



HAL
open science

Optimisation de l'effet radiobiologique d'un traitement de radiothérapie interne vectorisée des tumeurs neuroendocrines

Nicolas Rossetto

► **To cite this version:**

Nicolas Rossetto. Optimisation de l'effet radiobiologique d'un traitement de radiothérapie interne vectorisée des tumeurs neuroendocrines. Imagerie médicale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30223 . tel-03667321

HAL Id: tel-03667321

<https://theses.hal.science/tel-03667321>

Submitted on 13 May 2022

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

Présentée et soutenue le *01/02/2017* par :

Nicolas ROSSETTO

Optimisation de l'effet radiobiologique d'un traitement de radiothérapie interne vectorisée des tumeurs neuroendocrines

JURY

JACQUES MONTEIL
PHILIPPE FERNANDEZ
ISABELLE BERRY
ISABELLE QUELVEN
FRÉDÉRIC COURBON
SÉVERINE BRILLOUET

PU-PH, Université Limoges
PU-PH, Université Bordeaux
PU-PH, Université Toulouse III
PhD PharmD Université Limoges
PU-PH, Université Toulouse III
PhD PharmD Université
Toulouse III

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur
Co-directrice

École doctorale et spécialité :

GEET : Radio-physique et Imagerie Médicale

Unité de Recherche :

Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (INSERM UMR 1037, Equipe 12)

Directeur(s) de Thèse :

Frédéric COURBON et Séverine BRILLOUET

Rapporteurs :

Jacques MONTEIL et Philippe FERNANDEZ

Table des matières

Table des figures.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
A. Oncologie endocrinienne	1
A.1. Généralités	1
A.1.1. <i>Cancers neuroendocriniens</i>	3
A.1.2. <i>Système neuroendocrinien et gastro-intestinal</i>	4
A.1.3. <i>Thérapies anticancéreuses</i>	4
A.2. TNE et expression hormonale	7
A.2.1. <i>Somatostatine</i>	7
A.2.2. <i>Cholécystokinine/Gastrine</i>	8
A.2.3. <i>Contribution de la médecine nucléaire à la démarche diagnostique et thérapeutique</i> ..	9
A.2.4. <i>Démarche thérapeutique de l'imagerie</i>	11
B. Radiothérapie interne vectorisée : considérations générales et applications aux TE	12
B.1. Bases de physique particulière et rayonnements ionisants.....	12
B.1.1. <i>Rayonnements directement ionisants et indirectement ionisants</i>	12
B.1.2. <i>Rayonnements électromagnétiques X et γ</i>	13
B.1.3. <i>Rayonnements particuliers α et β</i>	14
B.1.4. <i>Notion de parcours</i>	17
B.2. Radiobiologie des rayonnements ionisants	20
B.2.1. <i>Transfert linéique d'énergie</i>	20
B.2.2. <i>Efficacité biologique relative (EBR)</i>	21
B.2.3. <i>Effets des rayonnements ionisants sur les tissus biologiques</i>	23
B.2.4. <i>Irradiation à bas débit de dose par les MRP</i>	34
B.2.5. <i>Evaluation de la dose absorbée</i>	36
B.3. Traitements en RIV	38
B.3.1. <i>Radioimmunothérapie : anticorps monoclonaux</i>	38
B.3.2. <i>Radiopeptidothérapie : ligands peptidiques</i>	38

C.	Optimisation de l'efficacité du traitement en RIV	44
C.1.	Index thérapeutique	44
C.2.	Changement de cible	46
C.2.1.	<i>Récepteurs à la somatostatine</i>	50
C.2.2.	<i>Récepteurs à la cholécystokinine</i>	53
C.3.	Augmentation de l'affinité pour le récepteur ciblé	56
C.3.1.	<i>Affinité du ciblage</i>	56
C.3.2.	<i>Spécificité du ciblage</i>	57
C.4.	Accessibilité de la cible : choix des vecteurs	58
C.4.1.	<i>Ciblage tumoral du RCCK2</i>	58
C.4.2.	<i>Dérivés de la cholécystokinine/gastrine</i>	59
C.5.	Diminution de la fixation non-spécifique	65
C.6.	Augmentation de l'efficacité radiobiologique	66
C.6.1.	<i>Choix des radionucléides</i>	66
C.6.2.	<i>Association thérapeutique</i>	69
D.	Radiomarquage des analogues peptidiques CCK4	77
D.1.	Objectifs du travail	77
D.2.	Matériel & Méthodes	78
D.2.1.	<i>Réalisation du marquage</i>	80
D.2.2.	<i>Contrôle qualité par chromatographie sur couche mince</i>	81
D.3.	Résultats	83
D.3.1.	<i>Marquage au ¹¹¹In</i>	83
D.3.2.	<i>Marquage au ⁹⁰Y</i>	86
D.3.3.	<i>Marquage au ¹⁷⁷Lu</i>	89
D.4.	Discussion	91
E.	Optimisation de l'efficacité par association thérapeutique	93
E.1.	Action de la DDA	93
E.2.	Matériel & Méthodes	95
E.2.1.	<i>Culture cellulaire</i>	95
E.2.2.	<i>Action de la dendrogénine A : mort cellulaire</i>	96
E.2.3.	<i>Expression de protéines : mise au point</i>	96
E.3.	Résultats	101

E.3.1.	<i>Effet de la DDA : mort cellulaire</i>	101
E.3.2.	<i>Expression de RCCK2</i>	102
E.3.3.	<i>Expression de Notch-1 et Notch-3</i>	104
E.4.	Discussion	106
F.	Expérimentation <i>in vivo</i> de la RIV par analogues CCK4 radiomarqués	108
F.1.	Objectifs de l'étude	108
F.2.	Matériel & Méthodes	108
F.2.1.	<i>Modèle de souris Swiss Nude</i>	108
F.2.2.	<i>Xénogreffe tumorale des lignées NIH-3T3-E151A et CMT-TT</i>	108
F.2.3.	<i>Suivi de pousse tumorale</i>	109
F.2.4.	<i>Dose de traitement et dose maximale tolérée</i>	109
F.2.5.	<i>Efficacité du traitement de peptides CCK4 radiomarqués au ⁹⁰Y</i>	110
F.3.	Résultats	111
F.3.1.	<i>Suivi de la pousse tumorale</i>	111
F.3.2.	<i>Dose maximale tolérée</i>	111
F.3.3.	<i>Efficacité du traitement de peptides CCK4 radiomarqués au ⁹⁰Y</i>	112
F.4.	Discussion	114
G.	Discussion générale	115
H.	Conclusion et perspectives	120
	Références.....	123

Table des figures

Figure 1 - Principales caractéristiques des cancers.....	2
Figure 2 – Structure des somatostatines de 14 et 18 acides aminés.....	7
Figure 3 - Structure d'acides aminés de la cholécystokinine 22	9
Figure 4 - Prédominance des interactions photon-matière [20].....	13
Figure 5 - Phénomènes d'interaction photon-matière : ionisation par effet photoélectrique (A), ionisation par diffusion Compton (B), création de paires e^-/e^+ et annihilation du positron (C)	14
Figure 6 - Carte des nucléides et leur mode de désintégration [22].....	15
Figure 7 - Interactions électron-matière : rayonnement de freinage (gauche) et collision inélastique (droite).....	17
Figure 8 - Coefficient d'atténuation des photons (gauche) et parcours des photons dans l'eau (droite). Données NIST (physics.nist.gov) : $\mu_{\text{eau}}(1000 \text{ keV}) = 0,07072 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu_{\text{eau}}(300 \text{ keV}) = 0,1186 \text{ cm}^{-1}$	18
Figure 9 - Courbe de Bragg de protons dans l'eau (gauche) et relation TEL/énergie pour les électrons et les protons (droite) [ICRU Report 16 – 1970].....	19
Figure 10 - Parcours des particules chargées en rapport au diamètre cellulaire (exemple de la RIT) [24]	19
Figure 11 - Valeurs typiques de TEL pour plusieurs particules [26,27]	20
Figure 12 - Schéma de l'effet d'une irradiation à faible TEL (électrons) et fort TEL (protons) sur une population cellulaire. adapté de [32]	21
Figure 13 - Variation de l'EBR en fonction du TEL. Les courbes 1,2 et 3 correspondent respectivement à des niveaux de survie cellulaire de 80%, 10% et 1%. L'EBR est aussi dépendant des données de survie cellulaire, et donc de la dose absorbée [38]	22
Figure 14 - Mécanismes d'action par effet Bystander au voisinage d'une cellule irradiée [45]	27
Figure 15 - Effets primaires et secondaires d'une irradiation, d'après [58].....	28
Figure 16 - Modèle linéaire-quadratique de la survie cellulaire, d'après [26]	29
Figure 17 - Cycle cellulaire : phases et points de contrôle.....	31
Figure 18 – Courbe de survie (gauche) et effet de la réoxygénation par fractionnement (droite), d'après [26]	33
Figure 19 - Principe de l'effet de "feux croisés" : des rayonnements émis à partir de cellules ayant fixé de MRP peuvent atteindre des cellules ne l'ayant pas capté. Une même cellule peut être irradiée par des rayonnements issus de plusieurs points d'émission [74].	36
Figure 20 - Liaison peptidique entre deux acides aminés	39
Figure 21 - Analogues peptidiques développés pour différentes localisations tumorales [79].....	40

Figure 22 - Structure moléculaire du ¹¹¹ In-Pentetreotide (Octreoscan™) : le ligand analogue de la SST (bleu) est lié au complexe chélateur DTPA (vert) - isotope radioactif ¹¹¹ In (jaune) (National Institute of Health – 2016)	41
Figure 23 - Evolutions de l'octreotide, analogue de la somatostatine. Les changements apportés apparaissent sur les sections colorées [82].....	42
Figure 24 - 4 exemples de chélateurs macrocycliques de métaux radioactifs.....	43
Figure 25 - Index thérapeutique en fonction des critères pharmacologiques d'après [91].....	44
Figure 26 - Index thérapeutique et précision de l'irradiation d'après [92]	45
Figure 27 - Relation structure-affinité des ligands naturels CCK et gastrine avec les récepteurs RCCK1 et RCCK2 traduit de [115].....	55
Figure 28 - Structure du récepteur RCCK2 chez le rat [117]	55
Figure 29 - Internalisation des peptides radiomarqués traduit de [119].....	56
Figure 30 – A gauche : modèle bi-dimensionnel du site de réception du RCCK2 (en rouge) liant l'analogue CCK9 (en noir) A droite : modèle tri-dimensionnel du RCCK2 [143,145]	62
Figure 31 - Scintigraphie de souris xéno greffée CMT-TT 24 heures après injection [146]	63
Figure 32 - Vue tridimensionnelle du complexe ¹¹¹ In-BPCA-(Ahx) ₂ -CCK4-RCCK2 [89]	64
Figure 33 - Biodistribution des conjugués CCK expérimentés sur souris xéno greffées NIH-3T3-E151A (n=6) [89].....	64
Figure 34 - Scintigraphie à 24 heures post-injection pour 3 ligands sur souris xéno greffées NIH-3T3-E151A [89]	65
Figure 35 - Parcours des émission β ⁻ des isotopes ⁹⁰ Y et ¹⁷⁷ Lu dans les tissus, d'après [159].....	68
Figure 36 - Protocole de radiochimiothérapie concomitante utilisée dans le cancer du col de l'utérus (INCa – 2016)	69
Figure 37 - Métabolisme du 5,6α-EC dans les tissus sains et tumoraux [167]	70
Figure 38 - Effet de la DDA sur cellules tumorales [167].....	71
Figure 39 - Rôles multiples de la signalisation Notch dans les tumeurs solides [170].....	72
Figure 40 - Phénomènes oncogéniques ou supresseurs de tumeurs de la voie Notch [170].....	73
Figure 41 - Réduction des marqueurs tumoraux par activation de Notch1 (NICD1) sur cellules CMT-TT in vitro (à gauche) et in vivo (à droite) [174].....	74
Figure 42 - Suivi de pousse tumorale de CMT-TT chez la souris avec ou sans activité Notch1 [174] ..	74
Figure 43 - Taille tumorale (à gauche) et expression ASCL1 (à droite) avec et sans induction Notch1 [174]	75
Figure 44 - Effet du traitement de thiocoraline sur le cycle cellulaire des lignées CMT-TT [179]	75
Figure 45 - Expression des récepteurs Notch1-3 (A), effet d'apoptose sur lignées CMT-TT (B) et CMT-MZ-CRC-1 (C) par traitement AB3 [182].....	76

Figure 46 - Bras espaceur Ahx (acide amino-6-hexanoïque).....	78
Figure 47 - Chélateur DOTA.....	79
Figure 48 - Structure du chélateur BPCA synthétisé [89].....	79
Figure 49 - Chélateur PCTA.....	80
Figure 50 - Radiochromatogramme d'un échantillon de [BPCA- ⁹⁰ Y]-(Ahx) ₂ -CCK4 en vert : pic d'activité au dépôt ; en rouge : pic d'activité au front de migration	82
Figure 51 - Radiochromatogramme du ¹¹¹ In libre + citrate de sodium 0,1 M pH = 5	84
Figure 52 - Radiochromatogramme du ¹¹¹ In + PCTA-(Ahx) ₂ -CCK4. A 15 minutes à température ambiante, la PRC mesurée est de 97,6 %	84
Figure 53 - Pureté radiochimique des marquages au ¹¹¹ In pour les 3 ligands à température ambiante (partie gauche) et à 90°C pendant une heure (partie droite)	85
Figure 54 - Stabilité du radiomarquage au ¹¹¹ In dans le SVF + transferrine humaine.....	86
Figure 55 - à gauche : migration de ⁹⁰ Y pur, phase mobile d'acétate de sodium au centre : migration de ⁹⁰ Y pur, phase mobile de citrate de sodium à droite : migration de ⁹⁰ Y + PCTA-(Ahx) ₂ -CCK4, solution tampon et phase mobile de citrate de sodium	87
Figure 56 - Pureté radiochimique des marquages au ⁹⁰ Y pour les 3 ligands à température ambiante (partie gauche) et à 90°C pendant une heure (partie droite)	88
Figure 57 - Pureté radiochimique du [⁹⁰ Y-PCTA]-(Ahx) ₂ -CCK4 + SVF et transferrine humaine, incubation à 37°C.....	88
Figure 58 - Pureté radiochimique des marquages au ¹⁷⁷ Lu pour les 3 ligands à température ambiante (partie gauche) et à 90°C pendant une heure (partie droite)	89
Figure 59 - Pureté radiochimique des 3 ligands + SVF et transferrine humaine, incubation à 37°C	90
Figure 60 – Principe de révélation des protéines cibles par les anticorps primaires et secondaires traduit de www.bio-rad.com	99
Figure 61 - Mort cellulaire des lignées NIH-3T3-E151A et CMT-TT après traitement DDA de 24 heures	101
Figure 62 - Mort cellulaire des lignées NIH-3T3-E151A et CMT-TT après traitement DDA de 48 heures	102
Figure 63 - Western Blot de l'expression du récepteur RCCK2 dans la lignée NIH-3T3-E151A traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)	102
Figure 64 - Western Blot de l'expression du récepteur RCCK2 dans la lignée CMT-TT traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)	103

