réseau vasculaire. L'angiogenèse est une prolifération vasculaire due au bourgeonnement de vaisseaux préexistants, puis à l'installation d'un réseau et à sa différenciation en différents secteurs fonctionnels. Le principal facteur déclencheur de ce processus est l'hypoxie : l'expression du facteur HIF (Hypoxia Inducible Factor) entraîne la sécrétion du facteur de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), lui-même responsable de la cascade angiogénique.

Les vaisseaux existants se dilatent et augmentent leur perméabilité vasculaire ; la matrice extracellulaire est dégradée puis les cellules endothéliales prolifèrent et migrent, ceci aboutissant à la formation du tube puis de la lumière endothéliale. Les intégrines αvβ3 sont exprimées sur les cellules endothéliales proliférantes. Les ligands naturels des intégrines sont la vitronectine, l'ostéopontine, la fibronectine et d'autres protéines matricielles. Leurs liaisons aux protéines d'adhésion cellulaire se fait par l'intermédiaire de la séquence de trois acides aminés « arginine - glycine - acide aspartique » (-RGD-) (figure 8). Les intégrines αvβ3 sont exprimées sur les cellules endothéliales proliférantes en cas de néoangiogenèse mais pas sur les cellules quiescentes, elles constituent également une cible intéressante pour le traitement anti-angiogénique.

Figure 8 : Zoom sur le processus et certains acteurs de la néoangiogenèse tumorale



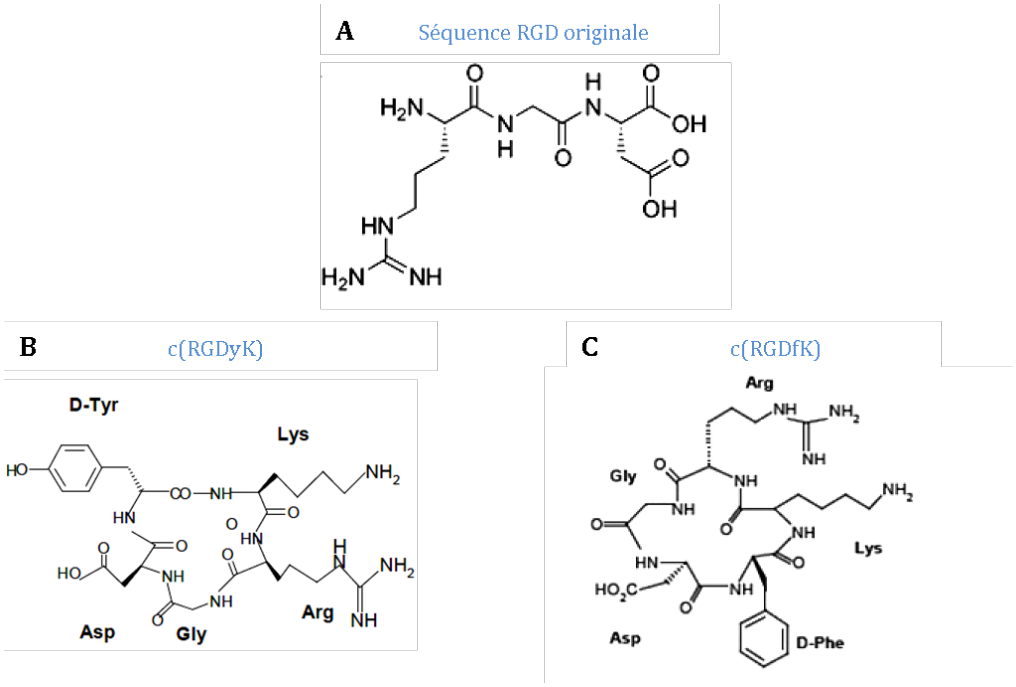
La découverte de la structure des ligands naturels reconnus par les intégrines ainsi que l'étude cristallographique de la structure de l'intégrine αvβ3 ont contribué à la conception d'inhibiteurs sélectifs de l'intégrine [66]. La séquence RGD découverte au début des années 1970 par E. Ruoslahti comme site de fixation dans la fibronectine [67] n'est reconnue que plus tard comme la séquence minimale de reconnaissance des intégrines, présente dans beaucoup des ligands naturels se liant au récepteur αvβ3. La séquence RGD est actuellement le modèle peptidique de base pour une variété de molécules conçues pour une liaison préférentielle à l'intégrine αvβ3 et à d'autres intégrines [68]. L'affinité des peptides RGD peut être affectée par la conformation stérique du peptide [69].

4.2.3. LES RADIOTRACEUR DEVELOPPES ET LEURS APPLICATIONS:

Un grand nombre de molécules ont été développées, la séquence RGD (Figure 9A), a été rapidement complémentée pour augmenter l'affinité et la sélectivité aux intégrines et permettre leurs marquages [69]. Les molécules développées sont pour la plupart cycliques et soit monomériques, soit multimériques. La cyclisation est communément utilisée pour améliorer les propriétés de liaison des peptides RGD, conférant de la rigidité à la structure. La rigidité conférée par cyclisation rend les peptides plus stables et plus spécifiques. Deux principaux peptides RGD cycliques ont été utilisés dans la littérature, le c(RGDfK) et le c(RGDyK). Un seul acide aminé diffère, «f» (normalement noté F) pour la phénylalanine (Phe) et «y» (normalement

noté Y) pour la tyrosine (Tyr). Les deux acides aminés sont dans la conformation D-Phe et D-Tyr (Figure 9B et C).

Figure 9 : Représentation chimique de molécules RGD pour l'imagerie TEP
(A) séquence RGD linéaire originale, (B) cyclo(RGDfK) ; (C) cyclo(RGDyK).



A partir de ces deux RGD cycliques, des molécules multimériques ont été développées, permettant d'augmenter la liaison avec les intégrines αvβ3 [69]. D'autres modifications peuvent être faites pour améliorer les molécules d'intérêt et augmenter l'élimination par voie rénale, par exemple en augmentant l'hydrophilie de la molécule par l'ajout d'acide aminé hydrophile, ou augmenter la glycosylation par ajout de polyéthylène glycol (PEGylation) [70].

Ces différentes molécules ayant comme cible l'angiogenèse et particulièrement les intégrines αvβ3 sont maintenant étudiées depuis plus de 15 ans. Elles ont été marquées par différents radionucléides. Plusieurs revues retracent l'utilisation de tels radiotraceurs en TEP. En 2012 Gaertner et col. [71] font le premier bilan des RGD radiomarqués pour l'imagerie et la thérapie, en 2014 Haubner et col. [72] se concentrent sur les radiotraceurs utilisés en clinique, en 2016 Haojun Chen et col. [73] font le point en clinique et enfin la dernière revue est de Jae Seon Eo et col. qui décrit les radiotraceurs marqués au gallium-68 essentiellement [74]. Les radiotraceurs utilisés pour la clinique sont représentés dans la figure 10. En France aucun d'eux n'a d'AMM, ils sont utilisés seulement dans le cadre d'essais cliniques. Le tableau 5 regroupe les principaux peptides RGD marqués au fluor-18 et au gallium-68, utilisés ces dernières années dans l'imagerie des cancers, en préclinique et en clinique.

Figure 10: Structure chimique des radiotraceurs RGD disponibles pour l'imagerie TEP en clinique. Encadré en bleu les RGD marqués au gallium-68

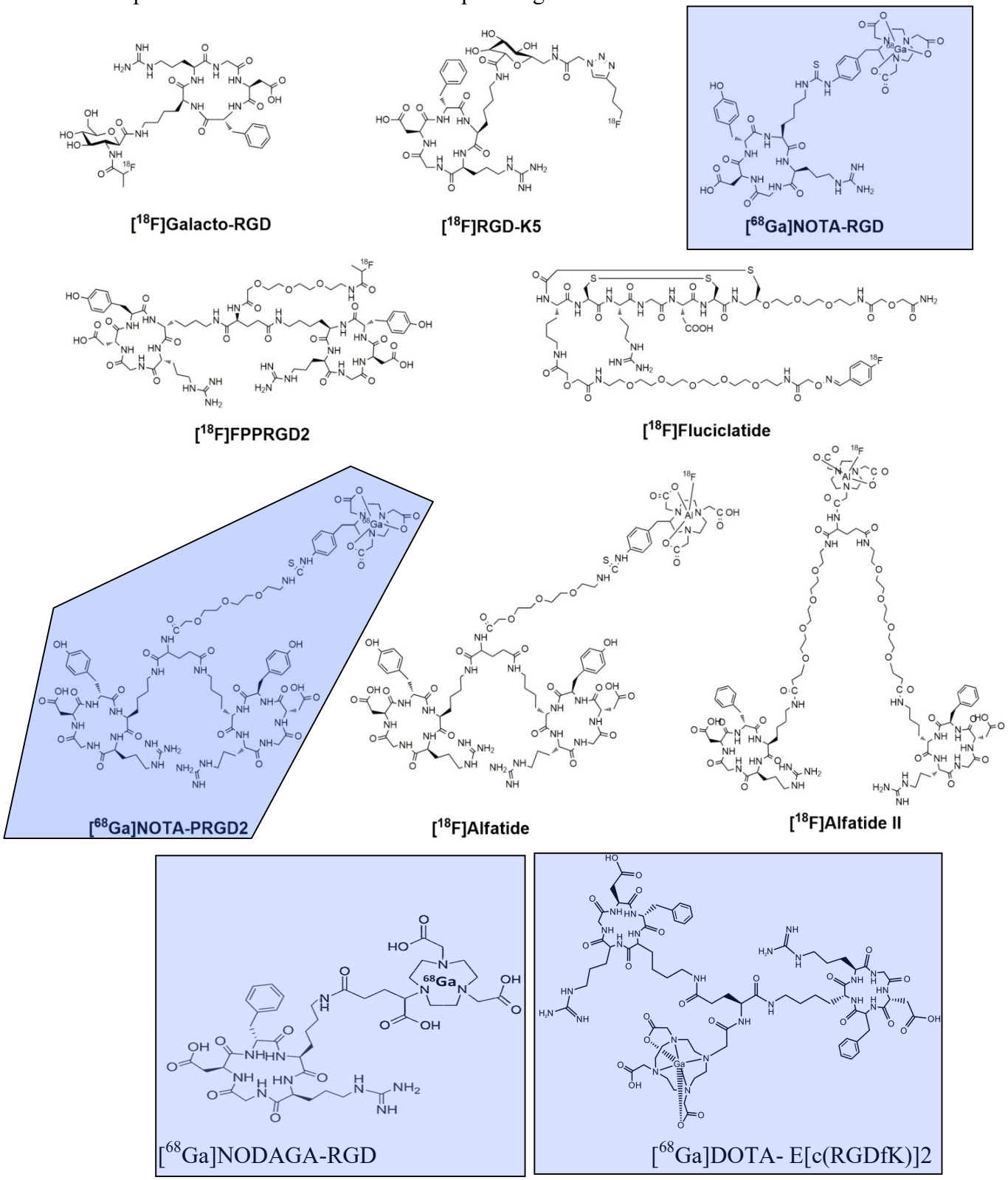


Tableau 5: Les différents RGD développés comme agents TEP pour la visualisation des intégrines αvβ3 en cancérologie.

Radio-nucléides	Nom du radio-traceur	Séquence peptidique	Application	Type de tumeur (nom des lignées cellulaire) [Références]
^{18}F	**Galacto-RGD**	c(RGDfK)	Préclinique	Carcinome épidermoïde (A431), melanome (M21) [75]
			Clinique	Mélanome, sarcomes, RCC (carcinome à cellules rénales) [75] SCCHN, GBM, cancer du sein [76] SCCHN [77] NSCLC, RCC, SCCHN, cancer rectal ou du sein [78] GBM / Mélanome [79] Cancer du sein [80] Cancer de la prostate métastasé [81]
	AH111585 ou fluciclatide (GE healthcare)	c(RGDfK) (légèrement modifié ponts disulfure et thioether)	Préclinique	cancer du poumon [82] GB U87MG + thérapie sunitinib [83]
			Clinique	Cancer du côlon, poumon, rein, GB, sein [84] Melanome [85]
	AlF-NOTA-PRGD2 ou ^{18}F-Alfatide et ^{18}F-AlfatideII	Dimérique c(RGDfK)	Préclinique	GB U87MG [86, 87] NSCLC [88] Cancer du rein [89] carcinome nasopharyngé (CNE-2) + thérapie Endostar [90] GB (U87MG) + thérapie avec sunitinib [91]
			Clinique	Métastases osseuses [92] Métastases cérébrales [93] GB [94]
	FPPRGD2 (GE healthcare)	Dimérique c(RGDyK)	Préclinique	GB U87MG [86, 87] GB U87MG, cancer du poumon A549 + thérapie VEGF121 [95]
			Clinique	Cancer du sein [96] GBM en récidive [97] GBM, cancer cervical, sein, NSCL, ovaire [98]
	FPPRGD4	Tétramérique c(RGDyK)	Préclinique	GB (U87MG) / Cancer du sein (MDA-MB-435) [99]
	RGD-K5 (Siemens)	c(RGDfK)	Clinique	Cancer du sein [100] Cancer tête et cou pendant chimiothérapie [101]

Radio-nucléides	Nom du radio-traceur	Séquence peptidique	Application	Type de tumeur (nom des lignées cellulaire) [Références]
^{68}Ga	**NOTA-PRGD2**	Dimériques c(RGDyK)	Préclinique Clinique	Gliome [102] Cancer du poumon [103]
	NOTA-RGD	c(RGDyK)	Préclinique Clinique	Glioblastome [86, 87] Cancer de la prostate [104] Cancer du sein [105] Fibrosarcome et cancer du côlon [106] Cancer du sein [107]
	DOTA-RGD	c(RGDfK)	Préclinique	Mélanome [108] Cancer du sein [109] cancer à cellules rénale [110]
	DOTA-E[c(RGDfK)]2	Dimérique c(RGDfK)	Clinique	Cancer du sein [111] Carcinome pulmonaire [112]
	NODAGA-RGD	c(RGDfK)	Préclinique Clinique	Cancer du pancréas [113] Carcinome épidermoïde (A431), GB (U87MG) + thérapie par bévacizumab [114] Carcinome hépatocellulaire [115]
	NODAGA-E[c(RGDyK)]2	Dimériques c(RGDyK)	Préclinique	GB (U87MG) / tumeur neuroendocrine (H727) [116]
	TRAP(RGD)3	Trimériques c(RGDfK)	Préclinique	Mélanome [117] Cancer du sein (MDA-MB-231) + thérapie par bévacizumab [118]

L'élaboration de peptides RGD multimériques n'a pas permis d'améliorer toutes les performances de ces agents d'imagerie TEP [17, 105]. D'après les différentes études, finalement, les molécules les plus satisfaisantes sont des monomères ou des dimères [119].

En préclinique l'utilisation des radiotraceurs RGD a fait l'objet d'un grand nombre d'études qui ont apporté certains résultats conflictuels. Certaines études montrent que la captation des radiotraceurs RGD reflète l'angiogenèse seulement lorsque les cellules tumorales n'expriment pas l'intégrine αvβ3 [77, 85]. Des études précliniques ont montré que le taux d'expression de l'intégrine αvβ3 et donc la captation de radiotraceurs RGD était associé à l'agressivité tumorale, au potentiel métastatique de la tumeur et au degré de différenciation tumorale [76, 102, 120, 121]. D'autres études indiquent que les peptides RGD sont seulement capables de refléter les changements de la densité néovasculaire et de l'expression de l'intégrine au cours de la thérapie

anti-angiogénique [122, 123]. Enfin, les dernières études montrent que la captation tumorale du peptide RGD ne reflète pas nécessairement de façon précoce les changements de l'expression des intégrines αvβ3 par les vaisseaux sanguins intra-tumoraux au cours de la thérapie anti-angiogénique [114]. Ces différentes conclusions viennent du fait que la captation des radiotraceurs RGD est inévitablement affectée par d'autres facteurs tels que l'hétérogénéité de l'apport sanguin, la pression du liquide interstitiel et la perméabilité vasculaire. Un autre problème soulevé dans la littérature est la spécificité du signal obtenu avec les peptides RGD en TEP. En effet, l'intégrine αvβ3 peut également être fortement exprimée sur diverses cellules bénignes, telles que les cellules musculaires lisses, les macrophages et les ostéoclastes.

Les premières études cliniques comparent les RGD au FDG dans la détection des lésions malignes et la stadification tumorale. Ces comparaisons ont été faites dans différents types de tumeurs, le glioblastome multiforme (GBM), le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (SCCHN), le cancer bronchique non à petites cellules (NSCLC), le cancer du sein, le mélanome, le sarcome avec métastases osseuses provenant d'un carcinome à cellules rénales. Les données des études pilotes indiquent que les RGD sont similaires au FDG mais ne sont pas supérieurs pour la visualisation des tumeurs primaires et des métastases. Cependant, les RGD se sont révélés intéressants dans les tumeurs où le FDG n'est capté que faiblement, comme le cancer de la prostate. De plus, comme le peptide RGD ne s'accumule pas dans le cortex cérébral, contrairement au FDG, la sensibilité et la spécificité sont plus élevées dans la détection des gliomes ainsi que des GBM récidivants.

L'inconvénient des radiotraceurs RGD est leur fixation dans le foie, ce qui réduit les possibilités de l'utiliser pour détecter les lésions hépatiques. Comme la plupart des agents TEP, ils possèdent une clairance rénale prédominante, ce qui réduit la possibilité de détecter des lésions du tractus urogénital.

Etant donné les résultats controversés de leur utilisation dans la visualisation des tumeurs primaires et des métastases, d'autres approches ont émergé.

La première approche consiste en la quantification, de façon non invasive, de l'expression des intégrines αvβ3. En préclinique et en clinique, il a été montré que la captation des radiotraceurs RGD est significativement corrélée aux résultats histologiques de l'expression de l'intégrine αvβ3 et à la densité de microvaisseaux (MVD) [76, 79, 85, 100]. L'imagerie de l'angiogenèse tumorale via la quantification des intégrines αvβ3 permettrait de sélectionner les patients susceptibles de répondre au traitement anti-angiogénique.

La deuxième approche, qui implique les dernières études publiées, porte sur la capacité de ces radiotraceurs à suivre l'efficacité d'un traitement. Bien qu'un bon nombre d'inhibiteurs de l'angiogenèse soit maintenant utilisé en clinique, il est important de noter que tous les patients ne bénéficient pas d'un traitement anti-angiogénique spécifique et que certaines tumeurs peuvent devenir résistantes à ce traitement. La thérapie anti-angiogénique va plutôt stopper la croissance tumorale qu'induire une régression du volume de la tumeur. De ce fait les méthodes d'imagerie traditionnelles qui ne mesurent que les changements morphologiques ne sont pas appropriées. Pour le moment, il y a très peu d'études cliniques mais quelques études précliniques ont été réalisées et les résultats ne permettent pas de conclure sur l'utilisation de ces radiotraceurs.

Pour le moment ces traceurs RGD ne sont l'objet d'aucune utilisation en routine clinique en cancérologie. Au-delà de la cancérologie, les RGD ont été étudiés dans les maladies vasculaires ischémiques, y compris l'infarctus du myocarde (IM) et les accidents vasculaires cérébraux ainsi que dans l'inflammation [124].

Pour cette thèse nous avons utilisé deux de ces radiotraceurs, tout deux des monomères c(RGDfK). Le premier, le ^{68}Ga-NODAGA-RGD (dénommé ^{68}Ga-RGD dans le reste de cette thèse) utilisé en clinique dans le carcinome hépatocellulaire et le deuxième, le ^{18}F-RGD-K5 déjà utilisé en clinique dans le cancer du sein et dans le cancer de la tête et cou.

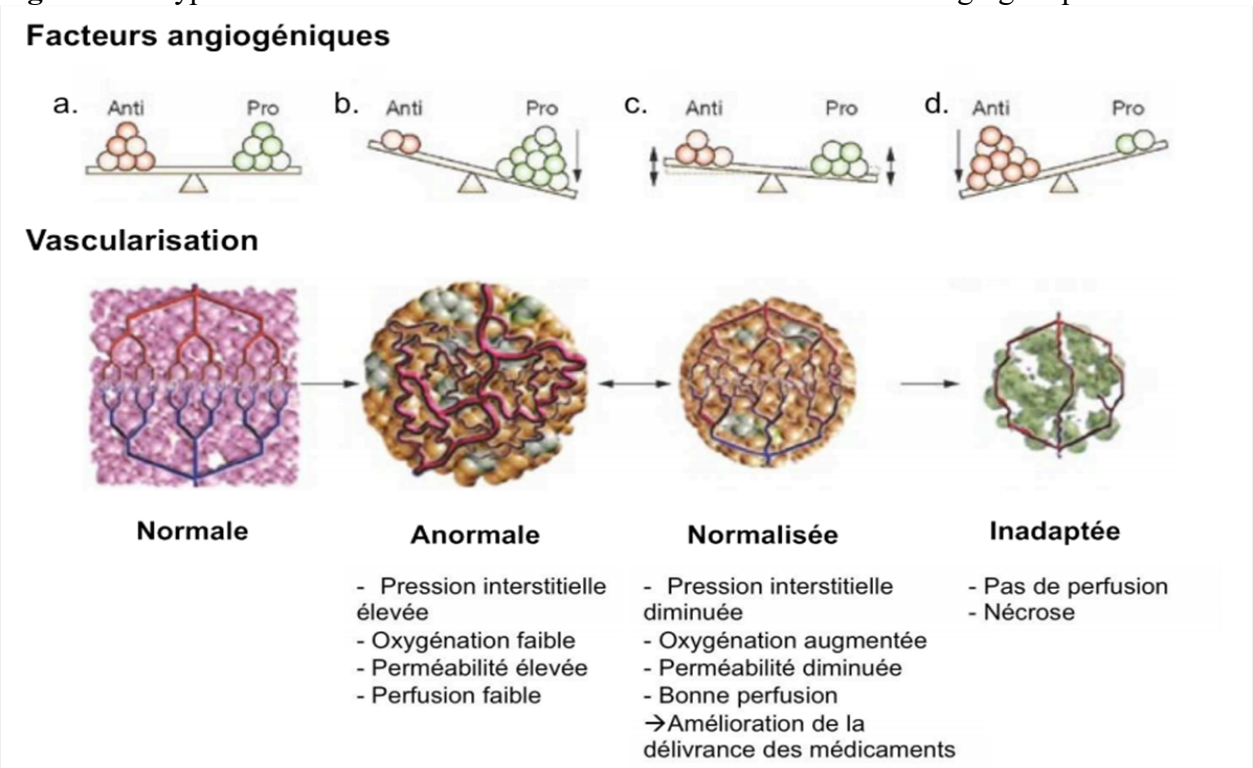
4.2.4. RGD ET TRAITEMENT ANTI-ANGIOGENIQUE

Lors de la découverte du mécanisme d'angiogenèse tumorale, très rapidement a surgi l'idée d'empêcher la tumeur d'envoyer ses signaux de détresse ou empêcher les cellules endothéliales de les recevoir. Comme vu précédemment, la formation des vaisseaux sanguins tumoraux est sous le contrôle de l'activation, la prolifération, l'adhésion, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Par conséquent, chacun de ces phénomènes constitue une cible potentielle pour le développement de molécules anti-angiogéniques. Dans les années 2000, la thérapie anti-angiogénique dans le cancer est devenue une réalité médicale. Ces molécules inhibent l'expansion des vaisseaux tumoraux, bloquent la formation de nouvelles ramifications et permettent la régression des vaisseaux préexistants. Les anti-angiogéniques semblent également normaliser le réseau vasculaire, entrainant une augmentation de la sensibilité des tumeurs à la chimiothérapie et la radiothérapie [125]. Ces observations expliquent pourquoi un traitement anti-angiogénique associé à une chimiothérapie est plus efficace que la chimiothérapie utilisée seule [126]. Malheureusement cette normalisation est transitoire. Après cette phase objective, une régression excessive de la vascularisation ou un échappement de la tumeur au traitement est

souvent observé (figure 11). En 2003, il a été montré que l'anticorps monoclonal anti-VEGF bevacizumab permet de prolonger la survie globale des patients atteints de cancer du côlon métastatique [127]. En 2004 ce médicament est approuvé par les autorités dans le cancer du côlon puis son indication s'est étendue au cancer du rein à cellules claires, du sein et de l'adénocarcinome bronchopulmonaire (non à petites cellules), de l'ovaire et le cancer avancé du col de l'utérus [128]. Des essais cliniques sont en cours dans d'autres cancers, GB notamment [129, 130]. Il s'agit, la plupart du temps, d'un traitement de première ligne pour les cancers en phase métastatique. Pour les cancers du côlon, du poumon et du sein, cet anti-angiogénique est associé à une chimiothérapie. Dans le cas du cancer du rein, il est associé à une immunothérapie par interféron alpha. Le bevacizumab possède une aptitude à inhiber le développement de la vascularisation des tissus cancéreux, par contre, il n'est pas capable d'éradiquer la tumeur à lui tout seul. C'est pour cela qu'il est administré généralement en association puis en maintenance d'une autre thérapie. Le succès clinique, même modéré, (environ 2 mois de survie supplémentaire) du bevacizumab a motivé les chercheurs et de nombreuses sociétés pharmaceutiques à développer d'autres inhibiteurs des voies impliquées dans l'angiogenèse tumorale (Figure 12) [131-134].

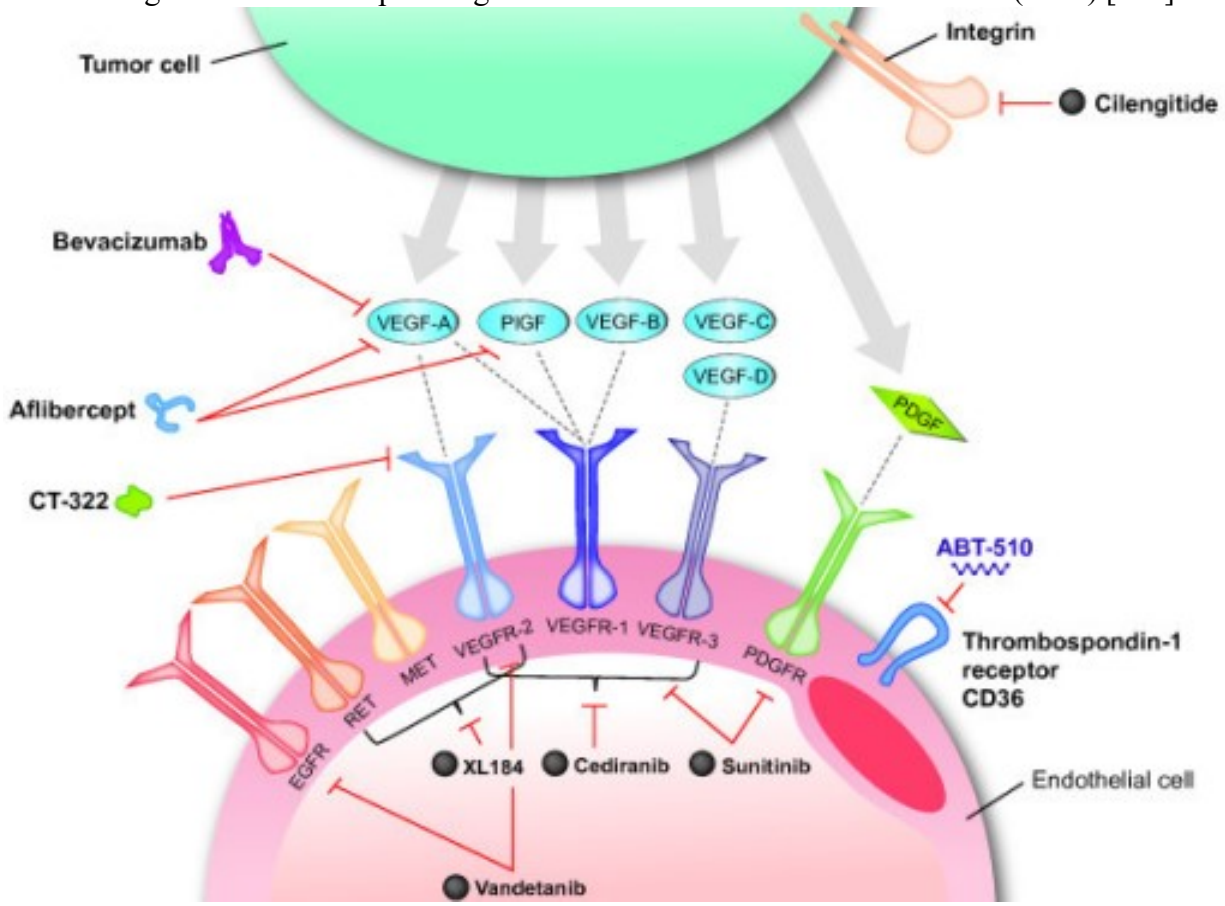
Les peptides RGD initialement développés pour la visualisation de l'angiogenèse tumorale, se sont vite vus attribuer un rôle de compagnon diagnostique, pouvant aider à la décision d'utiliser ou non ces thérapies anti-angiogéniques.

Figure 11 : Types de vascularisation dans une tumeur selon les facteurs angiogéniques.



a. Physiologiquement, il existe un état d'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques favorisant un réseau vasculaire organisé et fonctionnel.
b. La tumeur cancéreuse produit un excès de facteurs angiogéniques favorisant un réseau vasculaire anormal et non fonctionnel.
c. L'utilisation d'un traitement anti-angiogénique permet de rétablir un état d'équilibre et d'induire une normalisation partielle du réseau vasculaire favorisant l'efficacité des traitements anticancéreux.
d. Une inhibition prolongée de l'angiogenèse peut entraîner la destruction du réseau vasculaire et de la tumeur.
(Figure adaptée d'Elizabeth R. Gerstner, Nature Reviews Clinic Oncol, 2009) [135].

Figure 12 : Aperçu des agents anti-angiogéniques et leurs voies d'action pour la thérapie en cancérologie.
EGFR = epidermal growth factor receptor; PDGFR = platelet-derived growth factor receptor; PlGF = placental growth factor; VEGF = vascular endothelial growth factor; VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor. Figure de Beal K. et col. dans Radiat Oncol (2011) [136].



Objectifs du travail de doctorat

1. OBJECTIFS GENERAUX

L'objectif est d'étudier des traceurs marqués au gallium-68, en comparaison avec leurs compétiteurs marqués au fluor-18 lorsqu'ils existent, dans des modèles précliniques oncologiques originaux.

L'apport de la TEP préclinique à la TEP clinique en oncologie est manifeste : de nombreux essais cliniques fort coûteux sont lancés chaque année, malheureusement les molécules innovantes peuvent amener à des résultats non conclusifs et parfois à l'abandon de la molécule étudiée, alors que son application chez des groupes de patients sélectionnés aurait pu aboutir à une efficacité significative. Il arrive que le cadre de l'essai clinique ait été seulement trop largement défini, ne pouvant aboutir à des résultats statistiques satisfaisants, pour que le potentiel de la molécule soit démontré. Les études précliniques, par le développement de modèle animaux représentant la réalité du ciblage, doivent répondre plus clairement et facilement à leurs applications potentielles.

D'après le site ClinicalsTrials.gov, les essais cliniques réalisés pour des études d'imagerie TEP sont au nombre de 3812. Plus de 22% de ces essais cliniques sont non actifs (suspendus, sans recrutement, inconnus ou retirés) 44% sont terminés ou complets et un peu plus de 33% sont en cours. En France 314 études sont ouvertes avec le même pourcentage de non actives un peu moins d'études terminées avec 41% et plus de 36% sont en cours. Ces 22% montrent bien qu'un nombre non négligeable d'essais cliniques n'arrivera pas à aboutir. L'apport de la préclinique à la clinique en TEP oncologique est donc essentiel face à ce foisonnement de nouveaux radiotraceurs proposés. Il y a un réel besoin de comparaisons en préclinique, car mener toutes ces études comparatives en clinique serait impossible et surtout, le temps de parvenir à une conclusion, de nouvelles générations de radiotraceurs seraient probablement proposées. La recherche translationnelle est bidirectionnelle et se nourrit non seulement de nouveaux radiotraceurs mais aussi de nouveaux médicaments.

Cette thèse se partage en deux grandes parties avec l'utilisation de différents radiotraceurs et modèles animaux.

La première partie rapporte la comparaison du ^{68}Ga-DOTATOC, ligand des récepteurs de la somatostatine, avec le traceur de référence le FDG dans des modèles de NB. Pour ce faire une première étape de mise en place du marquage du DOTATOC au gallium-68 au sein du laboratoire a été nécessaire. Une fois le marquage maîtrisé, l'étude a consisté à mettre en place 3 modèles de NB avec des expressions différentes des SSTR2 pour réaliser des examens TEP au ^{68}Ga-DOTATOC et au FDG. Ainsi la comparaison a été faite avec la quantification de l'intensité de fixation dans les différents modèles avec les 2 radiotraceurs. Les résultats ont été comparés avec des données *ex vivo* d'immunohistochimie.

La deuxième partie rapporte l'étude des performances diagnostiques de radiotraceurs RGD. Il y a maintenant plus de 15 ans que ces radiotraceurs sont étudiés, cependant leur apport en imagerie TEP est encore mal défini. Pour cette étude nous avons dû, dans un premier temps, reproduire et améliorer le marquage d'un peptide RGD par le gallium-68. L'étude s'est poursuivie par la comparaison en TEP de la réponse tumorale d'un modèle murin de GB humain à un traitement par anti-angiogénique, seul ou couplé à une chimiothérapie, ou par la chimiothérapie seule. En parallèle, la TEP au FDG a été pratiquée pour vérifier la viabilité tumorale. Dans un deuxième temps, c'est le marquage du peptide RGD-K5 (Siemens) par le fluor-18 qui a été mis en place dans les locaux de PETNET Solutions (Lisses). Une fois le marquage validé, l'objectif a été d'étudier in vivo par imagerie TEP les caractéristiques pharmacodynamiques des deux traceurs RGD (marqués au fluor-18 ou au gallium-68) et leur interaction avec la cible spécifique l'intégrine $\alpha v\beta 3$, dans un modèle de GB. On a finalement comparé le ^{18}F-RGD-K5 et le ^{68}Ga-RGD dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique sur un modèle murin doublement greffé avec d'une part par une lignée cellulaire surexprimant les intégrines et d'autre part une autre ne les exprimant que faiblement.

2. METHODOLOGIE GENERALE

2.1 Radiomarquage au gallium-68

Le gallium-68 pour le marquage des molécules a été obtenu grâce à un générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$ (Eckert&Ziegler). Les marquages ont été réalisés grâce à un module automatisé contrôlé par le logiciel Gina star (SYNCROM Gallium, R&D, Raytest, Allemagne) qui permet de coupler le radionucléide ^{68}Ga au peptide (Figure 13). L'activité récupérée en sortie du générateur est environ 100MBq.

Figure 13: Module automatisé 2 réacteurs, SYNCROM Gallium, R&D, de Raytest.

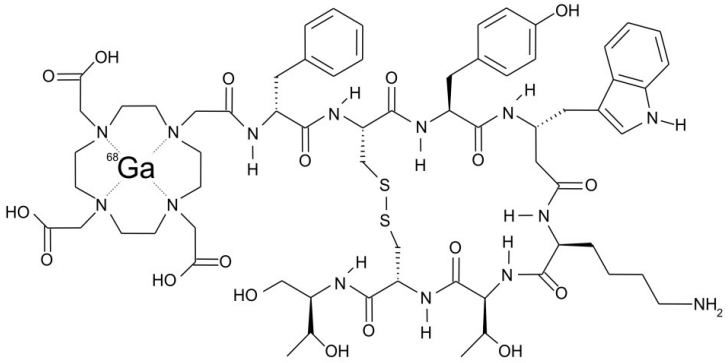
^{68}Ga-DOTATOC

Lors de notre travail, le générateur utilisé pour le marquage du DOTATOC au ^{68}Ga n'était pas encore GMP. Pour obtenir l'éluat le plus pur possible, avant le début de cette thèse nous avons mis en oeuvre des méthodes de pré-purification (non développées ici).

La pré-purification anionique est mise en place avant le marquage, afin d'éliminer le ^{68}Ge et les résidus de métaux. Le ^{68}Ga est obtenu par élution d'un générateur $^{68}Ge/^{68}Ga$ avec une solution de 5mL d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,1mol/L (sigma, 84434), cette solution est ensuite mélangée à 5mL d'HCl 12 mol/L (sigma) afin d'obtenir une molarité d'environ 6 mol/L. Le tout est envoyé sur une colonne anionique (Oasis WAX, Waters) conditionnée par 1mL d'éthanol (EtOH) 100%, puis 1mL d'HCl 5 mol/L. Deux rinçages sont ensuite faits avec 500µL de NaCl 5 mol/L puis 500µL d'EtOH 100%. Le ^{68}Ga est élué de la colonne par 1,5mL d'eau trace select (Sigma-Aldrich). Ces 1,5mL de ^{68}Ga sont mélangés avec 25 µL (17nmol) de DOTATOC (1mg/mL, masse molaire: 1421,64 $g.mol^{-1}$) et 320 µL d'acétate 0,8 mol/L pour tamponner la

solution à pH 4. Le radiomarquage se fait grâce à un chauffage du milieu réactionnel pendant 10 minutes à 95°C. Le radioligand est ensuite purifié afin d'éliminer le ^{68}Ga par passage sur une colonne SepPak C18 (Waters) conditionnée par 2 mL d'EtOH et 2 mL d'H_2O. Le ^{68}Ga-DOTATOC est élué avec 800µL d'EtOH 100%. L'EtOH est évaporé pendant 3 minutes à 70°C sous flux d'argon et le produit est dilué dans 1mL de sérum physiologique. Une fois le produit obtenu (Figure 14), une fraction de celui-ci est analysée en HPLC afin de vérifier la pureté radiochimique (Figure 15).