Figure 65 - Quantification de l'expression de RCCK2 rapportée à l'actine, pour la lignée CMT-TT (N = 3)	103
Figure 66 - Western Blot de l'expression de la voie Notch-1 dans la lignée NIH-3T3-E151A traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)	104
Figure 67 - Western Blot de l'expression de la voie Notch-1 dans la lignée CMT-TT traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)	104
Figure 68 - Western Blot de l'expression de la voie Notch-3 dans la lignée NIH-3T3-E151A traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)	105
Figure 69 - Western Blot de l'expression de la voie Notch-3 dans la lignée CMT-TT traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)	105
Figure 70 - Modèle tumoral d'ellipsoïde en 3 dimensions.....	109
Figure 71 - Pousse tumorale moyenne des lignée NIH-3T3-E151A et CMT-TT chez la souris Swiss Nude	111
Figure 72 - Radiochromatogrammes iTLC-SG de l'yttrium 90 libre (en haut), du radiopeptide [⁹⁰ Y-PCTA]- (Ahx) ₂ -CCK4 de 18,5 MBq (à gauche) et 37 MBq (à droite).....	112
Figure 73 - Volume tumoral des groupes contrôle (à gauche) et traitement (à droite) pour les souris greffées NIH-3T3-E151A Le jour d'administration du traitement à J39 est symbolisé par le repère rouge	112
Figure 74 - Volume tumoral des groupes contrôle (à gauche) et traitement (à droite) pour les souris greffées CMT-TT Le jour d'administration du traitement à J39 est symbolisé par le repère rouge ...	113

Liste des tableaux

Tableau 1 - Phénotypes des néoplasies endocriniennes multiples [5,6]	3
Tableau 2 - Récepteurs peptidiques surexprimés dans les tumeurs humaines, d'après [109].....	49
Tableau 3 - Motif d'expression sst1-sst5 dans les tumeurs humaines, d'après [110]	50
Tableau 4 - Motif d'expression sst1-sst5 dans les tissus humains sains, d'après [110].....	51
Tableau 5 - Incidence des récepteurs CCK dans 406 tumeurs humaines, traduit de [106]	54
Tableau 6 - Biodistribution des analogues CCK8 pour les organes et tumeurs CA20948 de rats traduit de [142]	60
Tableau 7 - Dosage des inositols triphosphates des ligands non-marqués et marqués au ¹¹¹ In [153] .	63
Tableau 8 - Caractéristiques physiques des nucléides considérés, d'après [93,159].....	67
Tableau 9 - Energie absorbée des particules β du ⁹⁰ Y et ¹⁷⁷ Lu dans des sphères, d'après [161]	67
Tableau 10 - Temps de doublement et taux de croissance tumoral après traitement au [⁹⁰ Y-PCTA]- (Ahx) ₂ -CCK4	113

Liste des abréviations

3D	tridimensionnel
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
APC	Antigen-Presenting Cell
ASCL1	Achaete-scute homolog 1
ASN	Autorité de Sureté Nucléaire
BER	Base Excision Repair
BPCA	Bipyridine-Chelator
CCK	Cholécystokinine
CgA	Chromogranine A
CMT	Cancer Médullaire de la Thyroïde
CPPC	Cancer Pulmonaire à Petites Cellules
CT	Calcitonine
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DDA	Dendrogénine A
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétrazacyclododecane 1,4,7,10-tétraacétique
DSB	Double-Strand Break
DTPA	Acide diéthylène triamine penta-acétique
EBR	Efficacité Biologique Relative
EC	Efficacité de clonage
GEP	Gastro-EnteroPancréatique
GH	Growth Hormone
GHIH	Growth Hormone-Inhibiting Hormone
HAS	Haute Autorité de Santé
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	Homologous Recombination
IAEA	International Atomic Energy Agency
ICRP	International Commission on Radiological Protection
ICRU	International Commission on Radiological Units

INCa	Institut National du Cancer
IP3	Inositol Trisphosphate
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
IT	Index Thérapeutique
iTLC-SG	Instant Thin-Layer Chromatography Silica Gel
LQL	Linéaire-Quadratique-Linéaire
mIBG	Méta-IodoBenzylGuanidine
MRP	Médicament RadioPharmaceutique
NEM	Néoplasie Endocrinienne Multiple
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NIS	Na/I Symport
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOTA	Acide 1,4,7-triazacyclononane-triacétique
PCTA	Acide 3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacétique
PE	Photoélectrique
PRC	Pureté Radio-Chimique
PRRT	Peptide-Receptor RadioTherapy
RCCK	Récepteur à la Cholécystokinine
RI	Rayonnement Ionisant
RIT	Radio-ImmunoThérapie
RIV	Radiothérapie Interne Vectorisée
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RTE	RadioThérapie Externe
SFRO	Société Française de Radiothérapie Oncologique
SR	Survie Relative
SSB	Single-Strand Break
SST	Somatostatine
SVF	Sérum de veau foetal
TCP	Tubule Contourné Proximal
TD	Temps de doublement

TDM	Tomodensitométrie
TEL	Transfert d'Energie Linéique
TEMP	Tomographie par Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Emission de Positrons
TE	Tumeurs Endocrines
TLC	Thin-Layer Chromatography
TNE	Tumeurs NeuroEndocrines
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
WB	Western Blot

Rationnel

Une première partie abordera les généralités concernant l'oncologie endocrinienne et les contributions de la médecine nucléaire dans le diagnostic et le traitement des cancers. Ce chapitre comprend deux parties : la première traitera des cancers endocriniens en abordant quelques généralités sur le cancer et les tumeurs neuroendocrines ainsi que le rôle de la Médecine Nucléaire dans le traitement de cette pathologie. Une seconde partie la technique de Radiothérapie Interne Vectorisée (RIV), de son utilisation actuelle en clinique, les aspects de Physique et de Radiobiologie, jusqu'aux choix stratégiques d'optimisation qui sont au cœur de ce travail. Les techniques de radiomarquage et les contrôles associés seront décrits, de même que l'influence du choix du radionucléide et des rayonnements sur l'efficacité théorique du traitement. Les principes de l'expérimentation de ce traitement de RIV sur un modèle animal seront explicités avec ses enjeux et les solutions développées pour l'optimisation antitumorale *in vivo* du radiopharmaceutique.

A. Oncologie endocrinienne

A.1. Généralités

Le cancer est souvent décrit comme l'une des principales causes de décès dans les pays développés d'Amérique du Nord et d'Europe [1,2].

Le cancer, ou plutôt "les" cancers, sont maintenant compris comme un dysfonctionnement du contrôle de la régulation du cycle cellulaire. Schématiquement, lors de la division d'une cellule au cours de son cycle de vie, des erreurs de réplication de son matériel génétique, l'ADN, peuvent survenir. Plusieurs contrôles ont lieu entre chaque phase du cycle, et la plupart du temps ces anomalies sont corrigées. Cependant, il peut survenir qu'une ou plusieurs mutations persistent et s'accumulent au cours des cycles de reproduction. Cette accumulation mène alors à la perte de certaines fonctions de régulation de la cellule qui conduisent à une prolifération anarchique de cellules qui échappent à tous mécanismes de régulations et acquièrent des compétences supplémentaires leur donnant un avantage prolifératif par rapport aux cellules saines, ce qui leur permet de coloniser l'organisme (métastases) et d'entraîner la mort [3].

L'apparition d'un cancer n'est pas le résultat d'un élément unique, mais la conséquence d'une association de plusieurs événements (fig. 1).

Les grandes étapes du processus de cancérisation ont été récemment proposées [4].

L'initiation, consiste en la création d'une lésion de l'ADN par un stress génotoxique endogène ou exogène (virus, alcool, tabac, radiation ionisante).

La promotion, si cette lésion n'est pas réparée (soit par défaut des systèmes de réparation, soit parce que le nombre de lésions à réparer excède les capacités de réparation), et si cette lésion est compatible avec la survie cellulaire, alors cette cellule va se diviser et générer d'autres cellules porteuses de cette lésion. Cette phase dépend de l'influence de facteurs de croissance telles que les hormones, ou ceux produits lors d'infections chroniques.

Instabilité génétique : de division cellulaire en division cellulaire, le génome devient instable avec des transferts de matériel chromosomique qui entraînent soit des pertes de fonctions (perte de gène suppresseur de tumeur par exemple), soit des gains de fonction (activation d'oncogène). Le gain de fonctions est nécessaire et parfois suffisant à un développement tumoral. C'est durant cette phase que la cellule acquiert ses compétences nouvelles.

Puis intervient la phase d'invasion, lorsque ces cellules échappent aux contrôles du système immunitaire.

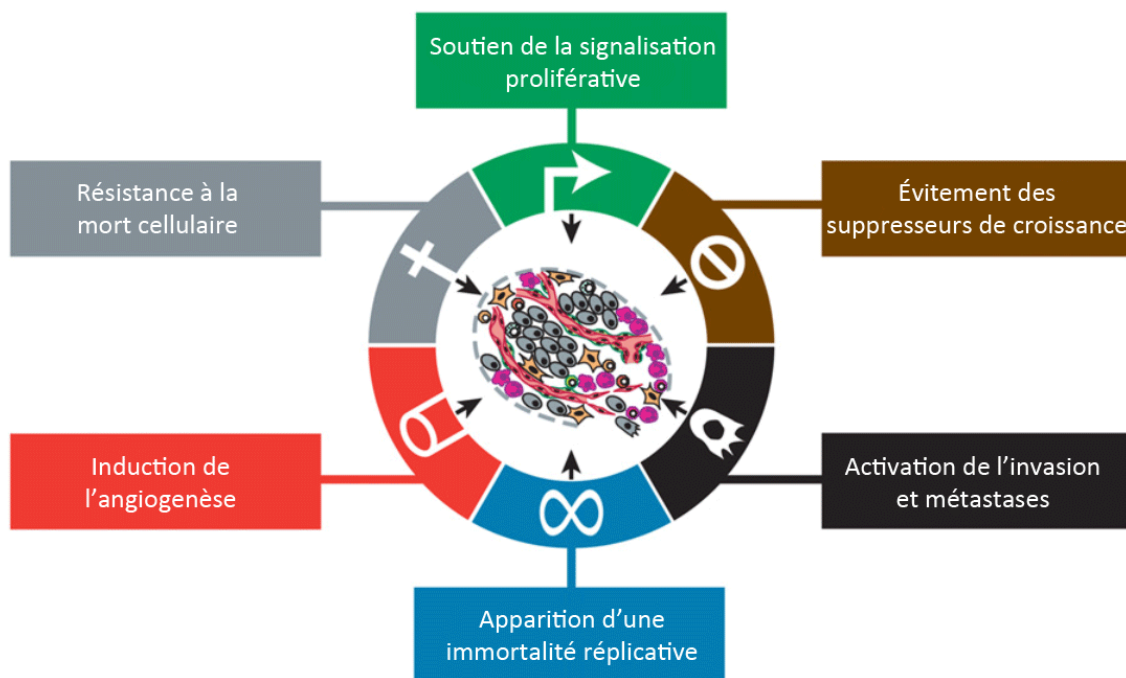


Figure 1 - Principales caractéristiques des cancers

Le développement tumoral est en lien étroit avec la formation de nouveaux vaisseaux sanguins venant irriguer et alimenter la tumeur en oxygène et nutriments. Ce phénomène appelé angiogénèse est un des récents axes de lutte antitumorale.

A.1.1. Cancers neuroendocriniens

Les tumeurs neuroendocrines (TNE) sont des affections malignes développées à partir des cellules du système neuroendocrinien qui sont présentes principalement dans le tractus digestif et bronchique mais également au niveau du pancréas. C'est un groupe très hétérogène de pathologies.

Les tumeurs peuvent être fonctionnelles, en raison de l'activité endocrine sécrétoire qui est conservée pouvant par exemple donner des flushs ou des diarrhées : la découverte de ces tumeurs se fait donc dans le cadre de l'exploration de ces symptômes sécrétoires. Dans d'autres cas ces pathologies tumorales sont non sécrétantes et évoluent donc à bas bruit, ce qui peut expliquer une découverte fortuite ou à un stade localement avancé.

Ces pathologies tumorales peuvent être sporadiques isolées ou bien associées à d'autres pathologies endocriniennes, on parle de Néoplasies Endocriniennes Multiples (NEM). Ces pathologies peuvent avoir un mode de transmission héréditaire.

Phénotype (%)		Manifestations cliniques	Incidence (%) [1, 2]
NEM type I	Syndrome de Wermer	Gastrinome (pancréas)	50
		Insulinome (pancréas)	20
		Adénome pituitaire	66*
		Angiofibrome	64*
		Lipome	17*
		Hyperparathyroïdie	90
NEM type II	NEM II A (60) Syndrome de Sipple	Cancer médullaire de la thyroïde (CMT)	100
		Phéochromocytome	8-60
		Hyperparathyroïdie	> 33
	NEM II B (5) Syndrome de Gorlin	Notalgia	50
		CMT	85
FCMT (35)	CMT	100	
		Morphotype marfanoïde	50
		Ganglioneuromatose cutanée, sous-muqueuse et digestive	80
			100

* % des patients NEM1 et gastrinome

Tableau 1 - Phénotypes des néoplasies endocriniennes multiples [5,6]

L'incidence de ce type de cancer, notamment les tumeurs endocrines (TE) et les cancers gastro-entéropancréatiques (GEP) a augmenté de façon remarquable au cours des 3 dernières décennies, notamment suite à l'évolution des techniques d'imagerie et de diagnostic histopathologies [7].

Le pronostic de ces pathologies dépend de l'agressivité des tumeurs qui apparaissent en histopathologie selon le grade, le pourcentage de cellules en mitose et des signes d'infiltration locale.

D'évolution généralement lente, les tumeurs peuvent être bénignes ou malignes, selon leur grade et degré de prolifération évalués sur l'analyse anatomopathologie et un score de l'OMS [8]. Le pronostic de survie est d'ailleurs fortement lié à ces paramètres, puisque la survie à 5 ans atteint 82 % pour les cancers neuroendocriniens bien différenciés, et tombe à 38 % pour les carcinomes non-différenciés [9].

A.1.2. Système neuroendocrinien et gastro-intestinal

Les TNE se développent au sein des organes ayant un rôle glandulaire ou dans un tissu voisin, à partir des cellules neuroendocrines. Elles sont disséminées dans le système neuroendocrine diffus, qui est composé des glandes neuroendocrines et d'autres tissus tels que les poumons, l'appareil digestif ou encore la peau.

A.1.3. Thérapies anticancéreuses

Les techniques de traitement des cancers n'ont cessé d'évoluer au fil du temps, et l'approche thérapeutique diffère selon le type de cancer. En effet, les trois principales approches médicales que sont la chirurgie, la radiothérapie et les traitements allopathiques permettent aujourd'hui la prise en charge de la majorité des cas. Cette dernière catégorie correspond au traitement médicamenteux. Elle connaît une véritable explosion de stratégie thérapeutique innovante. Les premiers traitements apparus sont les chimiothérapies dites classiques, car cytotoxiques, puis sont apparues les thérapies ciblées bloquant directement ou indirectement une voie biologique impliquée dans la prolifération cellulaire, et puis très récemment, sont apparues des stratégies thérapeutiques qui ne ciblent pas la tumeur mais son environnement, comme par exemple la restauration de l'immunité puisque l'on s'est aperçu que les cellules tumorales pouvaient soit détourner le système immunitaire à leur profit, soit le rendre incompetent. Le principe général est la destruction de la tumeur qui repose souvent sur la synergie des traitements : ils sont alors concomitants. La règle est d'adapter le traitement à l'état d'avancement de la pathologie.

A.1.3.1. Chirurgie

En cancérologie, l'acte chirurgical est réalisé au bloc opératoire, généralement sous anesthésie générale, à des fins différentes. Dans la majorité des cas, à l'exception des tumeurs liquides, le traitement chirurgical est le seul traitement curatif. La non-résécabilité ou la non-opérabilité conduit souvent à des options palliatives. Cette chirurgie curative a pour but de retirer le maximum de tissu tumoral du patient, y compris l'atteinte périphérique non-visible et parfois les chaînes ganglionnaires reliées à la zone opérée (curage ganglionnaire).

L'intérêt d'associer un traitement concomitant à la chirurgie est le maintien du confort de vie du patient traité. La chirurgie peut aussi être réalisée afin de réduire le volume tumoral, et permettre aux traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie réalisés par la suite de donner de meilleurs résultats.

A.1.3.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie est réalisée à l'aide d'une ou plusieurs molécules anticancéreuses administrées sur un ou plusieurs jours. Les effets sur la maladie sont analysés au fil des phases alternées de traitement et de repos, sur plusieurs mois, et le protocole de traitement est adapté en fonction des résultats. La chimiosensibilité des cancers et la tolérance du patient conditionnent fortement la réussite et l'efficacité du traitement.

A l'inverse de la chirurgie, l'avantage de la chimiothérapie est qu'elle agit par voie générale sur toutes les cellules cancéreuses du corps et celles dont la multiplication est rapide, y compris les cellules non détectées et les métastases disséminées. Administrée avant la chirurgie, la chimiothérapie néo-adjuvante permet une diminution du volume tumoral. Elle peut être utilisée après une opération ou bien seule pour traiter les métastases.

En situation curative, prescrite avant ou juste après la chirurgie, la chimiothérapie a pour but de réduire les risques de récurrence ou d'évolution métastatique. En situation métastatique, situation palliative le plus souvent, les traitements synergétiques ont pour objectif de ralentir la progression de la maladie.

A.1.3.3. Radiothérapie

La radiothérapie regroupe toutes les techniques développées dès le début du siècle dernier à la suite de la découverte des effets de la radioactivité, et qui utilisent des rayonnements ionisants pour traiter les tumeurs. L'irradiation ciblée délivrée au patient permet de détruire les cellules tumorales et de bloquer la progression du cancer, tout en préservant les tissus sains environnants. Durant le parcours de soin, plus de la moitié des patients atteints de cancer bénéficient d'une technique de radiothérapie. Comme la chimiothérapie, l'irradiation peut être néo-adjuvante, adjuvante ou bien exclusive si la localisation le permet.

Trois modalités de radiothérapie existent :

- en radiothérapie externe, le faisceau d'irradiation provient d'un dispositif médical, l'accélérateur de particule, situé hors du patient. Plusieurs évolutions de la radiothérapie classique "conformationnelle 3D" équipent les services de soin, comme la radiothérapie avec modulation d'intensité, l'arcthérapie, la tomothérapie, la radiothérapie stéréotaxique, le Cyberknife®, le GammaKnife®, la protonthérapie. Chacune de ces évolutions apporte une plus grande précision et ou une meilleure efficacité au traitement, au bénéfice du patient.
- la curiethérapie utilise des sources radioactives scellées d'iridium, d'iode ou de césium sous forme de grains ou de fils, positionnées de façon temporaire ou définitive au sein même de la zone à traiter. Selon la localisation tumorale, elle peut être endocavitaire (vagin, utérus), endoluminale (œsophage, trachée) ou interstitielle (prostate, sein, muscle) et permet l'irradiation très localisée des tissus. Ce positionnement particulier des sources permet l'utilisation de doses de radiation élevées en épargnant les tissus sains.
- la radiothérapie interne vectorisée ou "métabolique" consiste en l'administration d'une molécule radioactive qui se fixe en théorie sélectivement sur les cellules tumorales afin de les irradier. Cette technique est au cœur de ce travail de thèse et sera détaillée ci-dessous.

A.2. TNE et expression hormonale

Comme vu précédemment, les tumeurs neuroendocrines conservent leur activité sécrétoire et produisent diverses hormones qui se retrouvent dans la circulation sanguine. Ces hormones sont utilisées par l'organisme pour contrôler une multitude de fonctions, comme la croissance, la tension artérielle, la production d'urine, de lait, la digestion, la reproduction, etc. [10,11]. Lorsque les cellules neuroendocrines deviennent tumorales, la sécrétion n'est plus régulée et des symptômes liés apparaissent. Nous ne détaillerons pas ici toutes les hormones rattachées au système neuroendocrinien, nous décrivons brièvement la somatostatine et la cholécystokinine qui sont au centre des développements de notre travail.

A.2.1. Somatostatine

La somatostatine (SST), aussi appelée GHIH (*growth hormone-inhibiting hormone*), est une hormone peptidique naturellement présente dans le corps humain. Elle existe sous deux formes actives de 14 et 28 acides aminés, et est sécrétée par les cellules de l'hypothalamus mais aussi de l'estomac, de l'intestin et du pancréas (fig. 2).

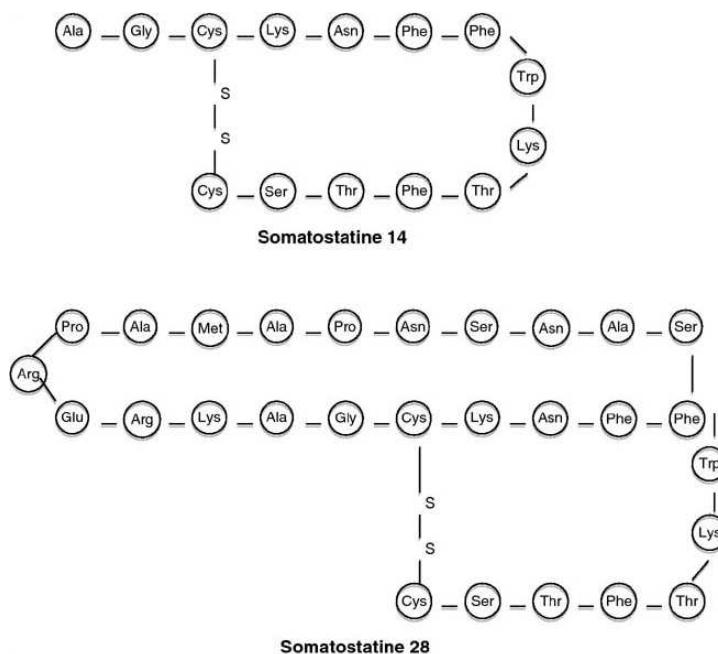


Figure 2 – Structure des somatostatines de 14 et 28 acides aminés

La somatostatine a une fonction de régulation du système endocrinien, et joue un rôle dans la neurotransmission et la prolifération cellulaire. Elle inhibe notamment le largage de plusieurs

hormones secondaires, telles que l'hormone de croissance (GH), l'hormone thyroïdienne (TSH), la gastrine, la cholécystokinine (CCK), la sécrétine, la motiline, ou encore l'insuline et le glucagon au niveau pancréatique.

Pour jouer son rôle d'inhibition, la somatostatine se fixe sur 5 récepteurs membranaires nommés SSTR1 à SSTR5 [12]. Ces dernières années, de nombreux analogues de la somatostatine ont été développés afin de cibler ces récepteurs membranaires dans un but thérapeutique. Logiquement, puisque l'efficacité du médicament repose sur le ciblage d'un récepteur, on a donc utilisé une molécule dérivée de ce principe actif pour vectoriser des isotopes et cibler des cellules tumorales comme outil diagnostique dans le cadre de l'imagerie diagnostique en médecine nucléaire [13] et plus récemment comme agent thérapeutique en radiothérapie interne vectorisée [14]. Les plus étudiés de ces analogues, l'octreotate et l'octreotide (ou sandostatine) ont été synthétisés au début des années 1980, et plus récemment les lanréotides [15]. L'octreotide radiomarqué à l'indium 111, ou Octreoscan®, bénéficie d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour l'imagerie non-invasive des tumeurs neuroendocrines surexprimant les récepteurs à la somatostatine et est utilisé en routine clinique. Les récepteurs à la somatostatine sont surexprimés à la surface de certaines tumeurs neuroendocrines, mais sont aussi exprimés par les tissus sains. Cet aspect est une des limitations des traitements utilisant les analogues à la somatostatine, et sera abordé plus en détail par la suite. Le problème est qu'au cours de leur évolution, ces tumeurs deviennent plus agressives et perdent leur capacité à exprimer ces récepteurs (dédifférenciation). Cette stratégie de ciblage n'est donc plus opérante en cas de tumeur dédifférenciée, d'où l'intérêt de rechercher d'autres cibles.

A.2.2. Cholécystokinine/Gastrine

La cholécystokinine (anciennement pancréozymine) est une hormone sécrétée par le duodénum, le premier segment de l'intestin grêle, relarguée dans la circulation sanguine, et qui joue un rôle dans la digestion des graisses et des protéines par la libération d'enzymes digestives et de bile, mais aussi dans la sensation de satiété et de douleur. Le gène CCK régulant son expression est situé sur le 3^{ème} chromosome du génome humain. La cholécystokinine est un polypeptide composé d'un nombre variable d'acides aminés (4, 5, 8, 22, 33,...), dont les différentes formes issues du précurseur pré-procholécystokinine, sont produites au sein de cellules issues aussi bien d'un tissu gastro-intestinal qu'extra-gastro-intestinal [16] (fig. 3).

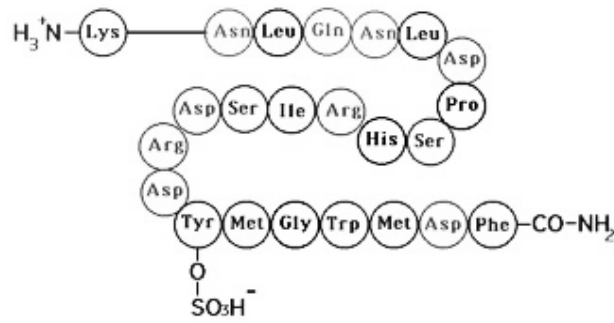


Figure 3 - Structure d'acides aminés de la cholécystokinine 22

Chacune des formes de cholécystokinine est présente en majorité dans un tissu et y apporte une fonction précise : CCK-8 pour une sécrétion pancréatique exocrine, CCK-4 pour une sécrétion pancréatique endocrine, par exemple. Le dénominateur commun à ces multiples formes de cholécystokinine sont les 4 acides aminés identiques de la chaîne C-terminale (-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) et qui assurent sa fonctionnalité sur les récepteurs membranaires [17]. Elle est de ce fait très similaire en termes de structure à la gastrine, une hormone sécrétée dans l'estomac, et qui possède elle aussi ces 4 acides aminés C-terminaux. Cet aspect versatile du groupe "cholécystokinine/gastrine" permet à cette hormone de réguler ses cibles de manière efficace.

L'intérêt d'utiliser les différentes formes de cholécystokinine réside dans l'expression des récepteurs membranaires associés RCCK1 et RCCK2 seulement dans les tissus endocriniens tumoraux. Cet aspect sera abordé plus en détail par la suite.

A.2.3. Contribution de la médecine nucléaire à la démarche diagnostique et thérapeutique

La médecine nucléaire est une spécialité médicale diagnostique et thérapeutique qui repose sur l'administration de médicaments radiopharmaceutiques (MRP). Selon l'isotope transporté, il est possible de faire de l'imagerie monophotonique, biphotonique ou bien de la radiothérapie interne vectorisée. Le nombre de médicaments radio-pharmaceutiques (MRP) utilisés est relativement important : dérivés technétisés, iode 123, thallium 201, gallium 68, indium 111, etc., ainsi que les radiotraceurs associés.

Les techniques d'imagerie de tomographie par émission monophotonique (TEMP-TDM) et de tomographie par émission de positron (TEP-TDM) couplées à un tomodensitomètre sont réalisées afin d'examiner le métabolisme des tissus : en vérifier la structure, le fonctionnement et détecter une

affection fonctionnelle. En cancérologie, ces techniques s'intègrent dans une démarche diagnostique à la recherche de lésions tumorales supposées, faisant suite à un examen médical initial. L'administration d'un MRP dont la nature (molécule, anticorps, hormone, peptide, cellule, neurotransmetteur, etc.) est spécifique de l'organe à explorer permet aux équipes soignantes d'établir des diagnostics, de dresser des bilans d'extension tumorale (métastases) et de poser un pronostic. En effet, ces MRP vont intégrer le métabolisme du tissu ou de l'organe ciblé et émettre un rayonnement ionisant pouvant être détecté à l'extérieur du patient. Cette technique offre la possibilité de localiser avec une précision relative la ou les régions à partir desquelles sont émis les photons de désintégration de l'atome radioactif. Ainsi une image de fixation est établie à partir de laquelle il est possible de quantifier la radioactivité "métabolisée".