Figure 14: ^{68}Ga-DOTA-[Tyr3]-octréotide ou ^{68}Ga-édotréotide

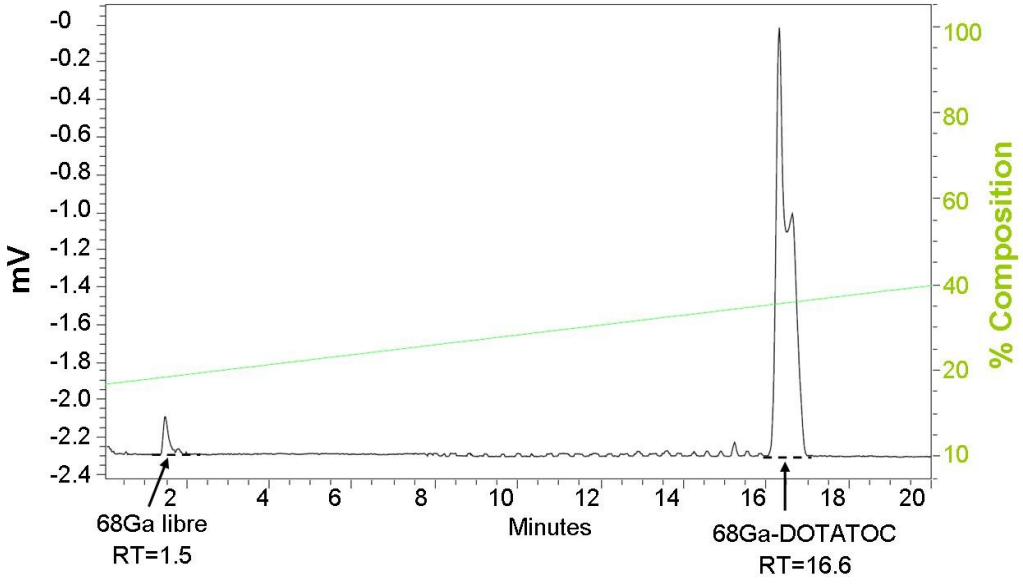


Les conditions d'HPLC utilisées pour le ^{68}Ga-DOTATOC ➔ colonne C18 Symmertry (Waters) 5µm, 4.6x150mm

Phase A: 100% H_2O + 0,01% de TFA
Phase B: 100% ACN + 0,01% de TFA
Gradient de 18% de phase B à 40% en 20 minutes

Le produit est décroché environ à 35% de la phase B, donnant un temps de rétention (RT) entre 16 et 17 minutes.

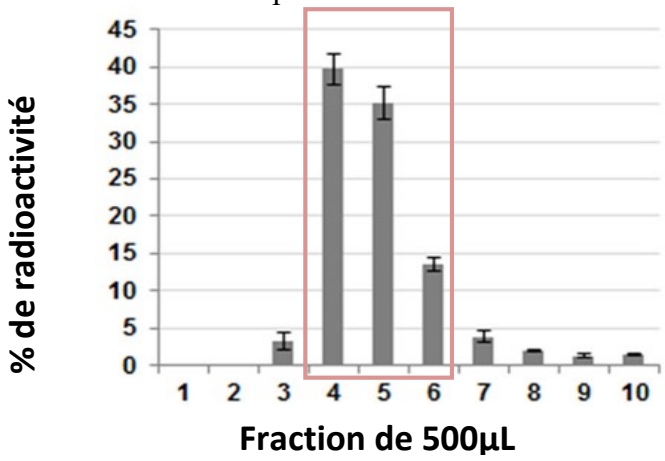
Figure 15: Chromatogramme HPLC du ^{68}Ga-DOTATOC



^{68}Ga-RGD

Pour le marquage du NODAGA-RGDfK, la méthode utilisée est dite par fractionnement. Cette méthode consiste à éluer le générateur ^{68}Ge/^{68}Ga par de l'HCl 0,1mol/L et permet de récupérer la fraction la plus concentrée en ^{68}Ga dans un volume d'environ 1,2 ± 0.1 mL. En effet lors du passage de l'HCl dans la colonne de TiO2 où est greffé le ^{68}Ge, le ^{68}Ga n'est pas décroché de façon homogène ; ainsi dans le volume d'HCl la concentration en $^{68}Ga^{3+}$ est plus ou moins importante selon la fraction de l'éluat choisi (Figure 16).

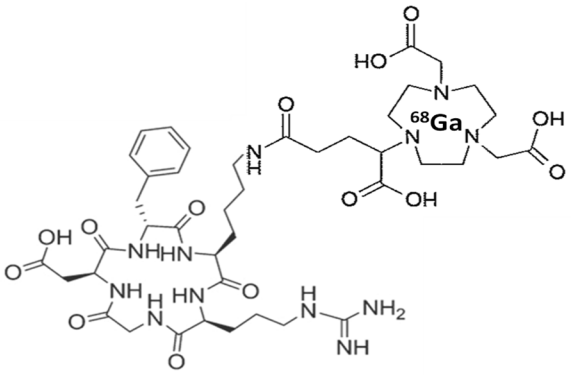
Figure 16: Profil d'une élution réalisée par méthode de fractionnement



L'éluat le plus concentré en gallium-68 se trouve dans les fractions 4, 5 et 6. Cette méthode permet d'éliminer les premières fractions, où il reste potentiellement du zinc provenant de la décroissance du gallium-68 depuis la dernière élution, et les dernières fractions qui contiennent potentiellement du germanium-68.

Une fois l'éluat récupéré, le ^{68}Ga est mélangé avec 150µL soit 7,5nmol (50µg/mL) de NODAGA-RGDfK (masse molaire: 961,03 g.mol^{-1}) et 180 µL d'acétate 0,8 mol/L pour tamponner la solution à pH 4, puis ensuite chauffé pendant 10 minutes à 40°C. Le radioligand est ensuite purifié afin d'éliminer le ^{68}Ga libre par une SepPak C18 light (Waters) conditionnée par 2 mL d'EtOH et 2 mL d'H_2O. Le ^{68}Ga-NODAGA-RGDfK est élué avec 800µL d'EtOH 100%. L'EtOH est évaporé pendant 3 minutes à 70°C sous flux d'argon et le produit est dilué dans 1mL de sérum physiologique. Une fois le produit obtenu (Figure 17), tout comme pour ^{68}Ga-DOTATOC, une fraction est analysée en HPLC afin de vérifier la pureté radiochimique (Figure 18).

Figure 17 : ^{68}Ga-NODAGA-RGDfK (^{68}Ga-RGD)

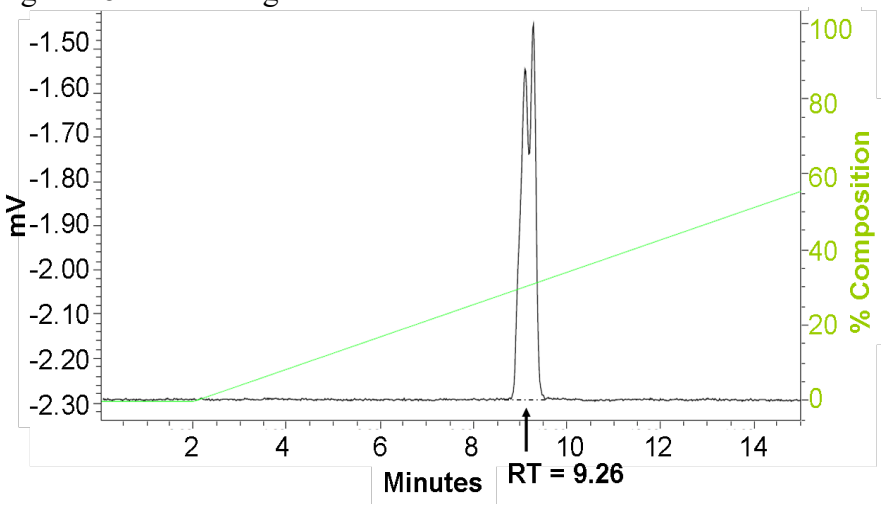


Les conditions d'HPLC utilisées ➔ colonne XDB-C18 Eclipse (Agilent) 5µm, 4.6x150mm

Phase A: 100% H_2O + 0.01% de TFA
Phase B: 100% ACN + 0.01% de TFA
Gradient de 0% de phase B à 55 % en 13 minutes

Le produit est décroché environ à 30% de la phase B, donnant un temps de rétention (RT) entre 9 et 10 minutes.

Figure 18: Chromatogramme HPLC du ^{68}Ga-RGD



2.2 Radiomarquage au fluor-18

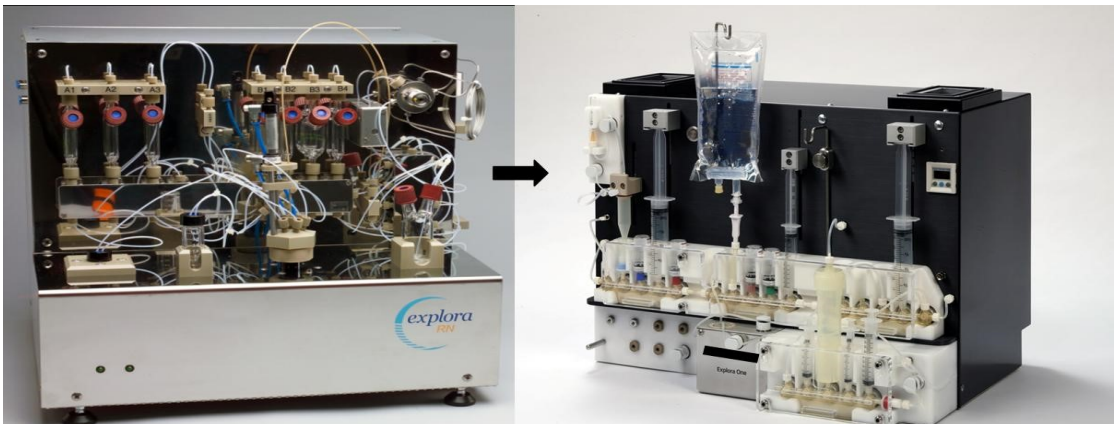
^{18}F-RGD-K5

La mise en place du marquage au fluor-18 a été effectuée au sein du laboratoire de PETNET Solutions (Lisses, France). Le développement du marquage a été étudié pour que le produit soit injectable à l'Homme. De ce fait, il a fait l'objet d'un plus grand nombre de contraintes que les marquages réalisés au gallium-68 qui étaient prévus pour une utilisation préclinique.

La méthode de marquage du produit a déjà été décrite en 2012 par Doss et col. [100]. Initialement, elle a été développée aux USA sur un module Siemens Explora®. Cependant, ce

module n'étant pas utilisable pour respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication Françaises (BPF), il a fallu développer le marquage du RGD-K5 sur le module Siemens Explora I (Figure 19). L'intérêt principal du module Explora I est que, contrairement au module Explora, il fonctionne avec des réacteurs et tubulures (cassettes de marquage) à usage unique.

Figure 19: Schéma des modules Explora et Explora I



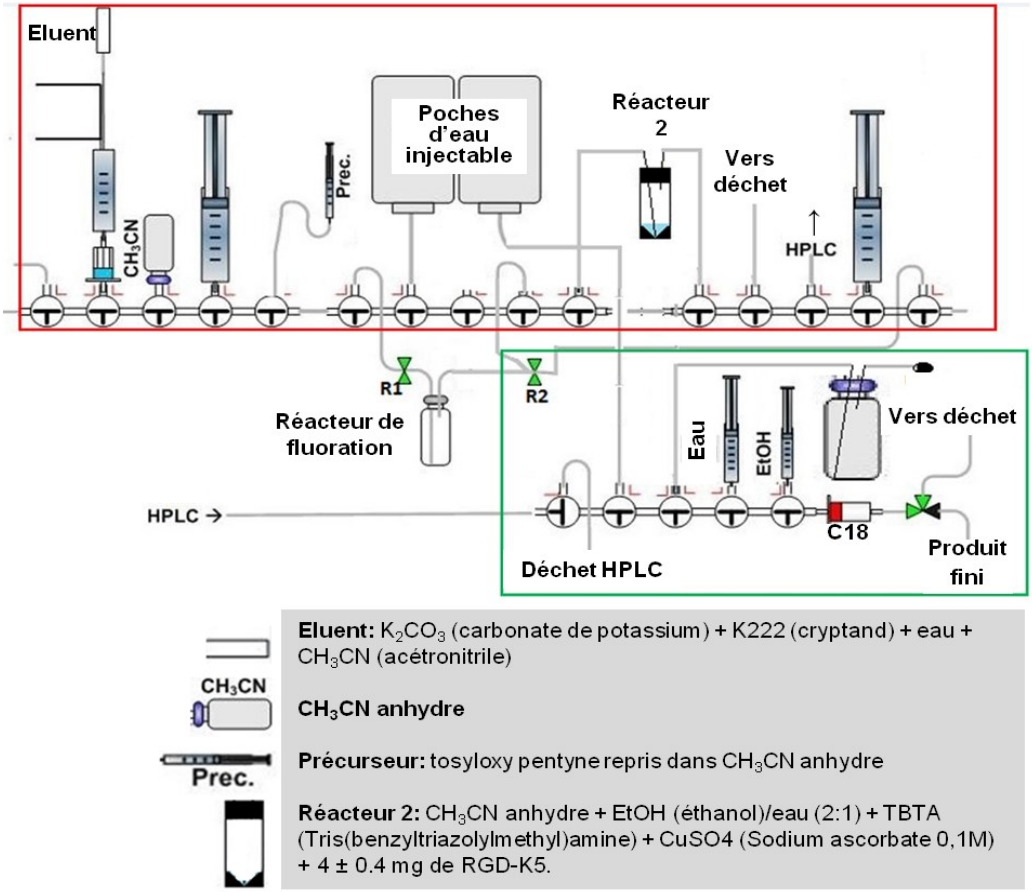
Ainsi il a fallu développer une cassette adéquate pour ce marquage en partant des cassettes déjà existantes utilisées pour le marquage du FDG.

Le marquage du ^{18}F-RGD-K5 comprend les étapes suivantes:

- Production du fluor-18 (Cyclotron)
- Séchage du fluor-18
- Fluoration
- Distillation du premier intermédiaire de synthèse (Fluoropentyne)
- Réaction de « click-chemistry »
- Purification HPLC du produit final
- Reformulation du produit final pour le rendre injectable

La constitution de la cassette de marquage a été imaginée en deux parties présentées dans la figure 20.

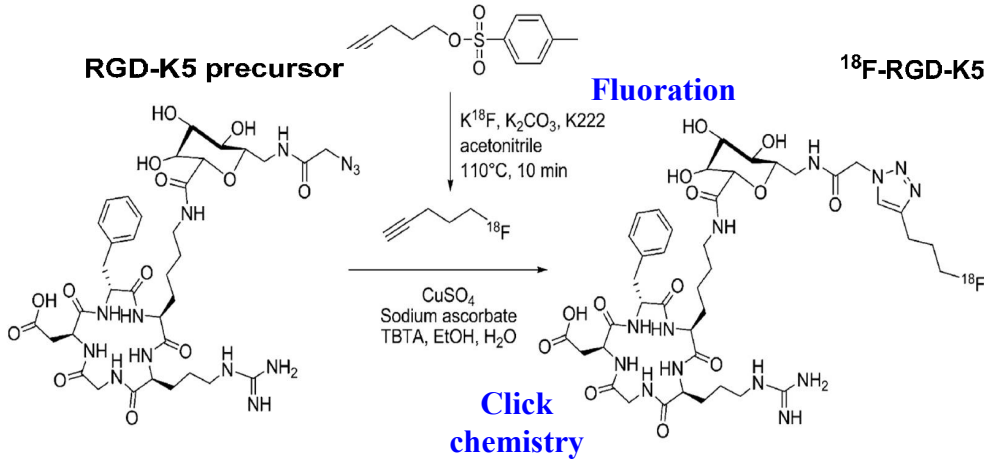
Figure 20 : Schéma de la cassette de marquage
Cadre rouge : partie supérieure pour la chimie jusqu'à l'injection a en HPLC semi-préparative
Cadre vert : partie inférieure pour la reformulation afin de rendre le produit injectable



Tous les marquages ont été réalisés à partir d'environ 320 GBq de ^{68}Ga. La « click chemistry » utilisée dans cette synthèse a fait l'objet d'un brevet pour le radiomarquage de composés pharmaceutiques comprenant des polypeptides cycliques (US7666392, 23 févr. 2010 Siemens Medical Solutions Usa, Inc.).

L'étape appelée de fluoration est le passage du 4-tosyloxypentyne en présence de fluor-18 conduisant à l'intermédiaire ^{18}F-pentyne. Cet intermédiaire est purifié par distillation par chauffage à 110°C pendant 10 min. La réaction « click chemistry » correspond au marquage de la molécule, le ^{18}F-fluoropentyne avec les 4 ± 0,4 mg de précurseur de RGD-K5, acide 2-((2S,5R,8S,11S)-5-benzyl-8-(4-((2S,3R,4R,5R,6S)-6-((2-(4-(3-18-fluoropropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acétamido)méthyl)-3,4,5-trihydroxytétrahydro-2H-pyran-2carboxamido) butyl)-11-(3-guanidinopropyl)-3,6,9,12,15-pentaoxo 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane-2-yl) acétique (989,11 g.mol^{-1}) (Figure 21).

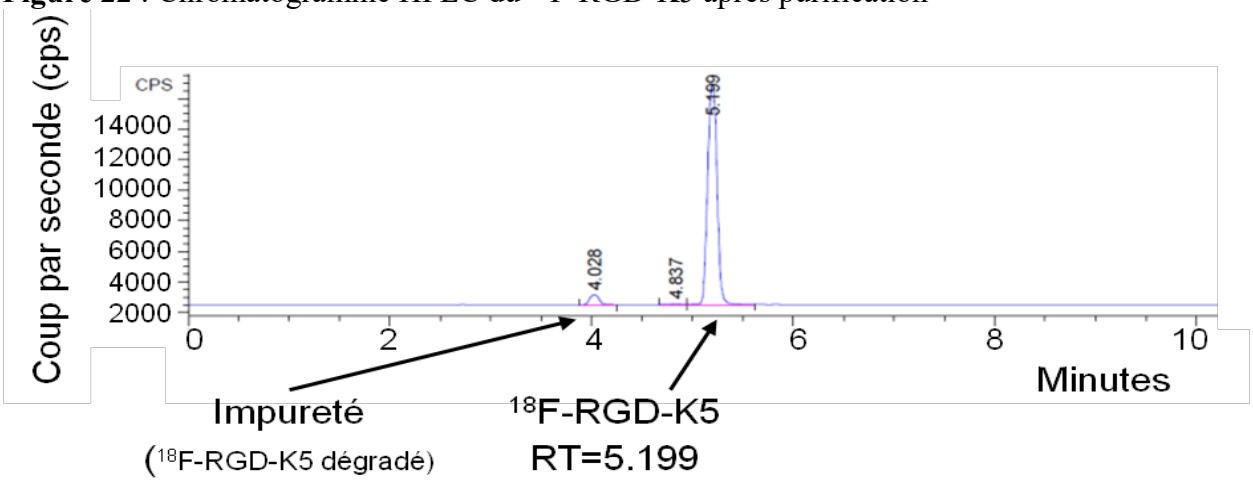
Figure 21 : Schéma de radio-marquage du ^{18}F-RGD-K5



La purification du mélange réactionnel est réalisée par HPLC semi-préparative, à la différence des marquages au gallium-68. La totalité du produit fini est concentrée sur une colonne HPLC (C18 Gemini (Phenomenex) 5µm, 4.6x150mm) afin de ne récupérer ^{18}F-RGD-K5 et d'éliminer le plus d'impuretés possibles. Le ^{18}F-RGD-K5 est purifié en 27 minutes grâce à un gradient allant de 100% à 82% de phase A (phase A: 100% H_2O + 0,01% de TFA, phase B: 100% ACN + 0,01% de TFA). La fraction recueillie est ensuite reformulée sous la forme d'une solution d'eau injectable à 10% d'éthanol via une colonne C18. Différents contrôles sont réalisés pour approuver la qualité du produit, dont une analyse en HPLC présentée en figure 22.

Conditions d'HPLC ➔ colonne C18 Symmertry (Waters) 5µm, 4.6x150mm. Phase A: 100% H_2O + 0.01% de TFA, phase B: 100% ACN + 0.01% de TFA. Gradient de 100% de phase A à 82% en 20 minutes

Figure 22 : Chromatogramme HPLC du ^{18}F-RGD-K5 après purification



2.3 Contrôles de qualité des marquages

Pour chaque radiotraceur, qu'il soit marqué au gallium-68 ou au fluor-18, certains contrôles sont réalisés pour vérifier l'intégrité du produit (Tableau 6). Bien entendu le RGD-K5 marqué au fluor-18 injectable à l'Homme est bien plus contrôlé que les deux autres.

Tableau 6 : Contrôles des produits radiomarqués

	^{68}Ga-		^{18}F-
	DOTATOC	RGD	RGD-K5
Activité volumique	≥ 0.3MBq/mL		500 ± 50 MBq/mL
Activité spécifique	≥ 4MBq/nmol		≥ 14.8MBq/nmol
Pureté chimique	NA		Acetonitrile: < 0.04% w/w Ethanol: 4.0-8.8% w/w K222 ≤ 50 µg/mL
Pureté radiochimique	≥ 95 %		≥ 95 %
Apparence du produit	pas de particules, solution limpide		
pH	~7		5- 7.5
Identité du radionucléide	NA		t1/2 = 105 to 115 min
Pureté radionucléique	NA		99.5% emissions gamma de 511 keV
Stérilité	NA		1:50 dilution; < 175 EU/Vmax Vérification à 14 jours pas de signe de croissance bactérienne.

2.4 Modèle animaux :

Toutes les expérimentations réalisées sur les animaux ont été faites selon la réglementation européenne.

-Modèle NB :

Généralités

- Tumeur du système nerveux sympathique périphérique
- 20% des cancers chez l'enfant
- Diagnostic difficile
- Présence de récepteurs à la SST2

- A la frontière avec les tumeurs neuroendocrines

Les tumeurs expérimentales dérivent de lignées cellulaires de NB humains, trois lignées IMR32 (ATCC®), CLB-Ga et CLB-Bar originaire du centre Léon Bérard (Lyon) fournies par l'Institut Curie. Caractéristiques de ces modèles issus des lignées:

CLB-Ga et CLB-Bar sont issus de métastases de la moelle osseuse [137, 138].
IMR32 est issus d'une métastase abdominale d'un patient de 13 mois en 1967 [139].

- Modèle de GB :

Généralités

- Tumeur cérébrale
- Astrocytome de grade IV
- Très agressif
- Très mauvais pronostic
- Exprime fortement les intégrines αvβ3

Les tumeurs expérimentales dérivent de la lignée cellulaire de GB humains, U87MG (ATCC®). Cette lignée dérive d'un gliome de grade IV d'un patient en 1966 [140].

- **Modèle de carcinome pulmonaire :**

Généralités

- Adénocarcinome bronchique : 40% de l'ensemble des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC)
- Exprime faiblement les intégrines αvβ3
- Très peu décrit pour la visualisation de l'angiogenèse tumorale en imagerie TEP RGD.

Les tumeurs expérimentales dérivent de la lignée cellulaire A549 (ATCC®). Cette lignée dérive de tissu carcinomateux pulmonaire d'un homme caucasien de 58 ans [141].

Résultats

Partie 1 : Comparaison du ^{68}Ga-DOTATOC et du FDG dans des modèles de neuroblastome.

INTRODUCTION

Les NB sont des tumeurs embryonnaires malignes dues à la mauvaise maturation des neuroblastes, cellules du système nerveux sympathique. Ces tumeurs pédiatriques peuvent se développer en n'importe quel point de l'organisme où existent des structures nerveuses sympathiques. Les causes du NB sont actuellement mal connues. Deux gènes principaux ont été identifiés comme des acteurs majeurs dans le NB, les gènes MYCN et ALK et certaines de leurs mutations été décrites par Oberthuer et col. en 2010 [142, 143]. Le diagnostic, qui reste à l'heure actuelle très difficile, se fait par différents examens cliniques, dosages dans le sang et les urines, imagerie médicale (source Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer FNCLCC); le plus souvent le NB est découvert du fait de la présence de métastases. L'imagerie par scintigraphie à la ^{123}I-métaiodobenzylguanidine (^{123}I-MIBG) est une méthode de référence pour la stadification du NB, mais elle présente plusieurs inconvénients, en particulier parce que la résolution spatiale ainsi que la sensibilité sont limitées.

Il est donc indispensable de trouver de nouveaux moyens pour l'imagerie fonctionnelle de cette tumeur.

Certains articles comparent, pour la détection du NB, la scintigraphie à la ^{123}I-MIBG à la TEP au FDG. L'étude de Kushner et col. en 2001 [144] a conclu que la TEP au FDG était plus précise pour la détection des lésions de NB dans 16 cas de discordance avec les résultats ^{123}I - MIBG. La même année, Papathanassiou et col. [145] ont rapporté des résultats discordants, en montrant que le FDG sous-évaluait la tumeur de 4 patients sur 28 (14 %), alors que la ^{123}I - MIBG évaluait correctement la tumeur sur 12 des 28 (43%) patients. Selon l'étude de Taggart et col. [146], l'imagerie ^{123}I-MIBG est significativement plus sensible que la TEP au FDG, dans la détection de l'ensemble des lésions osseuses. La même année, Sharp et col. ont insisté sur l'influence du stade du NB sur les performances du traceur, le FDG serait supérieur au stade 1 et 2 du NB, la ^{123}I-MIBG aux stades 4 du NB, en particulier pendant la chimiothérapie initiale, principalement en raison de la meilleure détection des métastases de la moelle osseuse [147]. D'un autre côté une étude clinique très récente (février 2018, European Journal of Nuclear Medicine Molecular Imaging) montre que les paramètres métaboliques et la captation des métastases de la moelle osseuse avec le FDG sont de bons facteurs prédictifs des récidives [148]. Le FDG a donc un rôle dans le diagnostique et le suivi des NB et s'est révélé fondamental lorsque l'imagerie des NB en ^{123}I-MIBG est négative [149].

La ^{18}F-FDOPA est un autre radiotraceur TEP qui s'est avéré intéressant. Quelques études ont été réalisées pour la comparer à l'imagerie ^{123}I-MIBG ainsi qu'au FDG [150, 151]. Les résultats amènent à penser que la ^{18}F-FDOPA, tout comme le FDG, est aussi un outil pour l'évaluation des NB dans la prédiction du comportement de la tumeur et pourrait compléter le système actuel de stadification.

Le ^{68}Ga-DOTATOC, comme décrit précédemment, est un radiotraceur de forte affinité pour les récepteurs de type 2 de la somatostatine (SST2) utilisé dans l'imagerie des TNE digestives. Des ligands de SSTR pour l'imagerie TEP ont été largement utilisés au cours de la dernière décennie pour les TNE et plus récemment dans le NB [50, 152]. L'utilisation de modèles animaux de NB peut être intéressante dans ce contexte, pour réduire le nombre d'études sur l'homme en comparant les traceurs TEP proposés et évaluer rapidement l'efficacité de nouveaux traitements. Étant une modalité d'imagerie fonctionnelle, la TEP permet la prédiction précoce de la réponse tumorale au traitement dans des modèles divers de cancers humains. À ce jour, la capacité de prédiction d'un traceur TEP dans des modèles animaux de NB a été signalée avec le FDG et la FLT, un autre traceur métabolique non spécifique [153-155] ainsi qu'avec la MIBG marquée avec ^{124}I [156], un émetteur de positons avec des propriétés physiques et dosimétriques moins favorables que ^{18}F ou ^{68}Ga.

L'objectif de cette première étude était de déterminer si ^{68}Ga-DOTATOC pouvait être un meilleur traceur que le FDG pour l'imagerie des modèles de NB dans les études précliniques, en tenant compte chez l'homme de l'hétérogénéité d'expression SSTR2 des tumeurs NB. Nous avons mesuré la captation tumorale, par rapport avec le bruit de fond, en utilisant le FDG comme traceur métabolique non spécifique et le ^{68}Ga-DOTATOC comme ligand des SSTR2 [152, 157]. Trois lignées cellulaires différentes ont été choisies pour des xénogreffes de souris nudes, en supposant qu'elles puissent exprimer SSTR2 avec une intensité différente. Les mesures ont été réalisées *in vivo* en utilisant l'imagerie TEP pour les deux traceurs et la quantification *ex vivo* avec un compteur gamma pour ^{68}Ga-DOTATOC seulement.

1er article

ANTICANCER RESEARCH *36*: 4459-4466 (2016)
doi:10.21873/anticanres.10990

^{68}Ga-DOTATOC and FDG PET Imaging of Preclinical Neuroblastoma Models

CLAIRE PROVOST[1], AURÉLIE PRIGNON[1], ALEX CAZES[2,3], VALÉRIE COMBARET[4], OLIVIER DELATTRE[2,3], ISABELLE JANOUEIX-LEROSEY[2,3], FRANÇOISE MONTRAVERS[1,5] and JEAN-NOËL TALBOT[1,5]

[1]*Positronic Molecular Imaging Laboratory LIMP, UMS028, Pierre and Marie Curie University, Paris, France;*
[2]*Inserm U830, Paris, France;*
[3]*Centre for Research, Curie Institute, Paris, France;*
[4]*Laboratory of Translational Research, Léon Bérard Centre, Lyon, France;*
[5]*Department of Nuclear Medicine, Tenon Hospital, Paris, France*

Abstract. *Background/Aim: Somatostatine receptors subtype 2 (SSTR2) are regarded as a potential target in neuroblastoma (NB) for imaging and promising therapeutic approaches. The purpose of this study was to evaluate and compare the SSTR2 status by ^{68}Ga-[tetraxetan-D-Phe1, Tyr3]-octreotide (^{68}Ga-DOTATOC) positron-emission tomography (PET) and the tumour metabolic activity by ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) PET in different experimental models of NB. Materials and Methods: Three cell lines of human NB with different levels of expression of SSTR2 were grafted into nude mice. Animals were imaged with FDG and ^{68}Ga-DOTATOC and the maximum standardized uptake value (SUVmax) was determined to quantify tracer uptake. Ex vivo biodistribution of ^{68}Ga-DOTATOC and immunohistochemical analysis of NB xenografts were performed. Results: Compared with FDG, the SUVmax of ^{68}Ga-DOTATOC uptake by the tumour was lower but the ratio to background was higher; there was a strong positive correlation between SUVmax values observed with the two tracers (r^2=0.65). Sorting the cell lines according to uptake of FDG or ^{68}Ga-DOTATOC, injected activity per gram of tissue, Ki67 index or expression of SSTR2 assessed visually led to the same classification. Conclusion: ^{68}Ga-DOTATOC allows preclinical imaging of NB according to the intensity of the expression of SSTR2. In contrast with what has been reported for neuroendocrine tumours, in this NB model, the ^{68}Ga-DOTATOC uptake was positively correlated with FDG uptake and with Ki67 index, usual markers of tumour aggressiveness. If confirmed in humans, this result would favour a theranostic application of ^{68}Ga-DOTATOC in NB, even in advanced stages.*

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Claire Provost, LIMP Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positonique, Hôpital Tenon 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France. Tel: +33 156017298, Fax: +33 156017298, e-mail: claire.provost@upmc.fr

Key Words: PET, neuroblastoma model, somatostatin receptor subtype 2, FDG, ^{68}Ga-DOTATOC.

Neuroblastoma (NB) is the most common extra-cranial solid cancer in human childhood. It arises anywhere along the sympathetic nervous system (1, 2). At present, its diagnosis is difficult. ^{123}Iodine-metaiodobenzylguanidine (^{123}I-MIBG) is currently the reference tracer for single photon-emission computed tomography (SPECT).

Another approach using SPECT imaging for SSTR with the somatostatin analogue ^{111}In-pentetreotide has been widely used in neuroendocrine tumours (NET) and also proposed in NB (3). Since 1994, studies have shown that SSTRs are indeed expressed by some NBs (4, 5). Georgantzi *et al.* showed that SSTR2 could be detected by immunohistochemistry in 89% of tumour specimens from 11 children with stage II-IV NB and 78% of experimental tumours derived from five human NB cell lines (6).

SPECT imaging has disadvantages, in particular its limited spatial resolution and sensitivity, and the long duration of image acquisition. PET is becoming the leading functional modality in cancer imaging, as it yields better image resolution, the procedure lasts a shorter time, and a more accurate quantification can be obtained, as compared to SPECT.

At the moment, only a few clinical studies have reported PET imaging in human NB, using metabolic tracers such as the amino acid analogue ^{18}F-fluorodopa (7) or the glucose analogue FDG (8, 9). Somatostatin analogues designed for PET imaging of SSTR are also available. ^{68}Ga-[tetraxetan-D-Phe1, Tyr3]-octreotate (^{68}Ga-DOTATATE) and ^{68}Ga-DOTATOC are somatostatin analogues suited for PET imaging that display very high SSTR2 receptor binding. ^{68}Ga-DOTATATE has been reported for imaging of NB in children and identifying those suitable for molecular

radiotherapy with ^{177}Lu-DOTATATE (10). According to the study of Kroiss *et al.*, ^{68}Ga-DOTATOC may be superior to ^{123}I-MIBG scintigraphy and even to the reference CT/magnetic resonance imaging technique in providing particularly valuable information for pre-therapeutic staging of phaeochromocytoma and NB (11).

The use of animal models of NB may be of interest in this context, in order to reduce the number of human studies and be useful for prediction of the efficacy of potential therapeutic regimens. To date, no preclinical studies have dealt with ^{68}Ga-DOTATOC PET in a model of NB, as far as we are aware. The ability of animal tumour models of NB to take up PET tracers has been reported with FDG in spontaneous murine NB (12, 13). Other studies compared FDG with another metabolic tracer 3'[^{18}F]-fluorothymidine in nude mice grafted with NB cell lines (14, 15) or used MIBG labelled with ^{124}I, a PET radionuclide (16).

The purpose of this study was, as first objective, to evaluate the uptake of FDG and ^{68}Ga-DOTATOC using PET imaging in three different animal models of NB, expressing SSTR2 at different levels. A second objective was to study *ex vivo* the biodistribution of ^{68}Ga-DOTATOC in these three NB animal models and correlate this analysis to immunohistochemistry in order to confirm that the tracer uptake was specific for NB.

Materials and Methods

NB cell lines. All cell lines were derived from patients with advanced stages (4s) of disease. CLB-Ga and CLB-Bar NB cell lines were established from tumour specimens obtained from stage 4 bone-marrow metastases and provided by the Léon Bérard Centre (17) and IMR32 was derived from metastatic abdominal site (ATCC LCG, Molsheim, France). Cell lines were maintained in RPMI-1640 with L glutamine (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% foetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

SSTR2 expression was measured in these cell lines by quantitative polymerase chain reaction (PCR) using the Power SYBR® Green kit. Total RNA was extracted from NB cell lines using Trizol® and RNA precipitation. Retro-transcription was then performed on 1 μg of RNA with high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA< USA). SSTR2 expression level was calculated relative to the mean expression of CLB-Bar cells and normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) expression. The following primers were used: forward 5'-tttgtggtggtcctcacctatgct-3'; reverse 5'-tctcattcagccgggatttgtcct-3'.

NB engrafts. Four nude mice (Charles River, l'Arbresle, France) per cell line were subcutaneously grafted in the right flank with 6×10^6 cells/100 μl, re-suspended in PBS and mixed 50/50 with Matrigel (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Tumours were measured twice a week with a calliper, the two perpendicular diameters were recorded, and tumour volume (cm^3) was calculated using the formula: $V=\pi/6\times l\times w^2$, in which l=length and w=width of tumour. All animal experiments were carried out in compliance with the French laws relating to the conduct of animal experimentation.

^{68}Ga-DOTATOC. DOTATOC was obtained as a lyophilisate (Iason GmBH, Graz-Seiersberg, Austria) and labelled with ^{68}Ga by means of a R&D Synchrom module (Raytest, Straubenhardt, Germany). The radiolabelling has already been described elsewhere (18). The overall decay-corrected radiochemical yield was 91 to 94%, radiochemical purity was ≥98% using analytical high-performance liquid chromatography and specific radioactivity was 1.95±0.78 MBq/nmol.

PET imaging. PET acquisitions were performed using the Mosaic animal PET machine (Philips Medical systems, Cleveland, OH, USA) on two consecutive days, 6 weeks after grafting, when tumour volume had reached 0.4 to 0.9 cm^3. Before FDG PET, mice had been fasting for 12 h with free access to water; no fast was applied for the other tracer. Approximately 5 MBq of each PET tracer was injected intravenously in the retro-orbital sinus. PET imaging was started 1 hour after FDG injection or 45 min after ^{68}Ga-DOTATOC injection. Static acquisitions were performed with an exposure time of 10 minutes. Mice were maintained under anaesthesia with 1.5% isoflurane. After acquisition, images were reconstructed and visualised as maximum intensity projection and from different slices (sagittal, transverse, coronal) to allow visual and quantitative analysis, for each animal and each PET tracer. Regions of interest were drawn, surrounding the tumour and a background region corresponding to the soft tissue contralateral to the grafted tumour, using Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). The uptake was reported as SUVmax, which was calculated as the radioactivity concentration in the ROI (kBq/mL) multiplied by the body weight (g) and divided by the radioactivity injected (kBq). Tumour to background (T/B) SUVmax ratio was also calculated.

Ex vivo biodistribution. One hour after injection of ^{68}Ga-DOTATOC, mice were sacrificed and dissected. The organs and tumours were removed, weighed and the radioactivity counted in a gamma-counter (1480 Wizard 3; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Tumour and tissue uptake was expressed as the percentage (mean±SD) of injected activity per gram of tissue (%ID/g), corrected for ^{68}Ga decay.

Immunohistochemistry. The excised tumours were embedded in paraffin according to standard procedures. The immunostaining of SSTR2 (RBK046-05; Zytomed Systems®, Berlin, Germany) was previously described (18). Haematoxylin-phloxin-safran (HPS) stain was performed for evaluating tissue appearance and proliferation was evaluated by staining of the tumour-proliferating antigen Ki67 in order to assess the tumour aggressiveness. The Ki67 index was calculated as the percentage of positively stained tumour cells among the total number of assessed malignant cells. The tumour slices were observed with an optical microscope in transmitted light (Nikon Eclipse, Champigny sur Marne, France).

Statistical analysis. All data are presented as the mean with standard error of the mean (SEM) or standard deviation (SD). Comparisons were performed using *t*-test for independent or for paired samples, accordingly. The correlation between FDG and ^{68}Ga-DOTATOC uptake was analyzed using Pearson's method to calculate the rank correlation coefficient, r. A probability value of less than 0.05 was considered as being statistically significant.

Results

Expression of the SSTR2 gene in NB cell lines. Real-time quantitative PCR showed that the CLB-Ga cells line harboured a low level of SSTR2 expression (0.49±0.82) as compared to CLB-Bar (1.15±0.21, p=0.007) and more strikingly to IMR32 (4.66±0.36, p=0.004), the difference between those two latter cell lines was not significant (Figure 1).

FDG and ^{68}Ga-DOTATOC PET. At the time of imaging, the mean tumour volume, based on calliper measurements, was 0.41±0.24 cm^3 for CLB-Ga, 0.69±0.24 cm^3 for CLB-Bar and 0.92±0.07 cm^3 for IMR32 grafts. These tumour volumes were not statistically different. On PET images, all NB tumours were clearly visualized with both tracers, allowing manual drawing of regions of interest, determination of SUVmax and calculation of the T/B ratio. One example of PET imaging obtained in the same mouse after injection of FDG and then of ^{68}Ga-DOTATOC is displayed in Figure 2.

On FDG PET, the expected biodistribution was observed, with FDG uptake in neck brown fat, in brain and in heart, and elimination of the tracer through the urinary system. Mean (±SEM) tumour SUVmax values obtained 1 h after injection of FDG are shown in Figure 3. The SUVmax was the greatest with IMR32 and the lowest with CLB-Ga, the difference being significant (p=0.008), without significant differences from CLB-Bar grafted mice Figure 3A. The mean T/B ratio did not differ significantly between CLB-Ga, CLB-Bar and IMR32 grafts (Figure 3B).

^{68}Ga-DOTATOC PET demonstrated rapid tumour uptake in 45 min and rapid clearance from the blood and all tissues, except in organs responsible for elimination (kidneys and bladder). The SUVmax was the greatest with IMR32 and the lowest with CLB-Ga, the difference being significant (p=0.04) (Figure 3A). The distribution of T/B ratios followed the same trend as that for SUVmax but no difference was significant (Figure 3B).

SUVmax was greater with FDG than with ^{68}Ga-DOTATOC but the grafts of the three cell lines were better visualised with ^{68}Ga-DOTATOC than with FDG, due to a lower background and better contrast (Figure 3A).

Ex vivo biodistribution of ^{68}Ga-DOTATOC. The biodistribution data are illustrated in Figure 4. Apart from the kidneys, NB tumours had the highest content of radioactivity with the three cell line models. The biodistribution in mice showed excretion of ^{68}Ga-DOTATOC exclusively via the urine. Kidneys had a similar retention in the three models. Other normal organs had a low DOTATOC uptake, below 1%. In the NB tumour, the %ID/g was significantly lower for CLB-Ga grafts (p=0.03) *vs.* IMR32, 1.60 but not significantly different from that of CLB-Bar.

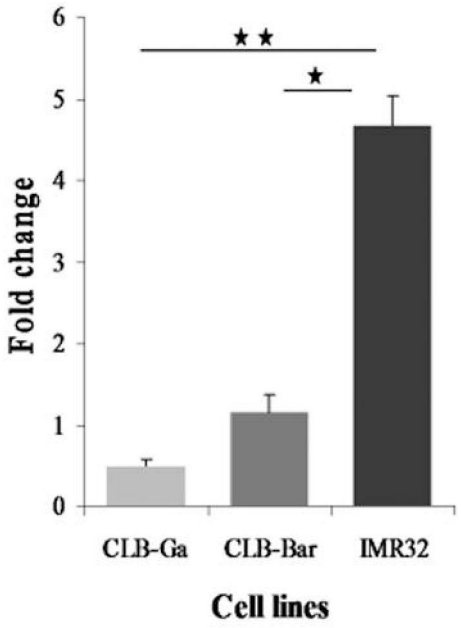


Figure 1. *Somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) expression in neuroblastoma cell lines CLB-Ga, CLB-Bar and IMR32 expressed as fold change relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Data are the mean±SD. Significantly different at *p<0.05 and **p<0.005.*

Immunohistochemistry. HPS staining confirmed that the tumours corresponded to NB. Ki67 index was 31% for CLB-Ga, 47% for CLB-Bar and 58% for IMR32. Immunohistochemistry with antibody to SSTR2 confirmed the presence of this type of receptor on the three cell lines. The labelling was more intense on the periphery of the cells and was less distinct, or even absent, inside the cells. Visually, the staining was less intense for CLB-Ga than for CLB-Bar grafts and more intense for IMR32 (Figure 5).

Relation between in vivo and ex vivo PET tracer uptake and immunohistochemistry. As expected, there was a significant correlation between the ^{68}Ga-DOTATOC %ID/g of tumour and the SUVmax for ^{68}Ga-DOTATOC in tumour (r=0.67, p=0.03). Furthermore, the uptake values of FDG and of ^{68}Ga-DOTATOC (expressed as SUVmax) by the NB tumours were positively correlated (r^2=0.65, p=0.005, Figure 6). Concordantly, sorting the cell lines according to FDG uptake, ^{68}Ga-DOTATOC uptake, Ki67 index or expression of SSTR2 assessed visually led to the same classification with all criteria: CLB-Ga < CLB-bar < IMR32 (Figure 6).

Discussion

NB is a heterogeneous childhood cancer that requires multiple imaging modalities for accurate staging and surveillance. The aim of this preclinical study was to

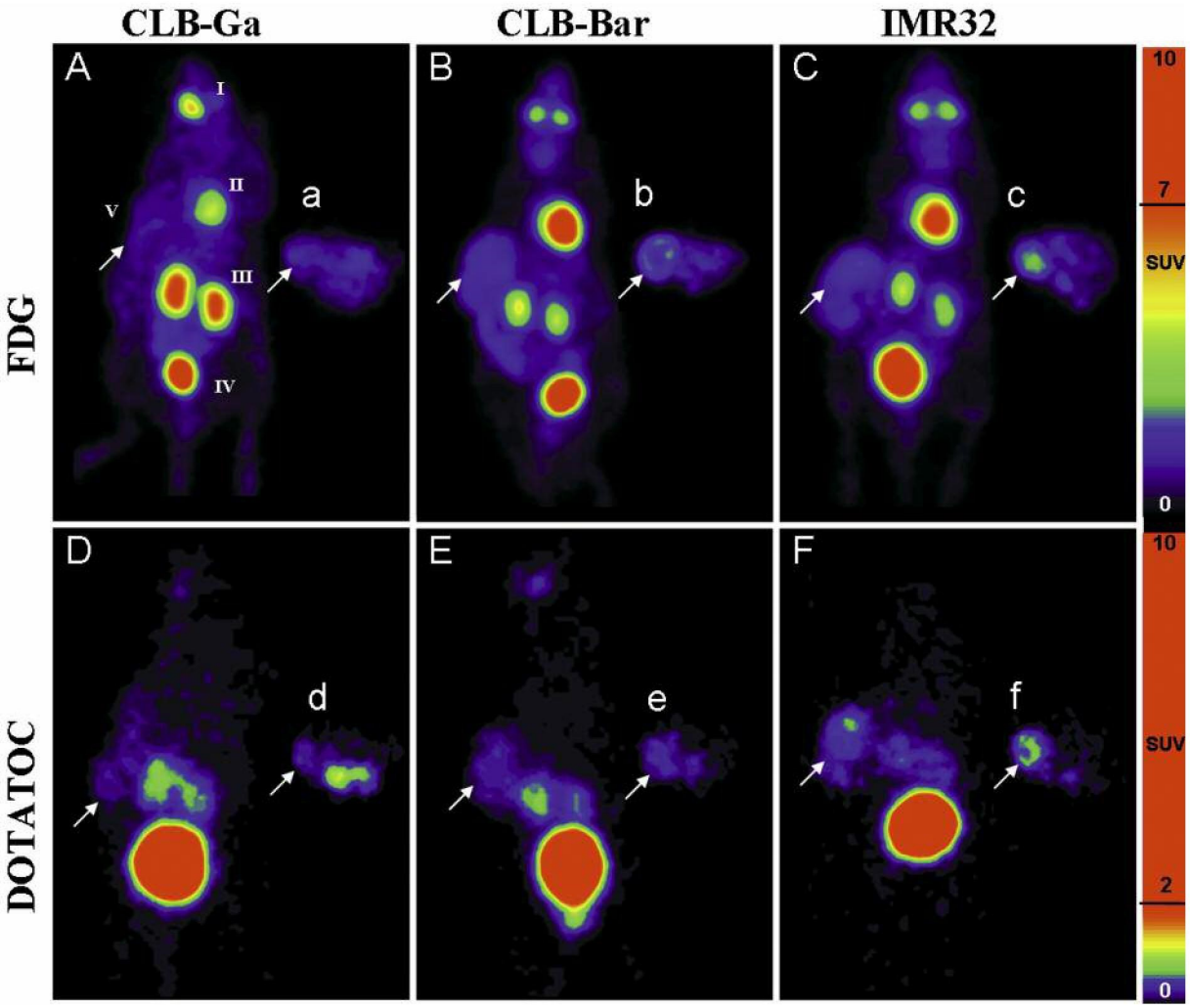


Figure 2. *Positron-emission tomography imaging with ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) (upper panel) and ^{68}Ga-[tetraxetan-D-Phe1,Tyr3]-octreotide (DOTATOC) (lower panel) in the same mice with xenografts of CLB-Ga, CLB-Bar or IMR32 cell lines. Images are shown in both transaxial (upper case letters) and coronal (lower case letters) slices. Injection site (I), heart (II), kidney (III), bladder (IV), tumour (V). Tumour volume was 0.9 cm^3 for CLB-Ga graft (A, D); 1.2 cm^3 for CLB-Bar graft (B, E) and 1.1 cm^3 for IMR32 graft (C, F).*

evaluate and compare the uptake of two tracers for PET imaging, FDG and ^{68}Ga-DOTATOC. We chose PET rather than scintigraphy for the functional molecular imaging of NB since, in humans, PET results in better image resolution and a more accurate quantification of tracer uptake that translates into better diagnostic performance. FDG, the glucose analogue, is the most widely used non-specific metabolic tracer for clinical imaging in oncology. For the detection of human NB lesions, based on their enhanced intracellular glucose transport and metabolism, FDG PET compared favourably with MIBG scintigraphy (19, 20). Even though published evidence is for the moment limited, it has been shown that ^{68}Ga-DOTATOC is also suited to the detection of human NB lesions, based on the overexpression of SSTR (11); furthermore, this capacity has been well-documented during the past decade for imaging NET. We therefore selected three different nude mouse tumour models of NB, with different in vitro expression of SSTR.

Our *in vivo* imaging results, obtained by means of ^{68}Ga-DOTATOC PET, are in accordance with the overexpression of SSTR2 observed on human NB tumours *in vitro,* already described in the literature (4, 5). Our initial assumption that these three types of NB cell lines express SSTR2 at different levels was also confirmed, leading to differential ^{68}Ga-DOTATOC uptake in experimental NB tumours. Both the uptake of ^{68}Ga-DOTATOC and the expression of SSTR2 differed according to tumour type and were the highest for IMR32, intermediary for CLB-bar and the lowest for CLB-

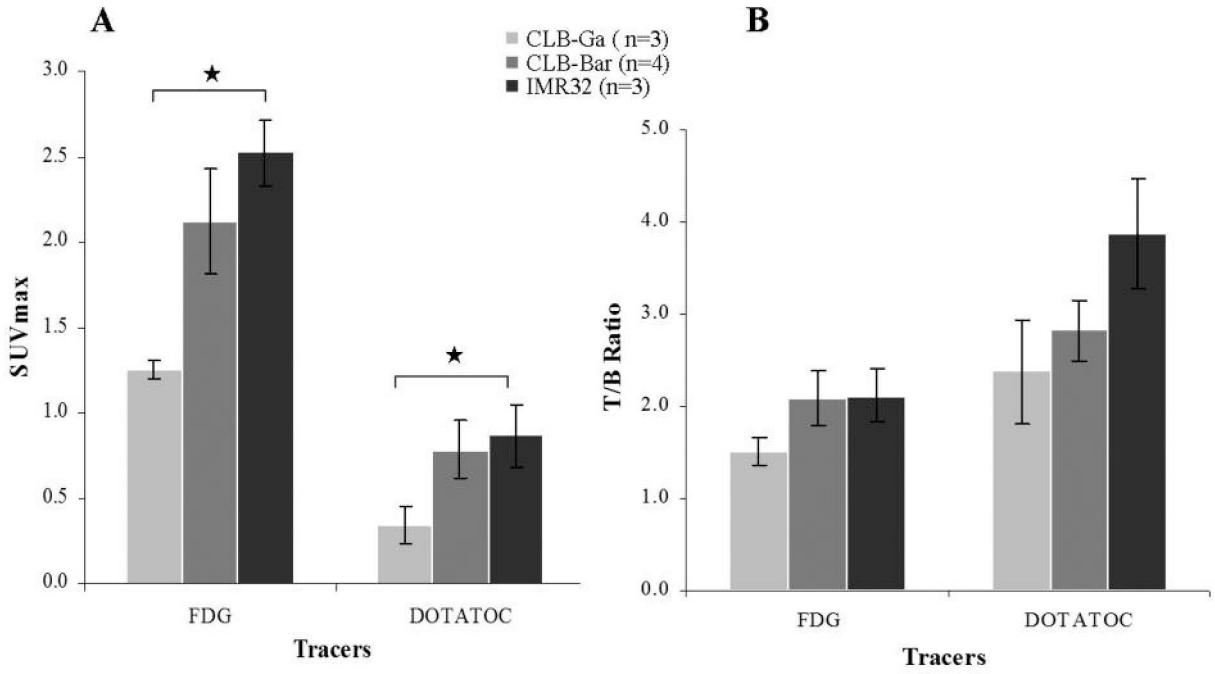


Figure 3. *Maximum standardized uptake value (SUVmax) (A) and tumour to background (T/B) ratio (B) for ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) and ^{68}Ga-[tetraxetan-D-Phe1,Tyr3]-octreotide (DOTATOC) in three different animal models engrafted with CLB-Ga, CLB-Bar or IMR32 cell lines. Data are the mean±standard error of the mean (SEM). *Significantly different at p<0.05.*

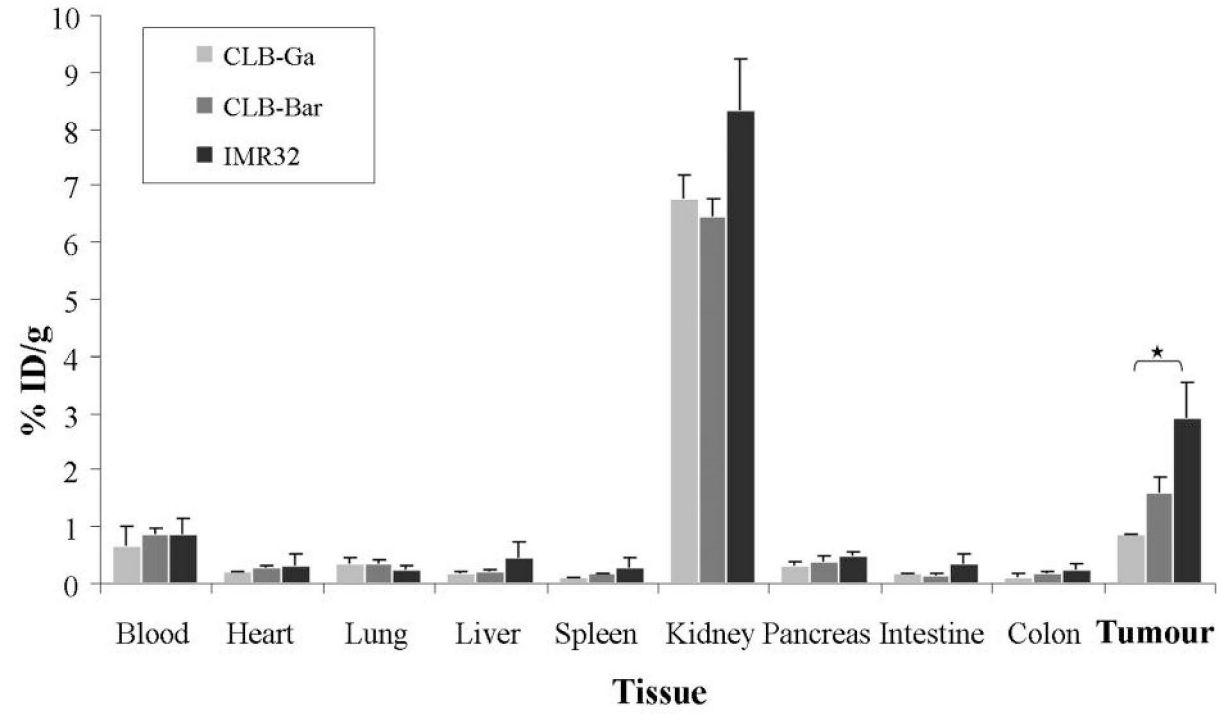


Figure 4. *Bar plot of ex-vivo ^{68}Ga-[tetraxetan-D-Phe1,Tyr3]-octreotide biodistribution as percentage injected dose per gram (%ID/g) in organs and tumour tissue from three different animal models engrafted with CLB-Ga (n=3), CLB-Bar (n=4) and IMR32 (n=3) cell lines. Data are the mean±SEM. *Significantly different at p<0.05.*

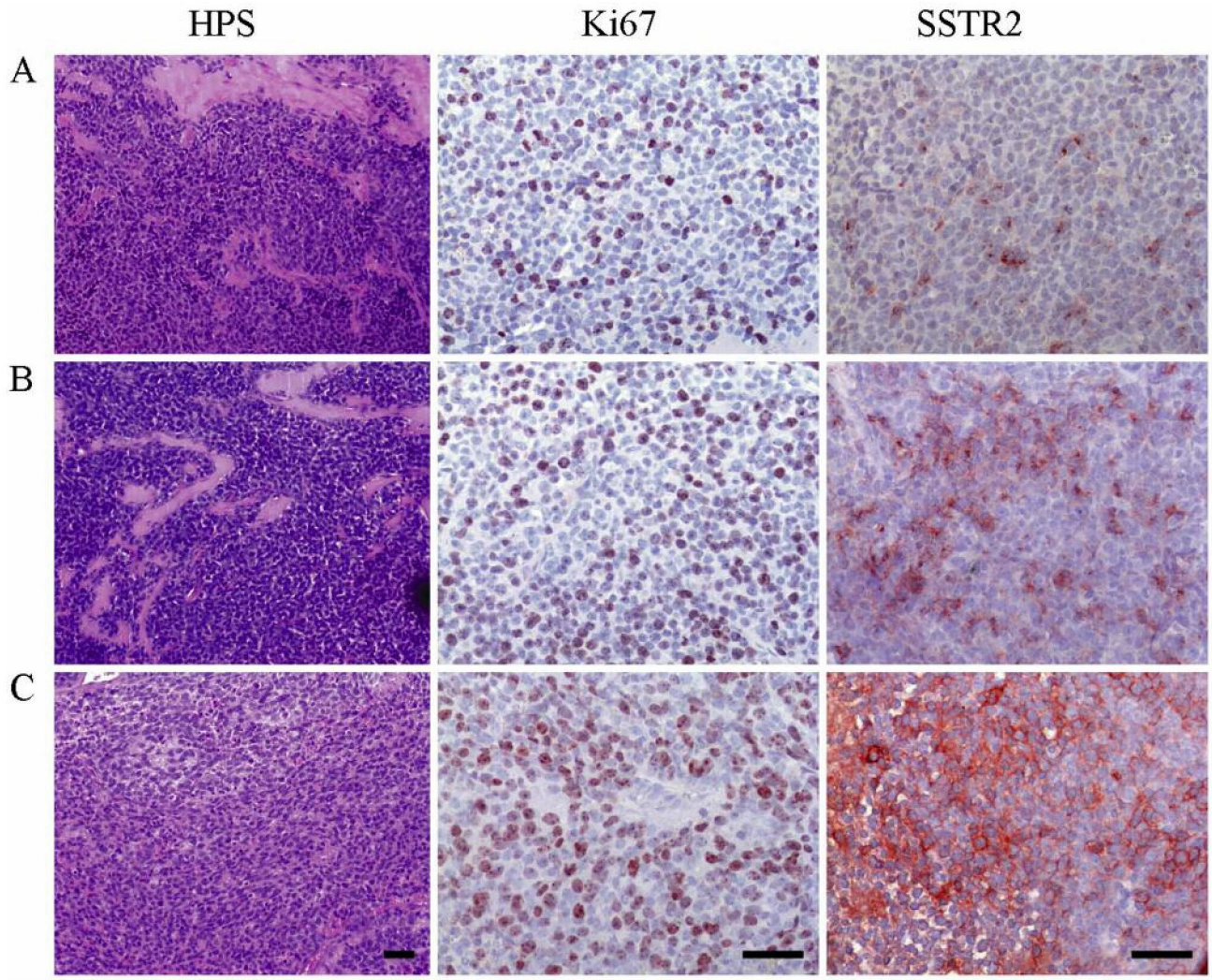


Figure 5. *Optical microscopy image for hematoxylin-phloxin-safran (HPS) (×100), Ki67 (×200) and antibody to somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) (×200) on tumours from cell lines CLB-Ga (A), CLB-Bar (B) and IMR32 (C). Scale bar=50 μm.*

Ga. This clearly confirms that *in vivo* uptake of ^{68}Ga-DOTATOC, as assessed on PET, is actually linked to the expression of SSTR2 and not to non-specific binding. Concerning the biodistribution of ^{68}Ga-DOTATOC in normal organs of nude mice, our data are consistent with those reported by other teams (21, 22), although the engrafted tumours in their studies were derived from the pancreatic tumour cell line AR4-2J, with low %ID/g in all normal organs except in the kidneys. In humans, ^{68}Ga-DOTATOC PET is significantly taken up in the pancreas, which we and another team did not observe in nude mice (23).

FDG uptake is usually correlated with tumour aggressiveness. In our study, tumour uptake of both tracers appeared to match tumour aggressiveness quantified through the determination of Ki67. A relation between tumour FDG uptake and Ki67 has been observed in preclinical and in clinical studies for many types of primary cancer, but has not been reported in NB, neither in animal models nor in humans (24). Recently a high FDG uptake (SUVmax≥ 3.31) by NB was demonstrated to be an ultra-high-risk feature that distinguished the most unfavourable genomic types in human NB (8). Surprisingly, in our NB models, the intensity of FDG uptake was also correlated with the expression of SSTR2 and therefore with ^{68}Ga-DOTATOC uptake. This result was not expected since in NET an inverse correlation has been observed: Kayani *et al.* showed a higher uptake of ^{68}Ga-DOTATATE, another somatostatin analogue, in low-

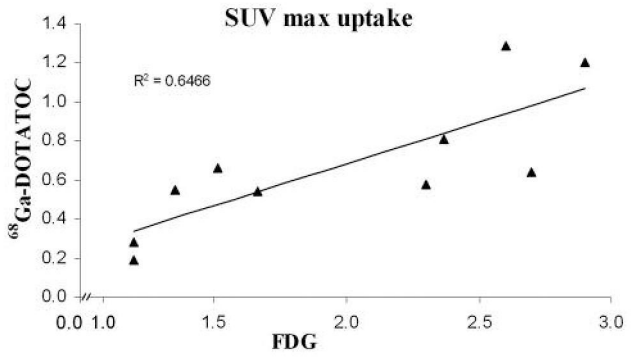


Figure 6. *Correlation of maximum standardized uptake value (SUVmax) for ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) and ^{68}Ga-[tetraxetan-D-Phe1, Tyr3]-octreotide (^{68}Ga-DOTATOC). Expression of somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) illustrated by ^{68}Ga-DOTATOC uptake correlated positively with FDG uptake value of neuroblastoma tumours with correlation coefficient R^2=0.65 and p=0.005.*

grade NET compared to high-grade NET and, conversely, the FDG uptake was higher in high-grade NET compared with low-grade NET (25). Its seems that the pattern of de-differentiation is different in NB and in NET, as our study shows that a high Ki67 is compatible with the overexpression of SSTR, paving the way for the use of 'cold' or radiolabeled somatostatin analogues as an alternative to ^{131}I-MIBG therapy.

Conclusion

For PET imaging of grafted NB tumours that express the SSTR2, FDG had a higher SUVmax than ^{68}Ga-DOTATOC, but tumour visualisation was difficult with FDG because of the high background (blood) and the lack of specificity of the tracer (Fgure 3). The contrast from the background and the visualisation of the tumours were significantly better with ^{68}Ga-DOTATOC in engrafts of the IMR32 and CLB-Bar cell lines, with a high expression of SSTR2. Our study confirms that FDG can be useful as a marker of NB cell metabolism, *e.g.* for testing new treatment regimens using PET imaging in murine models of NB. Furthermore, in animal models with spontaneous NB tumour, ^{68}Ga-DOTATOC might be superior for monitoring the effect of a treatment due to its low background and specificity. In contrast with what has been reported in NETs, in NB models used for this study, the ^{68}Ga-DOTATOC uptake was positively correlated with FDG uptake and with Ki67 index, usual markers of tumour aggressiveness. If confirmed in humans, this result would favour a theranostic application of ^{68}Ga-DOTATOC in NB, even in advanced stages.

References

1 Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M and Hedborg F: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. J Clin Oncol *11*: 1466-1477, 1993.

2 Castleberry RP: Neuroblastoma. Eur J Cancer *33*: 1430-1437; discussion 1437-1438, 1997.

3 Briganti V, Sestini R, Orlando C, Bernini G, La Cava G, Tamburini A, Raggi CC, Serio M and Maggi M: Imaging of somatostatin receptors by indium-111-pentetreotide correlates with quantitative determination of somatostatin receptor type 2 gene expression in neuroblastoma tumors. Clin Cancer Res *3*: 2385-2391, 1997.

4 Moertel CL, Reubi JC, Scheithauer BS, Schaid DJ and Kvols LK: Expression of somatostatin receptors in childhood neuroblastoma. Am J Clin Pathol *102*: 752-756, 1994.

5 Albers AR, O'Dorisio MS, Balster DA, Caprara M, Gosh P, Chen F, Hoeger C, Rivier J, Wenger GD, O'Dorisio TM and Qualman SJ: Somatostatin receptor gene expression in neuroblastoma. Regul Pept *88*: 61-73, 2000.

6 Georgantzi K, Tsolakis AV, Stridsberg M, Jakobson A, Christofferson R and Janson ET: Differentiated expression of somatostatin receptor subtypes in experimental models and clinical neuroblastoma. Pediatr Blood Cancer *56*: 584-589, 2011.

7 Piccardo A, Lopci E, Conte M, Garaventa A, Foppiani L, Altrinetti V, Nanni C, Bianchi P, Cistaro A, Sorrentino S, Cabria M, Pession A, Puntoni M, Villavecchia G and Fanti S: Comparison of ^{18}F-DOPA PET/CT and ^{123}I-MIBG scintigraphy in stage 3 and 4 neuroblastoma: a pilot study. Eur J Nucl Med Mol Imaging *39*: 57-71, 2012.

8 Liu YL, Lu MY, Chang HH, Lu CC, Lin DT, Jou ST, Yang YL, Lee YL, Huang SF, Jeng YM, Lee H, Miser JS, Lin KH, Liao YF, Hsu WM and Tzen KY: Diagnostic FDG and FDOPA positron-emission tomography scans distinguish the genomic type and treatment outcome of neuroblastoma. Oncotarget *7*: 18774-18786, 2016.

9 Papathanasiou ND, Gaze MN, Sullivan K, Aldridge M, Waddington W, Almuhaideb A and Bomanji JB: ^{18}F-FDG PET/CT and ^{123}I-metaiodobenzylguanidine imaging in high-risk neuroblastoma: diagnostic comparison and survival analysis. J Nucl Med *52*: 519-525, 2011.

10 Gains JE, Bomanji JB, Fersht NL, Sullivan T, D'Souza D, Sullivan KP, Aldridge M, Waddington W and Gaze MN: ^{177}Lu-DOTATATE molecular radiotherapy for childhood neuroblastoma. J Nucl Med *52*: 1041-1047, 2011.

11 Kroiss A, Putzer D, Uprimny C, Decristoforo C, Gabriel M, Santner W, Kranewitter C, Warwitz B, Waitz D, Kendler D and Virgolini IJ: Functional imaging in phaeochromocytoma and neuroblastoma with ^{68}Ga-DOTA-Tyr 3-octreotide positron emission tomography and 123I-metaiodobenzylguanidine. Eur J Nucl Med Mol Imaging 38: 865-873, 2011.

12 Cazes A, Lopez-Delisle L, Tsarovina K, Pierre-Eugene C, De Preter K, Peuchmaur M, Nicolas A, Provost C, Louis-Brennetot C, Daveau R, Kumps C, Cascone I, Schleiermacher G, Prignon A, Speleman F, Rohrer H, Delattre O and Janoueix-Lerosey I: Activated ALK triggers prolonged neurogenesis and RET up-regulation providing a therapeutic target in ALK-mutated neuroblastoma. Oncotarget *5*: 2688-2702, 2014.

13 Quarta C, Cantelli E, Nanni C, Ambrosini V, D'Ambrosio D, Di Leo K, Angelucci S, Zagni F, Lodi F, Marengo M, Weiss WA, Pession A, Tonelli R and Fanti S: Molecular imaging of neuroblastoma progression in TH-MYCN transgenic mice. Mol Imaging Biol *15*: 194-202, 2013.

14 Valentiner U, Haane C, Peldschus K, Gustke H, Brenner W, Wilke F, Pommert A, Owsijewitsch M, Schumacher U and Klutmann S: [^{18}F]FDG and [^{18}F]FLT PET-CT and MR imaging of human neuroblastomas in a SCID mouse xenograft model. Anticancer Res *28*: 2561-2568, 2008.

15 Krieger-Hinck N, Gustke H, Valentiner U, Mikecz P, Buchert R, Mester J and Schumacher U: Visualisation of neuroblastoma growth in a Scid mouse model using [^{18}F]FDG and [^{18}F]FLT-PET. Anticancer Res *26*: 3467-3472, 2006.

16 Seo Y, Gustafson WC, Dannoon SF, Nekritz EA, Lee CL, Murphy ST, VanBrocklin HF, Hernandez-Pampaloni M, Haas-Kogan DA, Weiss WA and Matthay KK: Tumor dosimetry using [^{124}I]m-iodobenzylguanidine microPET/CT for [^{131}I]m-iodobenzylguanidine treatment of neuroblastoma in a murine xenograft model. Mol Imaging Biol *14*: 735-742, 2012.

17 Schleiermacher G, Raynal V, Janoueix-Lerosey I, Combaret V, Aurias A and Delattre O: Variety and complexity of chromosome 17 translocations in neuroblastoma. Genes Chromosomes Cancer *39*: 143-150, 2004.

18 Chereau E, Durand L, Frati A, Prignon A, Talbot JN and Rouzier R: Correlation of immunohistopathological expression of somatostatin receptor-2 in breast cancer and tumor detection with ^{68}Ga-DOTATOC and ^{18}F-FDG PET imaging in an animal model. Anticancer Res *33*: 3015-3019, 2013.

19 Bleeker G, Tytgat GA, Adam JA, Caron HN, Kremer LC, Hooft L and van Dalen EC: ^{123}I-MIBG scintigraphy and ^{18}F-FDG-PET imaging for diagnosing neuroblastoma. Cochrane Database Syst Rev *9*: CD009263, 2015.

20 Dhull VS, Sharma P, Patel C, Kundu P, Agarwala S, Bakhshi S, Bhatnagar V, Bal C and Kumar R: Diagnostic value of ^{18}F-FDG PET/CT in paediatric neuroblastoma: comparison with ^{131}I-MIBG scintigraphy. Nucl Med Commun *36*: 1007-1013, 2015.

21 Ugur O, Kothari PJ, Finn RD, Zanzonico P, Ruan S, Guenther I, Maecke HR and Larson SM: Ga-66 labeled somatostatin analogue DOTA-DPhe1-Tyr3-octreotide as a potential agent for positron emission tomography imaging and receptor mediated internal radiotherapy of somatostatin receptor positive tumors. Nucl Med Biol *29*: 147-157, 2002.

22 Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B and Scholz A: An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression. Neuroendocrinology *87*: 233-242, 2008.

23 Zhang H, Moroz MA, Serganova I, Ku T, Huang R, Vider J, Maecke HR, Larson SM, Blasberg R and Smith-Jones PM: Imaging expression of the human somatostatin receptor subtype-2 reporter gene with ^{68}Ga-DOTATOC. J Nucl Med *52*: 123-131, 2011.

24 Ito M, Shien T, Kaji M, Mizoo T, Iwamoto T, Nogami T, Motoki T, Taira N, Doihara H and Miyoshi S: Correlation between 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography and clinicopathological features in invasive ductal carcinoma of the breast. Acta Med Okayama *69*: 333-338, 2015.

25 Kayani I, Bomanji JB, Groves A, Conway G, Gacinovic S, Win T, Dickson J, Caplin M and Ell PJ: Functional imaging of neuroendocrine tumors with combined PET/CT using ^{68}Ga-DOTATATE (DOTA-DPhe1,Tyr3-octreotate) and ^{18}F-FDG. Cancer *112*: 2447-2455, 2008.