L'imagerie fonctionnelle représente aujourd'hui la majorité (95 %) des actes réalisés en médecine nucléaire. Les techniques utilisées donnent des informations importantes et complémentaires aux imageries de tomodensitométrie et IRM mais ne les remplacent pas.

A.2.3.1. Tomographie d'Émission Mono-Photonique (TEMP-TDM)

La TEMP est une technique dont le principe a émergé au milieu du XX^{ème} siècle à l'Institut Curie, et qui a évolué jusqu'à aujourd'hui pour devenir une modalité d'imagerie fonctionnelle aux applications multiples. La fixation du traceur radioactif est imagée à l'aide de plusieurs détecteurs en rotation autour du patient. Ces détecteurs, qui équipent les TEMP-TDM, sont composés d'un scintillateur uniquement sensible aux photons : le dispositif peut imaginer un nombre important d'isotopes, à la seule condition qu'ils soient émetteurs de photons γ . Ces photons γ d'énergie élevée sont transformés en photons lumineux peu énergétiques au sein du cristal de scintillation, eux-mêmes transformés en électrons par une photocathode, et amplifiés par un tube photomultiplicateur pour obtenir en sortie un signal électrique interprétable. De nombreuses évolutions ont été apportées à la technique ces dernières années notamment le couplage quasi-systématique, sur les modèles récents, d'un tomodensitomètre (TDM) aux caméras à scintillation. L'examen métabolique est dès lors complété par une scanographie de la zone explorée : l'apport diagnostique est indéniable puisque la TEMP-TDM permet ainsi de quantifier et de localiser plus précisément les fixations pathologiques de l'isotope administré [18].

A.2.3.2. Tomographie par Emission de Positons (TEP-TDM)

La TEP est la seconde modalités d'imagerie nucléaire utilisant les détecteurs à scintillation. A l'inverse de la gamma caméra, les détecteurs de la TEP sont disposés en couronne autour du patient. Ceci est lié à la spécificité de ce type d'imagerie qui est l'utilisation exclusive d'émetteurs de positons (radioactivité β^+). Lors de ce type de désintégration, le positon éjecté du noyau s'annihile avec un électron avoisinant et deux photons de 511 keV sont émis à 180° l'un de l'autre. Les détecteurs disposés en couronne autour du patient permettent de capter ces deux photons dans un laps de temps très court – de l'ordre de la nanoseconde – pour obtenir un signal "de coïncidence". Une fois un nombre suffisant de coïncidences détectées, l'image peut être reconstruite informatiquement. Le radionucléide émetteur β^+ le plus couramment utilisé en TEP est le fluor 18, mais d'autres isotopes à durée de vie courte ouvrent le champ des possibilités d'imagerie, comme le carbone 11, l'azote 13, l'oxygène 15 ou encore le gallium 68. Ces isotopes sont couplés à des vecteurs permettant l'exploration de différents métabolismes.

A l'instar de la TEMP-TDM, la TEP est couplée avec un scanner afin d'améliorer la localisation des fixations imagées (résolution spatiale TEP de 5 mm et scanner de 1 mm) dans un but d'amélioration diagnostique. De plus, lorsque les hyperfixations du traceur sont neurologiques, les images obtenues en TEP peuvent être fusionnées avec des images issues d'un examen IRM afin d'obtenir des informations morphologiques et structurelles plus précises.

A.2.4. Démarche thérapeutique de l'imagerie

L'imagerie fonctionnelle dans le cadre thérapeutique est principalement basée sur le suivi de traitement et son évaluation. Le pilotage du traitement, c'est-à-dire sa modification, son arrêt ou son prolongement, est guidé par les images obtenues. Elles sont réalisées de manière chronique aux étapes clés du traitement. L'imagerie TEP est notamment utilisée pour le suivi de chimiothérapies et radiothérapies et dans le cadre d'une recherche de récurrence chez les patients déjà traités.

Plusieurs molécules sont utilisées en routine clinique, à savoir le ^{111}In -DTPA-octreotide (*Octreoscan*[™]) pour l'imagerie TEMP, ainsi que le ^{18}F -DOPA et le ^{68}Ga -DOTANOC pour l'imagerie TEP.

B. Radiothérapie interne vectorisée : considérations générales et applications aux TE

Comme vu précédemment, les cancers neuroendocriniens, par le rôle sécrétoire, expriment des récepteurs membranaires peu ou pas présents dans les cellules saines. En routine clinique, cette spécificité permet l'irradiation des tissus tumoraux par plusieurs techniques de radiothérapie interne, vectorisée ou non-vectorisée.

B.1. Bases de physique particulière et rayonnements ionisants

Un rayonnement ionisant (RI) est un flux de particules dont l'énergie est suffisante pour ioniser la matière qu'il rencontre et traverse : ce flux y dépose une quantité d'énergie suffisante pour arracher des électrons au cortège électronique de l'atome qui s'ionise en se chargeant positivement. Ce type de rayonnement existe à l'état naturel (rayonnement cosmique, tellurique), et peut être obtenu de manière artificielle en centrale nucléaire, à l'aide d'accélérateurs de particules (de type cyclotron) ou de tubes à rayons X. Les rayonnements ionisants sont dits "pénétrants" et peuvent altérer la nature de la matière en profondeur, en fonction de leur nature et de l'énergie qu'ils transportent. Les divers effets de cette altération induisent des dégâts aux tissus biologiques irradiés, et qui sont la base des traitements de radiothérapie.

B.1.1. Rayonnements directement ionisants et indirectement ionisants

Le caractère ionisant d'un rayonnement se distingue en deux catégories selon le processus d'interaction qui a lieu lors de sa traversée de la matière. Lorsque le rayonnement ionise la matière par l'intermédiaire de particules ionisantes secondaires qu'il a précédemment mis en mouvement, il est qualifié de rayonnement "indirectement ionisant" : c'est le cas des neutrons et les photons X et γ , qui sont électriquement non-chargés. Ces derniers cèdent leur énergie aux électrons du milieu, mais ne sont pas responsables de la création d'ions tout au long du parcours dans la matière : dans un premier temps, la particule secondaire chargée est libérée dans le milieu (électron libéré par un photon ou proton libéré par un neutron). Dans un second temps, la particule chargée libérée dépose son énergie au fil des interactions coulombiennes avec la matière sur son trajet.

A l'inverse, les rayonnements de particules électriquement chargées sont qualifiés de "directement ionisants" : électrons, positrons, protons, ions et particule α . Ils déposent une énergie suffisante pour

ioniser la matière en arrachant les électrons sur leur trajet. Ces rayonnements induisent des modifications chimiques ou physico-chimiques transitoires ou permanentes pouvant détruire la structure des molécules.

B.1.2. Rayonnements électromagnétiques X et γ

Les rayonnements électromagnétiques sont à la fois une onde et un flux de photons, dont la dénomination X ou γ est donnée en fonction de leur provenance : les rayons X sont produits au sein du nuage électronique des atomes, alors que les photons γ sont produits au sein du noyau lors de la conversion des nucléons. Wilhelm Conrad Röntgen découvre le phénomène de rayonnement X en 1896 [19], et il reçoit le prix Nobel de physique en 1901. La mise en évidence du rayonnement γ est quant à elle attribuée au physicien français Paul Villard en 1900.

Les rayonnements photoniques ionisants peuvent interagir avec la matière qu'ils traversent par trois phénomènes différents et dépendant de l'énergie du faisceau incident : l'effet photoélectrique, la diffusion Compton et la création de paires. Les deux premiers ont lieu pour toutes les énergies permettant l'ionisation d'un atome, auxquels vient s'ajouter la production de paires au-delà de 1022 keV, et leur prédominance est fonction du numéro atomique de la cible et de l'énergie du photon incident (fig. 4 et 5).

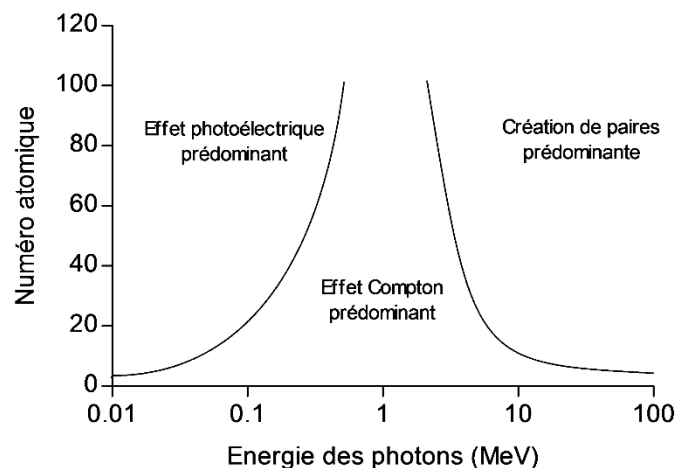


Figure 4 - Prédominance des interactions photon-matière [20]

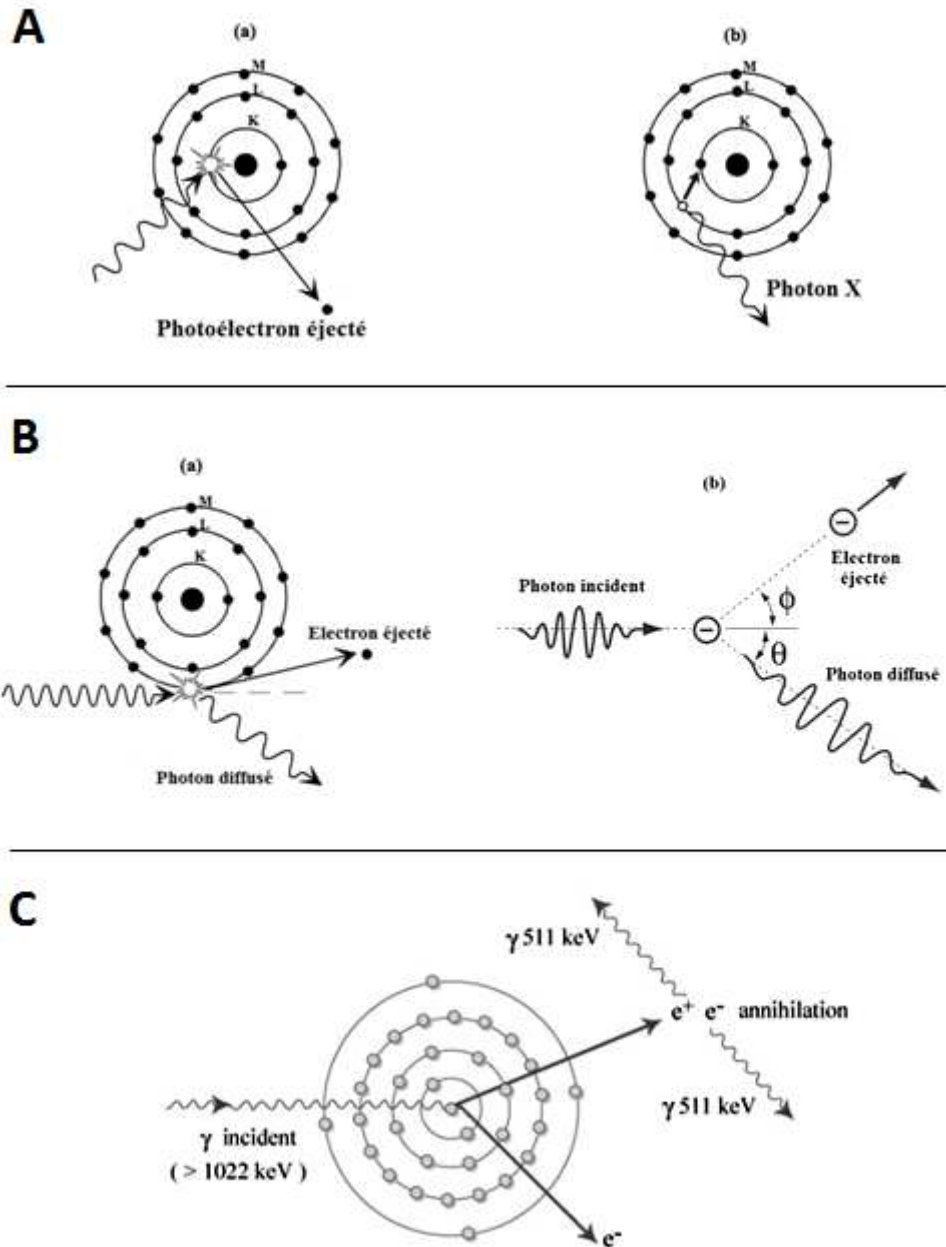


Figure 5 - Phénomènes d'interaction photon-matière : ionisation par effet photoélectrique (A), ionisation par diffusion Compton (B), création de paires e^-/e^+ et annihilation du positron (C)

B.1.3. Rayonnements particuliers α et β

Les rayonnements α et β sont des rayonnements de particules massives, issus de deux phénomènes distincts de désintégration radioactive de la matière mis en évidence par Rutherford en 1899 [21]. Dans les deux cas, la structure du noyau de l'élément "père" subit une modification et une particule chargée est éjectée du noyau.

La carte des nucléides, développée et mise à jour par l'IAEA (*International Atomic Energy Agency* [22]), présente les modes de désintégration des différents éléments radioactifs naturels et synthétisés connus à ce jour (fig. 6).