Received July 7, 2016
Revised July 29, 2016
Accepted August 1, 2016

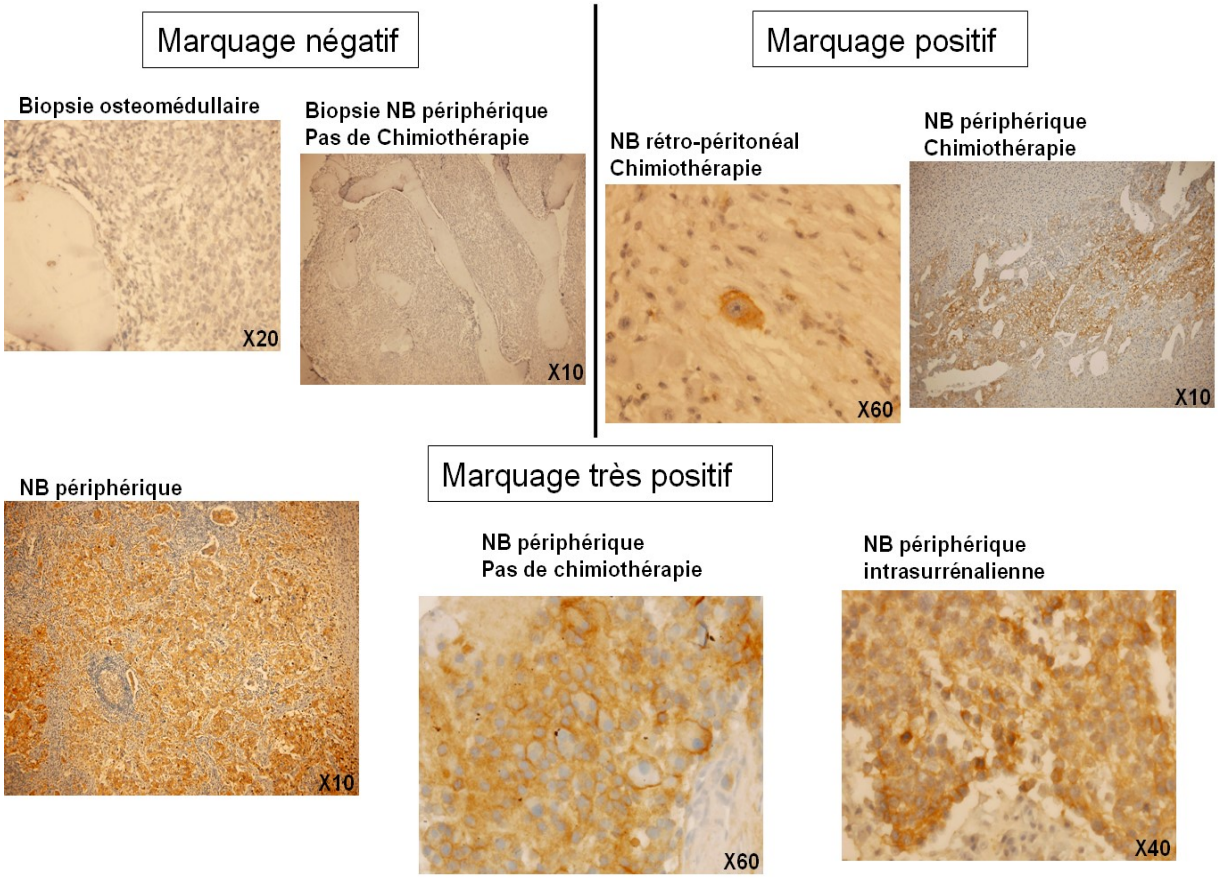
DISCUSSION ET PERSPECTIVES PARTIE 1

Un des objectifs de cette étude préclinique était de déterminer si ^{68}Ga-DOTATOC pouvait être un meilleur traceur que le FDG pour l'imagerie des tumeurs de NB en tenant compte de l'hétérogénéité des tumeurs chez l'homme. Nous avons donc mesuré, dans trois modèles de NB, la fixation tumorale en utilisant deux traceurs TEP, le FDG comme traceur métabolique non spécifique et le ^{68}Ga-DOTATOC, un ligand des SSTR2. Nos expériences ont confirmé notre hypothèse de départ : exprimant les SSTR2 à différents niveaux, les trois types de NB ont une intensité de fixation du ^{68}Ga-DOTATOC différente. Une parfaite concordance a été observée entre la fixation du ^{68}Ga-DOTATOC dans les tumeurs, les résultats de biodistribution *ex vivo* dans les tumeurs, et l'expression de SSTR2 dans les xénogreffes observés par immunohistochimie. Ceci confirme clairement que la fixation in vivo du ^{68}Ga-DOTATOC est effectivement liée à l'expression des SSTR2 et non à des liaisons non spécifiques. Nos résultats sont en accord avec la présence de SSTR2 au niveau des cellules de NB, déjà décrite dans la littérature [152, 157]. De plus une publication très récente, postérieure à la notre, vient appuyer nos résultats en corrélant l'expression des SSTR2 à la captation ^{68}Ga-DOTA-TATE dans des modèles de xénogreffe de neuroblastome [158].

Concernant la biodistribution de ^{68}Ga-DOTATOC chez la souris nude, nos données sont cohérentes avec celles rapportées par l'équipe de Ugur [159] , bien que dans ce cas, la tumeur xénogreffée soit issue d'une lignée cellulaire tumorale pancréatique AR4-2J, avec un faible % ID/g dans tous les organes sains, sauf dans les reins. Chez l'homme, la TEP au ^{68}Ga-DOTATOC montre une fixation significative dans le pancréas, que nous et une autre équipe, n'avons pas trouvé chez la souris nude [160]. En ce qui concerne l'imagerie du NB, la TEP au ^{68}Ga-DOTATOC a été rapportée pour l'instant chez l'homme [50], mais pas dans des modèles animaux. En revanche le FDG a déjà été utilisé pour l'imagerie TEP de modèles murins de NB, mais avec d'autres lignées cellulaires que celles utilisées dans la présente étude [153, 154]. Un autre radiotraceur a été utilisé dans le NB en préclinique, la ^{18}F-fluorothymidine ou FLT. Les études de Krieger-Hinck et col. [153] et celle de Valentiner et col. [161] ont comparé le FDG et la FLT et les résultats montrent une meilleure fixation avec le ^{18}F-FLT, cependant aucune autres études n'a été réalisée depuis. En revanche, des résultats récents montre le potentiel de la ^{18}F-FDOPA dans le NB [149, 151]. Tout comme dans notre étude avec l'obtention d'un meilleur contraste avec le ^{68}Ga-DOTATOC, une comparaison entre le ^{18}F-FDOPA et le ^{68}Ga-DOTATOC pourrait être utile dans des modèles animaux.

Deux études cliniques sont en cours dans l'évaluation de l'utilisation du 68Ga-DOTATOC pour le diagnostic, la stadification et l'évaluation de la réponse au traitement dans le NB (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT02441062 (2014), NCT02177773 (2015)). Après la publication de cet article une collaboration avec l'hôpital Trousseau a été établie afin de collecter et d'étudier des tissus de patients atteints de NB. Les lames ont été marquées par l'anticorps anti-SSTR2 (développé dans l'article) afin de quantifier l'expression des récepteurs SSTR2. Cependant il a été très difficile d'obtenir des lames de patients au vu de leur nombre réduit, par ailleurs les résultats ont été difficiles à exploiter du fait de la forte hétérogénéité des cas des patients. Les quelques lames analysées sont présentées dans la figure 23.

Figure 23 : Coupes de tumeurs de patients marquées avec un anticorps anti SSTR2 (RBKO46)



Ces résultats ne sont pas suffisants pour tirer des conclusions. Cependant on note tout de même que certains des tissus biopsiés sont marqués et qu'au vu de nos résultats une quantification aurait été possible. Il serait préférable de commencer une étude sur de nouveaux prélèvements avec un cadre bien défini pour l'inclusion de patients. L'étude de Jennifer E. Gains et col., parue en juin 2017 [162], a justement utilisé l'immunohistochimie pour évaluer l'expression des SSTR2 dans des tissus de patients ayant un NB. Les tissus de 75 patients ont été examinés et ont en

effet montré une grande hétérogénéité inter et intra patient de l'expression des récepteurs SSTR2, avec une médiane de 55% et intervalle interquartile 30% - 80%. Cette grande hétérogénéité met en évidence le besoin indéniable de l'évaluation individuelle de l'expression de la cible pour orienter le traitement. L'imagerie peut donner plus d'informations sur ce point, et ainsi orienter le clinicien afin d'éviter les échecs de traitement chez les patients dont l'expression de la cible est faible ou très variable.

La captation du FDG est habituellement corrélée avec l'agressivité tumorale [163]. Dans notre étude, la captation des deux traceurs par les tumeurs semble correspondre à l'agressivité tumorale, quantifiée grâce à la détermination du Ki-67. Une relation entre la captation du FDG par la tumeur et du Ki-67 a été observée dans des études précliniques et cliniques pour de nombreux cancers primitifs, mais n'a pas été rapportée précédemment dans le NB, que ce soit chez l'animal ou chez l'Homme. Récemment, il a été montré qu'une captation élevée du FDG dans les NB chez l'Homme (SUVmax $\geq$ 3,31) correspondait à une tumeur à très haut risque et de pronostic défavorable [151]. De manière surprenante, dans nos modèles de NB, l'intensité de la captation du FDG était également corrélée avec l'expression de SSTR2 et donc avec la captation du ^{68}Ga-DOTATOC. Ce résultat n'était pas attendu puisque dans les TNE une corrélation inverse avait été observée par Kayani et al : le ^{68}Ga-DOTATATE était davantage fixé par les TNE de bas grade comparées aux TNE de haut grade ; inversement, le FDG avait une intensité de fixation plus élevée dans les TNE de haut grade que dans celles de bas grade [49]. Il semble que le modèle de différenciation soit différent dans les NB que dans les TNE, puisque notre étude montre qu'un Ki-67 élevé est compatible avec la surexpression des SSTR2, ouvrant la voie à des analogues de la somatostatine "froids" ou radiomarqués comme alternative à la radiothérapie vectorisée par ^{131}I-MIBG.

Depuis plus de 30 ans la ^{131}I-MIBG est utilisée pour le traitement des NB mais le taux de survie à 5 ans reste de 40% à 50% (Neuroblastoma Treatment (PDQ®) Health Professional Version Pediatric Treatment Editorial Board. National Cancer Institute (US); 2002-. Published online: September 28, 2017). L'utilisation du ^{177}Lu-DOTATATE pour certains patients a déjà été envisagée dans quelques études [164, 165]. Une étude de 2016 rapporte le cas de huit patients où l'imagerie TEP au ^{68}Ga-DOTATATE a détecté une fixation chez trois d'entre eux non visible avec le ^{123}I-MIBG, ainsi que la mise en évidence d'une atteinte médullaire. Six des patients ont été jugés éligibles pour la radiothérapie vectorisée par ^{177}Lu-, ^{90}Y ou ^{111}In-DOTATATE, 4 d'entre eux ont reçu 17 cycles à titre palliatif ne donnant pas de toxicité significative et tous ont présenté une certaine réponse tumorale [166].

Les analogues de la somatostatine ont un vrai potentiel dans la prise en charge de patients atteint de NB dans une approche théranostique [167]. Dans certains cas de NB cette radiothérapie vectorisée représente une alternative et une stratégie thérapeutique efficace pour cette maladie. Très récemment (septembre 2017) un essai clinique de phase 2 a été lancé afin de démontrer l'utilité du double emploi de l'octréotide. Cette étude clinique vise à utiliser le 68Ga-DOTATOC ou TATE dans le diagnostic pour le ciblage de traitement et la surveillance; et le ^{90}Y-DOTA-tyr3-octréotide comme traitement en radiothérapie par récepteurs peptidiques SSTR2, chez des patients atteints de tumeurs surexprimant le récepteur de la somatostatine (dont le NB). (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03273712).

Partie 2 : Utilisation de traceurs RGD en TEP

La néoangiogenèse tumorale est une voie actuelle de recherche à la fois pour améliorer le diagnostic et pour cibler le traitement du cancer. Comme vu précédemment, l'imagerie fonctionnelle de la médecine nucléaire vise à caractériser, in vivo et de façon non invasive, les tumeurs solides, en utilisant des radiotraceurs servant de révélateur des anomalies ou troubles métaboliques qu'elles entrainent. Plus récemment, on a considéré que ces radiotraceurs pourraient être utilisés comme des «compagnons diagnostiques» afin d'aider à la prise en charge adéquate des patients. Le ciblage de l'angiogenèse par un radiotraceur pourrait donc permettre, d'une part de caractériser l'angiogenèse tumorale de façon très précoce, mais également ajouter la valeur pronostique de l'angiogenèse tumorale. De plus, empêcher le développement des vaisseaux tumoraux permet de limiter la progression tumorale et la dissémination des cellules métastatiques dans l'organisme. Ceci justifie le développement de nouveaux traitements à visée anti-angiogénique ; un radiotraceur ciblant ce phénomène pourrait être utile pour évaluer l'efficacité de ces traitements. Les cellules endothéliales qui constituent ces vaisseaux en formation surexpriment certains marqueurs spécifiques tels que l'intégrine αvβ3. Cette protéine membranaire reconnaît de manière spécifique le motif peptidique RGD (-Arginine-Glycine-Acide aspartique-). La mise au point d'un radioligand spécifique de l'intégrine αvβ3, utilisable en imagerie non invasive des tumeurs dans les services de médecine nucléaire, pourrait donc permettre d'atteindre le double objectif de surveiller le développement tumoral et de prédire l'efficacité de traitements anti-angiogéniques. Le succès limité des anti-angiogéniques en monothérapie ou en tant qu'adjuvant renforcent l'importance de l'imagerie de l'intégrine pour le recrutement des patients. Ainsi ce type de traceurs pourrait aider au choix du traitement et à la détermination précoce de son efficacité ou de l'absence de réponse afin de s'orienter rapidement vers un autre choix thérapeutique, sans attendre une toxicité sans efficacité. On pourrait même envisager d'associer ou non un tel agent anti-angiogénique à la chimiothérapie si un compagnon diagnostique était disponible, décelant les patients où sa valeur ajoutée en terme d'efficacité est probable ou au contraire improbable.

Etude 1: Comparer le ^{68}Ga-NODAGA-c(RGDfK) au FDG dans le glioblastome

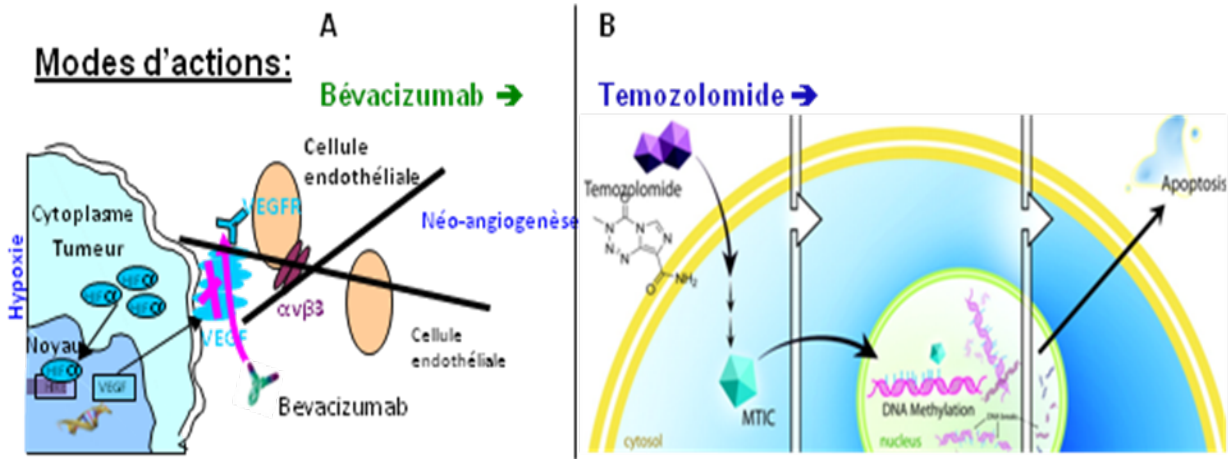
INTRODUCTION

Les glioblastomes (GB) sont des tumeurs cérébrales très agressives et très vascularisées pour lesquelles les traitements actuels ne permettent pas d'augmenter la durée de survie des patients. La survie moyenne constatée aujourd'hui est de 14,5 mois. L'IRM est actuellement la modalité d'imagerie anatomique d'évaluation des GB mais sa performance reste limitée pour délimiter la tumeur, évaluer son pronostic, sa réponse suite à un traitement, déceler une reprise évolutive. De nouvelles stratégies thérapeutiques visant l'angiogenèse tumorale sont en cours d'études cliniques, certaines ont pour cibles l'inhibition des facteurs angiogéniques et/ou de leurs récepteurs et des voies de signalisation qui en dépendent, comme les anti-VEGF (Bevacizumab), des antagonistes des intégrines (Cetuximab) ou encore des molécules impliquées dans la néo-angiogenèse.

Le bevacizumab (BVZ) est un anticorps monoclonal qui se lie au VEGF dont il inhibe la liaison à ses récepteurs situés à la surface des cellules endothéliales. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF fait régresser les vaisseaux tumoraux, normalise les vaisseaux tumoraux restants, et inhibe la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux, inhibant ainsi la croissance tumorale (figure 24A). Le BVZ est commercialisé par la firme Roche sous le nom d'Avastin®. Lors de récidive se GB, le BVZ est prescrit en standard aux Etats-Unis en seconde ligne avec ou sans la chimiothérapie. En France il est également utilisé lors de la récidive mais seulement dans le cadre d'essais cliniques. La chimiothérapie associée est souvent le TMZ, utilisé dans la prise en charge de tumeurs cérébrales malignes.

Le témozolomide (TMZ) est un dérivé triazène, qui subit une conversion chimique rapide à pH physiologique en monométhyl triazénoïmidazole carboxamide actif. La cytotoxicité de celui-ci est vraisemblablement due principalement à une alkylation de la guanine. Les lésions cytotoxiques qui sont développées sont supposées entraîner une réparation aberrante de l'ADN (acide désoxyribonucléique) méthylé (figure 24B).

Figure 24 : Mode d'actions du bévacizumab et du témozolomide.



L'apport de l'imagerie TEP au RGD en clinique est difficile à évaluer car les anti-angiogéniques sont la plupart du temps associés à une chimiothérapie ; il est donc difficile de savoir si le changement de captation des radiotraceurs RGD est induit par l'agent anti-angiogénique ou la chimiothérapie.

Le but de cette première étude était de comparer en imagerie TEP, l'apport d'un traceur RGD et celui du FDG, dans un modèle murin de GB humain, pour le suivi d'un traitement anti-angiogénique par BVZ, couplé ou non avec la chimiothérapie au TMZ. L'utilisation de radiotraceurs RGD ont été relativement étudiés dans les modèles de GB mais ont été peu étudiés dans le suivi de traitement couplant anti-angiogénique et chimiothérapie.

2ème article

[^{68}Ga]RGD versus [^{18}F]FDG PET imaging in monitoring treatment response of a mouse model of human glioblastoma tumour with bevacizumab and/or temozolomide

Claire Provost[1], Laura Rozenblum-Beddok[1, 2], Valérie Nataf[1, 2], Fatiha Merabtene[3] Aurélie Prignon[1], Jean-Noël Talbot[1, 2].

[^{68}Ga]RGD *vs.* [^{18}F]FDG PET for monitoring GB treatments

Articles

[1]Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positonique (LIMP), UMS 28, Université Pierre & Marie Curie Sorbonne Universités, Paris, France.

[2]Service de Médecine Nucléaire et Radiopharmacie, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France.

[3]Plateforme d'Histomorphologie Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France.

[*]Corresponding author: Claire Provost, LIMP Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positonique, Hôpital Tenon 4 rue de la Chine 75020 Paris. Phone: 33 1 56 01 72 98, Fax: 33 1 56 01 72 98. E-mail: claire.provost@upmc.fr

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to evaluate PET imaging with [^{68}Ga]NODAGA-c(RGDfK) ([^{68}Ga]RGD), in comparison with 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG), for early monitoring of the efficacy of an antiangiogenic agent associated or not with chemotherapy, in a mouse model of glioblastoma (GB).

Procedures: Mice bearing U87MG human GB cells line were parted into 5 groups of 5 mice. One group was imaged at baseline before the treatment phase; another group was treated with the bevacizumab (BVZ), another group with the temozolomide (TMZ), another group with both agents and the last was the control group. Tumours growth and biological properties were evaluated by calliper measurements and PET imaging at three time points (baseline, during treatment t1=4-6 days and t2=10-12 days). At the end of the study, tumours were counted and analysed by immunohistochemistry (CD31 to evaluate microvessel density).

Results: The tumour volume assessed by calliper measurements was significantly greater at t1 in the control group than in the TMZ + BVZ treated group or in the BVZ treated group. At t2, tumour volume of all treated groups was significantly smaller than that of the control group. [^{18}F]FDG PET failed to reflect this efficacy of treatment. In contrast, at t1 the [^{68}Ga]RGD tumour uptake was concordant with tumour growth in controls and in treated groups. At t2, a significant increase in tumour uptake of [^{68}Ga]RGD vs. t1 was only observed in the TMZ treated group, reflecting a lack of angiogenesis inhibition, whereas TMZ+BVZ resulted in a dramatic tumour arrest, reduction in microvessel density and stable tumour [^{68}Ga]RGD uptake.

Conclusions: [^{68}Ga]RGD is a useful PET agent for in vivo angiogenesis imaging and can be useful for monitoring not only antiangiogenic treatment but also chemotherapy and their association.

Keywords: PET, integrins αvβ3, angiogenesis, [^{68}Ga]RGD, [^{18}F]FDG, bevacizumab, temozolomide.

Introduction

Angiogenesis is currently the object of a high interest, in particular because of its significant role in several common diseases and for drug targeting . As a result, antiangiogenic drugs have emerged to expand the resources for cancer treatment, in particular bevacizumab (BVZ) . However, even in cancers with high vasculature proliferation, not all the patients can benefit from a specific antiangiogenic therapy as some patients do not respond . The radioactive glucose analogue [^{18}F]FDG, the most common radiotracer in oncologic PET, have been used for predicting survival following antiangiogenic therapy in different cancers. Colavolpe et al performed brain FDG PET in 25 patients with recurrent high-grade gliomas, within 6 weeks of starting chemotherapy with bevacizumab and irinotecan. Tumour [^{18}F]FDG uptake significantly predicted PFS and OS. In multivariate analysis, the tumour SUVmax and its ratio to the contralateral site were the most powerful independent predictors of PFS and OS. Sensitivity and specificity for predicting death at 6 months were respectively 88% and 59%. In preclinical studies, results are conflicted, the [^{18}F]FDG potential for monitoring an early response to antiangiogenic seems to depend on the agent . Another interesting marker aiming to predict an effect of antiangiogenic therapy is the over-expression of integrin αvβ3, a heterodimeric transmembrane glycoprotein which mediates cell-matrix and cell-cell interactions. Integrin αvβ3 is over-expressed on activated endothelial cells, where it plays a critical role in the angiogenic process. Moreover, studies have shown that αvβ3 is an important receptor affecting tumour growth, local invasiveness and metastatic potential . A part of natural ligands of integrin αvβ3 has been identified, notably an important binding epitope, the amino-acid sequence arginine-glycine-aspartic acid (RGD). For diagnostic imaging, various positron emission tomography (PET) tracers incorporating the RGD sequence have been developed and radiolabelled with different radionuclides . Clinical studies on rather small series have shown the potential of dimeric RGD peptide tracers such as [^{18}F]FPPRGD2 and alfatide for detecting cancer extension . Tumour response to

antiangiogenic therapy has also been studied; Zhang et al. performed a pilot clinical study in patients with glioma using [^{18}F]AlF-NOTA-PRGD2 (alfatide II) and highlighted the potential of semi-quantification (mainly with SUVmax) of PET performed before and after 3 weeks of treatment to predict tumour response to concurrent chemoradiotherapy. SUVmax values decreased from baseline to treatment PETs, 1.37 ± 0.40 vs. 1.03 ± 0.40 ($P < 0.05$) in the responder group, whereas no significant change was noted in the non-responder group (SUVmax 2.14 ± 1.00 vs. 2.19 ± 1.12, $P > 0.05$) . Likewise, Iagaru et al. performed a prospective trial to evaluate [^{18}F]FPPRGD2 PET in patients with glioblastoma multiforme (GBM) treated with BVZ. In this study, the decrease of [^{18}F]FPPRGD2 uptake, just one week after BVZ administration, was a predictor of therapy outcome. The SUVmax values decreased between baseline and after one week of treatment ($P = 0.025$) and was not significantly modified later .

To further investigate the potential of RGD imaging, preclinical studies using several radiolabelled RGD peptides for PET imaging were performed on the experimental U87MG model of human glioblastoma (GB). The U87MG cell line over-expresses the integrin αvβ3 and is very aggressive and highly vascular . Some recent preclinical studies addressed the ability of the RGD PET radiotracers to monitor antiangiogenic treatment . Battle et al., in an animal model of GB, showed a decrease in tumour uptake of [^{18}F]AH111585 (or fluciclatide) after antiangiogenic (sunitinib) therapy, before observing a reduction in tumour volume . Most of the RGD radioligands have been radiolabelled with ^{18}F. RGD ligands radiolabelled with ^{68}Ga have been introduced more recently . It is true that the energy of the beta + particle of ^{68}Ga is greater, leading to some loss of resolution in the PET images. In contrast, labelling with ^{68}Ga has some advantages. Thanks to the ^{68}Ge/^{68}Ga generator, the labelling of tracer lyophilised RGD tracer is feasible at any moment in the radiopharmacy. Thus urgent pretreatment PET/CT may be performed, independently of the delivery of a ^{18}F labelled ligand by an industrial firm, when the PET centre has no on-site cyclotron. Furthermore the ^{68}Ga

atom may be substituted in the chelate by a radionuclide for internal radiotherapy (e.g. ^{177}Lu) which is not the case for the ^{18}F labelled radiotracers. The ligand [^{68}Ga]NODAGA-c(RGDfK) used in this present study (and referred as [^{68}Ga]RGD in this article) was described by Knetsch in 2011 and was recently tried in Humans .

The aim of this present study was to evaluate this ^{68}Ga-labelled RGD radiotracer, in comparison with 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG), for monitoring the early therapeutic response to an antiangiogenic agent, BVZ, associated or not with temozolomide (TMZ) chemotherapy, in a mouse model grafted with human GB.

Materials and Methods

Radiolabelling

The radiolabelling was done thanks to an automated synthesis module (Synchrome R&D, Raytest, Germany). The ^{68}Ge/^{68}Ga generator (purchased from Iason GmBh, Graz, Austria) was eluted by fractioned method with 5 mL of 0.1 mol/L HCl. Around 100 MBq of $^{68}Ga^{3+}$ in 1.2 mL HCl was mixed with 8 nmol of NODAGA-c(RGDfK) (961,03 g/mol, Pichem, Austria) in 150µL of water trace select plus 180 µL of 0,8 mol/L sodium acetate. Reaction products were heated for 10 minutes at 40°C. The radioligand was purified from unchelated ^{68}Ga using a SepPak C18 light cartridge (Waters, USA) preconditioned with 2 mL of ethanol and 2 mL of water. One rinse of 2 mL of water was performed and [^{68}Ga]RGD was eluted with 800 µL of ethanol 100%. Ethanol was evaporated during few minutes by heating at 70°C, and the product was reconstituted with 1 mL of physiologic serum. High-performance liquid chromatography (HPLC) quality control was performed using a Waters breeze system with a 1525 binary pump. Radioactivity was detected with a Berthold radio-HPLC detector. The HPLC mobile phase was a mixture of water with 0.1% of TFA (phase A) and acetonitrile with 0.1% of TFA (phase B). The HPLC Reverse Phase C18 column (Symmetry C18, 5µm, Waters) was equilibrated at a flow rate of 1 mL/min with 100%; the HPLC gradient was as

follows: 0-15 min 45% A, 55% B, (flow 1mL/min). Retention time was around 10 minutes at 30% of B.

Animal model

U87MG human GB cells lines were maintained in RPMI 1640 with L-Glutamine (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% foetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were grown in T175 CellBind flasks (CellBind Flask Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

Twenty five Swiss female nude mice aged 6 weeks (Charles River) were subcutaneously grafted in right back leg, with $3x10^6$ cells suspended in 100µL of phosphate buffered saline (PBS) and mixed 50/50 with Matrigel (BD Biosciences), to favour tumour engraftment. The resulting tumours were measured twice a week with a calliper, the two perpendicular diameters were recorded, and tumour volume was calculated using the formula: $V = \pi/6*l*w^2$, in which l = length and w = width. Volume was expressed as mean ± SD in mm^3. Five of this twenty five mice where use for baseline SUV max values before the treatments. All animal experiments were carried out in compliance with the French laws relating to the conduct of animal experimentation, in application of the directive 2010/ 63/ EU.

Treatment

For treatment monitoring, twenty mice were parted into 4 homogeneous groups of 5 mice. All treatments were injected intraperitoneously (IP), twice a week during 2 weeks (Fig. 1). The first group was injected 17 mg/kg of TMZ, the second one with 20 mg/kg of BVZ, the third one with 20 mg/kg of BVZ and 17 mg/kg of TMZ at the same time and the control group with PBS.

PET imaging

PET acquisitions were performed using the Mosaic animal PET machine (Philips Medical systems, Cleveland, OH, USA). Before [^{18}F]FDG PET imaging, mice had been fasting for 7h with free access to water; no fast was applied for the [^{68}Ga]RGD tracer imaging. Around 5 MBq of [^{18}F]FDG or around 1.6 MBq (~ 600 pmol) of [^{68}Ga]RGD were injected intravenously in the retro-orbital sinus. PET imaging was started 1 hour after [^{18}F]FDG injection or 40 min after [^{68}Ga]RGD injection. Static acquisitions were performed during 10 minutes. Mice were maintained under anaesthesia with 1.5% isoflurane during image acquisition. After acquisition, images were reconstructed and visualised as maximum intensity projection (MIP) and as slices (sagittal, transverse, coronal) for visual and quantitative analysis. Regions of interest (ROI) were drawn manually around the tumour, using Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). The uptake was quantified as maximum standardized uptake value (SUVmax), which corresponds to the maximal radioactivity concentration in the pixels of the ROI (kBq/mL) multiplied by body mass (g) and divided by injected radioactivity (kBq).

Study design

Schedule of study is summarized in figure 1. After the xenograft of twenty five mice, the first PET imaging for baseline, when the tumour volume reached around 300 mm^3, was performed into five mice with [^{18}F]FDG and forty-eight hours later with [^{68}Ga]RGD. To evidence the viability and metabolic activity of the tumours before starting the treatment, 5 grafted mice were imaged with [^{18}F]FDG, and 48h later with [^{68}Ga]RGD, to be sure that their tumour took up these tracers at baseline. The mice of this “baseline” group were kept alive to replace mice that would die in control group but they were actually no more imaged. The twenty mice remaining were randomized into four groups (n=5 per group). Treatments began at day 25 when tumour volume reached around 450 mm^3. The 2nd PET imaging (t1) was performed after two injections of the therapy, 4-6 days after the beginning of treatment. [^{18}F]FDG PET was performed first and [^{68}Ga]RGD PET forty-eight hours later. The 3rd PET imaging (t2)

was performed similarly after four injections of the therapy, 10-12 days after the beginning of treatment (Fig. 1).

Ex-vivo biodistribution.

One hour after the last injection of [^{68}Ga]RGD followed by PET imaging, mice were sacrificed and dissected. Tumours were removed, weighed and counted in a gamma-counter (1480 Wizard 3, Perkin Elmer). Tumour uptake was expressed as mean ± SD percentage of injected activity of tissue (%ID), corrected for ^{68}Ga decay.

Immunohistochemistry

All tumours were embedded in paraffin according to standard procedures and different stains were performed. Haematoxylin-eosin (HE) for evaluating tissue appearance, an anti-mouse CD31 antibody (Abcam, UK) was used to evaluate the relative microvessel density (MVD) (%) ± SD expression. The tumour slices were observed with an optical microscope in transmitted light, at x 20 magnification (Nikon Eclipse, Champigny sur Marne, France). Quantitative analysis of the immunostaining was performed by evaluating the percentage of positive area within the area of the entire section, using Image J software.

Statistical analysis

Calliper volume measurements and SUVmax values were expressed as mean ± SD. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test or two-way ANOVA was used to search for differences between groups. Paired samples t-test was used to search in each group for significant variations between results at t1 and t2. The statistical analysis was performed with GraphPad software (USA).

Results

Radiolabelling

The overall decay-corrected radiochemical yield (RY) was 98%; the radiochemical purity was ≥ 98% using analytical HPLC and the specific radioactivity (SR) was 5.5 and 5.8 MBq/nmol (n=2).

Effect of treatments on tumour growth

Figure 2 illustrates the evolution of tumour volume evaluated by means of calliper in each group of mice. We performed a two way ANOVA, the 1st factor was time consisting in 5 dates of tumour measurement (figure 2), and the 2nd factor was the treatment (PBS for the control group). Tumour growth was significantly faster in controls than in all other groups ($P < 0.0001$) and in TMZ or BZV alone vs. TMZ + BVZ ($P=0.007$ for TMZ and $P=0.05$ for BVZ), the only regimen that resulted in a decrease in tumour size.

On the 31th day after xenograft, six days after the beginning of treatment, tumour volume was significantly larger in the control group than in the TMZ + BVZ treated group and in the BVZ treated group ($P < 0.05$). On the 35th day after xenograft, ten days after the beginning of treatment, tumour volume was significantly larger in controls than in all treated groups ($P < 0.05$) and this difference was reinforced on day 37, twelve days after the beginning of treatment ($P < 0.05$).

Evaluation of the effect of treatment with [^{18}F]FDG PET

At baseline the mean tumour of [^{18}F]FDG SUVmax was no significantly different than mean tumour of [^{18}F]FDG SUVmax in each group at t1 and at t2. In the first and second PET imaging sessions, there was no significant difference in mean [^{18}F]FDG SUVmax between the four groups. No difference in mean [^{18}F]FDG SUVmax was observed between t1 and t2 for any group (Fig. 3a). In the control group, a photopenic zone was observed at t2 in the centre of all the tumours (rim sign) reflecting a reduction in glucose metabolism (Fig. 3b), due to necrosis of the centre of the large tumours (Fig. 3c).

Evaluation of the effect of treatment with [^{68}Ga]RGD PET

At baseline, the mean tumour [^{68}Ga]RGD SUVmax was 1.00 ± 0.29, uptake values in each other group at t1 or t2 compared to the baseline were no significantly different. At t1, the mean tumour [^{68}Ga]RGD SUVmax was significantly greater in the control group than in BVZ or TMZ + BVZ treated mice; no difference was observed between controls and TMZ treated group (Fig. 4a). However, the difference between controls and treated groups observed at t1 was no longer significant at t2. On the other hand, at t2, the mean tumour [^{68}Ga]RGD SUVmax in the TMZ treated group was significantly greater than that of the BVZ treated groups (Fig. 4a).

The mean SUVmax of control group decreased significantly between t1 and t2: 1.22 ± 0.27 at t1 vs. 0.90 ± 0.21 at t2. A significant increase in mean tumour uptake of [^{68}Ga]RGD was only observed in the TMZ treated group: SUVmax was 0.92 ± 0.1 at t1 and 1.24 ± 0.2 at t2 ($P < 0.05$) (Fig. 4b).

Ex-vivo tumour uptake of [^{68}Ga]RGD in treated groups was clearly higher in case of treatment with TMZ alone than with the two other treatments, 4.50 ± 1.33 % ID/g versus 2.36 ± 0.53 % ID/g in BVZ treated tumours and 2.07 ± 0.80 % ID / g in tumours treated with TMZ + BVZ ($P < 0.05$). Tumour [^{68}Ga]RGD uptake was low but no significantly different in TMZ treated group than in the control group: 3.27 ± 0.85 %ID/g (Fig. 4c).

Staining CD31 showed the presence of microvessels in the tumours of the control group, with a percentage of positive area of 0.92 ± 0.79 %, similar to 0.92 ± 0.75 % in TMZ treated tumours, with an important heterogeneity. In the other groups, MVD was low, with rare presence of microvessels, the percentage of positive area in tumours being 0.06 ± 0.05 % and 0.08 ± 0.06 % in the groups treated with BVZ or with TMZ + BVZ, respectively (Fig. 5).

Discussion

Due to the rapid evolution of GB in humans and the high cost of the most modern therapeutic regimens, it is important to assess a marker for monitoring the effectiveness of an antiangiogenic agent, in order to early discontinue ineffective treatments. Previous reports favoured PET imaging as an adequate technique for such monitoring . Some preclinical and clinical studies used [^{18}F]FDG, but the results remain conflicting . The objective of our study was to investigate the interest of [^{68}Ga]RGD, a PET marker of angiogenesis, compared to [^{18}F]FDG for monitoring an anti-angiogenic treatment with BVZ and/or an alternative treatment with TMZ, in a mouse model of human GB. To the best of our knowledge, this is the first study which evaluated the effect of chemotherapy and/or anti-angiogenic in a GB model by means of PET with a [^{68}Ga]RGD radiotracer.

Subcutaneous xenografting was chosen since it enables to follow the evolution of the tumour volume by calliper measurements. From the first week, BVZ and BVZ + TMZ treatments induced a clearly significant reduction in the slope of tumour growth, as compared to controls. At the end of the second week, the tumour volume of all the treated mice was significantly smaller than that of the control group (Fig. 2). We observed that the tumour growth was stopped by using a combined TMZ + BVZ regimen; whereas BVZ or TMZ alone only resulted in a reduction of the slope of tumour growth. These results are explained by the mechanism of action of BVZ which blocks vascular endothelial growth factor (VEGF-A). Therefore it hampers tumour growth by mediating the regression of existing tumour vasculature and preventing regrowth over time . But this agent is not able to eradicate the tumour all by itself . In the TMZ-treated group, chemotherapy created cytotoxic lesions resulting in an aberrant DNA repair leading to cell apoptosis. However GB is known to be aggressive and, as in previous studies, U87MG GB model had a very fast tumour growth with a volume increase of more than 630% in two weeks. The combination of those two agents appeared to be more efficient thanks to their synergic action on two different pathways that promote tumour growth. Similar results have been obtained by MRI measurement of

tumour volume in an orthotopic rat model of human U87MG GB; after 2 weeks, the best response was induced by combined TMZ + BVZ treatment .

Even if [^{18}F]FDG was taken up by U87MG tumours, the intensity of uptake was variable between tumours and did not correlate with the effect of treatment with BVZ or TMZ or a combination of both on the volume of GB tumours. Literature results obtained in same U87MG model are conflicting using other antiangiogenic treatments. One study reported that the [^{18}F]FDG uptake in the tumour significantly increased after 13 days of the sunitinib treatment whereas the tumour volume decreased . Another team reported a substantial decrease in [^{18}F]FDG uptake in U87MG tumour on day 10 after starting axitinib . It is quite possible that each anti-angiogenic drug has a different influence on the glucose transporter. With same treatment, similar results as ours were already reported by Corroyer-Dulmont et al. from an orthotopic rat U251 GB model . Actually, [^{18}F]FDG reflected the metabolic activity of untreated tumours of the control group at t1 and allowed to visually identify central necrosis at t2 (Fig. 3b and c) although the SUVmax value was not impacted.

At t1, a reduction in [^{68}Ga]RGD tumour uptake in comparison with controls was observed in the mice treated with BVZ alone or combined with TMZ, concordantly with a reduction in tumour growth. The interest of an early follow-up PET with a tracer RGD may be challenged since MRI is able to visualize the evolution of the tumour volume as already shown . However, our results show that [^{68}Ga]RGD PET may confirm the reduction in the angiogenic potential of the tumour when BVZ is used.

Between t1 and t2, the [^{68}Ga]RGD SUVmax increased significantly in the TMZ group although the tumour volume only increased modestly (non-significant difference), whereas it decreased in controls (Fig. 4b) the tumour volume of which was definitely progressing. This decrease in [^{68}Ga]RGD uptake in controls could be explained by the necrosis seen on [^{18}F]FDG PET and at immunohistochemistry that may be related to reduction of tumour blood supply. At t2, we observed a slight difference between in vivo and ex vivo results. In vivo, the

RGD SUVmax of the tumour was less in the BVZ treated group than in the TMZ treated group, without difference between TMZ+BVZ and the two other groups. But, ex vivo, the RGD %ID was significantly smaller in mice treated with TMZ +BVZ than with TMZ alone. One explanation could be that the % ID is a more direct measurement of the actual radiotracer uptake than the SUVmax determined on a ROI that may include other structures than the tumour. It may thus be more sensitive to a decrease in integrin expression. The abundant angiogenesis in mice treated with TMZ was confirmed by the results of immunohistochemistry: the % MVD of the TMZ group was heterogeneous, similar to that of the tumours of the control group (analyzes were carried on non-necrotic zones) and statistically greater than those of the BVZ and TMZ + BVZ groups (Fig. 5). To the best of our knowledge only the study of Xue et al. described similar results and found that TMZ could stimulate neovascularization 6 days after the start of treatment . In our study the evolution of tumour volume is not concordant, in bevacizumab treated groups, with RGD uptake measurement. If evolution of tumour volume is considered to reflect antitumor effect, our results suggest that the [^{68}Ga]RGD permit to detect the vascular antiangiogenic effects of bevacizumab but not actually the antitumor effect. [^{68}Ga]RGD PET was able to monitor the persistence of integrin expression in the TMZ treated group at least similar to that of controls. This persistence was reflected neither by the evolution of tumour volume nor by tumour [^{18}F]FDG uptake.

Conclusions

[^{18}F]FDG PET visualized tumours but was not available to follow chemotherapy or antiangiogenic treatment in murine model tumour of U87MG human GB. In contrast, [^{68}Ga]RGD appeared to be a useful PET agent for non-invasive imaging angiogenesis. The decrease in its tumour uptake as compared to controls reflected the effect of treatment with the antiangiogenic agent bevacizumab combined or not with temozolomide chemotherapy on

tumour vasculature. In contrast the treatment with temozolomide led to an increase in [^{68}Ga]RGD uptake.

Acknowledgments

The study was supported by the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), PETNET Solutions SAS, Siemens healthineers.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Carmeliet P, Jain RK. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature; 407: 249-57.

2. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med; 285: 1182-6.

3. Folkman J. (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov; 6: 273-86.

4. Folkman J. (2007) Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? J Pediatr Surg; 42: 1-11.

5. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. (2009) An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. Nat Rev Clin Oncol; 6: 569-79.

6. Tarallo V, De Falco S. (2015) The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. Int J Biochem Cell Biol; 64: 185-9.

7. Bellou S, Pentheroudakis G, Murphy C, Fotsis T. (2013) Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. Cancer Lett; 338: 219-28.

8. Sennino B, McDonald DM. (2012) Controlling escape from angiogenesis inhibitors. Nat Rev Cancer; 12: 699-709.

9. Scott BJ, Quant EC, McNamara MB, Ryg PA, Batchelor TT, Wen PY. (2010) Bevacizumab salvage therapy following progression in high-grade glioma patients treated with VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. Neuro Oncol; 12: 603-7.

10. Ye W. (2016) The complexity of translating anti-angiogenesis therapy from basic science to the clinic. Dev Cell; 37: 114-25.

11. Colavolpe C, Chinot O, Metellus P, Mancini J, Barrie M, Bequet-Boucard C, et al. (2012) FDG-PET predicts survival in recurrent high-grade gliomas treated with bevacizumab and irinotecan. Neuro Oncol; 14: 649-57.

12. Goggi JL, Bejot R, Moonshi SS, Bhakoo KK. (2013) Stratification of 18F-labeled PET imaging agents for the assessment of antiangiogenic therapy responses in tumors. J Nucl Med; 54: 1630-6.

13. Bao X, Wang MW, Luo JM, Wang SY, Zhang YP, Zhang YJ. (2016) Optimization of early response monitoring and prediction of cancer antiangiogenesis therapy via noninvasive PET molecular imaging strategies of multifactorial bioparameters. Theranostics; 6: 2084-98.

14. Corroyer-Dulmont A, Peres EA, Gerault AN, Savina A, Bouquet F, Divoux D, et al. (2016) Multimodal imaging based on MRI and PET reveals [18F]FLT PET as a specific and early indicator of treatment efficacy in a preclinical model of recurrent glioblastoma. Eur J Nucl Med Mol Imaging; 43: 682-94.

15. Sheldrake HM, Patterson LH. (2009) Function and antagonism of beta3 integrins in the development of cancer therapy. Curr Cancer Drug Targets; 9: 519-40.

16. Desgrosellier JS, Cheresh DA. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Nat Rev Cancer; 10: 9-22.

17. Gaertner FC, Souvatzoglou M, Brix G, Beer AJ. (2012) Imaging of hypoxia using PET and MRI. Curr Pharm Biotechnol; 13: 552-70.

18. Niu G, Chen X. (2016) RGD PET: From lesion detection to therapy response monitoring. J Nucl Med; 57: 501-2.

19. Zhang H, Liu N, Gao S, Hu X, Zhao W, Tao R, et al. (2016) Can an 18F-ALF-NOTA-PRGD2 PET/CT scan predict treatment sensitivity to concurrent chemoradiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma? J Nucl Med; 57: 524-9.

20. Iagaru A, Mosci C, Mittra E, Zaharchuk G, Fischbein N, Harsh G, et al. (2015) glioblastoma multiforme recurrence: An exploratory study of 18F FPPRGD2 PET/CT. Radiology; 277: 497-506.

21. Bozon-Petitprin A, Bacot S, Gauchez AS, Ahmadi M, Bourre JC, Marti-Batlle D, et al. (2015) Targeted radionuclide therapy with RAFT-RGD radiolabelled with 90Y or 177Lu in a mouse model of alphavbeta3-expressing tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging; 42: 252-63.

22. Guo N, Zhang F, Zhang X, Guo J, Lang L, Kiesewetter DO, et al. (2015) Quantitative evaluation of tumor early response to a vascular-disrupting agent with dynamic PET. Mol Imaging Biol; 17: 865-73.

23. Cui Y, Liu H, Liang S, Zhang C, Cheng W, Hai W, et al. (2016) The feasibility of 18F-AlF-NOTA-PRGD2 PET/CT for monitoring early response of Endostar antiangiogenic therapy in human nasopharyngeal carcinoma xenograft model compared with 18F-FDG. Oncotarget; 7: 27243-54.

24. Kazmierczak PM, Todica A, Gildehaus FJ, Hirner-Eppeneder H, Brendel M, Eschbach RS, et al. (2016) 68Ga-TRAP-(RGD)3 Hybrid imaging for the in vivo monitoring of alphavss3-integrin expression as biomarker of anti-angiogenic therapy effects in experimental breast cancer. PLoS One; 11: e0168248.

25. Rylova SN, Barnucz E, Fani M, Braun F, Werner M, Lassmann S, et al. (2014) Does imaging alphavbeta3 integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? J Nucl Med; 55: 1878-84.

26. Battle MR, Goggi JL, Allen L, Barnett J, Morrison MS. (2011) Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled alphaVbeta3-integrin and alphaV beta5-integrin imaging agent. J Nucl Med; 52: 424-30.

27. Eo JS, Jeong JM. (2016) Angiogenesis imaging using 68Ga-RGD PET/CT: therapeutic implications. Semin Nucl Med; 46: 419-27.

28. Haubner R, Maschauer S, Prante O. (2014) PET radiopharmaceuticals for imaging integrin expression: tracers in clinical studies and recent developments. Biomed Res Int; 2014: 871609.

29. Knetsch PA, Petrik M, Griessinger CM, Rangger C, Fani M, Kesenheimer C, et al. (2011) [68Ga]NODAGA-RGD for imaging alphavbeta3 integrin expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging; 38: 1303-12.

30. Haubner R, Finkenstedt A, Stegmayr A, Rangger C, Decristoforo C, Zoller H, et al. (2016) [(68)Ga]NODAGA-RGD - Metabolic stability, biodistribution, and dosimetry data from patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. Eur J Nucl Med Mol Imaging; 43: 2005-13.

31. Frosina G. (2016) Non-routine tracers for PET imaging of high-grade glioma. Anticancer Res; 36: 3253-60.

32. Kreisl TN, Smith P, Sul J, Salgado C, Iwamoto FM, Shih JH, et al. (2013) Continuous daily sunitinib for recurrent glioblastoma. J Neurooncol; 111: 41-8.

33. Corroyer-Dulmont A, Peres EA, Petit E, Guillamo JS, Varoqueaux N, Roussel S, et al. (2013) Detection of glioblastoma response to temozolomide combined with bevacizumab based on muMRI and muPET imaging reveals [18F]-fluoro-L-thymidine as an early and robust predictive marker for treatment efficacy. Neuro Oncol; 15: 41-56.

34. Omuro A, Beal K, Gutin P, Karimi S, Correa DD, Kaley TJ, et al. (2014) Phase II study of bevacizumab, temozolomide, and hypofractionated stereotactic radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma. Clin Cancer Res; 20: 5023-31.

35. Huang J, Frischer JS, Serur A, Kadenhe A, Yokoi A, McCrudden KW, et al. (2003) Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. Proc Natl Acad Sci U S A; 100: 7785-90.

36. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, et al. (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. Am J Pathol; 165: 35-52.

37. Beal K, Abrey LE, Gutin PH. (2011) Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnosed glioblastoma: analysis of single-agent and combined modality approaches. Radiat Oncol; 6: 2.

38. Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, Harlos C, Pitz M, Hamai A, et al. (2017) Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. Pharmacol Ther.

40. Xue W, Du X, Wu H, Liu H, Xie T, Tong H, et al. (2017) Aberrant glioblastoma neovascularization patterns and their correlation with DCE-MRI-derived parameters following temozolomide and bevacizumab treatment. Sci Rep; 7: 13894.

Figures

Figure 1: Experimental study design for monitoring treatment efficacy with [^{68}Ga]RGD and [^{18}F]FDG. T: intraperitoneal administration of treatment. 4 groups: TMZ treated, BVZ treated, TMZ + BVZ treated, controls.

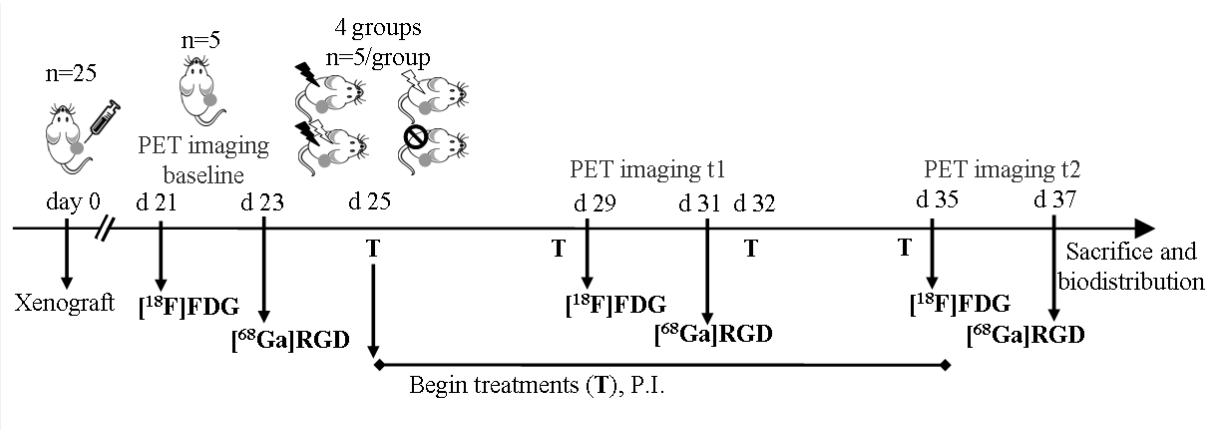
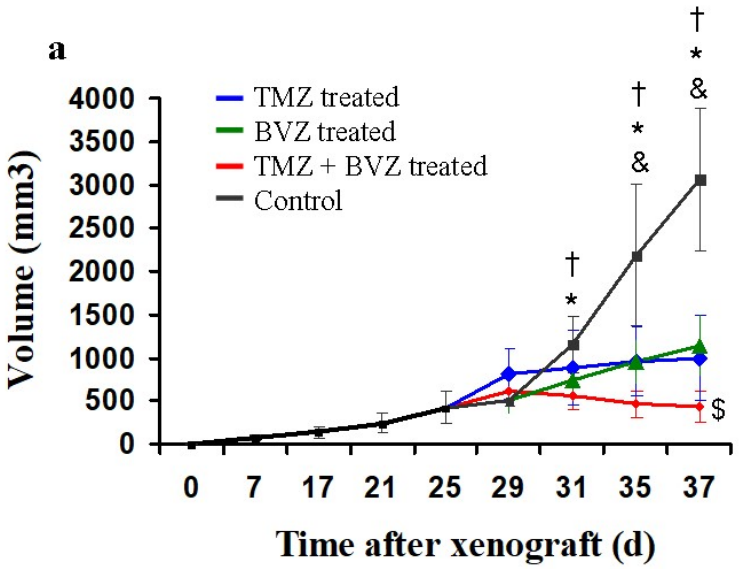


Figure 2: (a) Follow up of tumour volume, measured with calliper, of twenty mice grafted with U87MG cells. Blue curve, TMZ treated mice; green curve, BVZ treated mice; red curve, TMZ + BVZ treated; black curve, controls (n=5 per group). (*P<0.05*, controls vs. BVZ treated *(*)*, vs. TMZ + BVZ treated (†), *vs.* TMZ treated (&) and TMZ + BVZ treated vs. BVZ treated ($)). (b) Mean increase in tumour volume between d25 and d35 for each group.



b

Groups	Mean increase between d25 and d37
TMZ	140%
BVZ	170%
TMZ + BVZ	5%
Control	630%

Figure 3: [^{18}F]FDG PET results. (a) Quantitative FDG SUVmax mean ± SD in U87MG-tumour-bearing mice after one week (t1) or two weeks (t2) of treatment. Blue bars, TMZ treated; green bars, BVZ treated; red bars, TMZ+BVZ treated; black bars, controls (n=5 per group). (b) Representative image of [^{18}F]FDG PET at t1 and t2 of a mouse from the control group, the tumours are surrounded by a red dotted line. (c) Representative slice of HE staining (same mouse tumour imaging PET), the black arrow points to the necrotic part of the tumour.

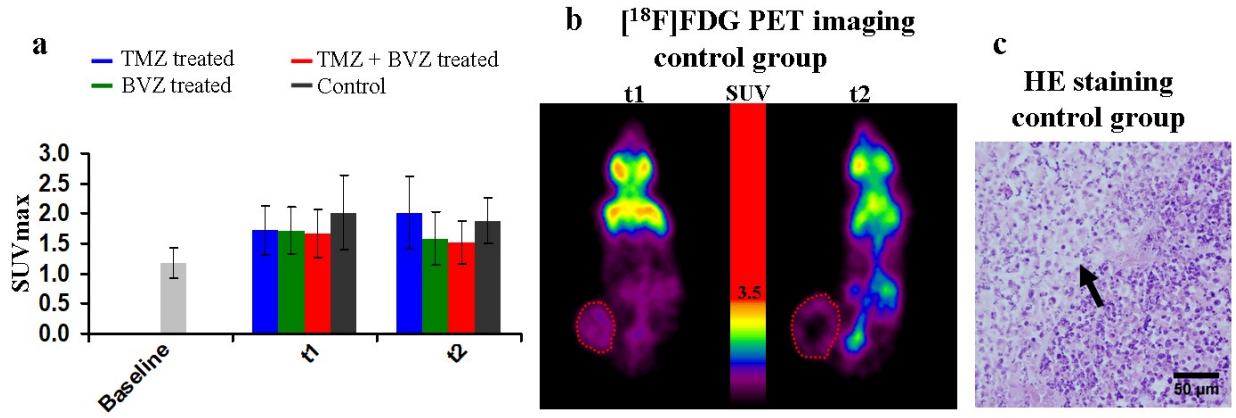


Figure 4: [^{68}Ga]RGD PET results. (a and b) Quantitative [^{68}Ga]RGD SUVmax mean ± SD of in U87MG-tumour-bearing mice after one week (t1) or two weeks (t2) of treatment. (c) Representative image of [^{68}Ga]RGD PET at t2 of a mouse from TMZ, BVZ, TMZ+BVZ treated groups and control group, the tumours are surrounded by a red dotted line.

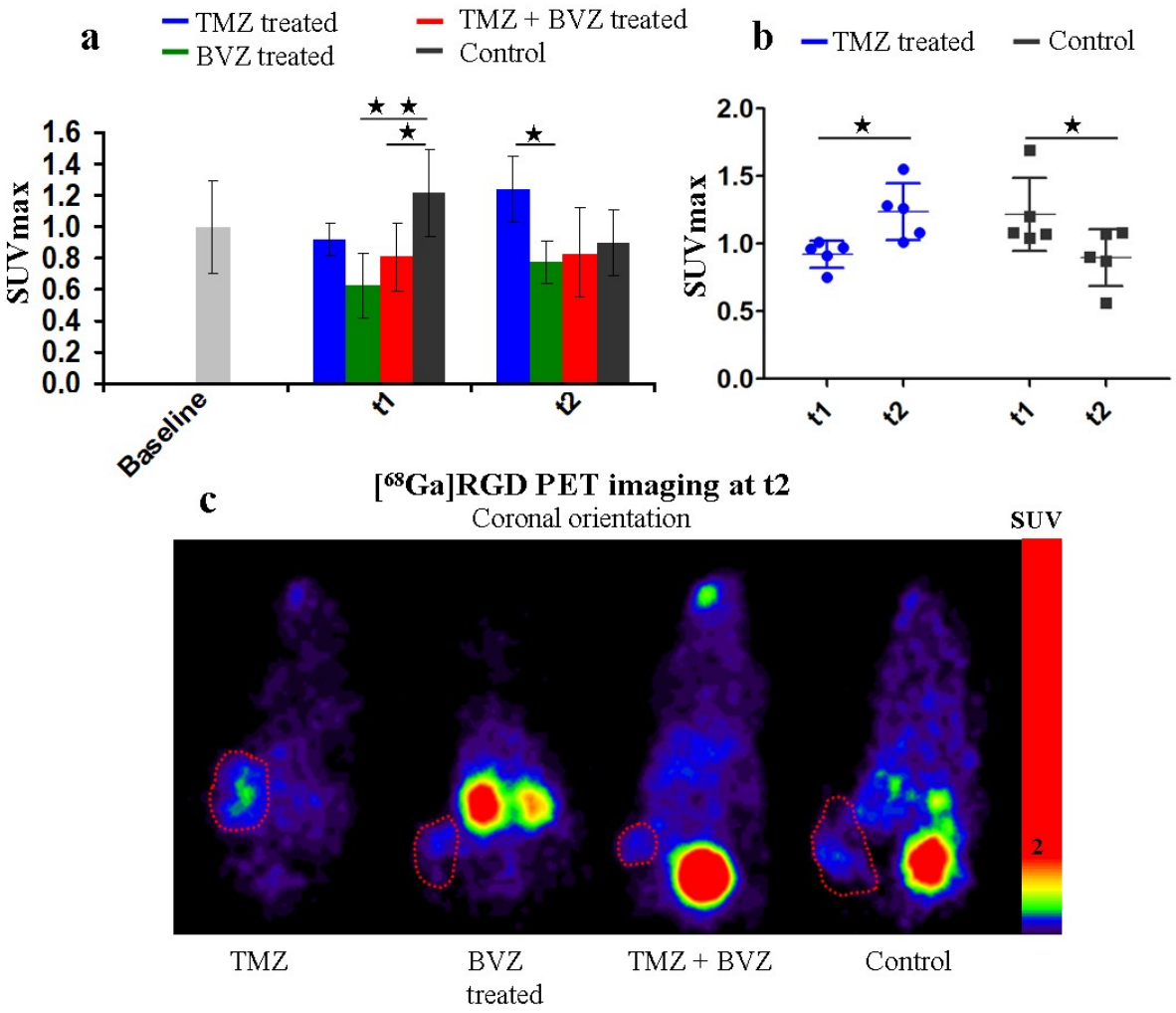
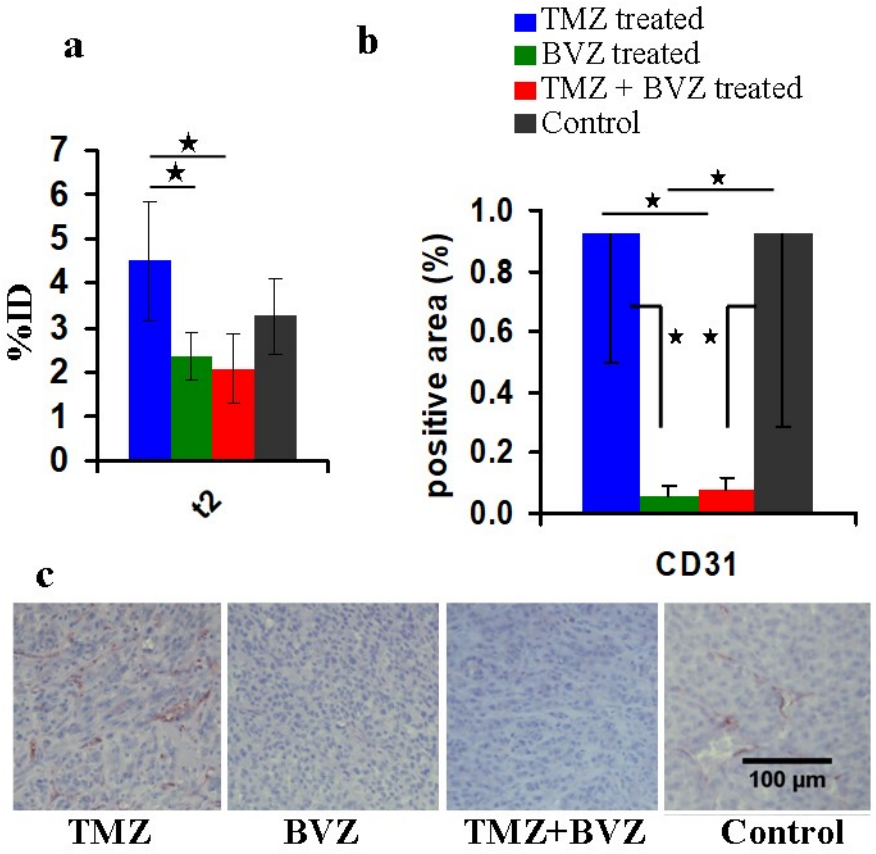


Figure 5: *Ex-vivo* (a) biodistribution of [^{68}Ga]RGD in tumour at t2, (%ID). Blue bar or dot, TMZ treated; green bar, BVZ treated; red bar, TMZ + BVZ treated; black bar or dot, control group (n=5 per group). **p<0.05 and **p<0.*005. Immunohistochemistry staining CD31: (b) Quantification by percentage of CD3-positive area in the tumour. Blue bars, TMZ treated; green bars, BVZ treated; red bars, TMZ + BVZ treated; black bars, control group (n=5 per group). **p<0.05.* (c) Representative images acquired at x 20 magnification.



Au vu des résultats de l'étude, on note clairement l'utilité du ^{68}Ga-RGD dans le suivi de traitements face au FDG. Le FDG bien que traduisant l'activité métabolique de la tumeur, n'a pas permis de différencier les groupes répondeurs ni au premier temps d'imagerie ni au deuxième. En revanche le ^{68}Ga-RGD lui, nous a permis de voir les groupes répondeurs dès le premier temps d'imagerie. Il a également montré qu'une tumeur traitée par chimiothérapie seule, présentait une angiogenèse augmentée par rapport à une tumeur traitée avec un anti-angiogénique seul ou couplé à une chimiothérapie. Cette capacité de visualiser cette augmentation qui pourrait laisser penser à une suspections de récidive s'avère très intéressante.

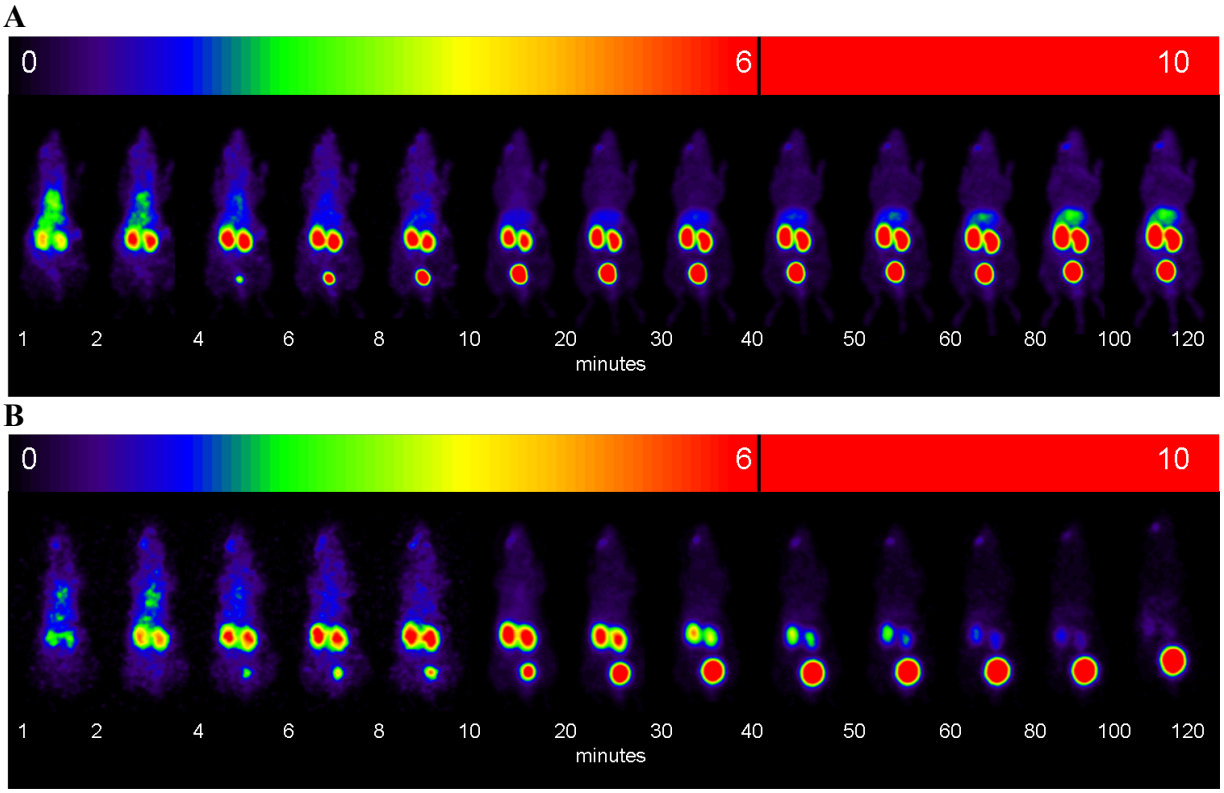
Notre collaboration avec PETNET Solutions SAS m'a permis de travailler avec un autre radiotraceur RGD, le ^{18}F-RGD-K5. Comme vu précédemment le RGD-K5 marqué au ^{18}F est peu étudié en préclinique mais déjà utilisé dans 3 essais cliniques en France et dans deux études pilotes à l'étranger [100, 101]. C'est pourquoi la deuxième étude porte sur la comparaison en préclinique de ces deux radiotraceurs. Bien que ces radiotraceurs soient déjà en essais cliniques depuis peu (2016), mener ces études comparatives en clinique serait impossible, et le temps de parvenir à une conclusion, de nouvelles générations de radiotraceurs seraient probablement proposées.

Etude 2 : Comparaison et évaluation d'un ^{68}Ga-RGD et du ^{18}F- RGD-K5 pour le suivi d'un traitement par bévacizumab

INTRODUCTION

Après la mise en en place du marquage des 2 radiotraceurs, leur biodistribution a été comparée chez des animaux sains. La figure 25 illustre l'imagerie dynamique d'une même souris injectée avec le^{18}F-RGD-K5 (A) et avec le ^{68}Ga-RGD (B). L'évolution temporelle de la biodistribution est quantifiée et présentée sous forme de courbes dans l'article ci-après (Article 3, figure 1).

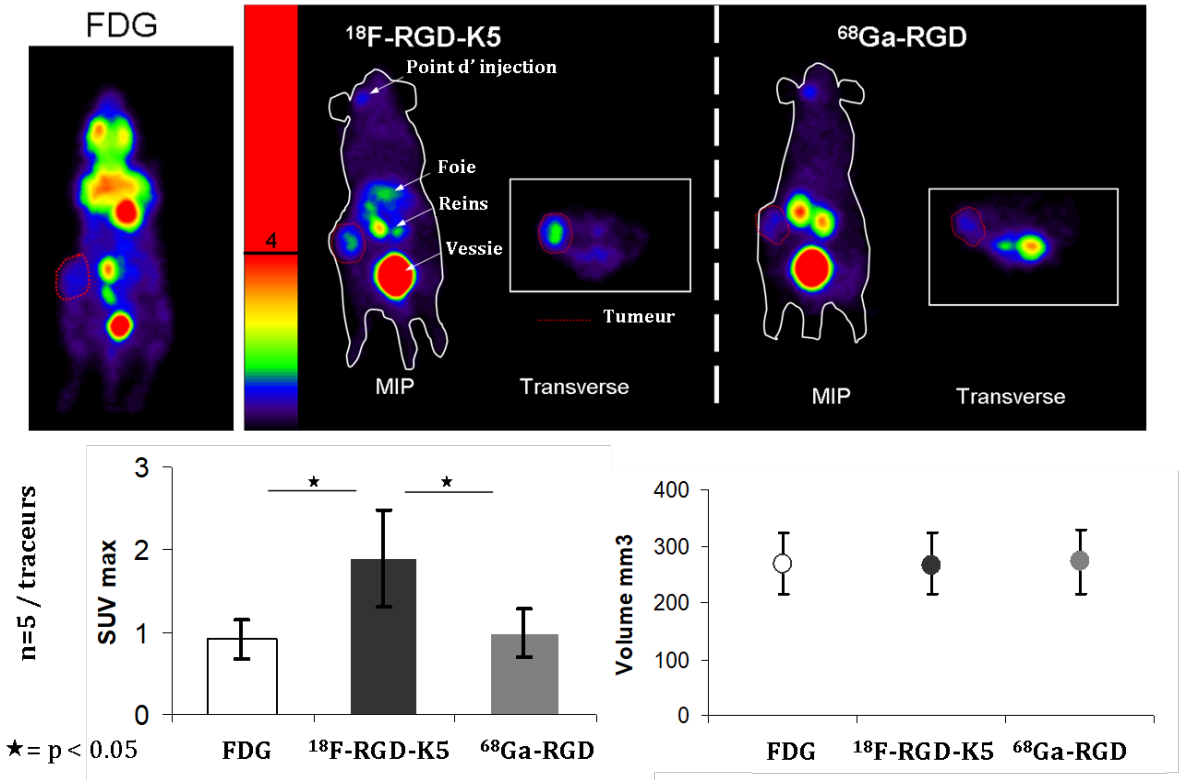
Figure 25 : Biodistribution en imagerie TEP chez une souris saine. Image 3D MIP (maximum intensity projection) (A) ^{18}F-RGD-K5 6MBq , injectée avec 12pmol, (B) ^{68}Ga-NODAGA-RGDfK injectée avec 2.7MBq soit 363pmol. Acquisition dynamique pendant 2h (frame 5x2min + 5x10min + 3x20min).



Par la suite nous avons réalisé une quantification de chaque radiotraceur dans le modèle tumoral déjà utilisé (GB) et nous les avons comparés au FDG (Figure 26). A volume tumoral semblable, 265.75 ± 49.31, 268,05 ± 52.28, 272.45 ± 57.04 mm^3, on obtient une fixation plus importante

pour le ^{18}F-RGD-K5 avec un SUVmax de 1.90 ± 0.59 puis pour le ^{68}Ga-RGD avec un SUVmax de 1 ± 0.29 et enfin un SUVmax de 0.92 ± 0.24 avec le FDG. La fixation des 2 radiotraceurs RGD est significativement plus élevée que celle du FDG (p = 0,02).

Figure 26 : Imagerie TEP d'un model murin de GB humain avec le FDG, le ^{18}F-RGD-K5 et le ^{68}Ga-RGD. Résultats semi-quantitatifs : SUV max de la fixation des traceurs dans la tumeur de GB issus de la lignée cellulaire U87MG.



Pour la suite de l'étude, nous avons comparé ces 2 radiotraceurs dans l'évaluation de l'effet du même anti-angiogénique que la première étude, c'est-à-dire le BVZ. Cette fois, nous avons également voulu évaluer le potentiel de ces radiotraceurs en tant que compagnons diagnostiques. Pour cela, nous avons développé un modèle murin doublement greffé, avec des tumeurs issues des cellules U87MG qui surexpriment les intégrines αvβ3 et des tumeurs issus des cellules A549 qui surexpriment peu les intégrines αvβ3. L'étude a été réalisée sur un temps plus long de traitement, dans la première étude les animaux ont été traités durant 12 jours à raison de 4 injections (1 injection tous les 2 jours) et dans le 3ème article sur une période de 22 jours à raison de 7 injections (1 injection tous les 2 jours).

3ème article

Comparison and evaluation of two RGD peptides labelled with ^{68}Ga or ^{18}F for PET imaging of angiogenesis in animal models of human glioblastoma or lung carcinoma

Claire Provost[1, 2], Aurélie Prignon[1], Laura Rozenblum-Beddok[1, 3], Quentin Bruyer[2], Sylvie Dumont[4], Fatiha Merabtene[4], Valérie Nataf[3], Cédric Bouteiller[2], Jean-Noël Talbot[1, 3].

[1]Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Positonique (LIMP), UMS 28 Université Pierre & Marie Curie, France.

[2]PETNET Solutions SAS, Siemens healthineers, Lisses, France.

[3]Service de Médecine Nucléaire et Radiopharmacie, Hôpital Tenon, AP-HP Paris, France.

[4]Plateforme d'Histomorphologie Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France.

Corresponding author: Claire Provost

Phone: +33 1 56 01 72 98, Fax: +33 1 56 01 72 98. E-mail: claire.provost@upmc.fr

Keywords: preclinical PET, integrins αvβ3, angiogenesis, ^{68}Ga-RGD, ^{18}F-RGD-K5, bevacizumab.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate two RGD radiotracers radiolabelled with fluorine-18 or gallium-68, in detecting angiogenesis in grafted human tumours and monitoring their treatment with the anti-angiogenic agent bevacizumab.

Sixteen mice bearing an U87MG tumour in one flank and a contralateral A549 tumour were treated with intravenous injections of bevacizumab twice a week for 3 weeks. PET images with 18F-RGD-K5 and 68Ga-RGD were acquired before treatment (baseline), after three bevacizumab injections (t1) and after seven bevacizumab injections (t2).

In A549 tumours, the treatment stopped the tumour growth, with a tumour volume measured by calliper remaining between 0.28 and 0.40 cm3. The decrease in tumour uptake of both RGD tracers was non-significant. Therefore it was not possible to predict this efficacy on tumour growth based on RGD PET results, whereas ex vivo measurements showed a significantly lower tumour uptake of both tracers in mice sacrificed at t2 vs. at baseline.