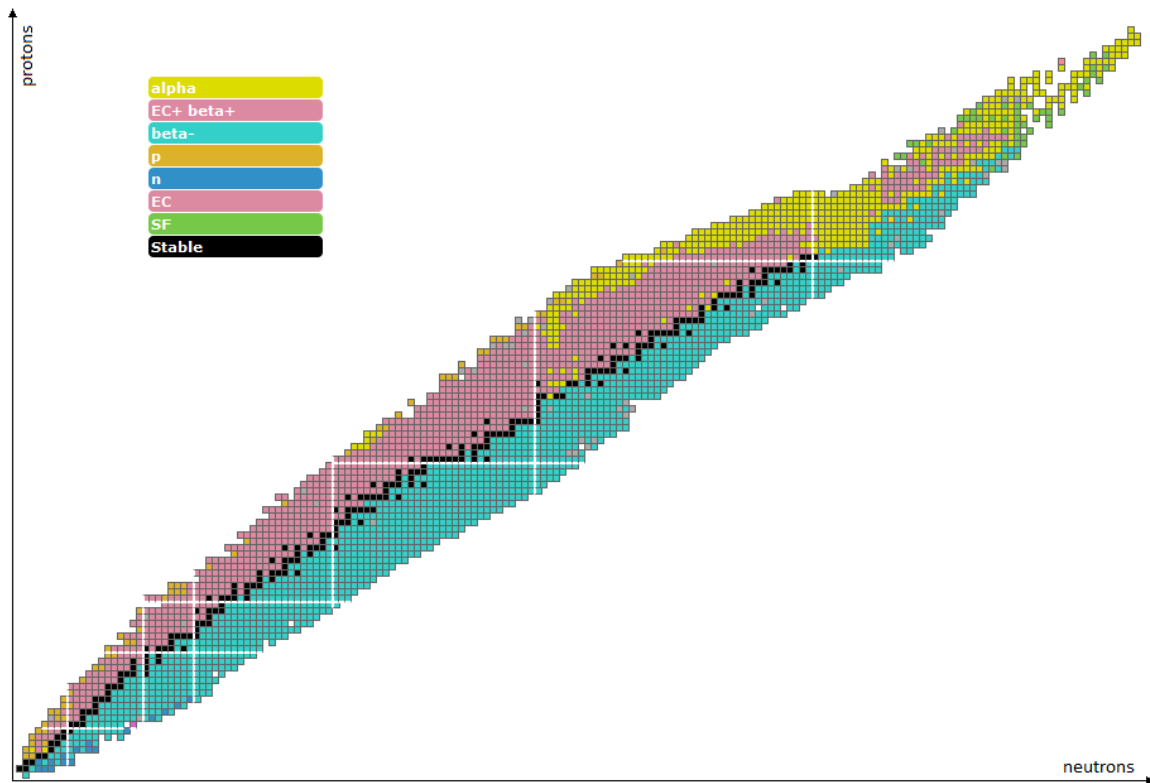
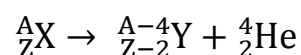


Figure 6 - Carte des nucléides et leur mode de désintégration [22]

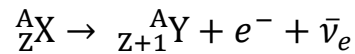
Les désintégrations α (jaune) correspondent à un excès de nucléons, les désintégrations β^+ (rose) sont liées à un excès de protons et les β^- (bleu) à un excès de neutrons. Ainsi, les désintégrations successives de ces radionucléides mènent à la création d'éléments stables, représentés en noir, et qui constituent ce que les physiciens appellent la "vallée de la stabilité". Cette dénomination provient du fait que l'énergie de liaison des noyaux est plus élevée pour ces éléments stables.

Le premier de ces phénomènes, la radioactivité α , consiste en l'éjection de deux nucléons et deux protons du noyau "père", composant ainsi la particule alpha et qui correspond à un noyau d'Hélium.

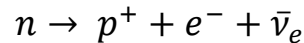


Cette particule massive, chargée positivement, est éjectée avec une énergie cinétique importante, de l'ordre de quelques millions d'électronvolts (MeV). Ces trois caractéristiques donnent à la particule α un fort potentiel ionisant lors de ses interactions avec la matière traversée. Les éléments se désintégrant de cette façon ont une période de demi-vie d'autant plus courte que l'énergie disponible et transférée à la particule α est grande.

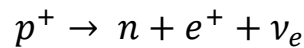
Le second phénomène, la désintégration β , correspond à l'éjection d'un électron ou d'un positron à partir du noyau. L'excès de proton conduit à l'éjection d'un électron et d'un antineutrino afin de respecter la conservation du nombre leptonique et de la charge électrique du noyau :



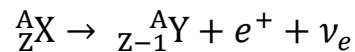
Un neutron (udd) se transforme en proton (uud) par le passage d'un quark "down" à un quark "up", suivi de l'émission des deux autres particules :



L'opération inverse a lieu lors de la désintégration β^+ puisqu'un proton se transforme en neutron en éjectant un positron et un neutrino du noyau :



L'équation finale pour cette désintégration est alors :



B.1.3.1. Interaction des électrons par collision inélastique

L'interaction entre le rayonnement incident et le nuage électronique se produit par collision "à distance". Ce sont les champs coulombiens des deux particules qui entrent en contact. Si l'énergie déposée est inférieure à l'énergie de liaison de l'électron cible, ce dernier est excité et revient dans son état d'énergie le plus stable en émettant un photon de fluorescence. Le cas échéant, l'électron cible est éjecté à l'instar d'une diffusion Compton, et la lacune créée est comblée par un électron d'une couche supérieure. S'en suit l'émission d'un photon X de fluorescence ou bien d'un électron Auger. De ce fait, le spectre d'émission de ces photons est un spectre "de raies" d'énergie spécifiques bien définies.

B.1.3.2. Interaction des électrons par rayonnement de freinage

L'interaction d'un électron avec un noyau atomique de Z élevé est aussi une interaction inélastique. Le champ électrique du noyau accélère (positivement ou négativement) l'électron incident qui va perdre une partie de son énergie en émettant des photons de freinage (ou rayonnement *Bremsstrahlung*) lors

de sa déviation. Cette perte d'énergie est importante pour les électrons de très haute énergie. La probabilité d'interaction par rayonnement de freinage croît avec l'énergie cinétique de l'électron incident ainsi qu'avec le numéro atomique de la cible de manière quadratique. Le spectre d'énergie du rayonnement de freinage s'étend de 0 eV jusqu'à l'énergie maximale du rayonnement incident.

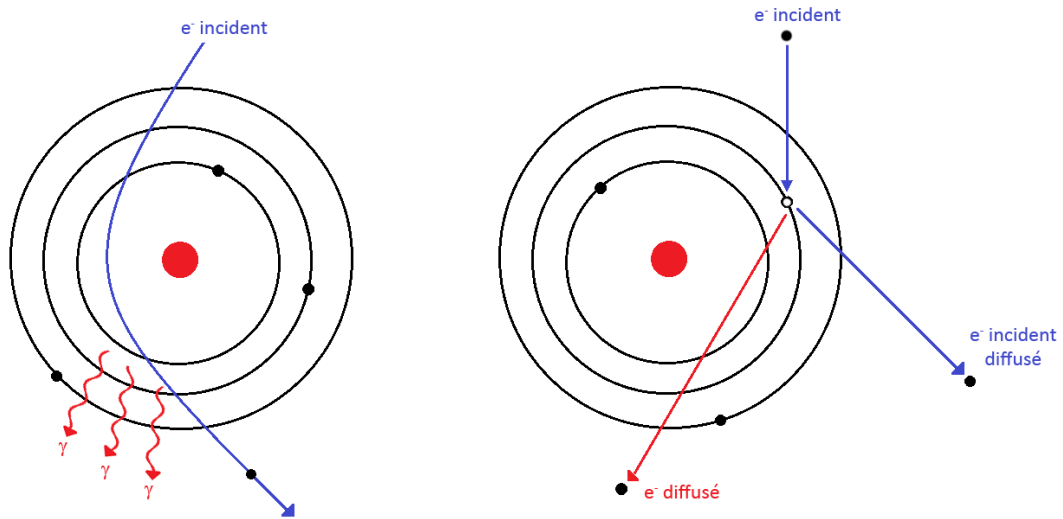


Figure 7 - Interactions électron-matière : rayonnement de freinage (gauche) et collision inélastique (droite)

En définitive, le pouvoir de ralentissement total des électrons dans la matière est donné par la somme des pouvoirs d'arrêt par collision et par rayonnement de freinage : $\frac{dE}{dx} = \left(\frac{dE}{dx}\right)_{coll} + \left(\frac{dE}{dx}\right)_{rad}$

B.1.4. Notion de parcours

Le pouvoir pénétrant des rayonnements ionisants dans la matière est une caractéristique qui varie selon plusieurs paramètres : l'énergie et la nature des particules émises ainsi que la densité du milieu traversé (numéro atomique Z). Ce pouvoir pénétrant est représenté par le parcours moyen R du projectile, et qui correspond à la distance moyenne que peut franchir la particule avant d'être totalement stoppée et d'avoir transférée toute son énergie au milieu.

Les interactions entre les photons énergétiques et la matière ont un caractère aléatoire et non-obligatoire : le rayonnement est atténué, et non pas stoppé par la matière traversée. Par conséquent, le nombre de photons $N(x)$ n'ayant pas interagit en fonction de la distance traversée x suit une loi de décroissance exponentielle qui dépend d'un coefficient d'atténuation linéique μ : $N(x) = N_0 \cdot e^{-\mu x}$. Ce

coefficient d'atténuation est dépendant de l'énergie du rayonnement ainsi que de la densité du milieu traversé (fig. 8).

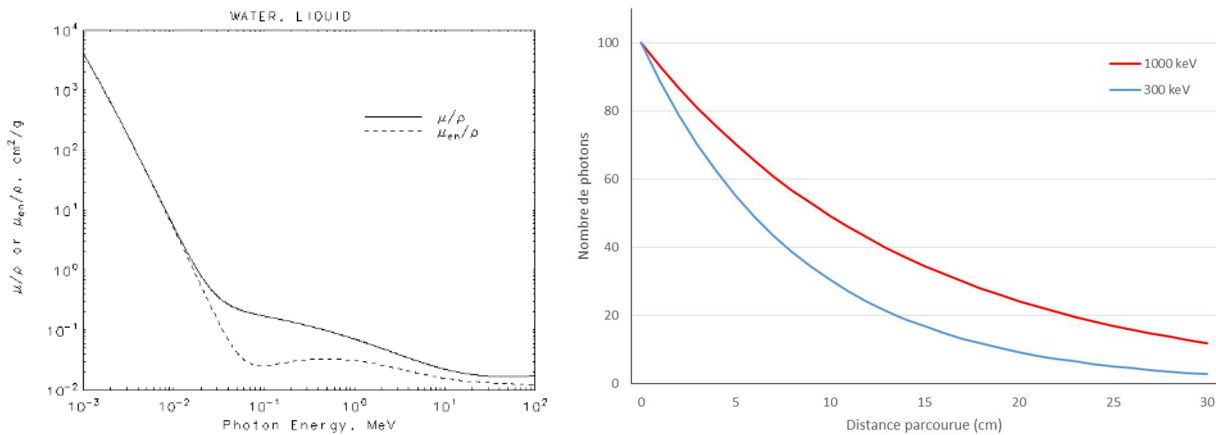


Figure 8 - Coefficient d'atténuation des photons (gauche) et parcours des photons dans l'eau (droite).
Données NIST (physics.nist.gov) : $\mu_{eau}(1000 \text{ keV}) = 0,07072 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu_{eau}(300 \text{ keV}) = 0,1186 \text{ cm}^{-1}$

Les particules chargées les plus lourdes (protons, ions, particules α) ont un parcours moyen sensiblement égal à la longueur de leur trajectoire : les interactions successives n'ont que peu d'effet de déviation [23].

La figure 14 ci-dessous présente le parcours (en traits pleins) ainsi que le pouvoir linéique de ralentissement de ces particules (en pointillés) dans différents matériaux en fonction de la quantité de mouvement p ($\text{GeV}\cdot\text{c}^{-1}$), c'est-à-dire de l'énergie cinétique. La dépendance en énergie est identique pour chacune des particules représentées, faisant fortement varier la distance parcourue dans le milieu. Il est intéressant de noter que plus la particule chargée est lourde, plus la quantité de mouvement qu'elle doit posséder pour atteindre un parcours moyen donné est élevée. L'exemple le plus parlant est la particule α qui, pour atteindre $10 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ dans le plomb nécessite une quantité de mouvement d'environ $1400 \text{ MeV}\cdot\text{c}^{-1}$ en comparaison du proton qui nécessite approximativement $360 \text{ MeV}\cdot\text{c}^{-1}$. Ceci est confirmé par un pouvoir de ralentissement de la particule α bien plus important que les autres particules massiques.

Cette notion de parcours dans la matière, lié à l'énergie du rayonnement, est d'une grande importance dans le cadre des traitements par radiations ionisantes. Le choix des radionucléides dans l'optimisation de la RIV, selon l'énergie de leur rayonnement, est conditionné par la localisation et la taille des tissus à traiter.

La trajectoire des particules lourdes dans la matière est rectiligne. En effet, les déviations que ces particules subissent lors des différentes collisions sont minimales de par leur masse et leur taille vis-à-vis des électrons de la matière qu'elles mettent en mouvement. Le parcours moyen de ces particules lourdes est sensiblement égal à la longueur de leur trajectoire. Leur profil de dépôt d'énergie dans la matière est représenté par une courbe de Bragg (ou pic de Bragg) (fig. 9) : au fur et à mesure de leur traversée de la matière, les particules ralentissent et déposent de plus en plus d'énergie à chaque interaction, jusqu'à l'arrêt total.

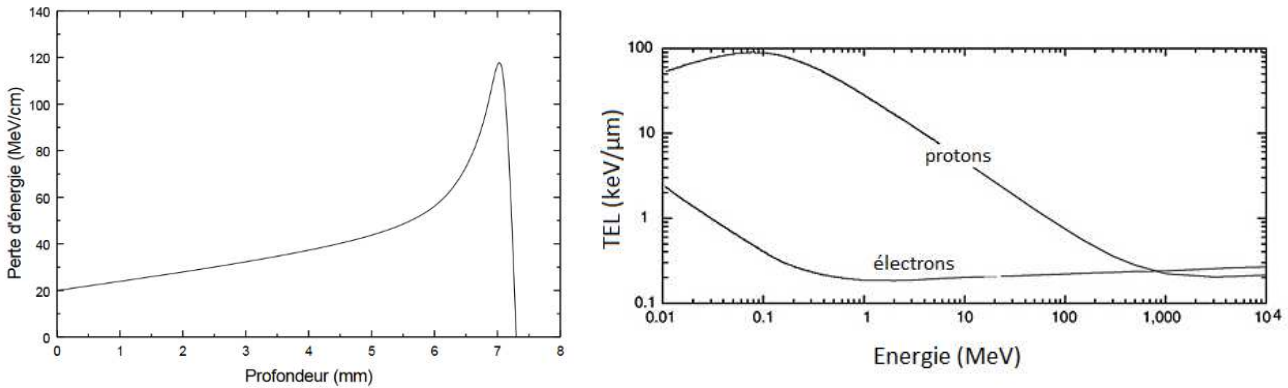


Figure 9 - Courbe de Bragg de protons dans l'eau (gauche) et relation TEL/énergie pour les électrons et les protons (droite) [ICRU Report 16 – 1970]

Les électrons ayant quant à eux une masse bien inférieure aux structures avec lesquels ils interagissent par chocs élastiques, ils sont fortement déviés sur leur parcours. La trajectoire qui en résulte, notamment aux faibles énergies, est un schéma en tronçons. De ce fait, le parcours moyen des électrons dans la matière est long, mais reste très inférieur à la longueur de leur trajectoire et l'on admet généralement la relation entre parcours moyen et énergie maximale du rayonnement : $R_{moyen} (g \cdot cm^{-2}) = \frac{E (MeV)}{2}$.