In U87MG tumours, the uptake measured on PET decreased during treatment, reflecting the partial therapeutic effect observed on tumour volume, consisting in a decrease in the slope of tumour growth. Using 18F-RGD-K5, this decrease in tumour SUVmax became significant at t1, whereas it was also observed with the 68Ga-RGD tracer, but only at t2. 18F-RGD-K5 appeared more efficient than 68Ga-RGD in the visualisation and follow-up of U87MG tumours.

The comparison of those results with those of immunohistochemistry at baseline and at t2 favoured the hypothesis that tumour RGD uptake reflects other cancer properties than just its angiogenic capacity.

INTRODUCTION

The formation of new blood vessels involving the migration, growth, and differentiation of endothelial cells, has been described around the end of 1900's [1]. It has rapidly been shown that this process, named angiogenesis, plays a critical role in the growth and spread of cancers [2]. One of the identified targets in relation with this process is an heterodimeric transmembrane glycoprotein receptor, the integrin αvβ3, which is usually overexpressed in tumour-associated blood vessels [3]. It has been highlighted that the aminoacid sequence arginine-glycine-aspartic acid (RGD) is an important binding epitope of several extracellular matrix proteins, such as vitronectin, fibrinogen, osteopontin and fibronectin, recognized by the integrin αvβ3. Various radiotracers for positron emission tomography (PET) imaging incorporating the RGD sequence were developed and radiolabeled with different radionuclides [4]. During last years, cyclic monomeric, dimeric, and tetrameric RGD derivatives were labelled with gallium-68 [5], fluorine-18 or copper-64 for PET imaging [4, 6]. The first one to be used in human studies was [^{18}F]Galacto-RGD [7-9], then the [^{18}F]AH111585 and the [^{18}F]-FPPRGD$_2$ (GE healthcare) [10, 11], the [^{18}F]alfatide [12], the [^{18}F]RGD-K5 (Siemens) [13] and, more recently, the [^{68}Ga]NOTA-PRGD$_2$ [14] and the [^{68}Ga]NODAGA-RGD [15]. In preclinical studies, RGD radiotracers were evaluated in different cancer models of melanoma [16], lung cancer [17], breast cancer [18] and especially glioblastoma (GB). U87MG cells line, which overexpresses the integrin αvβ3, has been the most widely reported among models of human GB [19]. Some recent studies addressed the utility of the RGD PET radiotracers in monitoring antiangiogenic treatment. ^{18}F-fluciclatide could detect changes in tumour vascularity in mice bearing U87MG in response to sunitinib therapy [20]. [^{18}F]FPPRGD2, with quantitative analysis of dynamic PET, was able to distinguish effective from ineffective VEGF121/rGel therapy in U87MG and A549 mice models at an

early stage [21]. [^{18}F]AlF-NOTA-PRGD$_2$ PET/CT was considered as useful to monitoring early response to Endostar anti-angiogenic treatment in a model of nasopharyngeal carcinoma (NPC) xenograft [22].

The aim of our study was to compare, in mouse models bearing human cancer grafts, two PET radiotracers that incorporate the RGD sequence, one radiolabelled with ^{18}F and the other one with ^{68}Ga. Two models were tested, either grafting the U87MG cell line of human GB, which is highly vascular and αvβ3 positive, or grafting A549 cell line of human lung carcinoma, which is moderately vascular and αvβ3 positive, at a lower level than U87MG [23]. The comparison was extended to monitoring during 3 weeks the effect of bevacizumab, an anti-angiogenic antibody raised against vascular endothelial growth factor (VEGF), on these two models, by measuring the tumour diameter and by performing PET imaging at three time points.

RESULTS

Radiolabelling

The time required for radiolabelling was around 110 minutes for ^{18}F-RGD-K5 and 45 minutes for ^{68}Ga-RGD. The overall decay-corrected radiochemical yields (RY) of ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD were respectively 15% and 96%. The radiochemical purity (RP) was ≥ 98% for both radiotracers. Specific activities (SA) of ^{68}Ga-RGD and ^{18}F-RGD-K5 were respectively 4.85 ± 0.78 and > 14.8 MBq/nmol, which were better than acceptance criteria for batch release.

Normal biodistribution of the PET tracers

The time-evolution of biodistribution of the two radiotracers in healthy mice was illustrated with time activity curves (TACs) (Figure 1). The logarithmic ordinate corresponds to the percentage of the quantified radioactivity of each organ measured on PET over the injected radioactivity dose corrected for radionuclide decay. ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD demonstrated a rapid clearance from the blood and all tissues, except in the urinary elimination route (kidneys and bladder). Renal excretion was maximal between 5 and 10 min p.i. and decreased slowly. Accumulation in urinary bladder increased up to 35 min and then reached a plateau at a level of 52 ± 9 % for ^{18}F-RGD-K5 and 32 ± 10 % for ^{68}Ga-RGD. One hour after injection, the liver uptake of ^{18}F-RGD-K5, 6.5 ± 1.56 %, was somewhat greater than that of ^{68}Ga-RGD, 4 ± 0.72 % (Figure 1).

Tumour uptake of PET tracers before treatment (baseline)

When the mean volume reached 0.26 ± 0.17 cm^3 for U87MG tumours and 0.37 ± 0.14 cm^3 for A549 tumours, the baseline PET images were acquired. The tumours were successfully visualised on PET with both tracers (Figure 2A and 2C). The intensity of uptake in U87MG tumours was greater with ^{18}F-RGD-K5 than with ^{68}Ga-RGD, with a mean of maximum standardised uptake value (SUVmax) of 1.44±0.23 versus 0.93±0.33 (p=0.05). For A549 tumours, SUVmax was 1.18±0.35 for ^{18}F-RGD-K5 and 0.94±0.27 for ^{68}Ga-RGD (p=0.31). No statistically significant difference in baseline tumour uptake was observed between the U87MG and A549 tumours (p=0.27 with ^{18}F-RGD-K5 and p=0.98 with ^{68}Ga-RGD).

Effect of treatment on tumour volume

In a first approach, the effect of treatment was evaluated by measuring the tumour volume with calliper. Bevacizumab stopped the growth of A549 tumours, the volume of which stayed between 0.28 and 0.40 cm^3 (Figure 3A). U87MG tumours continued to grow despite bevacizumab treatment, but, compared with the

spontaneous evolution of U87MG tumour volume in untreated mice, a partial effect of the anti-angiogenic treatment became obvious after 7 days (p=0.04) and reinforced after 14 days (p=0.0004) (Figure 3B).

Evolution of tumour tracer uptake on PET during treatment

During treatment, mean SUVmax of ^{18}F-RGD-K5 was 0.74±0.23 at t1 (10 days after the beginning of treatment) and then 0.54±0.14 at t2 (22 days after the beginning of treatment) in U87MG tumours. In A549 tumours, it was 0.67±0.08 at t1 and then 0.70±0.13 at t2. With ^{68}Ga-RGD, mean SUVmax was 0.74±0.27 at t1 (12 days after the beginning of treatment) and then 0.41±0.07 at t2 (23 days after the beginning of treatment) in U87MG tumours, and 0.57±0.05 at t1 and then 0.59±0.32 at t2 in A549 tumours (Figure 2). For U87MG tumours, the SUVmax of ^{18}F-RGD-K5 decreased significantly between baseline and t1 (p= 0.005); and was also significantly lower at t1 than at baseline (p = 0.001). For ^{68}Ga-RGD, the decrease of SUVmax became significant only at t2 (p=0.04) (Figure 2A and B). For A549 tumours, a non- significant trend to decrease was observed with both tracers (Figure 2C and D).

***Ex vivo* determination of tumour tracer uptake**

In the U87MG tumours, the %ID/g was significantly greater before anti-angiogenic treatment for ^{18}F-RGD-K5 than for ^{68}Ga-RGD (p=0.04). After the end of treatment (t2), the difference was no longer significant. For both tracers, %ID/g was significantly greater in non-treated tumours at baseline than in treated tumours at t2: 4.22 ± 0.57 vs. 2.17 ± 1.20 (p=0.03) with ^{18}F-RGD-K5, and 2.94 ± 0.80 vs. 1.01 ± 0.55 (p=0.01) with ^{68}Ga-RGD (Figure 4A).

For the A549 tumours, the %ID/g before anti-angiogenic treatment was similar with ^{18}F-RGD-K5 or ^{68}Ga-RGD. It was significantly greater with ^{18}F-RGD-K5 in treated tumours at t2 (p=0.04). For both tracers, %ID/g was significantly greater in non-treated at baseline than in treated tumours at t2: 3.88 ± 1.15 vs. 2.18 ± 1.61 (p=0.05) with ^{18}F-RGD-K5, and 3.22 ± 1.09 vs. 1.15 ± 0.36 (p=0.03) with ^{68}Ga-RGD (Figure 4B).

Immunochemistry results

Immunohistochemistry staining with Ki67 and CD31 was conducted to further investigate the effect of anti-angiogenic treatment on tumour growth. U87MG tumours had intense proliferation and abundant vasculature, as indicated by strong signal of Ki67 and CD31 staining of the untreated tumour slices (Figure 5). Before treatment, A549 tumours had more heterogeneous proliferation than U87MG tumours (Figure 5A) and significantly less vasculature (p=0.03 Figure 5B). Compared to non-treated tumours at baseline, a significantly lower proliferation was observed in treated tumours at t2, both for U87MG (p=0.00003) and A549 (p=0.003) tumours (Figure 5A). Compared to non-treated tumours at baseline, a significantly lower MVD was observed in treated tumours at t2, both for U87MG (p=0.01) and A549 (p=0.003) tumours (Figure 5B).

Relation between PET tracer uptake, measured in vivo and ex vivo, and immunohistochemistry

As expected, there was a significant correlation between the tumour uptake of RGD tracers measured as SUVmax on PET and as %ID/g of tumour ex vivo, in A549 or U87MG tumours (r=0.77, p<.0.0001). Furthermore, the expression of CD31 was positively correlated with the tumour uptake of RGD tracers expressed either as SUVmax measured on PET (r= 0.54, p= 0.006) or as %ID/g of tumour measured ex vivo (r=0.53, p=0.03).

DISCUSSION

For more than 15 years, the first radiolabelled RGD peptides have been introduced to image angiogeniesis via the visualization of integrin αvβ3 expression thanks to nuclear medicine imaging [24]. At the present time, some RGD PET tracers have been evaluated in clinical trials but their roles in clinical practice have not been assessed yet.

In this study, our aim was to evaluate and compare two RGD PET tracers, ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-NODAGA-c(RGDfK) (abbreviated as ^{68}Ga-RGD above) to predict and monitor efficacy of anti-angiogenic treatment in two different tumour models with different potential of vascular proliferation. Those two tracers have been chosen because they are currently investigated clinically [25]. To the best of our knowledge, there are no preclinical results available with the ^{18}F-RGD-K5 PET tracer in oncology and no study compared these two tracers.

A few studies compared fluorine-labelled and gallium-labelled radiotracers for cancer targeting with PET. Preliminary results in mice or in humans [26, 27] found a trend to superior imaging with fluorinated tracers. This can be due, at least partially, to the physical characteristics of those radionuclides, with a shorter range of the positron of ^{18}F compared to ^{68}Ga, resulting in a better image resolution. Furthermore, the specific activity is greater when radiolabelling is performed with fluorine, in relation with the higher activity of ^{18}F obtained from the cyclotron compared to that of ^{68}Ga eluted from the ^{68}Ge/^{68}Ga generator. This favours a better visualization of the target lesions, with a higher tumour over non-tumour uptake ratio. On the other hand, the labelling with ^{18}F requires a rather demanding environment, which is only available in industrial centres or PET centres equipped with their own cyclotron. It consists in a more complicated process involving more steps than ^{68}Ga labelling of a tracer including a metal chelator. This implies a greater risk of failure in obtaining a fluorine-18 tracer that is adequate for human use.

In this *in vivo* study, the biodistribution in healthy mice was similar for both tracers (Figure 1). There were no intense physiological foci, apart from the elimination routes. Both tracers were eliminated via the urinary tract. ^{18}F-RGD-K5 also had a significant biliary elimination; the liver and the gallbladder were visible on PET images, as described in humans [13]. The ^{18}F-RGD-K5 was superior to the ^{68}Ga-RGD for the visualisation of U87MG tumours before treatment (Figure 2). This greater tumour uptake was confirmed by the *ex vivo* measurement of the %ID/g (Figure 4).

Prior to treatment, immunohistochemistry confirmed abundant microvessels in the U87MG tumours (Figure 5), which were thus visualised on PET with both RGD radiotracers. Immunohistochemistry at baseline showed that the MVD of the A549 tumours was weaker than that of the U87MG tumours (Figure 5). The hypothesis was that MVD is correlated to integrin αvβ3 expression [28]. Indeed the link between MVD and integrin αvβ3 expression is not totally assessed. Guo et al. observed, using anti-human integrin αvβ3 antibodies, a greater expression of integrin for U87MG, in comparison with A549 tumours (22% and 5.5 % of CD61 positive areas respectively). Another study using fluorescence imaging confirmed this difference of integrin αvβ3 expression between U87MG and A549 tumours [23]. Therefore a rather low tumour uptake of both radiotracers was expected in non-treated A549 tumours. Actually this was not observed and A549 tumours were visualised on PET with both tracers before treatment. There was no statistically significant difference between the U87MG and A549 tumours in the SUVmax of each radiotracer. Moreover the evidence for a similar radiotracer uptake in both models was reinforced by the ex vivo measurements that showed very similar values of the %ID/g. A first hypothesis to explain these results could be that the difference in the expression of αvβ3 integrin between U87MG and A549 tumours is not sufficient to be detected in vivo with PET and RGD tracers. Considering the fact that there was no

significant difference in Ki67 index between the two tumour models at baseline, a second hypothesis to explain the similar tumour uptake of both radiotracers could be that the uptake of RGD tracers is related not only to microvasculature density, as confirmed by its significant correlation with the expression of CD31, but also to the overall proliferative capacity of the tumour.

The anti-angiogenic agent used in this study was bevacizumab, an antibody directed against vascular endothelial growth factor (VEGF), which was the first anti-angiogenic therapy registered for the treatment of various advanced cancers in humans (lung, GB, breast, colon, ovarian cancers). In this study, the efficacy of bevacizumab to reduce tumour volume has been evaluated by measuring grafted tumours with a calliper. During treatment, U87MG tumours continued to progress, but the comparison with spontaneous growth showed that bevacizumab was not totally ineffective in U87MG tumours. Our results and those of other teams show that untreated U87MG tumours grow rapidly and animals must be sacrificed after 30 days for ethical reasons, as the tumour load becomes too large [20, 21, 29], which was not the case of mice bearing U87MG tumours treated with bevacizumab. During bevacizumab treatment, it has been possible to confirm a drop in U87MG tumour uptake of both RGD radiotracers, even though the consequences of treatment were detected earlier with ^{18}F-RGD-K5 than with ^{68}Ga-RGD (Figure 2). Immunochemistry confirmed the effect of the treatment, since levels of Ki-67 and CD31 expression were lower at t2 than at baseline in these tumours. Concordant results have been reported by Battle et al. who monitored with ^{18}F-fluciclatide the effects of repeated administration of sunitinib, an anti-angiogenic inhibitor of tyrosine kinase receptor, in an U87MG model [20]. The partial effect of bevacizumab could be explained by the ability of U87MG tumours to remodelling properties under treatment. Indeed studies have shown that the use of bevacizumab, or of other VEGFA/VEGFR2-targeting drugs, has been followed by adaptive tumour responses in preclinical models and clinical settings [30-32].

In contrast, the growth of A549 tumours was stopped by bevacizumab. Concordantly, immunohistochemistry showed lower levels of the proliferation index Ki67 and CD31 expression in treated vs. non-treated tumours. Concerning the PET tracers in A549 tumours, the results were less concordant. There was no difference between non-treated and treated tumours for RGD uptake of both radiotracers on PET. But, the % ID/g e*x vivo* was significantly less intense in treated than in non-treated A549 tumours. One explanation could be that the % ID/g is a more direct measurement of the actual radiotracer uptake than the SUVmax determined on a ROI that may include other structures than the tumour. It may thus be more sensitive to a decrease in integrin expression. On the other hand, the difference in % ID/g has been observed between two independent groups of mice whereas no significant change in SUVmax of a given tumour during treatment has been found using paired statistics considered to be the most powerful approach. It would be interesting to continue the study on a longer evaluation period to find out if the uptake of RGD tracers in A549 tumours actually reflects the response to treatment.

CONCLUSIONS

In this study, qualitative and semi-quantitative results with ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD were concordant, but ^{18}F-RGD-K5 was more efficient than ^{68}Ga-RGD for visualization and follow-up of U87MG tumours. The intensity of the radiotracer uptake prior to treatment, similar for both radiotracers, was not predictive of the quality of the response, which was a moderate reduction in the slope of tumour growth in the model of human GB vs. a strong inhibition of tumour growth in the model of human lung cancer. The Ki67 of the tumour at baseline as an index of aggressiveness was not able to improve the prediction since there was no significant difference in baseline value between glioblastoma (U87MG) and lung cancer (A549) models. Results of MVD

with CD31 were not predictive. MVD was significantly lower in A549 than in U87MG, nevertheless A549 was the model that showed the best response to the anti-angiogenic antibody. It is interesting to note that U87MG and A549 models showed similar in vivo radiotracer uptake whereas they have different integrin αvβ3 expression. Thus RGD radiotracer uptake on PET probably not only reflects tumour vascularisation, which was confirmed in this study, but also the overall proliferative capacity of the tumour.

MATERIALS AND METHODS

The 2 radiotracers have different characteristics, in relation with the radionuclide and the carrier molecule (Table 1).

Radiolabeling of ^{18}F-RGD-K5

RGD-K5 was synthesized by Siemens; its radiolabelling with fluorine-18 was already described by Doss et al. [13]. It was performed by PETNET Solutions (France) on an automated synthesis module (Explora I, Siemens, USA). All the syntheses were performed starting from 320 GBq to get a very high specific activity of the final product. The first step was the fluorination of 4-tosyloxypentyne leading to the intermediate 18F-pentyne. This intermediate was purified by distillation. The second step was the click chemistry reaction of ^{18}F-fluoropentyne with 4 ± 0.4 mg of RGD-K5 azide precursor (989.11 g/mol). The final third step was the purification of the reaction mixture by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). The collected fraction was reformulated as an injectable solution of 10% EtOH: water via C18 trap.

Radiolabelling of ^{68}Ga-RGD

NODAGA-c(RGDfK) (Pichem, Austria) was radiolabelled according to the method of Knetsch et al. [16], with some modifications, on an automated synthesis module (Synchrome R&D, Raytest, Germany). The eluate from a ^{68}Ge/^{68}Ga generator (Iason, Austria) by 5 mL of 0.1 mol/L HCl was fractionated. Around 100 MBq of $^{68}Ga^{3+}$ in 1.2 mL HCl were mixed with 7.5 µg of NODAGA-c(RGDfK) (961.03 g/mol) in 150µL of water trace select plus, 180 µL of 0.8 mol/L sodium acetate. Reaction products were heated for 10 minutes at 40°C. The radioligand was purified from unchelated ^{68}Ga using a SepPak C18 light cartridge (Waters, USA) preconditioned with 2 mL of ethanol and 2 mL of water. One rinsing of 2mL of water was performed and ^{68}Ga- NODAGA-c(RGDfK) was eluted with 800 µL of ethanol 100%. Ethanol was evaporated during few minutes by heating at 70°C, and the product was reconstituted with 1 mL of physiologic serum.

Animal model

Twenty 6-weeks old female nude mice (Charles River) were used for this experiment, which was performed in accordance with French guidelines and regulations, in application of the current European directive (2010/63/EU), with the permission of the committee on animal ethics (Charles Darwin, C2EA - 05). To serve as controls, 4 mice were grafted with U87MG cells lines and were not treated to monitor spontaneous tumour growth. Six of the sixteen mice remaining had PET imaging with one of the two tracers (three mice per tracer), before tumour engraftment, for analysis of TACs in healthy mice.

For a better understanding of the rest of the study, a study is presented Figure 6.

U87MG human GB and A549 human lung carcinoma cell lines (ATTCC) were maintained in RPMI 1640 with L Glutamine (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% foetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-

Aldrich). Cells were grown in T175 CellBind flasks (CellBind Flask Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

Both cells lines were re-suspended in 100µL of phosphate buffered saline and mixed 50/50 with Matrigel (BD Biosciences) to favour tumour engraftment. Mice were subcutaneously grafted in their right flank with $2x10^6$ U87MG cells and in their left flank with $3x10^6$ A549 cells. The resulting tumours were measured twice a week with a calliper. The two perpendicular diameters were recorded, and tumour volume (cm^3) was calculated using the formula: $V = \pi/6*l*w^2$, in which l = length and w = width. When the tumour volume reached 0.3 cm^3, mice were separated into two groups of 8 with a similar tumour size, according to the tracer used for PET imaging, either ^{18}F-RGD-K5 or ^{68}Ga-RGD. Four mice of each group were sacrificed one hour after injection of the PET tracer and autopsied for *ex-vivo* analyses. The remaining 8 mice were treated by 20mg/kg of Bevacizumab (Avastin®, Roche, France) injected intravenously twice a week during 3 weeks. PET imaging with ^{18}F-RGD-K5 or ^{68}Ga-RGD were performed respectively after 9 days or 11 days and 22 or 23 days of treatment. After the last PET imaging, all mice were sacrificed and autopsied for *ex-vivo* analyses.

PET imaging

PET acquisitions were performed using the Mosaic animal PET machine (Philips Medical systems, USA). For each PET tracer, 1-6 MBq (~0.1nmol of ^{18}F-RGD-K5 or ~0.5nmol of ^{68}Ga-RGD) were injected intravenously in the retro-orbital sinus. Mice were maintained under anaesthesia with 1.5% isoflurane during acquisition. Dynamic PET imaging was performed, starting immediately post injection (p.i.) and lasting over 60 min. Static PET imaging was started 1 hour after ^{18}F-RGD-K5 injection or 40 min after ^{68}Ga-RGD injection, over 10 minutes. All sinograms were reconstructed and visualised as 3D images according to a scale of [SUV = radioactive concentration in the ROI (kBq/mL) multiplied by body weight (g) and divided by injected radioactivity (kBq)]. PET analyses were made using Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). Time activity curves (TACs) were obtained by drawing regions of interest (ROI) on dynamic images; counts in the ROI were reported to the total counts in the mouse derived from the dynamic PET data sets. Tumour uptake measured on the static PET data sets was reported as maximum standardised uptake value (SUVmax), which was calculated as the maximal value of the SUVs in the ROI.

***Ex-vivo* analysis**

One hour and twenty minutes after injection of ^{18}F-RGD-K5 and one hour after injection of ^{68}Ga-RGD, mice were sacrificed and dissected. The organs and tumours were removed, weighed and counted in a gamma-counter (1480 Wizard 3, Perkin Elmer). Uptake of tumours and tissues was expressed as mean ± SD percentage of injected activity per gram of tissue (%ID/g), corrected for ^{18}F or ^{68}Ga decay.

All tumours were embedded in paraffin according to standard procedures and different stains were performed: haematoxylin-eosin (HE) for evaluating tissue appearance, tumour-proliferating antigen Ki67 for the tumour aggressiveness and CD31 for expressing the relative microvessel density (MVD) (%). The tumour slices were observed with an optical microscope in transmitted light (Nikon Eclipse, France). All quantitative analyses of the immunostaining were expressed as the percentage of positive area over the area of the entire section; they were measured by using Image J software.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) and PETNET Solutions SAS, Siemens healthineers. The precursor of RGD-K5 was kindly provided by Siemens Molecular Imaging, Inc.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med. 1971; 133: 275-88.
2. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000; 407: 249-57.
3. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. Science. 1994; 264: 569-71.
4. Gaertner FC, Kessler H, Wester HJ, Schwaiger M, Beer AJ. Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2012; 39 Suppl 1: S126-38.
5. Eo JS, Jeong JM. Angiogenesis imaging using 68Ga-RGD PET/CT: therapeutic implications. Semin Nucl Med. 2016; 46: 419-27.
6. Chen X, Sievers E, Hou Y, Park R, Tohme M, Bart R, Bremner R, Bading JR, Conti PS. Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer. Neoplasia. 2005; 7: 271-9.
7. Beer AJ, Haubner R, Goebel M, Luderschmidt S, Spilker ME, Wester HJ, Weber WA, Schwaiger M. Biodistribution and pharmacokinetics of the alphavbeta3-selective tracer 18F-galacto-RGD in cancer patients. J Nucl Med. 2005; 46: 1333-41.
8. Beer AJ, Haubner R, Wolf I, Goebel M, Luderschmidt S, Niemeyer M, Grosu AL, Martinez MJ, Wester HJ, Weber WA, Schwaiger M. PET-based human dosimetry of 18F-galacto-RGD, a new radiotracer for imaging alpha v beta3 expression. J Nucl Med. 2006; 47: 763-9.
9. Beer AJ, Niemeyer M, Carlsen J, Sarbia M, Nahrig J, Watzlowik P, Wester HJ, Harbeck N, Schwaiger M. Patterns of alphavbeta3 expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by 18F-Galacto-RGD PET. J Nucl Med. 2008; 49: 255-9.
10. Kenny LM, Coombes RC, Oulie I, Contractor KB, Miller M, Spinks TJ, McParland B, Cohen PS, Hui AM, Palmieri C, Osman S, Glaser M, Turton D, et al. Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp (RGD) peptide radioligand 18F-AH111585 in breast cancer patients. J Nucl Med. 2008; 49: 879-86.
11. Minamimoto R, Jamali M, Barkhodari A, Mosci C, Mittra E, Shen B, Chin F, Gambhir SS, Iagaru A. Biodistribution of the 18F-FPPRGD(2) PET radiopharmaceutical in cancer patients: an atlas of SUV measurements. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015; 42: 1850-8.
12. Wan W, Guo N, Pan D, Yu C, Weng Y, Luo S, Ding H, Xu Y, Wang L, Lang L, Xie Q, Yang M, Chen X. First experience of 18F-alfatide in lung cancer patients using a new lyophilized kit for rapid radiofluorination. J Nucl Med. 2013; 54: 691-8.
13. Doss M, Kolb HC, Zhang JJ, Belanger MJ, Stubbs JB, Stabin MG, Hostetler ED, Alpaugh RK, von Mehren M, Walsh JC, Haka M, Mocharla VP, Yu JQ. Biodistribution and radiation dosimetry of the integrin marker 18F-RGD-K5 determined from whole-body PET/CT in monkeys and humans. J Nucl Med. 2012; 53: 787-95.
14. Zheng K, Liang N, Zhang J, Lang L, Zhang W, Li S, Zhao J, Niu G, Li F, Zhu Z, Chen X. 68Ga-NOTA-PRGD2 PET/CT for integrin imaging in patients with lung vancer. J Nucl Med. 2015; 56: 1823-7.
15. Haubner R, Finkenstedt A, Stegmayr A, Rangger C, Decristoforo C, Zoller H, Virgolini IJ. [(68)Ga]NODAGA-RGD - Metabolic stability, biodistribution, and dosimetry data from patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016; 43: 2005-13.
16. Knetsch PA, Petrik M, Griessinger CM, Rangger C, Fani M, Kesenheimer C, von Guggenberg E, Pichler BJ, Virgolini I, Decristoforo C, Haubner R. [68Ga]NODAGA-RGD for imaging alphavbeta3 integrin expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011; 38: 1303-12.
17. Morrison MS, Ricketts SA, Barnett J, Cuthbertson A, Tessier J, Wedge SR. Use of a novel Arg-Gly-Asp radioligand, 18F-AH111585, to determine changes in tumor vascularity after antitumor therapy. J Nucl Med. 2009; 50: 116-22.
18. Liu Z, Yan Y, Liu S, Wang F, Chen X. (18)F, (64)Cu, and (68)Ga labeled RGD-bombesin heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer. Bioconjug Chem. 2009; 20: 1016-25.
19. Bozon-Petitprin A, Bacot S, Gauchez AS, Ahmadi M, Bourre JC, Marti-Batlle D, Perret P, Broisat A, Riou LM, Claron M, Boturyn D, Fagret D, Ghezzi C, et al. Targeted radionuclide therapy with RAFT-RGD radiolabelled with 90Y or 177Lu in a mouse model of alphavbeta3-expressing tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015; 42: 252-63.

20. Battle MR, Goggi JL, Allen L, Barnett J, Morrison MS. Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled alphaVbeta3-integrin and alphaV beta5-integrin imaging agent. J Nucl Med. 2011; 52: 424-30.
21. Guo N, Zhang F, Zhang X, Guo J, Lang L, Kiesewetter DO, Niu G, Li Q, Chen X. Quantitative Evaluation of tumor early response to a vascular-disrupting agent with dynamic PET. Mol Imaging Biol. 2015; 17: 865-73.
22. Cui Y, Liu H, Liang S, Zhang C, Cheng W, Hai W, Yin B, Wang D. The feasibility of 18F-AlF-NOTA-PRGD2 PET/CT for monitoring early response of Endostar antiangiogenic therapy in human nasopharyngeal carcinoma xenograft model compared with 18F-FDG. Oncotarget. 2016; 7: 27243-54.
23. Zheng Y, Ji S, Czerwinski A, Valenzuela F, Pennington M, Liu S. FITC-conjugated cyclic RGD peptides as fluorescent probes for staining integrin alphavbeta3/alphavbeta5 in tumor tissues. Bioconjug Chem. 2014; 25: 1925-41.
24. Haubner R, Wester HJ, Weber WA, Mang C, Ziegler SI, Goodman SL, Senekowitsch-Schmidtke R, Kessler H, Schwaiger M. Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. Cancer Res. 2001; 61: 1781-5.
25. Cai H, Conti PS. RGD-based PET tracers for imaging receptor integrin alphav beta3 expression. J Labelled Comp Radiopharm. 2013; 56: 264-79.
26. Dietlein M, Kobe C, Kuhnert G, Stockter S, Fischer T, Schomacker K, Schmidt M, Dietlein F, Zlatopolskiy BD, Krapf P, Richarz R, Neubauer S, Drzezga A, et al. Comparison of [18F]DCFPyL and [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC for PSMA-PET imaging in patients with relapsed prostate cancer. Mol Imaging Biol. 2015; 17: 575-84.
27. Lang L, Li W, Guo N, Ma Y, Zhu L, Kiesewetter DO, Shen B, Niu G, Chen X. Comparison study of [18F]FAl-NOTA-PRGD2, [18F]FPPRGD2, and [68Ga]Ga-NOTA-PRGD2 for PET imaging of U87MG tumors in mice. Bioconjug Chem. 2011; 22: 2415-22.
28. Seguin J, Nicolazzi C, Mignet N, Scherman D, Chabot GG. Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours. Tumour Biol. 2012; 33: 1709-17.
29. Goggi JL, Bejot R, Moonshi SS, Bhakoo KK. Stratification of 18F-labeled PET imaging agents for the assessment of antiangiogenic therapy responses in tumors. J Nucl Med. 2013; 54: 1630-6.
30. Cortes-Santiago N, Hossain MB, Gabrusiewicz K, Fan X, Gumin J, Marini FC, Alonso MM, Lang F, Yung WK, Fueyo J, Gomez-Manzano C. Soluble Tie2 overrides the heightened invasion induced by anti-angiogenesis therapies in gliomas. Oncotarget. 2016; 7: 16146-57.
31. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang J, Stieber D, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108: 3749-54.
32. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. Cancer Cell. 2009; 15: 220-31.
33. Rylova SN, Barnucz E, Fani M, Braun F, Werner M, Lassmann S, Maecke HR, Weber WA. Does imaging alphavbeta3 integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? J Nucl Med. 2014; 55: 1878-84.

Figures

Figure 1 Time-activity curves of PET radiotracer biodistribution in healthy mice. Solid lines represent the percentage of injected dose accumulated in each organ for ^{18}F-RGD-K5 and dotted lines for ^{68}Ga-RGD. Red lines correspond to the heart, yellow to the liver, blue to the kidneys and pink to the bladder.

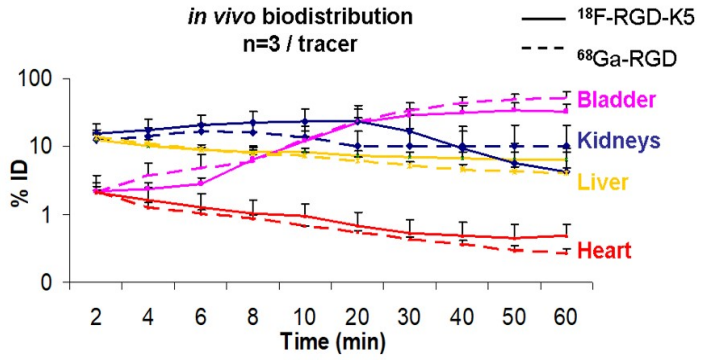


Figure 2 Representative static PET images (A-C) and quantitative analysis of uptake using SUVmax (B-D) of ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD in U87MG-tumour-bearing mice (A-B) and in A549-tumour-bearing mice (C-D), before treatment (baseline) and during anti-angiogenic treatment (t1 and t2). Gb: gallbladder, L: liver; K: kidney; B: bladder; S: spleen. **p<0.05 and **p<0.005*

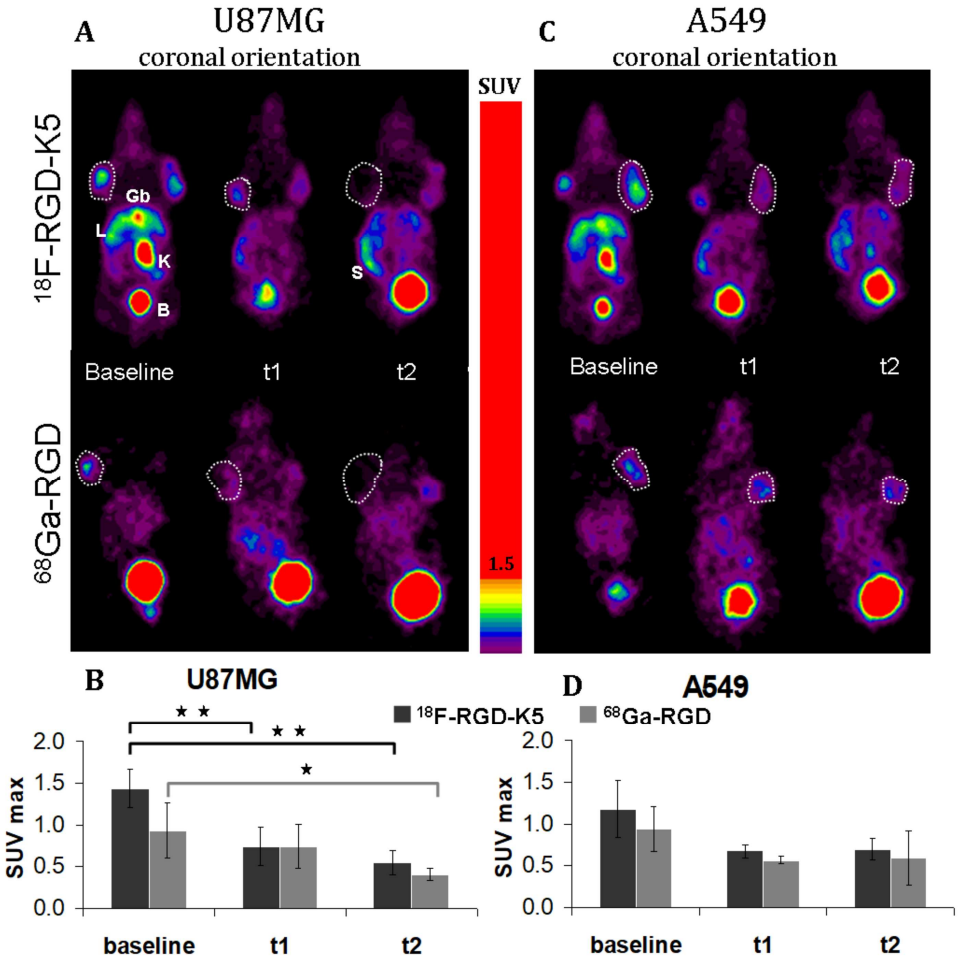


Figure 3 Evolution of tumour volume in cm^3, measured with calliper. (A) Growth of U87MG and A549 tumours treated with bevacizumab. (B) Comparison of tumour volume between bevacizumab-treated and non-treated (NT) U87MG tumours **p<0.05 and ***p<0.0005*

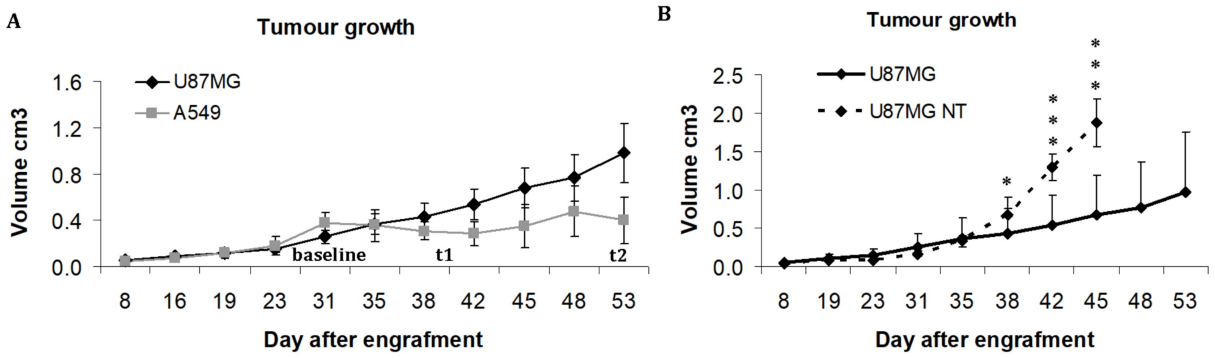


Figure 4 *Ex vivo* uptake of ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD in U87MG or A549 tumour-bearing mice, either non-treated (baseline) or after 3 weeks of anti-angiogenic treatment (t2). **p<0.05*

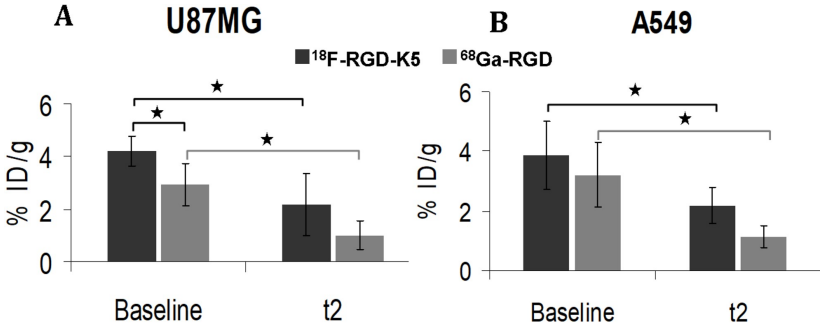


Figure 5 Immunohistochemistry staining Ki67 (A) and CD31 (B) in non-treated (baseline) or treated (t2) tumours. **p<0.05 **p<0.005 and ****p<0.00005*

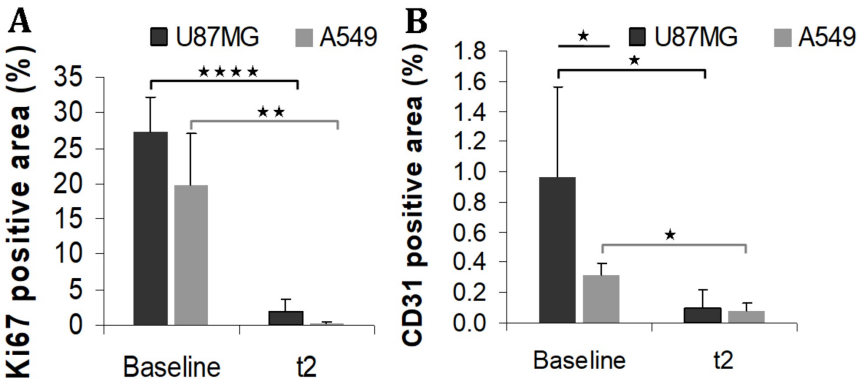


Table 1 Characteristics of ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD. The chemical structure in green corresponds to the cyclic tripeptide RGD Arginin-Glycin-Aspartic acid (c(RGDfK), the orange structure corresponds to a sugar, the purple structure to the triazole, the blue structure to the NODAGA chelate and in red the radionuclide

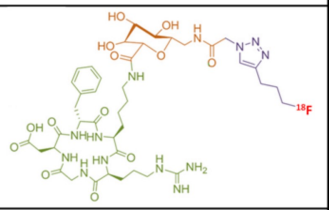
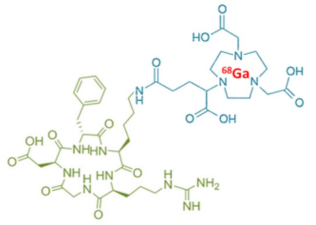
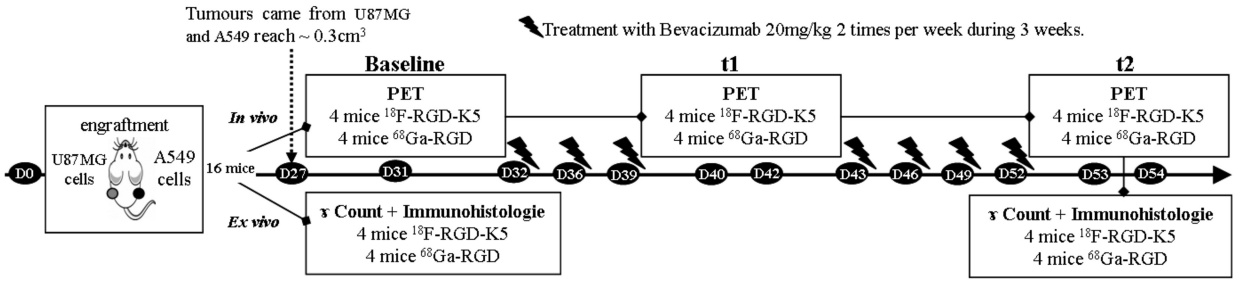
Radio-tracers	Isotope	Molecule
^{18}F-RGD-K5	Fluorine-18 ½ half life = 109.8min Positron yield = 96.86 % Mean energy $E_{\beta =}$ 0.250 Mev Maximum energy $E_{\beta max =}$ 0.634 Mev	
^{68}Ga-RGD	Gallium-68 ½ half life = 68 min Positron yield = 89.14 % Mean energy $E_{\beta =}$ 0.829 Mev Maximum energy $E_{\beta max =}$ 1.899 Mev	

Fig. 6 Study design for comparison of ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD imaging during monitoring of bevacizumab treatment efficacy



DISCUSSION ET PERSPECTIVES PARTIE 2

L'angiogenèse tumorale est un mécanisme compliqué qui implique de nombreuses voies et de nombreux acteurs dont l'ensemble est encore mal compris. La TEP est une technique d'imagerie peu invasive permettant d'acquérir un grand nombre d'informations. Cependant il n'est pas toujours aisé d'interpréter correctement les images obtenues. Ces dernières années, il y a eu un développement important de différents radiotraceurs pour l'imagerie TEP de l'angiogenèse [71-74] et plus particulièrement des intégrines αvβ3. La comparaison entre les traceurs comportant le peptide RGD est difficile, car chaque équipe développe sa molécule et l'étudie sur des modèles différents avec des protocoles différents.

FDG ou RGD ?

Etude 1 :

Les différentes études ayant comparé des radiotraceurs RGD au FDG, en clinique ou en préclinique, montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre la fixation de ces 2 radiotraceurs [90, 91, 98, 101]. Les mécanismes d'accumulation des deux radiotraceurs sont différents, la biodistribution du FDG reflète l'activité des transporteurs du glucose et la phosphorylation par les cellules tumorales, alors que le RGD se lie à l'intégrine αvβ3 exprimée à la surface des cellules tumorales et à celle des cellules endothéliales activées.

Nous avons observé que l'intensité de fixation du FDG, dans les tumeurs U87MG, était relativement variable. Aucune différence n'a été relevée pendant le traitement selon qu'il comportait du BVZ ou du TMZ ou la combinaison des deux (2ème Article, figure 3A). Les résultats de la littérature obtenus dans le même modèle U87MG en utilisant d'autres traitements anti-angiogéniques sont assez contradictoires. Une étude a rapporté que la captation du FDG par la tumeur augmentait significativement après 13 jours de traitement par sunitinib, alors que le volume tumoral diminuait [91]. Une autre équipe a rapporté une diminution de la captation du FDG par la tumeur, 10 jours après le début de traitement par axitinib [168]. Il est tout à fait possible que chaque médicament anti-angiogénique ait une influence indirecte sur le transporteur de glucose qui soit différente. L'augmentation de captation peut être également expliquée par la fixation du FDG dans l'inflammation, l'infection et les maladies granulomateuses, pouvant conduire à des résultats faux positifs au cours de traitements anti-angiogéniques [169, 170]. Avec les mêmes traitements que dans notre étude, Corroyer-Dulmont et col. rapportent des résultats similaires aux nôtres, dans un modèle orthotopique de cellules U251 de GB chez le rat

[171]. Le FDG et les radiotraceurs RGD fournissent des informations moléculaires complémentaires sur les propriétés métaboliques et biologiques des tumeurs, mais non redondantes, étant donné l'absence de corrélation observée. Dans notre étude, le FDG a d'ailleurs permis d'identifier visuellement une nécrose centrale dans les tumeurs du groupe témoin (2ème Article, figure 3A) alors que la valeur de SUVmax n'était pas affectée (ce qui montre qu'il subsiste en périphérie du tissu tumoral actif et qu'il n'est pas inhibé) et qu'elle ne était pas décelable avec le ^{68}Ga-RGD.

Les radiotraceurs RGD dans le suivi de traitements par un agent anti-angiogénique et/ou chimiothérapie

Etude 1 :

Dans le modèle de GB humain U87MG connu pour surexprimer les intégrines αvβ3, notre étude a montré une réduction après 6 jours de traitement de la fixation du ^{68}Ga-RGD dans les tumeurs traitées avec du BVZ seul ou combiné avec du TMZ par rapport aux témoins. Ces résultats sont en concordance avec une réduction de la croissance tumorale (2ème Article figure 2 et 4A). Le ^{68}Ga-RGD confirme la réduction du potentiel angiogénique des tumeurs lorsqu'elles sont traitées par du BVZ.

De façon intéressante, le SUVmax du ^{68}Ga-RGD a augmenté significativement dans le groupe TMZ entre 6 et 12 jours de traitement, alors que le volume tumoral n'augmentait que modestement (2ème Article figure 4B). Nous avons observé une augmentation de la fixation du RGD dans les tumeurs traitées par TMZ, confirmée par l'immunohistochimie qui est significativement plus forte qu'en cas de traitement par BVZ seul ou associé au TMZ (2ème Article figure 5). À notre connaissance, seule l'étude de Xue et col. a décrit des résultats similaires et conforte l'hypothèse que le TMZ pourrait stimuler la néovascularisation [172]. Seule la TEP au ^{68}Ga-RGD a été capable de montrer la persistance de l'expression de l'intégrine dans le groupe traité par TMZ, à un niveau au moins similaire à celui des témoins. Cette persistance n'était reflétée ni par l'évolution du volume tumoral ni par la fixation tumorale de FDG.

Etude 2 :

Pendant le traitement par BVZ, les tumeurs U87MG ont continué à progresser en taille, mais la comparaison avec la croissance spontanée a montré que le traitement n'était pas totalement inefficace. Pendant le traitement par BVZ, les deux radiotraceurs RGD ont montré une

diminution de la captation tumorale des tumeurs U87MG. Le ^{18}F-RGD-K5 a détecté de façon plus précoce que le ^{68}Ga-RGD l'efficacité du traitement (3ème Article Figure 2). Des résultats concordants ont été rapportés par Battle et col. qui ont suivi avec la TEP au ^{18}F-fluciclatide les effets de l'administration répétée de sunitinib, un inhibiteur anti-angiogénique du récepteur tyrosine kinase, dans un modèle de tumeur U87MG [83]. L'effet partiel du BVZ pourrait s'expliquer par la capacité des tumeurs U87MG à remodeler leurs propriétés métaboliques en cours de traitement. En effet, des études ont montré que l'utilisation du bevacizumab, ou d'autres médicaments ciblant VEGFA / VEGFR2, amenaient à une réponse tumorale adaptative dans des modèles précliniques et cliniques [114, 173].

En revanche, le bevacizumab a arrêté la croissance des tumeurs A549 (3ème Article Figure 3A). En concordance, l'immunohistochimie a montré des niveaux inférieurs de l'indice de prolifération Ki-67 et du CD31 dans les tumeurs traitées par rapport aux tumeurs non traitées. Concernant les 2 radiotraceurs dans les tumeurs A549, les résultats étaient moins concordants. Aucune différence d'intensité de fixation des deux radiotraceurs RGD n'a été observée entre les tumeurs non traitées et traitées. Cependant, *ex vivo* le % ID / g était significativement plus petit dans les tumeurs traitées que dans les tumeurs non traitées (3ème Article Figure 4). Peut être une certaine diminution de l'angiogenèse n'a-t-elle pas été identifiable par le SUVmax, déterminé sur une ROI qui peut inclure d'autres structures que la tumeur alors qu'elle l'est avec le % ID/ g qui est une mesure plus directe de la fixation réelle. Quoi qu'il en soit, les deux radiotraceurs RGD pour l'imagerie TEP utilisés dans notre étude, n'ont pas permis de visualiser l'efficacité du traitement sur les tumeurs A549, alors que la croissance tumorale a été arrêtée.

Les radiotraceurs RGD comme compagnons diagnostiques

Etude 2 :

Avant le traitement, l'immunohistochimie a confirmé la présence de microvaisseaux abondants dans les tumeurs U87MG, qui ont été ainsi visualisées en TEP avec les deux radiotraceurs RGD. A l'inverse, les tumeurs A549 présentaient une plus présence significativement plus faible de microvaisseaux (3ème Article Figure 5). Au vu des données de la littérature, la présence de microvaisseaux est souvent corrélée à l'expression de l'intégrine αvβ3 [174]. Guo et col. ont observé, en utilisant des anticorps anti-intégrine αvβ3 humains, une plus grande expression de l'intégrine par les tumeurs U87MG, en comparaison avec les tumeurs A549 (respectivement 22% et 5,5% des zones positives) [95]. Une autre étude utilisant l'imagerie par fluorescence a confirmé cette différence d'expression de l'intégrine αvβ3 entre les tumeurs U87MG et A549

[103]. Par conséquent, on s'attendait à une captation tumorale des deux radiotraceurs relativement plus faible dans les tumeurs A549 que dans les U87MG. Pourtant l'intensité de fixation in vivo et % ID / g *ex vivo* des 2 radiotraceurs a été semblable dans les deux types de tumeurs, A549 et U87MG. Une première hypothèse pour expliquer ces résultats est que la différence dans l'expression de l'intégrine avß3 entre les tumeurs U87MG et A549 n'est pas suffisante pour être détectée in vivo par les radiotraceurs RGD. Considérant le fait qu'il n'y ait pas de différence significative du Ki-67 entre les deux modèles tumoraux, une seconde hypothèse est que la captation des radiotraceurs RGD est liée non seulement à la densité microvasculaire, mais aussi à la capacité proliférative globale de la tumeur reflétée par l'indice Ki-67.

Les radiotraceurs RGD marqués au fluor-18, au gallium-68 et avec d'autres radionucléides

En cancérologie, seulement quelques études ont comparé l'imagerie de radiotraceurs marqués au fluor-18 et marqués au gallium-68. Les résultats préliminaires en clinique et en préclinique ont montré une tendance en faveur de l'imagerie avec des radiotraceurs fluorés [86, 175]. Cela peut s'expliquer, au moins partiellement, du fait des caractéristiques physiques de ces radionucléides, avec un parcours plus court du positron du ^{18}F par rapport à ^{68}Ga, ce qui entraîne une meilleure résolution de l'image. De plus, l'activité spécifique est plus importante lorsque le radiomarquage est effectué avec du fluor, en relation avec l'activité plus élevée de ^{18}F obtenu à partir d'un cyclotron par rapport à celle de ^{68}Ga élué à partir du générateur ^{68}Ge / ^{68}Ga. Ceci favorise une meilleure visualisation des lésions, avec un rapport tumeur sur bruit de fond plus élevé. Par contre, le marquage au ^{18}F nécessite une installation et un environnement contraignants, ce qui n'est disponible que dans les centres industriels ou les rares centres TEP équipés de leur propre cyclotron.

Nos résultats ont montré que les biodistributions du ^{18}F-RGD-K5 et du ^{68}Ga-RGD étaient similaires chez les souris saines (3ème Article Figure 1). Nous n'avons pas identifié de foyers physiologiques d'activité intense, hormis les voies d'élimination. Les deux radiotraceurs sont éliminés par les voies urinaires et le ^{18}F-RGD-K5 a également eu une élimination biliaire significative; le foie et la vésicule biliaire sont visibles sur les images TEP, comme décrit chez l'homme [100]. Les autres radiotraceurs décrits dans la littérature, présentent le même type de biodistribution avec une élimination essentiellement urinaire [86, 117, 176]. Dans la visualisation des tumeurs U87MG avant le traitement (3ème Article Figure 2) le SUVmax était significativement plus important avec le ^{18}F-RGD-K5 (1,44 ± 0,27) qu'avec le ^{68}Ga-RGD (0,93 ± 0,33) (p=0,05). Ces résultats sont concordants avec ceux de la 1er étude, réalisés sur des

tumeurs de volumes similaires (0,26 ± 0,17 cm^3 et 0,27 ± 0,06 cm^3) le SUVmax tumoral était de 1 ± 0,29 avec ^{68}Ga-RGD, significativement inférieur au SUVmax du ^{18}F-RGD-K5 (p=0,04). La plus forte activité tumorale du ^{18}F-RGD-K5 a été confirmée *ex vivo* grâce à la mesure du % ID/g (3ème Article Figure 4).

Il est difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature au vu des différents équipements TEP utilisés et les différentes méthodes d'analyse. En imagerie TEP préclinique où l'obtention de données ex vivo est possible, la quantification de l'intensité de fixation d'un radiotraceur peut être réalisée de plusieurs façons. Nous avons utilisé le SUVmax. D'autres équipes utilisent le « ID/g ». La concentration radioactive en MBq/mL est calculée à partir de l'intensité du pixel moyen, en utilisant une constante d'étalonnage liée au rendement de détection de la machine. En supposant une masse volumique du tissu tumoral de 1 g/mL, on l'assimile à la concentration radioactive massique en MBq/g que l'on divise par l'activité injectée en multipliant par 100 pour obtenir % ID/g [177]. Quelques équipes ont comparé des radiotraceurs RGD marqués au ^{18}F ou ^{68}Ga dans le modèle de GB humain U87MG. Tout comme les nôtres, leurs résultats sont en faveur des peptides RGD marqués au ^{18}F-. L'équipe de Guo rapporte une intensité de fixation en TEP de 3,45 ± 0,18% ID/g pour le ^{18}F-AlF-NOTA-PRGD2, de 2,91 ± 0,35 %ID/g pour le ^{18}F-FPPRGD2 et 2,42 ± 0,56 %ID/g pour le ^{68}Ga-NOTA-PRGD2 [86, 87].

Des équipes ont travaillé sur le radiomarquage de traceur comportant le peptide RGD avec d'autres radionucléides, pour une utilisation en imagerie TEP ou TEMP. En préclinique, l'équipe de Dumont et col. a utilisé des c(RGDfK) avec différents chélateurs pour les marquer au ^{64}Cu ou au ^{68}Ga. Leurs résultats sont en faveurs du ^{64}Cu- et du ^{68}Ga-NODAGA-c(RGDfK), le choix de l'un ou de l'autre reposant seulement sur des critères de production [178]. Une autre étude préclinique a travaillé sur deux dérivés de c(RGDfK), le (PEG)2-c(RGDfK) et le PEG4-SAA4-c(RGDfK) pour marquage au cuivre-64 avec le chélateur NOTA. Ils ont mené leur étude dans le modèle de GB humain U87MG et favorise l'utilisation du radiotraceur ^{64}Cu-NOTA-PEG4-SAA4-c(RGDfK) [179]. En imagerie clinique TEMP, une équipe à développé le ^{99m}Tc-3P-RGD2 pour la détection de métastases osseuses. Ce radiotraceur a permis une détection presque deux fois meilleure qu'avec le bisphosphonate technétié habituellement utilisé (^{99m}Tc-MDP WBS). Il a également permis la détection de tumeurs primitives inconnues et de métastases ganglionnaires [180].

Perspectives

De nombreux nouveaux agents anti-angiogéniques sont développés pour le traitement du cancer. Le sunitinib (Sutent ®) et le sorafenib (Nexavar ®) sont des inhibiteurs de tyrosine kinase. Ils

bloquent la signalisation en aval des récepteurs des facteurs de croissance, dont le VEGF. Le sunitinib a obtenu une AMM pour le traitement en première ligne du cancer du rein métastatique tandis que le sorafenib est utilisé en deuxième ligne pour ce même cancer. Contrairement au bevacizumab, ces médicaments sont administrés seuls, sans chimiothérapie. Ils sont un peu plus efficaces car ils ont un mécanisme d'action pluri-cibles. Il serait intéressant de réaliser des études similaires à celles présentées ci-dessus en utilisant ces nouveaux traitements innovants. Le cilengitide (Ciclane ®), est un petit peptide cyclique contenant le motif RGD [181]. Le cilengitide visant la même cible que les radiotraceurs RGD, une compétition est possible entre l'agent thérapeutique et le radiotraceur, rendant difficile voir impossible l'analyse des images TEP. Il serait donc intéressant de voir, en comparaison avec le FDG ou un autre traceur métabolique reflétant la viabilité tumorale, si les traceurs RGD sont malgré tout capables de mettre en évidence l'efficacité anti-angiogénique de ce traitement.

Un autre axe de perspective est l'analyse des images. Dans nos études, nous n'avons utilisé que le SUVmax pour quantifier nos résultats. De plus en plus d'études développent l'imagerie paramétrique à partir d'acquisition dynamiques en TEP, fournissant une évaluation plus sensible que les images statiques. Bien que les études soient encore controversées, certaines publications montrent une supériorité des cartes paramétriques, par rapport aux images statiques [87, 95, 182-185]. Elles augmenteraient le rapport tumeur sur bruit de fond et apporteraient une meilleure quantification par pixel de l'expression de l'intégrine dans les lésions primaires et métastatiques dans tout le corps [95]. L'analyse dite de « texture » de la tumeur, grâce aux nouveaux logiciels proposés comme « Lifex » développé par le CEA, pourrait enrichir l'interprétation des images TEP par radiotraceurs RGD, probablement en association avec les images obtenues avec le FDG.

Une des forces des études en préclinique est l'analyse ex vivo des tissus en particulier par le marquage immunohistochimique, ce qui n'est pas réalisable chez l'Homme. Il semble intéressant, pour mieux comprendre les mécanismes de la fixation des radiotraceurs RGD et l'impact des anti-angiogénique sur le GB, d'identifier les autres acteurs moléculaires pouvant être impliqués. Cortes-Santiago a étudié l'expression d'une angioprotéine (Ang2) lors d'un traitement au BVZ par marquage immunohistochimique et a observé que l'expression de cette angioprotéine était augmentée après traitement. Ceci évoque un rôle important de la voie Ang2-Tie2 dans les GB après traitement anti-angiogénique [186]. Il serait intéressant de réaliser un tel marquage sur les coupes histologiques que nous possédons, pour comparer l'expression de cette angioprotéine, lors du traitement par BVZ et/ou TMZ ou par BVZ dans deux modèles animaux différents.

Les radiotraceurs RGD ont été beaucoup étudiés en oncologie, mais la surexpression des intégrines αvβ3 dans d'autres pathologies a été confirmée par des études cliniques, par exemple, dans l'infarctus du myocarde [187, 188], l'athérosclérose [189] et l'infarctus cérébral [190]. Les radiotraceurs RGD peuvent également s'accumuler dans certaines lésions telles que la réaction cutanée d'hypersensibilité retardée [124], la synovite villonodulaire [75], l'hémangiome [80] et l'oncocytome [191, 192]. Toutes ces pathologies peuvent être des voies de recherche pour l'utilisation des radiotraceurs RGD.

Conclusion

En cancérologie la TEP est une technique d'imagerie qui n'a de cesse d'évoluer. Les équipements deviennent de plus en plus performants et les recherches fondamentales sur les voies de signalisations des cellules cancéreuses ouvrent la voie au développement de nouveaux radiotraceurs. Ces radiotraceurs se veulent de plus en plus spécifiques afin d'apporter aux patients une prise en charge la plus personnalisée possible. La préclinique est un outil très important dans le développement de ces nouveaux radiotraceurs, dans leur comparaison et la recherche de nouvelles applications. La préclinique a de surcroît l'avantage de pouvoir associer les résultats qualitatifs et quantitatifs de l'imagerie à la réalité du ciblage grâce à l'étude des tissus par immunohistochimie.

Dans la première partie de cette thèse, il a été montré que le ^{68}Ga-DOTATOC est capable de visualiser, en TEP dans un modèle murin, des tumeurs de NB humain greffées. L'imagerie des NB par le ^{68}Ga-DOTATOC a été corrélée à l'expression des SSTR2 lors de notre étude et plus récemment par l'équipe de Zhang et col. [158]. Contrairement à ce qui a été rapporté dans les TNE, dans le modèle de NB utilisé pour cette étude, la captation du ^{68}Ga-DOTATOC était corrélée positivement avec à celle du FDG. Nos résultats et la littérature récente favorisent une application théranostique des ligands des récepteurs de la somatostatine dans les NB, même à des stades avancés [167].

Dans la deuxième partie de cette thèse, il a été montré que le ^{68}Ga-RGD, contrairement au FDG, discriminait les tumeurs répondeuses au traitement par anti-angiogénique associées ou non à une chimiothérapie (après 6 jours de traitement). De façon intéressante, la fixation du ^{68}Ga-RGD a augmenté dans les tumeurs traitées par chimiothérapie au témozolomide. La comparaison des deux radiotraceurs ^{68}Ga-RGD et ^{18}F-RGD-K5 a montré la supériorité du ^{18}F-RGD-K5 dans la visualisation du modèle murin de GB humain et dans son suivi lors du traitement anti-angiogénique.

Le radionucléide de référence pour l'imagerie TEP en cancérologie clinique reste le fluor-18 ; qui est utilisé pour la plupart des radiotraceurs métaboliques. La volonté de développer des nouveaux radiotraceurs plus spécifiques a orienté les recherches, depuis les années 2000, vers des marquages au gallium-68 dont la chimie est moins compliquée. A l'heure actuelle, le

gallium-68 commence clairement à trouver sa place en TEP clinique et n'est plus seulement un radionucléide de développement utilisé en préclinique.

Il est difficile de choisir entre fluor-18 et gallium-68, chacun a ses avantages et ses inconvénients. Bien que la production du fluor-18 demande une installation conséquente, il est produit à de forte activité et permet d'obtenir des radiotraceurs avec une haute activité spécifique. Les images obtenues avec au fluor-18 ont une meilleure résolution qu'avec le gallium-68. Le gallium-68 a une chimie de marquage plus simple une fois qu'on dispose d'un traceur comportant un chélateur optimal. Cependant l'obtention de générateurs $^{68}Ge/^{68}Ga$ est actuellement passagèrement difficile, du fait de leur arrivée récente sur le marché et de leur succès dépassant la production de germanium-68 par des cyclotrons puissants. En règle générale, la production de radiotraceurs marqués au gallium-68 élué d'un générateur permet l'injection d'un nombre de patients beaucoup plus petit que la livraison de radiotraceurs marqués au fluor-18 dans un environnement industriel. Ces deux radionucléides sont globalement complémentaires ; à l'avenir, le gallium-68 sera probablement limité en routine humaine à des pathologies peu fréquentes sans flux de patients important. L'utilisation de l'imagerie TEP préclinique, permettra d'optimiser la translation des radiotraceurs réellement adaptés à la résolution de problèmes cliniques non résolus par l'imagerie des traceurs métaboliques non spécifiques.

Références

1. **Patton**, The birth of nuclear medicine instrumentation: Blumgart and Yens, 1925. J Nucl Med, 2003. 44(8): p. 1362-5.

2. **Kuhl and Edwards**, Image separation radioisotope scanning. Radiology, 1963. 80(4): p. 653-662.

3. **Anger and Gottschalk**, Localization of brain tumors with the positron scintillation camera. J Nucl Med, 1963. 4: p. 326-30.

4. **Phelps, Hoffman, Mullani, and Ter-Pogossian**, Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. J Nucl Med, 1975. 16(3): p. 210-24.

5. **Beyer, Czernin, and Freudenberg**, Variations in clinical PET/CT operations: results of an international survey of active PET/CT users. J Nucl Med, 2011. 52(2): p. 303-10.

6. **Orlhac, Theze, Soussan, Boisgard, and Buvat**, Multiscale texture analysis: from 18F-FDG PET images to histologic images. J Nucl Med, 2016. 57(11): p. 1823-1828.

7. **Orlhac, Nioche, Soussan, and Buvat**, Understanding changes in tumor texture indices in PET: A comparison between visual assessment and index values in simulated and patient Data. J Nucl Med, 2017. 58(3): p. 387-392.

8. **Roesch**, Scandium-44: benefits of a long-lived PET radionuclide available from the (44)Ti/(44)Sc generator system. Curr Radiopharm, 2012. 5(3): p. 187-201.

9. **Berg, Halldin, and Brunstrom**, Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. Environ Toxicol Chem, 2001. 20(12): p. 2836-40.

10. **Halldin, Gulyas, Langer, and Farde**, Brain radioligands--state of the art and new trends. Q J Nucl Med, 2001. 45(2): p. 139-52.

11. **Laruelle, Slifstein, and Huang**, Relationships between radiotracer properties and image quality in molecular imaging of the brain with positron emission tomography. Mol Imaging Biol, 2003. 5(6): p. 363-75.

12. **Pike**, PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. Trends Pharmacol Sci, 2009. 30(8): p. 431-40.

13. **Mansi, Wang, Forrer, Waser, Cescato, Graham,... Maecke**, Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011. 38(1): p. 97-107.

14. **Guo, You, Shi, Song, Gao, Xu,... Zhang**, Development of a New FR-Targeting Agent 99mTc-HYNFA with Improved Imaging Contrast and Comparison of Multimerization and/or PEGylation Strategies for Radio-Folate Modification. Mol Pharm, 2017.

15. **Thumshirn, Hersel, Goodman, and Kessler**, Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. Chemistry, 2003. 9(12): p. 2717-25.

16. **Poethko, Schottelius, Thumshirn, Hersel, Herz, Henriksen,... Wester**, Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: (18)F-labeled RGD and octreotide analogs. J Nucl Med, 2004. 45(5): p. 892-902.

17. **Li, Chen, and Chen**, (68)Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin alpha(v)beta (3) expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. 35(6): p. 1100-8.

18. **Pandey, Byrne, Jiang, Packard, and Degrado**, Cyclotron production of (68)Ga via the (68)Zn(p,n)(68)Ga reaction in aqueous solution. Am J Nucl Med Mol Imaging, 2014. 4(4): p. 303-10.

19. **Roesch**, Maturation of a key resource - the germanium-68/gallium-68 generator: development and new insights. Curr Radiopharm, 2012. 5(3): p. 202-11.

20. **Velikyan**, 68Ga-Based radiopharmaceuticals: production and application relationship. Molecules, 2015. 20(7): p. 12913-43.

21. **Decristoforo, Pickett, and Verbruggen**, Feasibility and availability of (6)(8)Ga-labelled peptides. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 39 Suppl 1: p. S31-40.

22. **Berry, Ma, Ballinger, Tavare, Koers, Sunassee,... Blower**, Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. Chem Commun (Camb), 2011. 47(25): p. 7068-70.

23. **Conti and Eriksson**, Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. EJNMMI Phys, 2016. 3(1): p. 8.

24. **Disselhorst, Brom, Laverman, Slump, Boerman, Oyen,... Visser**, Image-quality assessment for several positron emitters using the NEMA NU 4-2008 standards in the Siemens Inveon small-animal PET scanner. J Nucl Med, 2010. 51(4): p. 610-7.

25. **Sanchez-Crespo**, Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography. Appl Radiat Isot, 2013. 76: p. 55-62.

26. **Decristoforo**, Gallium-68 -- a new opportunity for PET available from a long shelf-life generator - automation and applications. Curr Radiopharm, 2012. 5(3): p. 212-20.

27. **Srinivasarao, Galliford, and Low**, Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. Nat Rev Drug Discov, 2015. 14(3): p. 203-19.

28. **Koopmans and Glaudemans**, Rationale for the use of radiolabelled peptides in diagnosis and therapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 39 Suppl 1: p. S4-10.

29. **A and Fanti**, Radiolabelled peptides in diagnosis and therapy: an introduction. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 39 Suppl 1: p. S1-3.

30. **Velikyan**, Prospective of (6)(8)Ga-radiopharmaceutical development. Theranostics, 2013. 4(1): p. 47-80.

31. **Laverman, Sosabowski, Boerman, and Oyen**, Radiolabelled peptides for oncological diagnosis. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 39 Suppl 1: p. S78-92.

32. **Reubi**, Old and new peptide receptor targets in cancer: future directions. Recent Results Cancer Res, 2013. 194: p. 567-76.

33. **Mach**, Small molecule receptor ligands for PET studies of the central nervous system-focus on G protein coupled receptors. Semin Nucl Med, 2017. 47(5): p. 524-535.

34. **Schottelius and Wester**, Molecular imaging targeting peptide receptors. Methods, 2009. 48(2): p. 161-77.

35. **Kraeber-Bodere, Rousseau, Bodet-Milin, Frampas, Faivre-Chauvet, Rauscher,... Barbet**, A pretargeting system for tumor PET imaging and radioimmunotherapy. Front Pharmacol, 2015. 6: p. 54.

36. **Donnelly, Smith, Morin, Lipovsek, Gokemeijer, Cohen,... Hayes**, Synthesis and biological evaluation of a novel 18F-labeled adnectin as a PET radioligand for imaging PD-L1 expression. J Nucl Med, 2017.

37. **Tavare, Mccracken, Zettlitz, Salazar, Olafsen, Witte, and Wu**, Immuno-PET of murine T cell reconstitution postadoptive stem cell transplantation using anti-CD4 and anti-CD8 Cys-diabodies. J Nucl Med, 2015. 56(8): p. 1258-64.

38. **Reubi**, Neuropeptide receptors in health and disease: the molecular basis for in vivo imaging. J Nucl Med, 1995. 36(10): p. 1825-35.

39. **Patel**, Somatostatin and its receptor family. Front Neuroendocrinol, 1999. 20(3): p. 157-98.

40. **Barbieri, Bajetto, Pattarozzi, Gatti, Wurth, Thellung,... Florio**, Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm. Int J Pept, 2013. 2013: p. 926295.

41. **Velikyan, Rosenstrom, Estrada, Ljungvall, Haggstrom, Eriksson, and Antoni**, Synthesis and preclinical evaluation of 68Ga-labeled collagelin analogs for imaging and quantification of fibrosis. Nucl Med Biol, 2014. 41(9): p. 728-36.

42. **Naji and A**, (6)(8)Ga-labelled peptides in the management of neuroectodermal tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 39 Suppl 1: p. S61-7.

43. **Fani, Nicolas, and Wild**, Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy. J Nucl Med, 2017. 58(Suppl 2): p. 61S-66S.

44. **Reubi, Schar, Waser, Wenger, Heppeler, Schmitt, and Macke**, Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. Eur J Nucl Med, 2000. 27(3): p. 273-82.

45. **Zhang-Yin, Dirand, Sasanelli, Correge, Peudon, Kiffel,... Talbot**, Equivalent dose rate 1 meter from neuroendocrine tumor patients exiting the nuclear medicine department after undergoing imaging. J Nucl Med, 2017. 58(8): p. 1230-1235.

46. **Antunes, Ginj, Zhang, Waser, Baum, Reubi, and Maecke**, Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals? Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007. 34(7): p. 982-93.

47. **Fani, Del Pozzo, Abiraj, Mansi, Tamma, Cescato,... Maecke**, PET of somatostatin receptor-positive tumors using 64Cu- and 68Ga-somatostatin antagonists: the chelate makes the difference. J Nucl Med, 2011. 52(7): p. 1110-8.

48. **Ambrosini, Tomassetti, Castellucci, Campana, Montini, Rubello,... Fanti**, Comparison between 68Ga-DOTA-NOC and 18F-DOPA PET for the detection of gastro-entero-pancreatic and lung neuro-endocrine tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. 35(8): p. 1431-8.

49. **Kayani, Bomanji, Groves, Conway, Gacinovic, Win,... Ell**, Functional imaging of neuroendocrine tumors with combined PET/CT using 68Ga-DOTATATE (DOTA-DPhe1,Tyr3-octreotate) and 18F-FDG. Cancer, 2008. 112(11): p. 2447-55.

50. **Kroiss, Putzer, Uprimny, Decristoforo, Gabriel, Santner,... Virgolini**, Functional imaging in phaeochromocytoma and neuroblastoma with 68Ga-DOTA-Tyr 3-octreotide positron emission tomography and 123I-metaiodobenzylguanidine. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011. 38(5): p. 865-73.

51. **Naji, Zhao, Welsh, Meades, Win, Ferrarese,... Al-Nahhas**, 68Ga-DOTA-TATE PET vs. 123I-MIBG in identifying malignant neural crest tumours. Mol Imaging Biol, 2011. 13(4): p. 769-75.

52. **Putzer, Gabriel, Henninger, Kendler, Uprimny, Dobrozemsky,... Virgolini**, Bone metastases in patients with neuroendocrine tumor: 68Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in comparison to CT and bone scintigraphy. J Nucl Med, 2009. 50(8): p. 1214-21.

53. **Srirajaskanthan, Kayani, Quigley, Soh, Caplin, and Bomanji**, The role of 68Ga-DOTATATE PET in patients with neuroendocrine tumors and negative or equivocal findings on 111In-DTPA-octreotide scintigraphy. J Nucl Med, 2010. 51(6): p. 875-82.