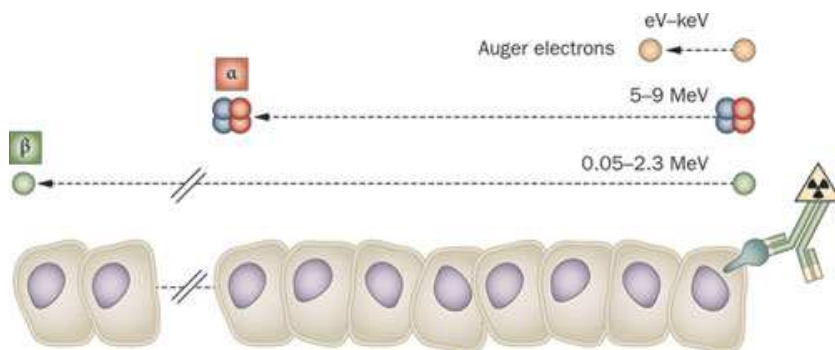


Figure 10 - Parcours des particules chargées en rapport au diamètre cellulaire (exemple de la RIT) [24]

Selon la nature du rayonnement, la distribution du transfert d'énergie dans la matière peut être très différente, notamment dans le cas de rayonnement particulaire chargé utilisé en RIV (fig. 10). L'énergie des particules β^- a un fort impact sur le volume cellulaire irradié.

B.2. Radiobiologie des rayonnements ionisants

B.2.1. Transfert linéique d'énergie

Afin de les caractériser selon leur effet dans la matière, les différents rayonnements ionisants sont classés en fonction de l'énergie moyenne transférée localement tout au long de leur parcours : le transfert d'énergie linéique (TEL). Ce paramètre physique, généralement exprimé en $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, a été défini en 1976 par l'*International Commission on Radiological Units* (ICRU) comme le rapport $\frac{dE}{dl}$ où dE est l'énergie moyenne localement transmise au milieu par une particule chargée d'énergie spécifique sur la distance dl . Il varie selon la masse, la charge et l'énergie de la particule ionisante et représente le dépôt d'énergie par ralentissement progressif ou par atténuation des particules dans la matière par unité de longueur parcourue. Un TEL élevé reflète une grande quantité d'énergie déposée et donc des dégâts biologiques potentiellement importants. Ce paramètre résulte des travaux expérimentaux de Hans Bethe corrigés par Felix Bloch en 1932 [25]. Les interactions des photons avec la matière ayant un caractère aléatoire, leur TEL proche de 1 n'est pas réellement caractéristique mais comparatif vis-à-vis des interactions à caractère obligatoire des particules massiques (neutrons, protons, électrons, positons, particule α).

Rayonnement	TEL ($\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$)
Rayons-X de ^{60}Co	0,2
Rayons-X 250 kV	2,0
Protons 10 MeV	4,7
Protons 150 MeV	0,5
Electrons β^- de ^{90}Y	0,2
Electrons β^- de ^{177}Lu	1
Electrons Auger	10 - 25
Neutrons 14 MeV	100
Particule α 2,5 MeV	166

Figure 11 - Valeurs typiques de TEL pour plusieurs particules [26,27]

De manière générale, le TEL des rayonnements électroniques β est relativement faible (fig. 11). Leur long parcours permet l'irradiation d'un grand nombre de cellules autour de la cible (phénomène de *crossfire* ou feu croisé), augmentant ainsi le potentiel de destruction tumorale des traitements vectorisés.

Les électrons Auger (émis suite à une fluorescence X) ont un TEL intermédiaire dû à leur faible énergie. Cependant, si leur rayonnement est émis à proximité directe des molécules d'ADN, leur efficacité biologique est élevée et les courbes de survie cellulaires correspondent à celles obtenues avec des particules α à TEL élevé. Le cas échéant (source Auger dans le cytoplasme), l'effet biologique est similaire aux électrons β [28].

Les particules α , à fort TEL déposent leur énergie très localement, typiquement dans les 100 premiers micromètres de tissu. Leur TEL élevé avoisinant les $100 \text{ keV}\mu\text{m}^{-1}$ est susceptible d'induire des dégâts biologiques élevés sur un nombre restreint de cellules, sans irradier les tissus sains distants. Les études précliniques et cliniques ayant mis en avant démontré l'intérêt de ces nucléides font des émetteurs α , tels que l'actinium-225, l'astate-211 ou encore le bismuth-213, des candidats de choix pour le traitement des tumeurs de petite taille, les métastases et les cancers disséminés [29–31].

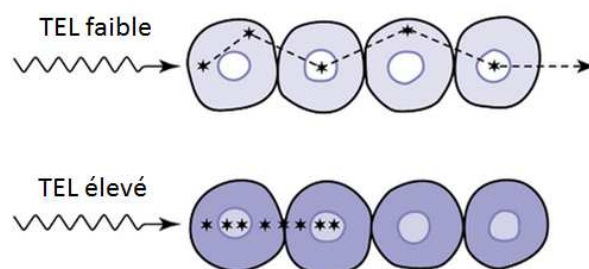


Figure 12 - Schéma de l'effet d'une irradiation à faible TEL (électrons) et fort TEL (protons) sur une population cellulaire. adapté de [32]

B.2.2. Efficacité biologique relative (EBR)

Connaitre le TEL d'un rayonnement est un point essentiel dans l'étude des dégâts causés par la radiothérapie. En effet, la même dose déposée par des rayonnements de TEL différents dans un tissu biologique induit des effets radiobiologiques différents. Cette capacité des rayonnements à TEL différents à produire des dégâts biologiques équivalents dans des conditions identiques est caractérisée par l'Efficacité Biologique Relative (EBR). De manière pratique, l'EBR traduit le potentiel d'un rayonnement à induire des dommages aux tissus biologiques en comparaison à un rayonnement de photons "de référence". Historiquement, cette référence est un rayonnement de photons X de 250

keV, qui tend à être remplacée, selon les recommandations de l'ICRP, par un rayonnement photonique de ^{60}Co ($E_{\gamma 1} = 1,33$, $E_{\gamma 2} = 1,17$ MeV, $E_{\beta} = 318$ keV) [33].

L'EBR est calculé selon le formalisme suivant :

$$EBR = \frac{\text{dose de référence (photons 250 keV ou } ^{60}\text{Co)}(\text{Gy})}{\text{dose du rayonnement (Gy)}} \text{ pour le même effet biologique}$$

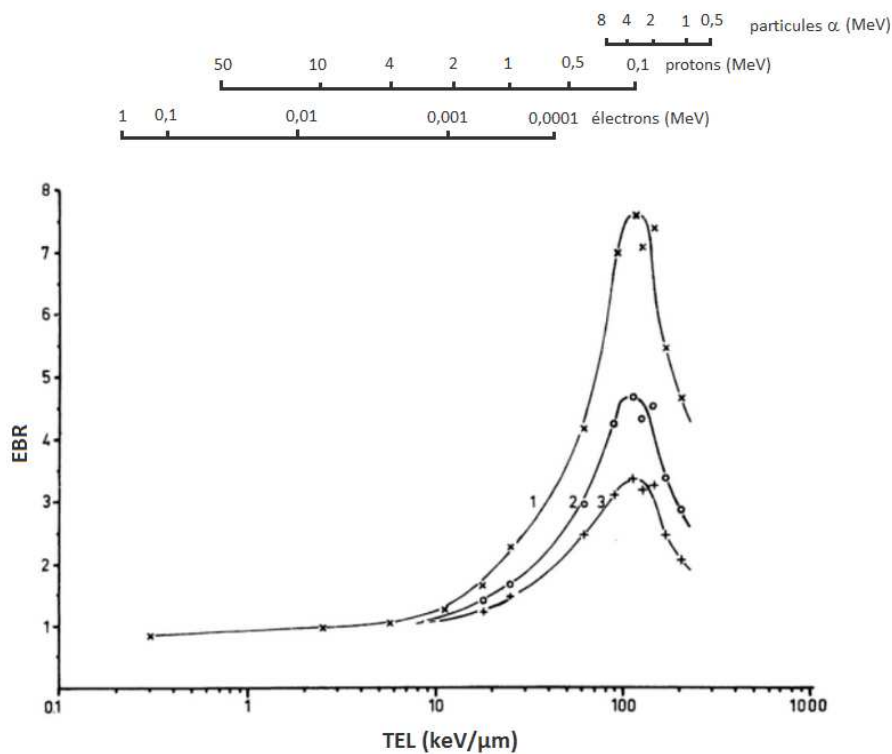


Figure 13 - Variation de l'EBR en fonction du TEL. Les courbes 1,2 et 3 correspondent respectivement à des niveaux de survie cellulaire de 80%, 10% et 1%. L'EBR est aussi dépendant des données de survie cellulaire, et donc de la dose absorbée [38]

La relation entre l'EBR et le TEL varie selon les particules pénétrant les tissus, leur énergie, mais aussi leur cytotoxicité (fig. 13). Pour les rayonnements à TEL faible ou modéré (photons X et γ , électrons Auger et β , protons de faible énergie), l'efficacité biologique est relativement faible – le parcours des particules entre deux ionisations est encore relativement élevé vis-à-vis de la densité tissulaire – et croît exponentiellement entre 10 et 100 $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. L'EBR atteint une valeur maximale lorsque le TEL est égal à 100 $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$: à cette valeur de densité d'ionisation, la distance qui sépare deux événements ionisants est environ égale au diamètre de la double-hélice de la molécule d'ADN. En conséquence, la

probabilité pour le rayonnement de causer des cassures double-brin fortement cytotoxiques est maximale en regard de la l'énergie déposée. Au-delà de $100 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, l'EBR diminue à nouveau à cause d'un dépôt de dose inutilement trop élevé dans une même cellule, on parle alors d'*overkill* [34].

B.2.3. Effets des rayonnements ionisants sur les tissus biologiques

Les effets biologiques des radiations sont usuellement classés dans deux catégories : les effets déterministes (obligatoires et non-aléatoires), et les effets stochastiques (probabilistes et aléatoires).

Les effets déterministes sont causés par la délivrance d'une forte dose absorbée, supérieure à un certain seuil, et qui dépend notamment de la nature du tissu ainsi que de sa radiosensibilité. Pour un même organe, la valeur de seuil dépend du fractionnement et de l'étalement de la dose dans le temps : lorsqu'elle est délivrée sur un temps court, le seuil déterministe est plus faible que lorsque la délivrance est étalée. Quand des tissus radiosensibles tels que les tissus hématopoïétiques, les gonades, la peau et les intestins sont touchés, les effets déterministes peuvent être réversibles à condition que les cellules souches présentes dans ces tissus soient suffisamment nombreuses et intactes pour reconstruire les lésions. Certains effets déterministes tardifs peuvent quant à eux être irréversibles (cataracte, infertilité, lésions cutanées par exemple) [35].

Les effets stochastiques n'ont pas d'effet de seuil : leur occurrence est proportionnelle à la dose absorbée. De plus, ils se distinguent des effets déterministes par une sévérité de l'atteinte indépendante de la dose. Les mutations radio-induites engendrées peuvent persister au fil des divisions successives et les conséquences apparaître des années après sous différentes formes (affections héréditaires, cancers) [36]. Du fait que l'apparition de cancers primaires est la conséquence d'effets stochastiques multifactoriels, établir un lien entre ces lésions et l'apparition de cancers radio-induits n'est pas aisé et nécessite des études épidémiologiques [37]. Des suivis sur plusieurs décennies estiment l'apparition de ces cancers secondaires chez 5 à 20 % des patients ayant subis une radiothérapie [38,39].

B.2.3.1. Lésions à l'ADN et phénomènes de réparation

L'action des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN provoque des dégâts de plusieurs types : altération des bases puriques ou pyrimidiques, pontage ADN-ADN ou ADN-protéines, les cassures simple-brin (SSB) et double-brin (DSB) de la chaîne polynucléotidique.

Outre l'activité métabolique normale des cellules, l'exposition à une dose de 1 Gy produit environ 2000 dommages de bases, 1000 cassures simple-brin, 150 pontages ADN-protéine, 40 cassures double-brin et 30 pontages ADN-ADN par cellule. Les cassures double-brin sont les plus difficiles à réparer et une seule DSB non réparée suffit à induire la mort cellulaire [40]. En outre, les particules à fort TEL créant des grappes d'ionisations sur une faible distance induit l'accumulation de lésions élémentaires (SSB, altération des bases, pontages) sur environ un tour d'hélice de l'ADN. La réparation de ces *lésions multiples localisées* est lente et souvent infidèle, ce qui leur confère un fort pouvoir létal [41].

Les systèmes développés par les cellules eucaryotes pour réparer ces dommages impliquent un grand nombre d'acteurs en relation avec les points de contrôle du cycle cellulaire. Les deux voies de réparation les plus importantes sont :

- la réparation par excision-resynthèse qui comprend l'excision de base (*base excision repair, BER*) et l'excision de nucléotide (*nucleotide excision repair, NER*) qui prennent en charge les altérations de base et les cassures simple-brin, mais aussi la réparation des mésappariements de bases ou *mismatch repair*, qui apparaissent sur les erreurs de réplication de l'ADN [41].
- Les mécanismes de réparation des cassures double-brin qui comprend la recombinaison homologue (HR), pour laquelle la DSB sur un chromosome est réparée par l'utilisation du chromosome homologue non-lésé en tant que matrice pour une réparation sans erreur génétique, ainsi que la suture non-homologue (*non-homologous end-joining, NHEJ*) pouvant produire une perte d'information génétique [42].

Aussi, schématiquement, on peut retenir que la survie cellulaire après une exposition aux rayonnements ionisants va dépendre du rapport entre le nombre et la complexité des lésions supplémentaires créées et les capacités de réparation cellulaire qui sont déclenchées.

B.2.3.2. Chronologie d'une irradiation cellulaire

Les mécanismes d'action des radiations ionisantes dans l'organisme se distinguent selon 4 phases successives : physique, chimique, cellulaire et tissulaire (fig.20).

Phase physique (de 10^{-18} à 10^{-13} secondes) : il s'agit de la phase d'ionisation ou d'excitation des atomes du milieu par le flux de particules incidentes.