54. **Baum and Kulkarni**, THERANOSTICS: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy - The bad Berka experience. Theranostics, 2012. 2(5): p. 437-47.

55. **Barrio, Czernin, Fanti, Ambrosini, Binse, Du,... Fendler**, The impact of somatostatin receptor-directed PET/CT on the management of patients with neuroendocrine tumor: A systematic review and meta-analysis. J Nucl Med, 2017. 58(5): p. 756-761.

56. **Mikolajczak and Maecke**, Radiopharmaceuticals for somatostatin receptor imaging. Nucl Med Rev Cent East Eur, 2016. 19(2): p. 126-32.

57. **Dalm, Haeck, Doeswijk, De Blois, De Jong, and Van Deurzen**, SSTR-mediated imaging in breast cancer: Is there a role for radiolabeled somatostatin receptor antagonists? J Nucl Med, 2017. 58(10): p. 1609-1614.

58. **Schartinger, Dudas, Url, Reinold, Virgolini, Kroiss,... Uprimny**, (68)Ga-DOTA (0)-Tyr (3)-octreotide positron emission tomography in nasopharyngeal carcinoma. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015. 42(1): p. 20-4.

59. **Lapa, Lohr, Bluemel, Monoranu, and Herrmann**, Primary central nervous system lymphoma and meningioma in DOTATATE PET/CT. Clin Nucl Med, 2013. 38(12): p. 994-5.

60. **Maecke and Reubi**, Somatostatin receptors as targets for nuclear medicine imaging and radionuclide treatment. J Nucl Med, 2011. 52(6): p. 841-4.

61. **Kraeber-Bodere, Pallardy, Lacombe, Eugene, Ansquer, Bodet-Milin,... Cherel**, Radionuclide therapy: New radiopharmaceuticals. Medecine Nucleaire-Imagerie Fonctionnelle Et Metabolique, 2011. 35(11): p. 613-616.

62. **Strosberg, Yao, Bajetta, Aout, Bakker, Hainsworth,... Pavel**, Efficacy of octreotide long-acting repeatable in neuroendocrine tumors: RADIANT-2 placebo arm post hoc analysis. Endocr Relat Cancer, 2015. 22(6): p. 933-40.

63. **Yeong, Cheng, and Ng**, Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. J Zhejiang Univ Sci B, 2014. 15(10): p. 845-63.

64. **De, Razorenova, Mccabe, O'toole, Qin, and Byzova**, VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(21): p. 7589-94.

65. **Folkman**, Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971. 285(21): p. 1182-6.

66. **Marinelli, Lavecchia, Gottschalk, Novellino, and Kessler**, Docking studies on alphavbeta3 integrin ligands: pharmacophore refinement and implications for drug design. J Med Chem, 2003. 46(21): p. 4393-404.

67. **Ruoslahti and Pierschbacher**, New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science, 1987. 238(4826): p. 491-7.

68. **Temming, Schiffelers, Molema, and Kok**, RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. Drug Resist Updat, 2005. 8(6): p. 381-402.

69. **Liu**, Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin alphavbeta3 targeted radiotracers for tumor imaging. Mol Pharm, 2006. 3(5): p. 472-87.

70. **Shi, Wang, and Liu**, Radiolabeled cyclic RGD peptides as radiotracers for tumor imaging. Biophys Rep, 2016. 2(1): p. 1-20.

71. **Gaertner, Kessler, Wester, Schwaiger, and Beer**, Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. 39 Suppl 1: p. S126-38.

72. **Haubner, Maschauer, and Prante**, PET radiopharmaceuticals for imaging integrin expression: tracers in clinical studies and recent developments. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 871609.

73. **Chen, Niu, Wu, and Chen**, Clinical application of radiolabeled RGD peptides for PET imaging of integrin alphavbeta3. Theranostics, 2016. 6(1): p. 78-92.

74. **Eo and Jeong**, Angiogenesis imaging using (68)Ga-RGD PET/CT: Therapeutic implications. Semin Nucl Med, 2016. 46(5): p. 419-27.

75. **Haubner, Weber, Beer, Vabuliene, Reim, Sarbia,... Schwaiger**, Noninvasive visualization of the activated alphavbeta3 integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F]Galacto-RGD. PLoS Med, 2005. 2(3): p. e70.

76. **Beer, Haubner, Sarbia, Goebel, Luderschmidt, Grosu,... Schwaiger**, Positron emission tomography using [18F]Galacto-RGD identifies the level of integrin alpha(v)beta3 expression in man. Clin Cancer Res, 2006. 12(13): p. 3942-9.

77. **Beer, Grosu, Carlsen, Kolk, Sarbia, Stangier,... Schwaiger**, [18F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of alphavbeta3 expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res, 2007. 13(22 Pt 1): p. 6610-6.

78. **Beer, Lorenzen, Metz, Herrmann, Watzlowik, Wester,... Schwaiger**, Comparison of integrin alphaVbeta3 expression and glucose metabolism in primary and metastatic lesions in cancer patients: a PET study using 18F-galacto-RGD and 18F-FDG. J Nucl Med, 2008. 49(1): p. 22-9.

79. **Schnell, Krebs, Carlsen, Miederer, Goetz, Goldbrunner,... Beer**, Imaging of integrin alpha(v)beta(3) expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography. Neuro Oncol, 2009. 11(6): p. 861-70.

80. **Beer, Niemeyer, Carlsen, Sarbia, Nahrig, Watzlowik,... Schwaiger**, Patterns of alphavbeta3 expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by 18F-Galacto-RGD PET. J Nucl Med, 2008. 49(2): p. 255-9.

81. **Beer, Schwarzenbock, Zantl, Souvatzoglou, Maurer, Watzlowik,... Krause**, Non-invasive assessment of inter-and intrapatient variability of integrin expression in metastasized prostate cancer by PET. Oncotarget, 2016. 7(19): p. 28151-9.

82. **Morrison, Ricketts, Barnett, Cuthbertson, Tessier, and Wedge**, Use of a novel Arg-Gly-Asp radioligand, 18F-AH111585, to determine changes in tumor vascularity after antitumor therapy. J Nucl Med, 2009. 50(1): p. 116-22.

83. **Battle, Goggi, Allen, Barnett, and Morrison**, Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled alphaVbeta3-integrin and alphaV beta5-integrin imaging agent. J Nucl Med, 2011. 52(3): p. 424-30.

84. **Kenny, Coombes, Oulie, Contractor, Miller, Spinks,... Aboagye**, Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp (RGD) peptide radioligand 18F-AH111585 in breast cancer patients. J Nucl Med, 2008. 49(6): p. 879-86.

85. **Mena, Owenius, Turkbey, Sherry, Bratslavsky, Macholl,... Kurdziel**, [(1)(8)F]fluciclatide in the in vivo evaluation of human melanoma and renal tumors expressing alphavbeta 3 and alpha vbeta 5 integrins. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2014. 41(10): p. 1879-88.

86. **Lang, Li, Guo, Ma, Zhu, Kiesewetter,... Chen**, Comparison study of [18F]FAl-NOTA-PRGD2, [18F]FPPRGD2, and [68Ga]Ga-NOTA-PRGD2 for PET imaging of U87MG tumors in mice. Bioconjug Chem, 2011. 22(12): p. 2415-22.

87. **Guo, Lang, Gao, Niu, Kiesewetter, Xie, and Chen**, Quantitative analysis and parametric imaging of 18F-labeled monomeric and dimeric RGD peptides using compartment model. Mol Imaging Biol, 2012. 14(6): p. 743-52.

88. **Wan, Guo, Pan, Yu, Weng, Luo,... Chen**, First experience of 18F-alfatide in lung cancer patients using a new lyophilized kit for rapid radiofluorination. J Nucl Med, 2013. 54(5): p. 691-8.

89. **Dijkgraaf, Terry, Mcbride, Goldenberg, Laverman, Franssen,... Boerman**, Imaging integrin alpha-v-beta-3 expression in tumors with an 18F-labeled dimeric RGD peptide. Contrast Media Mol Imaging, 2013. 8(3): p. 238-45.

90. **Cui, Liu, Liang, Zhang, Cheng, Hai,... Wang**, The feasibility of 18F-AlF-NOTA-PRGD2 PET/CT for monitoring early response of Endostar antiangiogenic therapy in human nasopharyngeal carcinoma xenograft model compared with 18F-FDG. Oncotarget, 2016. 7(19): p. 27243-54.

91. **Bao, Wang, Luo, Wang, Zhang, and Zhang**, Optimization of early response monitoring and prediction of cancer antiangiogenesis therapy via noninvasive PET molecular imaging strategies of multifactorial bioparameters. Theranostics, 2016. 6(12): p. 2084-2098.

92. **Mi, Yu, Pan, Yang, Wan, Niu, and Chen**, Pilot prospective evaluation of (18)F-Alfatide II for detection of skeletal metastases. Theranostics, 2015. 5(10): p. 1115-21.

93. **Yu, Pan, Mi, Xu, Lang, Niu,... Chen**, (18)F-Alfatide II PET/CT in healthy human volunteers and patients with brain metastases. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015. 42(13): p. 2021-8.

94. **Zhang, Liu, Gao, Hu, Zhao, Tao,... Yuan**, Can an (1)(8)F-ALF-NOTA-PRGD2 PET/CT Scan predict treatment sensitivity to concurrent chemoradiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma? J Nucl Med, 2016. 57(4): p. 524-9.

95. **Guo, Zhang, Zhang, Guo, Lang, Kiesewetter,... Chen**, Quantitative evaluation of tumor early response to a vascular-disrupting agent with dynamic PET. Mol Imaging Biol, 2015. 17(6): p. 865-73.

96. **Iagaru, Mosci, Shen, Chin, Mittra, Telli, and Gambhir**, (18)F-FPPRGD2 PET/CT: pilot phase evaluation of breast cancer patients. Radiology, 2014. 273(2): p. 549-59.

97. **Iagaru, Mosci, Mittra, Zaharchuk, Fischbein, Harsh,... Gambhir**, Glioblastoma multiforme recurrence: An exploratory study of (18)F FPPRGD2 PET/CT. Radiology, 2015. 277(2): p. 497-506.

98. **Minamimoto, Jamali, Barkhodari, Mosci, Mittra, Shen,... Iagaru**, Biodistribution of the (1)(8)F-FPPRGD(2) PET radiopharmaceutical in cancer patients: an atlas of SUV measurements. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015. 42(12): p. 1850-8.

99. **Wu, Li, Chen, Cai, He, Chin,... Chen**, microPET of tumor integrin alphavbeta3 expression using 18F-labeled PEGylated tetrameric RGD peptide (18F-FPRGD4). J Nucl Med, 2007. 48(9): p. 1536-44.

100. **Doss, Kolb, Zhang, Belanger, Stubbs, Stabin,... Yu**, Biodistribution and radiation dosimetry of the integrin marker 18F-RGD-K5 determined from whole-body PET/CT in monkeys and humans. J Nucl Med, 2012. 53(5): p. 787-95.

101. **Chen, Wang, Lin, Chang, Hsieh, Liao,... Yen**, RGD-K5 PET/CT in patients with advanced head and neck cancer treated with concurrent chemoradiotherapy: Results from a pilot study. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2016. 43(9): p. 1621-9.

102. **Li, Zhao, Zhang, Li, Ji, Gao,... Zhu**, (68)Ga-PRGD2 PET/CT in the evaluation of Glioma: a prospective study. Mol Pharm, 2014. 11(11): p. 3923-9.

103. **Zheng, Liang, Zhang, Lang, Zhang, Li,... Chen**, 68Ga-NOTA-PRGD2 PET/CT for Integrin Imaging in Patients with Lung Cancer. J Nucl Med, 2015. 56(12): p. 1823-7.

104. **Israel, Richter, Stritzker, Van Ooschot, Donat, Buck, and Samnick**, PET imaging with [(6)(8)Ga]NOTA-RGD for prostate cancer: a comparative study with [(1)(8)F]fluorodeoxyglucose and [(1)(8)F]fluoroethylcholine. Curr Cancer Drug Targets, 2014. 14(4): p. 371-9.

105. **Liu, Niu, Shi, Liu, Wang, Liu, and Chen**, (68)Ga-labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: promising agents for tumor integrin alphavbeta3 PET imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009. 36(6): p. 947-57.

106. **Shao, Liang, Kang, Yang, Ma, Li,... Wang**, A direct comparison of tumor angiogenesis with (6)(8)Ga-labeled NGR and RGD peptides in HT-1080 tumor xenografts using microPET imaging. Amino Acids, 2014. 46(10): p. 2355-64.

107. **Yoon, Kang, Chun, Cho, Im, Jeong,... Moon**, Correlation of breast cancer subtypes, based on estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2, with functional imaging parameters from (6)(8)Ga-RGD PET/CT and (1)(8)F-FDG PET/CT. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2014. 41(8): p. 1534-43.

108. **Decristoforo, Hernandez Gonzalez, Carlsen, Rupprich, Huisman, Virgolini,... Haubner**, 68Ga- and 111In-labelled DOTA-RGD peptides for imaging of alphavbeta3 integrin expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. 35(8): p. 1507-15.

109. **Alam, Witney, Tomasi, Carroll, Twyman, Nguyen, and Aboagye**, Radiolabeled RGD tracer kinetics annotates differential alphavbeta 3 integrin expression linked to cell intrinsic and vessel expression. Mol Imaging Biol, 2014. 16(4): p. 558-66.

110. **Dijkgraaf, Yim, Franssen, Schuit, Luurtsema, Liu,... Boerman**, PET imaging of alphavbeta(3) integrin expression in tumours with (6)(8)Ga-labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011. 38(1): p. 128-37.

111. **Vatsa, Bhusari, Kumar, Chakraborty, Dash, Singh,... Mittal**, Integrin alphavbeta3 as a promising target to image neoangiogenesis using in-house generator-produced positron emitter (68)Ga-labeled DOTA-arginine-glycine-aspartic acid (RGD) ligand. Cancer Biother Radiopharm, 2015. 30(5): p. 217-24.

112. **Arrieta, Garcia-Perez, Michel-Tello, Ramirez-Tirado, Pitalua-Cortes, Cruz-Rico,... De La Garza-Salazar**, Response assessment of 68Ga-DOTA-E-[c(RGDfK)]2 PET/CT for lung adenocarcinoma patients treated with nintedanib plus docetaxel. J Nucl Med, 2017.

113. **Trajkovic-Arsic, Mohajerani, Sarantopoulos, Kalideris, Steiger, Esposito,... Siveke**, Multimodal molecular imaging of integrin alphavbeta3 for in vivo detection of pancreatic cancer. J Nucl Med, 2014. 55(3): p. 446-51.

114. **Rylova, Barnucz, Fani, Braun, Werner, Lassmann,... Weber**, Does imaging alphavbeta3 integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? J Nucl Med, 2014. 55(11): p. 1878-84.

115. **Haubner, Finkenstedt, Stegmayr, Rangger, Decristoforo, Zoller, and Virgolini**, [(68)Ga]NODAGA-RGD - Metabolic stability, biodistribution, and dosimetry data from patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2016. 43(11): p. 2005-13.

116. **Oxboel, Brandt-Larsen, Schjoeth-Eskesen, Myschetzky, El-Ali, Madsen, and Kjaer**, Comparison of two new angiogenesis PET tracers 68Ga-NODAGA-E[c(RGDyK)]2 and (64)Cu-NODAGA-E[c(RGDyK)]2; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. Nucl Med Biol, 2014. 41(3): p. 259-67.

117. **Notni, Pohle, and Wester**, Be spoilt for choice with radiolabelled RGD peptides: preclinical evaluation of (6)(8)Ga-TRAP(RGD)(3). Nucl Med Biol, 2013. 40(1): p. 33-41.

118. **Kazmierczak, Todica, Gildehaus, Hirner-Eppeneder, Brendel, Eschbach,... Cyran**, 68Ga-TRAP-(RGD)3 Hybrid imaging for the in vivo monitoring of alphavss3-Integrin expression as biomarker of anti-angiogenic therapy effects in experimental breast cancer. PLoS One, 2016. 11(12): p. e0168248.

119. **Liu, Liu, Wang, Liu, and Chen**, Noninvasive imaging of tumor integrin expression using (18)F-labeled RGD dimer peptide with PEG (4) linkers. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009. 36(8): p. 1296-307.

120. **Niu and Chen**, Why integrin as a primary target for imaging and therapy. Theranostics, 2011. 1: p. 30-47.

121. **Rolli, Fransvea, Pilch, Saven, and Felding-Habermann**, Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(16): p. 9482-7.

122. **Shi, Jin, Liu, Fan, Sun, Zhao,... Wang**, PET imaging of neovascularization with (68)Ga-3PRGD2 for assessing tumor early response to Endostar antiangiogenic therapy. Mol Pharm, 2014. 11(11): p. 3915-22.

123. **Terry, Abiraj, Frielink, Van Dijk, Bussink, Oyen, and Boerman**, Imaging integrin alphavbeta3 on blood vessels with 111In-RGD2 in head and neck tumor xenografts. J Nucl Med, 2014. 55(2): p. 281-6.

124. **Pichler, Kneilling, Haubner, Braumuller, Schwaiger, Rocken, and Weber**, Imaging of delayed-type hypersensitivity reaction by PET and 18F-galacto-RGD. J Nucl Med, 2005. 46(1): p. 184-9.

125. **Goel, Duda, Xu, Munn, Boucher, Fukumura, and Jain**, Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. Physiol Rev, 2011. 91(3): p. 1071-121.

126. **Jain**, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science, 2005. 307(5706): p. 58-62.

127. **Hurwitz**, Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer, 2004. 4 Suppl 2: p. S62-8.

128. **Sandler, Gray, Perry, Brahmer, Schiller, Dowlati,... Johnson**, Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med, 2006. 355(24): p. 2542-50.

129. **Tewari, Sill, Long, Penson, Huang, Ramondetta,... Monk**, Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. N Engl J Med, 2014. 370(8): p. 734-43.

130. **Sandstrom, Laudius, Lindqvist, Asklund, and Johansson**, A retrospective evaluation of bevacizumab treatment in patients with progressive malignant glioma in northern Sweden. Anticancer Res, 2017. 37(4): p. 1869-1874.

131. **Ye**, The Complexity of translating anti-angiogenesis therapy from basic science to the clinic. Dev Cell, 2016. 37(2): p. 114-25.

132. **Bellou, Pentheroudakis, Murphy, and Fotsis**, Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. Cancer Lett, 2013. 338(2): p. 219-28.

133. **Ivy, Wick, and Kaufman**, An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. Nat Rev Clin Oncol, 2009. 6(10): p. 569-79.

134. **Tarallo and De Falco**, The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. Int J Biochem Cell Biol, 2015. 64: p. 185-9.

135. **Gerstner, Duda, Di Tomaso, Ryg, Loeffler, Sorensen,... Batchelor**, VEGF inhibitors in the treatment of cerebral edema in patients with brain cancer. Nat Rev Clin Oncol, 2009. 6(4): p. 229-36.

136. **Beal, Abrey, and Gutin**, Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnosed glioblastoma: analysis of single-agent and combined modality approaches. Radiat Oncol, 2011. 6: p. 2.

137. **Schleiermacher, Janoueix-Lerosey, Combaret, Derre, Couturier, Aurias, and Delattre**, Combined 24-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis indicates predominant rearrangements of early replicating chromosome regions in neuroblastoma. Cancer Genet Cytogenet, 2003. 141(1): p. 32-42.

138. **Schleiermacher, Raynal, Janoueix-Lerosey, Combaret, Aurias, and Delattre**, Variety and complexity of chromosome 17 translocations in neuroblastoma. Genes Chromosomes Cancer, 2004. 39(2): p. 143-50.

139. **Maestrini, Tamagnone, Longati, Cremona, Gulisano, Bione,... Comoglio**, A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(2): p. 674-8.

140. **Ponten and Macintyre**, Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathol Microbiol Scand, 1968. 74(4): p. 465-86.

141. **Lieber, Smith, Szakal, Nelson-Rees, and Todaro**, A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. Int J Cancer, 1976. 17(1): p. 62-70.

142. **Oberthuer, Hero, Berthold, Juraeva, Faldum, Kahlert,... Fischer**, Prognostic impact of gene expression-based classification for neuroblastoma. J Clin Oncol, 2010. 28(21): p. 3506-15.

143. **Cazes, Lopez-Delisle, Tsarovina, Pierre-Eugene, De Preter, Peuchmaur,... Janoueix-Lerosey**, Activated Alk triggers prolonged neurogenesis and Ret upregulation providing a therapeutic target in ALK-mutated neuroblastoma. Oncotarget, 2014. 5(9): p. 2688-702.

144. **Kushner, Yeung, Larson, Kramer, and Cheung**, Extending positron emission tomography scan utility to high-risk neuroblastoma: fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography as sole imaging modality in follow-up of patients. J Clin Oncol, 2001. 19(14): p. 3397-405.

145. **Papathanasiou, Gaze, Sullivan, Aldridge, Waddington, Almuhaideb, and Bomanji**, 18F-FDG PET/CT and 123I-metaiodobenzylguanidine imaging in high-risk neuroblastoma: diagnostic comparison and survival analysis. J Nucl Med, 2011. 52(4): p. 519-25.

146. **Taggart, Han, Quach, Groshen, Ye, Villablanca,... Matthay**, Comparison of iodine-123 metaiodobenzylguanidine (MIBG) scan and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography to evaluate response after iodine-131 MIBG therapy for relapsed neuroblastoma. J Clin Oncol, 2009. 27(32): p. 5343-9.

147. **Sharp, Shulkin, Gelfand, Salisbury, and Furman**, 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG PET in neuroblastoma. J Nucl Med, 2009. 50(8): p. 1237-43.

148. **Li, Zhang, Chen, Huang, Wu, Zhang,... Wang**, Prognostic value of metabolic indices and bone marrow uptake pattern on preoperative 18F-FDG PET/CT in pediatric patients with neuroblastoma. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018. 45(2): p. 306-315.

149. **Bleeker, Tytgat, Adam, Caron, Kremer, Hooft, and Van Dalen**, 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG-PET imaging for diagnosing neuroblastoma. Cochrane Database Syst Rev, 2015(9): p. CD009263.

150. **Lu, Liu, Chang, Jou, Yang, Lin,... National Taiwan University Neuroblastoma Study**, Characterization of neuroblastic tumors using 18F-FDOPA PET. J Nucl Med, 2013. 54(1): p. 42-9.

151. **Liu, Lu, Chang, Lu, Lin, Jou,... Tzen**, Diagnostic FDG and FDOPA positron emission tomography scans distinguish the genomic type and treatment outcome of neuroblastoma. Oncotarget, 2016. 7(14): p. 18774-86.

152. **Georgantzi, Tsolakis, Stridsberg, Jakobson, Christofferson, and Janson**, Differentiated expression of somatostatin receptor subtypes in experimental models and clinical neuroblastoma. Pediatr Blood Cancer, 2011. 56(4): p. 584-9.

153. **Krieger-Hinck, Gustke, Valentiner, Mikecz, Buchert, Mester, and Schumacher**, Visualisation of neuroblastoma growth in a Scid mouse model using [18F]FDG and [18F]FLT-PET. Anticancer Res, 2006. 26(5A): p. 3467-72.

154. **Valentiner, Valentiner, and Schumacher**, Expression of CD44 is associated with a metastatic pattern of human neuroblastoma cells in a SCID mouse xenograft model. Tumour Biol, 2008. 29(3): p. 152-60.

155. **Quarta, Cantelli, Nanni, Ambrosini, D'ambrosio, Di Leo,... Fanti**, Molecular imaging of neuroblastoma progression in TH-MYCN transgenic mice. Mol Imaging Biol, 2013. 15(2): p. 194-202.

156. **Seo, Gustafson, Dannoon, Nekritz, Lee, Murphy,... Matthay**, Tumor dosimetry using [124I]m-iodobenzylguanidine microPET/CT for [131I]m-iodobenzylguanidine treatment of neuroblastoma in a murine xenograft model. Mol Imaging Biol, 2012. 14(6): p. 735-42.

157. **Moertel, Reubi, Scheithauer, Schaid, and Kvols**, Expression of somatostatin receptors in childhood neuroblastoma. Am J Clin Pathol, 1994. 102(6): p. 752-6.

158. **Zhang, Vines, Scollard, Mckee, Komal, Ganguly,... Baruchel**, Correlation of somatostatin receptor-2 expression with gallium-68-DOTA-TATE uptake in neuroblastoma Xenograft Models. Contrast Media Mol Imaging, 2017. 2017: p. 9481276.

159. **Ugur, Kothari, Finn, Zanzonico, Ruan, Guenther,... Larson**, Ga-66 labeled somatostatin analogue DOTA-DPhe1-Tyr3-octreotide as a potential agent for positron emission tomography imaging and receptor mediated internal radiotherapy of somatostatin receptor positive tumors. Nucl Med Biol, 2002. 29(2): p. 147-57.

160. **Zhang, Moroz, Serganova, Ku, Huang, Vider,... Smith-Jones**, Imaging expression of the human somatostatin receptor subtype-2 reporter gene with 68Ga-DOTATOC. J Nucl Med, 2011. 52(1): p. 123-31.

161. **Valentiner, Haane, Peldschus, Gustke, Brenner, Wilke,... Klutmann**, [18F]FDG and [18F]FLT PET-CT and MR imaging of human neuroblastomas in a SCID mouse xenograft model. Anticancer Res, 2008. 28(5A): p. 2561-8.

162. **Gains, Sebire, Moroz, Wheatley, and Gaze**, Immunohistochemical evaluation of molecular radiotherapy target expression in neuroblastoma tissue. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2017.

163. **Ito, Shien, Kaji, Mizoo, Iwamoto, Nogami,... Miyoshi**, Correlation between 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography and

clinicopathological features in invasive ductal carcinoma of the breast. Acta Med Okayama, 2015. 69(6): p. 333-8.

164. **Gains, Bomanji, Fersht, Sullivan, D'souza, Sullivan,... Gaze**, 177Lu-DOTATATE molecular radiotherapy for childhood neuroblastoma. J Nucl Med, 2011. 52(7): p. 1041-7.

165. **Piccardo, Lopci, Conte, Foppiani, Garaventa, Cabria,... Cistaro**, PET/CT imaging in neuroblastoma. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2013. 57(1): p. 29-39.

166. **Kong, Hofman, Murray, Wilson, Wood, Downie,... Hicks**, Initial experience with gallium-68 DOTA-Octreotate PET/CT and peptide receptor radionuclide therapy for pediatric patients with refractory metastatic neuroblastoma. J Pediatr Hematol Oncol, 2016. 38(2): p. 87-96.

167. **Alexander, Vali, Ahmadzadehfar, Shammas, and Baruchel**, Review: The role of radiolabeled DOTA-conjugated peptides for imaging and treatment of childhood neuroblastoma. Curr Radiopharm, 2017.

168. **Goggi, Bejot, Moonshi, and Bhakoo**, Stratification of 18F-labeled PET imaging agents for the assessment of antiangiogenic therapy responses in tumors. J Nucl Med, 2013. 54(9): p. 1630-6.

169. **Lee, Ahn, Moon, Chun, Kang, Cheon,... Lim**, Comparison of 18F-FDG, 18F-FET and 18F-FLT for differentiation between tumor and inflammation in rats. Nucl Med Biol, 2009. 36(6): p. 681-6.

170. **Strauss**, Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostics of oncological patients. Eur J Nucl Med, 1996. 23(10): p. 1409-15.

171. **Corroyer-Dulmont, Peres, Gerault, Savina, Bouquet, Divoux,... Valable**, Multimodal imaging based on MRI and PET reveals [(18)F]FLT PET as a specific and early indicator of treatment efficacy in a preclinical model of recurrent glioblastoma. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2016. 43(4): p. 682-94.

172. **Xue, Du, Wu, Liu, Xie, Tong,... Zhang**, Aberrant glioblastoma neovascularization patterns and their correlation with DCE-MRI-derived parameters following temozolomide and bevacizumab treatment. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 13894.

173. **Keunen, Johansson, Oudin, Sanzey, Rahim, Fack,... Niclou**, Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(9): p. 3749-54.

174. **Seguin, Nicolazzi, Mignet, Scherman, and Chabot**, Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours. Tumour Biol, 2012. 33(5): p. 1709-17.

175. **Dietlein, Kobe, Kuhnert, Stockter, Fischer, Schomacker,... Neumaier**, Comparison of [(18)F]DCFPyL and [(68)Ga]Ga-PSMA-HBED-CC for PSMA-PET Imaging in Patients with Relapsed Prostate Cancer. Mol Imaging Biol, 2015. 17(4): p. 575-84.

176. **Guo, Lang, Li, Kiesewetter, Gao, Niu,... Chen**, Quantitative analysis and comparison study of [18F]AlF-NOTA-PRGD2, [18F]FPPRGD2 and [68Ga]Ga-NOTA-PRGD2 using a reference tissue model. PLoS One, 2012. 7(5): p. e37506.

177. **Guo, Bai, Zhao, and Wang**, Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival. Med Oncol, 2012. 29(3): p. 1656-62.

178. **Dumont, Deininger, Haubner, Maecke, Weber, and Fani**, Novel (64)Cu- and (68)Ga-labeled RGD conjugates show improved PET imaging of alpha(nu)beta(3) integrin expression and facile radiosynthesis. J Nucl Med, 2011. 52(8): p. 1276-84.

179. **Hernandez, Czerwinski, Chakravarty, Graves, Yang, England,... Cai**, Evaluation of two novel (6)(4)Cu-labeled RGD peptide radiotracers for enhanced PET imaging of tumor integrin alphavbeta(3). Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015. 42(12): p. 1859-68.

180. **Shao, Gu, Guo, Zang, Fu, Liu,... Wang**, Clinical study of (99m)Tc-3P-RGD2 peptide imaging in osteolytic bone metastasis. Oncotarget, 2017. 8(43): p. 75587-75596.

181. **Smith**, Cilengitide Merck. Curr Opin Investig Drugs, 2003. 4(6): p. 741-5.

182. **Guo, Guo, Lang, Kiesewetter, Xie, Li,... Chen**, (18)F-alfatide II and (18)F-FDG dual-tracer dynamic PET for parametric, early prediction of tumor response to therapy. J Nucl Med, 2014. 55(1): p. 154-60.

183. **Tomasi, Turkheimer, and Aboagye**, Importance of quantification for the analysis of PET data in oncology: review of current methods and trends for the future. Mol Imaging Biol, 2012. 14(2): p. 131-46.

184. **Muzi, O'sullivan, Mankoff, Doot, Pierce, Kurland,... Kinahan**, Quantitative assessment of dynamic PET imaging data in cancer imaging. Magn Reson Imaging, 2012. 30(9): p. 1203-15.

185. **Takesh**, The potential benefit by application of kinetic analysis of PET in the clinical oncology. ISRN Oncol, 2012. 2012: p. 349351.

186. **Cortes-Santiago, Hossain, Gabrusiewicz, Fan, Gumin, Marini,... Gomez-Manzano**, Soluble Tie2 overrides the heightened invasion induced by anti-angiogenesis therapies in gliomas. Oncotarget, 2016. 7(13): p. 16146-57.

187. **Higuchi, Bengel, Seidl, Watzlowik, Kessler, Hegenloh,... Schwaiger**, Assessment of alphavbeta3 integrin expression after myocardial infarction by positron emission tomography. Cardiovasc Res, 2008. 78(2): p. 395-403.

188. **Verjans, Wolters, Laufer, Schellings, Lax, Lovhaug,... Hofstra**, Early molecular imaging of interstitial changes in patients after myocardial infarction: comparison with delayed contrast-enhanced magnetic resonance imaging. J Nucl Cardiol, 2010. 17(6): p. 1065-72.

189. **Beer, Pelisek, Heider, Saraste, Reeps, Metz,... Schwaiger**, PET/CT imaging of integrin alphavbeta3 expression in human carotid atherosclerosis. JACC Cardiovasc Imaging, 2014. 7(2): p. 178-87.

190. **Choi, Phi, Paeng, Kim, Lee, Jeong,... Wang**, Imaging of integrin alpha(V)beta(3) expression using (68)Ga-RGD positron emission tomography in pediatric cerebral infarct. Mol Imaging, 2013. 12(4): p. 213-7.

191. **Withofs, Martinive, Vanderick, Bletard, Scagnol, Mievis,... Hustinx**, [(18)F]FPRGD2 PET/CT imaging of integrin alphavbeta3 levels in patients with locally advanced rectal carcinoma. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2016. 43(4): p. 654-62.

192. **Withofs, Signolle, Somja, Lovinfosse, Nzaramba, Mievis,... Hustinx**, 18F-FPRGD2 PET/CT imaging of integrin alphavbeta3 in renal carcinomas: correlation with histopathology. J Nucl Med, 2015. 56(3): p. 361-4.

Titre: Comparaison de radiotraceurs marqués au gallium-68 et au fluor-18 pour l'imagerie TEP de modèles précliniques de neuroblastome, de glioblastome ou de cancer bronchopulmonaire.

Mots clés : ^{18}F, ^{68}Ga, TEP, édotréotide, peptides RGD, oncologie

Résumé : La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une modalité d'imagerie médicale en pleine expansion depuis une quinzaine d'années. En oncologie, la TEP au ^{18}F-fluorodésoxyglucose (FDG) est devenue un outil essentiel pour la prise en charge des patients souffrant de cancer. Cependant il ne permet pas la détection et le suivi de tous les cancers, de nombreux radiotraceurs sont donc développés, plus ciblés et plus spécifiques que les analogues des substrats métaboliques. Durant ce travail de doctorat, la première étude TEP a été réalisée avec du ^{68}Ga-DOTATOC dans un modèle préclinique de neuroblastome (NB) humain. Cette tumeur, qui présente des analogies avec les tumeurs neuroendocrines, exprime fréquemment des récepteurs de type 2 de la somatostatine (SSTR2). Nous avons comparé, le FDG au ^{68}Ga-DOTATOC dans 3 modèles murins de différents NB humains, exprimant les SSTR2 avec une densité différente. La deuxième étude a comparé et évalué le FDG et un ^{68}Ga-RGD, ligand des intégrines, sur des modèles murins de glioblastome (GB) humain surexpriment l'intégrine αvβ3. L'évaluation s'est faite dans le suivi de 4 groupes d'animaux traités ou non avec un anti-angiogénique et/ou une chimiothérapie. La troisième étude a comparé et évalué le ^{68}Ga-RGD et le ^{18}F-RGD-K5 dans un modèle murin, associant GB humain et carcinome pulmonaire humain, lors du suivi d'un traitement anti-angiogénique. Le ^{68}Ga-DOTATOC et le FDG ont tous deux permis de visualiser les 3 différents modèles de NB. La fixation du FDG s'est avérée corrélée à celle du ^{68}Ga-DOTATOC et, *ex vivo,* à l'expression des SSTR2 et du Ki-67. Le ^{68}Ga-RGD, contrairement au FDG, a permis de discriminer les groupes répondeurs après 6 jours de traitement. Bien que les résultats soient concordants entre le ^{68}Ga-RGD et le ^{18}F-RGD-K5, celui-ci a permis une meilleure visualisation et un meilleur suivi sous traitement des GB.

Title: Comparison of gallium-68 and fluor-18 labelled radiotracers for PET imaging of preclinical models of neuroblastoma, glioblastoma or bronchopulmonary cancer.

Keywords : ^{18}F, ^{68}Ga, PET, edotreotide, RGD peptides, oncology

Abstract: Positron Emission Tomography (PET), a modality of functional medical imaging, has been developing for about 15 years. In oncology, ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) PET has become a main tool for cancer diagnosis. However, FDG cannot detect and monitor all types of cancer. Thus research is continuing, exploring new applications for other documented tracers and developing more specific and targeted tracers than analogues of metabolic substrates. The first study of this doctorate was done with ^{68}Ga-DOTATOC PET in preclinical model of neuroblastoma (NB), which share some biologic properties with neuroendocrine tumours, frequently expressing somatostatin receptors subtype 2 (SSTR2). Our aim was to compare FDG and ^{68}Ga-DOTATOC PET in 3 different mouse models of human NB that express SSTR2 at different levels. The second study compared FDG and ^{68}Ga-RGD, a ligand of integrins, in a mouse model of human glioblastoma (GB) that overexpresses αvβ3 integrin. Both tracers have been evaluated in monitoring 4 groups of animals untreated or treated with an anti-angiogenic agent and/or chemotherapy. The third study compared the ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD in a mouse model bearing human GB and pulmonary carcinoma, which has a low expression of αvβ3 integrin. The potential of those tracers for monitoring an anti-angiogenic treatment was subsequently studied. Both ^{68}Ga-DOTATOC and FDG allowed visualizing the different models of NB. There was a correlation between tumour uptake of FDG and of ^{68}Ga-DOTATOC and, *ex vivo,* with SSTR2 and Ki-67. ^{68}Ga-RGD, unlike FDG, discriminated responders after 6 days of treatment. Results with ^{18}F-RGD-K5 and ^{68}Ga-RGD were concordant, but ^{18}F-RGD-K5 was more efficient than ^{68}Ga-RGD for visualization and treatment monitoring GB.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France