Phase physicochimique (de 10^{-13} à 1 seconde) : les réarrangements atomiques et moléculaires de la phase physique entraînent des réactions chimiques pouvant durer jusqu'à une seconde (lésions directes). Ces réactions chimiques induisent de nombreuses ruptures de liaisons covalentes et scissions dans les molécules irradiées qui finissent par former des radicaux libres. Ces fragments moléculaires, notés A^* ou R^* , portent un ou plusieurs électrons libres non-appariés sur les couches externes. Cela leur confère une réactivité chimique importante menant à des ruptures ou pontages moléculaires, notamment au niveau des structures vitales de la cellule comme l'ADN, les membranes cellulaires (peroxydation lipidique), les ribosomes et les mitochondries. Les dommages indirects causés par la radiolyse de l'eau sont responsables d'environ deux tiers des effets des rayonnements ionisants dans les tissus.

Le mécanisme lésionnel principal repose sur la réaction radiochimique à partir de la production d'espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau. Celles-ci vont interagir avec les molécules environnantes et altérer le fonctionnement et amener à des dégâts cellulaires. Lors de l'irradiation des tissus biologiques (lésions indirectes), la radiolyse de l'eau présente dans les cellules conduit à la formation de deux radicaux libres fortement réactifs : l'oxydant hydroxyle HO^* , le réducteur hydrogène H^* , l'électron aqueux e^-_{aq} , le superoxyde O_2^* . D'autres espèces réactives de l'oxygène, non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , sont formées lors de la radiolyse de l'eau et entrent en jeu dans l'altération du matériel génétique.

Phase cellulaire ou biochimique (quelques heures après l'irradiation) : la molécule d'ADN est lésée et les processus de réparation entrent en jeu. Lorsque la réparation est complète, la cellule poursuit son cycle de division cellulaire normalement. Lorsque la réparation est "fautive", les mutations du génome engendrées peuvent ou non inhiber la réplication cellulaire. Si la mutation échappe aux contrôles et aux systèmes d'élimination (apoptose, immunité, elle peut être responsable de conséquences héréditaires ou de cancers secondaires (effet stochastique).

Si la réparation du matériel génétique est impossible, la mort cellulaire survient soit :

- par mort mitotique différée : la cellule perd la capacité à se diviser infiniment et meurt après mitose. Le délai entre l'irradiation et la diminution du volume tumoral est relié au nombre de

divisions avant l'apparition d'un clone abortif. La mort mitotique est le mécanisme majoritaire dans l'arrêt de la prolifération suite à une irradiation.

- par apoptose : programmée et régie par l'activité des mitochondries et les récepteurs de mort [43], l'apoptose radio-induite est initiée par la voie du gène p53 dans les premières heures après l'irradiation. Ce processus d'autodestruction est plus ou moins efficace selon la nature de la tumeur et la mutation ou non de la voie p53.
- par mort immédiate : cette mort nécrotique survient à la suite de fortes doses d'irradiation ou lorsque les lésions à l'ADN sont directement létales.

Phase tissulaire ou biologique (plusieurs jours à plusieurs années) : la cible principale est l'ADN du tissu. Les conséquences des lésions cellulaires de la phase biochimique sont soit des effets tissulaires précoces pour les tissus et organes à renouvellement rapide, soit des effets tissulaires tardifs qui correspondent à un déficit cellulaire qui se révèle longtemps après l'irradiation, pour des tissus à renouvellement lent. La majorité des tumeurs malignes sont assimilées à des tissus à fort renouvellement, sur lesquels les dommages radiologiques sont rapidement perceptibles.

B.2.3.3. Effet *Bystander*

L'effet de proximité, aussi appelé *effet Bystander*, est l'ensemble des conséquences biologiques qui surviennent, suite à l'irradiation d'une cellule, au sein des cellules voisines non-irradiées. Le mécanisme d'action de l'effet de proximité est basé sur la communication entre la cellule exposée et ses voisines qu'elles soient au contact ou à distance (fig. 14). La transmission d'espèces oxygénées et azotées réactives *ROS/RNS* (*reactive oxygen/nitrogen species*), tels que des radicaux libres, et de cytokines par la cellule irradiée à ses voisines via les *gap-junction* et le milieu extracellulaire induisent chez ces dernières des réactions similaires. Ces composés activent des voies de signalisation (NF- κ B, JAK-STAT3, MAPK) dans les cellules *Bystander* qui, tout en subissant des dégâts conséquents, produisent à leur tour des cytokines, des espèces radicalaires *ROS/RNS*, et les transmettent en entraînant ainsi une nouvelle cascade de dommages cellulaires [44]. L'intervention de macrophages sur le site d'irradiation participe aussi à la formation de cytokines, propageant l'effet *Bystander*.

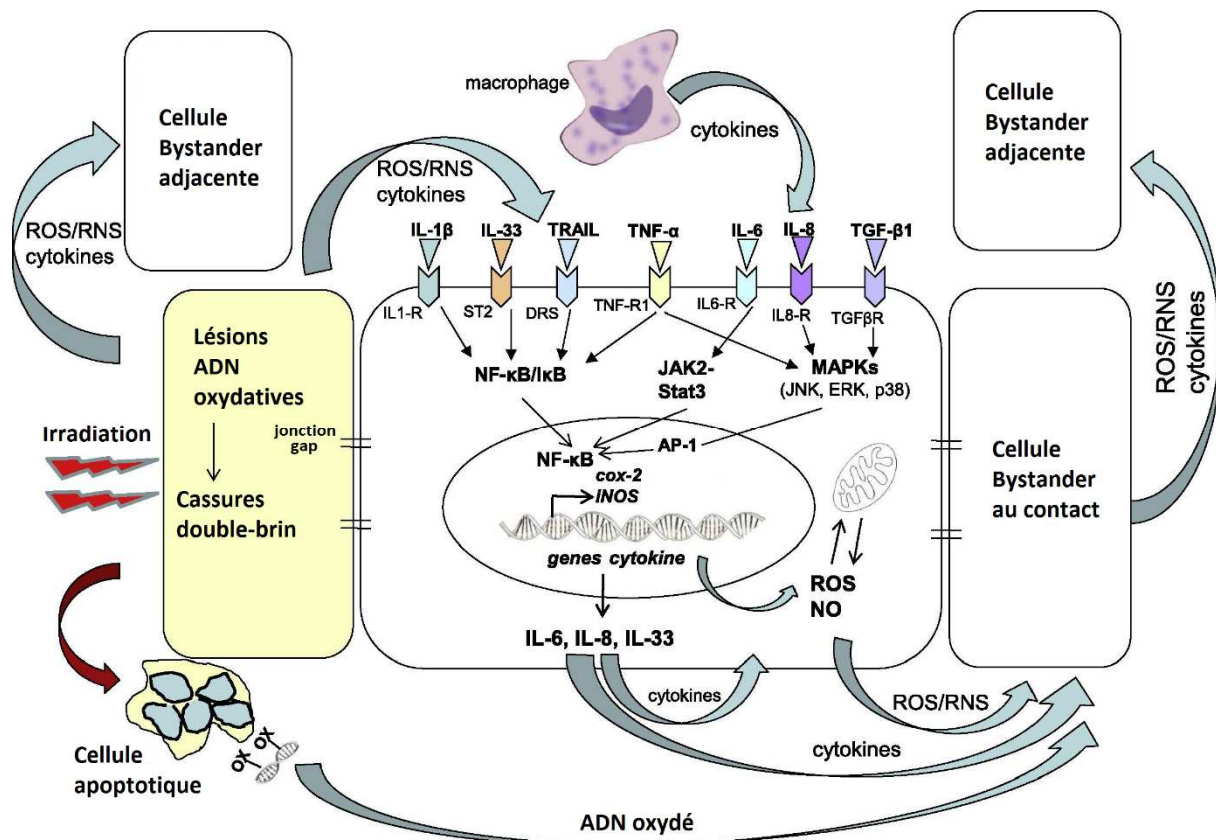


Figure 14 - Mécanismes d'action par effet Bystander au voisinage d'une cellule irradiée [45]

Bien défini en radiothérapie externe, en radiothérapie interne vectorisée l'importance de l'effet *Bystander* sur la radiosensibilité tumorale n'est pas clairement décrite [46] et les études suggèrent une différence d'efficacité selon le TEL des particules irradiantes utilisées [47]. Cependant, *Mairs et Boyd* ont récemment montré que l'effet *Bystander* est prépondérant en RIV en comparaison avec la radiothérapie externe [48,49].

B.2.3.4. Effet abscopal

Comme l'effet *Bystander*, l'effet abscopal est un phénomène reliant une irradiation locale avec une régression tumorale à distance du site ciblé. Cet effet a été démontré dans plusieurs types de cancers, notamment le mélanome, le lymphome et le carcinome du rein [50–52]. Bien que partiellement décrit, l'effet abscopal est une conséquence de l'activation du système immunitaire par la radiothérapie [53,54].

De récentes études mettent en avant une synergie entre le premier temps de traitement, la radiothérapie, et l'activation dans un second temps d'une réponse immunitaire, lorsque les patients sont traités afin d'augmenter l'effet antitumoral [55].

Le mécanisme de l'effet abscopal débute par l'activation d'un signal "danger" via les protéines Hsp70 (*Heat-shock protein 70*) et HMGB1, et le relargage de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) par les cellules irradiées (fig. 15). Le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui suit permet la maturation de cellules dendritiques indispensables à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques [56,57]. Bien que ces mécanismes soient connus, la compréhension des réactions immunitaires liées aux effets d'irradiation sur le microenvironnement tumoral reste floue.

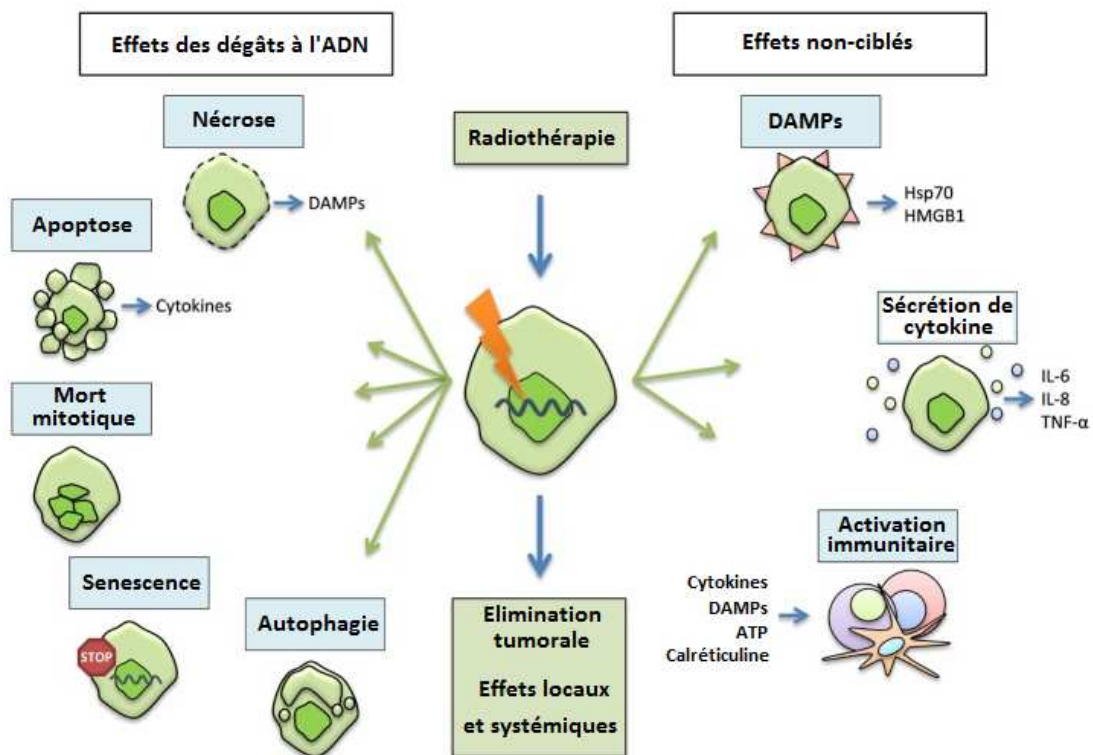


Figure 15 - Effets primaires et secondaires d'une irradiation, d'après [58]

B.2.3.5. Courbes de survie cellulaire

Les courbes de survie cellulaire décrivent la relation qui existe entre les doses délivrées et la proportion de cellules irradiées ayant survécu. La définition de la survie cellulaire diffère selon le contexte et la nature des cellules : pour les cellules différenciées qui ne prolifèrent pas, la perte d'une fonction spécifique est une caractéristique de mort ; pour les cellules prolifératives telles que les cellules

hématopoïétiques, la mort cellulaire peut être définie par la perte de la capacité de reproduction normale. Ainsi, des cellules irradiées et continuant le cycle mitotique une à deux fois, tout en produisant des protéines peut tout de même être considérée comme morte si elle ne peut plus proliférer. Ces définitions sont d'autant plus vraies pour la radiothérapie des cellules tumorales, puisque le but recherché est bien l'arrêt de la prolifération et l'induction de la mort mitotique ou de l'apoptose.

Les courbes de survie sont obtenues lors d'expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires spécifiques. La cytotoxicité d'une irradiation est évaluée par la survie relative (SR), qui dépend elle-même de l'efficacité de clonage (EC) des colonies de cellules inoculées en culture :

$$SR = \frac{\text{colonies comptées}}{\text{cellulesensemencées} \times (EC/100)}$$

avec

$$EC = \frac{\text{nombre de colonies comptées}}{\text{nombre de cellulesensemencées}} \text{ avant traitement}$$

L'estimation de l'efficacité de clonage des colonies permet de s'affranchir des perturbations de la pousse cellulaire : qualité du milieu de culture, incertitude de comptage, impact du décollement par la trypsine et de la manipulation. Elle est calculée à l'aide d'une unique plaque témoin ne subissant pas le traitement d'irradiation.

La représentation des courbes est linéaire pour la dose, et logarithmique pour la survie. De manière quantitative, l'irradiation à faible dose par un rayonnement de faible TEL est représentée par une droite linéaire ce qui correspond à un effet exponentiel. Lorsque les doses augmentent, la courbe de survie se courbe et une relation quadratique existe entre la dose et le logarithme de la survie cellulaire, pour continuer sur une nouvelle relation linéaire à très forte dose.

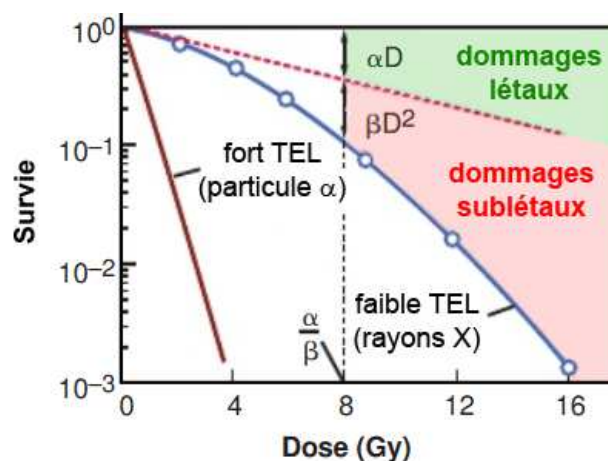


Figure 16 - Modèle linéaire-quadratique de la survie cellulaire, d'après [26]

Le modèle linéaire-quadratique couramment utilisé pour représenter l'effet d'irradiation implique qu'il existe deux composants de la mort cellulaire par irradiation, le premier étant proportionnel à la dose et le second proportionnel à la dose au carré. De ce fait, l'expression de la survie cellulaire est définie par le formalisme linéaire-quadratique suivant [59] :

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

où S est la fraction de cellules ayant survécu à la dose D , α et β sont les probabilités de lésions respectivement directement létales (cassures double-brin non réparées) et sublétales du rayonnement (fig. 16). L'accumulation des lésions sublétales de l'ADN conduit à la saturation des systèmes de réparation et à la mort cellulaire. Les deux contributions de cette mort cellulaire sont égales lorsque $\alpha D = \beta D^2$, c'est-à-dire quand $D = \alpha/\beta$. L'information de dose donnée par le rapport α/β permet de comparer les effets de deux rayonnements différents sur une même lignée cellulaire.

L'effet des particules à fort TEL est très majoritairement directement léthal (nombreuses cassures double-brin) et apparaît donc linéairement sur les courbes de survie : la relation avec la dose est purement exponentielle, ne faisant intervenir que le paramètre α . A forte dose, la comparaison faite entre les effets comparables des rayonnements de faible et fort TEL conduisent à l'étude de nouveaux modèles de survie cellulaire faisant intervenir un troisième paramètre linéaire, les modèles linéaires-quadratiques-linéaires (LQL) [60,61].

B.2.3.6. Facteurs d'influence l'effet des radiations

Radiosensibilité intrinsèque

Les cellules, selon leur nature et leur profil génomique, n'ont pas le même comportement face aux irradiations. La capacité qu'a une cellule à réparer efficacement conditionne sa radiorésistance (réparations efficaces) ou sa radiosensibilité (réparations incomplètes). Chaque tumeur et chaque tissu possède sa propre radiosensibilité intrinsèque. De manière générale, les cellules les plus radiosensibles sont issues des tissus compartimentaux et comprennent les cellules tumorales hématologiques, les cellules souches, les cellules fonctionnelles (vessie, intestin, yeux) et celles liées aux organes sexuels. A l'inverse, les tissus non-compartimentaux, les mélanomes et les sarcomes se trouvent parmi les plus radiorésistants.

Position des cellules dans leur cycle

Le cycle de multiplication des cellules de mammifères se décompose en 4 phases successives : la phase G_1 , la synthèse d'ADN (S) et la phase G_2 et la mitose (M) (fig. 17). La phase G_1 ou "gap 1" correspond à l'accumulation du matériel nécessaire à la division cellulaire, comme les nucléotides. Lors de la phase de synthèse S, la molécule d'ADN est décompactée puis répliquée. La phase G_2 ou "gap 2" est une préparation à l'entrée en mitose, et permet la synthèse des protéines enzymatiques qui vont permettre la séparation des chromosomes pour donner naissance à deux cellules filles. Ce cycle se perpétue jusqu'à la mort cellulaire.

L'état et la conformation de la molécule d'ADN, cible privilégiée des rayonnements ionisants, font varier la radiosensibilité des cellules. Ainsi, les phases G_2 et M sont dites radiosensibles à l'inverse du début de la phase G_1 et de la fin de la phase S où la réparation des cassures double-brin est la plus efficace [62,63]. En outre, l'occurrence des réparations non-homologues concorde avec les phases radiosensibles du cycle, et celle des réparations homologues, bien plus fidèles, avec les phases radorésistantes.

De plus, l'administration d'une dose de rayonnement provoque un ralentissement de la synthèse de l'ADN et un allongement de la phase S avec un blocage des cellules en phase G_2 . Le retard que cela provoque à la phase de mitose synchronise le cycle des cellules irradiées. Le fait d'administrer quotidiennement une dose perturbe ce cycle et permet l'irradiation des tumeurs dans une phase de radiosensibilité.

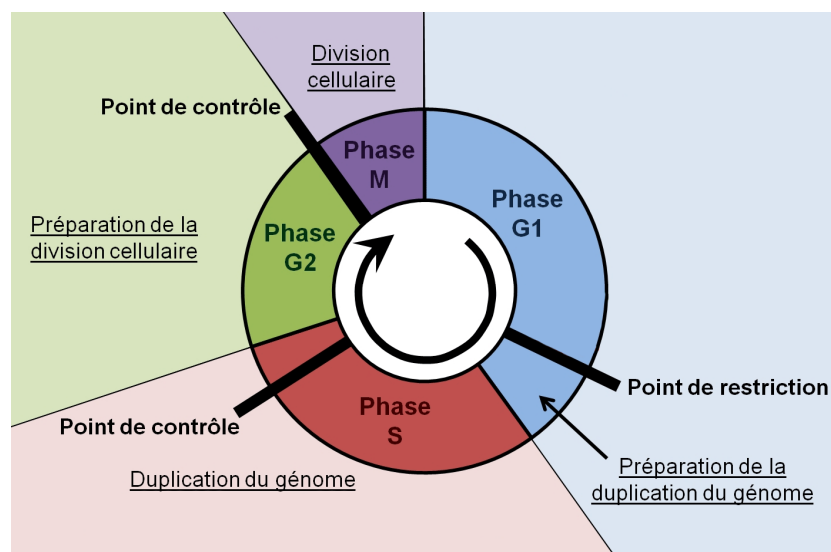


Figure 17 - Cycle cellulaire : phases et points de contrôle

Effet oxygène

La structure des tumeurs solides consiste de manière générale en un réseau plus ou moins anarchiques de vaisseaux sanguins, irrigant les cellules tumorales périphériques, au centre desquelles se trouve un cœur nécrotique de cellules hypoxiques. Le faible apport d'oxygène aux cellules du cœur leur confère une forte radiorésistance. Comme vu précédemment, la radiolyse de l'eau provoque la création d'espèces oxygénées et de radicaux libres à proximité des structures vitales de la cellule, comme l'ADN. L'effet oxygène a un rôle important sur le rendement de production des radicaux libres : si la concentration en O₂ augmente au sein des cellules, la production d'espèces oxygénées comme H₂O₂ augmente. Ces espèces très réactives vont, à l'instar des dégâts directs, infliger des dommages de type cassure simple brin et cassure double brin au matériel génétique. Par conséquent, l'oxygène présent dans les cellules périphériques va permettre au rayonnement d'avoir une efficacité maximale. Une fois les cellules périphériques détruites l'apport en oxygène aux cellules du centre de la tumeur augmente, elles deviennent dès lors plus radiosensibles. Ce phénomène est un des facteurs renforçant le plus l'effet radiobiologique des rayonnements ionisants. Récemment, un nombre croissant d'études proposent des solutions pharmacologiques afin d'augmenter l'oxygénation des tissus tumoraux [64] ou d'agir directement sur les voies de signalisation cellulaires liées à l'hypoxie, comme le facteur de transcription HIF-1 qui régule l'angiogénèse et augmente la survie ainsi que la formation de métastases [65].

Facteur temps (fractionnement / étalement)

En radiothérapie, l'étalement (temps qui séparer la première irradiation de la dernière) et le fractionnement (nombre de séances et dose par séance) sont deux notions clés de la réussite du traitement. Un temps de traitement court et une dose par séance importante sont la source de complications aiguës et tardives pour les tissus sains. A l'inverse, un étalement trop important et une dose par séance faible laisse le temps aux tumeurs de se réparer et empêche le control local de l'affection (SFRO/INCa – 2016).

Les capacités de réparation des cellules tumorales étant plus faibles que pour les cellules saines, le fractionnement du traitement permet une bonne récupération des tissus sains et une destruction des tissus tumoraux qui mettent plus de temps à se réparer : c'est l'effet différentiel. La mort des cellules périphériques permet la réoxygénation du centre de la tumeur au fur et à mesure des irradiations. Ainsi, la répétition des cycles de réoxygénation/irradiation induit l'accumulation de lésions fortement létales dans la cellule qui, submergée dans son processus de réparation, finit par mourir (fig. 18).

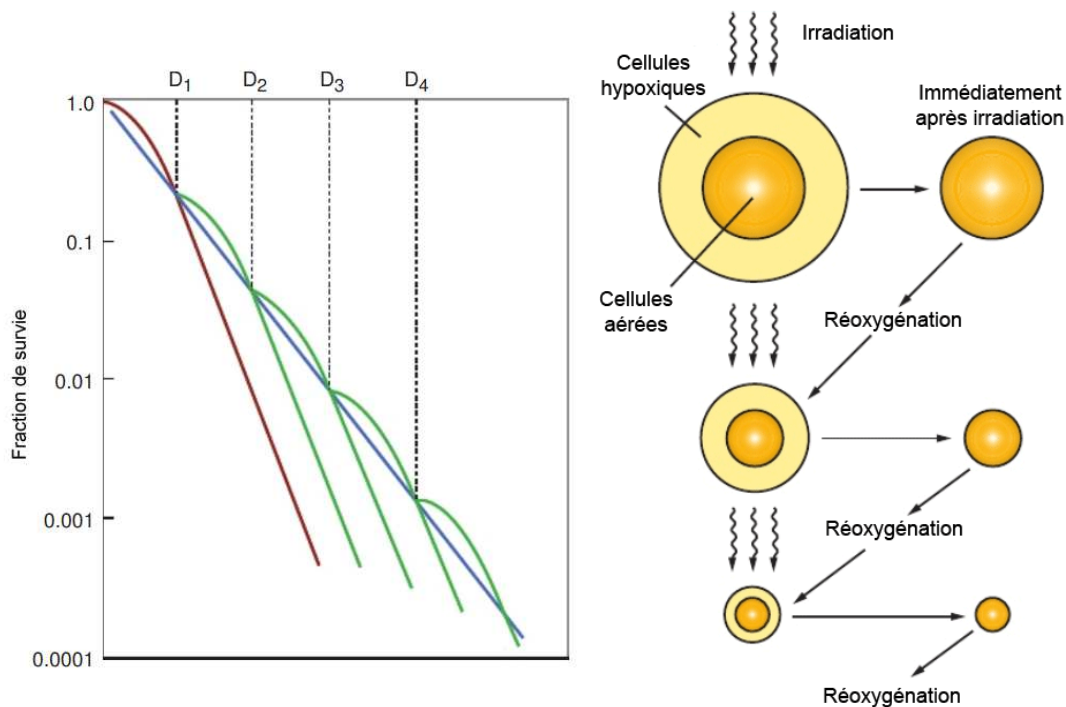


Figure 18 – Courbe de survie (gauche) et effet de la réoxygénation par fractionnement (droite), d'après [26]

L'intérêt du fractionnement de la dose en RIV a été démontré lors de l'utilisation d'anticorps radiomarqués (RIT) par une hétérogénéité de fixation diminuée, et une réduction de la toxicité rénale par rapport à l'administration d'une dose unique [66]. Ce fractionnement en trois à cinq doses permet une augmentation de la dose totale et un contrôle tumoral plus efficace tout en conservant une toxicité identique [67].

Quelques études portent aujourd'hui sur l'application aux traitements radiopeptidiques d'une stratégie de fractionnement similaire, pour lesquels la dose est délivrée par cycle, et qui tendrait vers des résultats prometteurs pour le développement de ces traitements [68,69].

Maîtrise du fractionnement : les 5 R

Le fractionnement d'un traitement est conditionné par 5 processus liés à la réaction des cellules aux irradiations, qu'elle soit saines ou tumorales. **La réparation** est la première raison du fractionnement. Comme vu précédemment, la capacité de réparation d'une cellule dépend de sa capacité à reconnaître les lésions, activer les voies de réparation et arrêter le cycle cellulaire. Ces voies de réparations sont le plus souvent absentes des cellules tumorales, par une mutation ou une inhibition du gène *p53*, les empêchant de subir une réparation efficace. Les voies de réparations des cellules saines intactes leur

permettent de réparer les lésions sublétales entre deux irradiations. Cependant, il est important de tenir compte de la grande variabilité des temps de réparation pour chaque tissu sain. **La redistribution** est liée aux phases du cycle cellulaire : lors de l'irradiation, les cellules les plus sensibles (i.e. en phase G₂ et M) sont susceptibles d'être directement tuées, le reste de la population tumorale étant alors en phase de radiorésistance (S ou G₁). Une synchronisation apparaît durant la réparation lorsque les cellules bloquent leur progression dans le cycle aux transitions en G₁ et G₂-M. Ce blocage a pour but d'éviter la reproduction du génome lorsque les dégâts à l'ADN sont potentiellement létaux. Lors de l'irradiation suivante, les survivantes seront la plupart en phase de radiosensibilité où elles subiront des dégâts importants. La redistribution apparaît notamment lors des irradiations à faible dose. L'hypoxie des cellules, décrite précédemment dans le phénomène de **réoxygénation**, peut être chronique (cellule éloignée des vaisseaux, typiquement 150 µm) ou bien aiguë lorsque les vaisseaux sanguins à proximité sont transitoirement fermés, rendant les cellules radiorésistantes. La fermeture des vaisseaux pouvant être relativement courte, le fractionnement de la dose augmente les chances de traiter les cellules sur une période d'oxygénation [70]. Le phénomène de **repopulation** est l'augmentation de la division cellulaire entre deux fractions de traitement, aussi bien pour les tissus sains que tumoraux. Les observations cliniques décrivent une accélération de la prolifération tumorale en réaction aux irradiations autour de la quatrième semaine de traitement, notamment pour les carcinomes de la tête et du cou. Pour obtenir un contrôle local, il est alors nécessaire d'augmenter la dose totale, au détriment du tissu sain sujet aux effets secondaires et tardifs [71]. L'hyperfractionnement des doses (plusieurs séances par jour) et le développement de techniques de radiothérapie toujours plus conformationnelles pallie en partie l'effet de repopulation. Le cinquième 'R' correspond à **la radiosensibilité** présentée précédemment.

La maîtrise de ces 5 facteurs influençant la radiosensibilité des cellules conditionne fortement la réussite d'un traitement de radiothérapie.

B.2.4. Irradiation à bas débit de dose par les MRP

A la différence de la radiothérapie externe qui utilise des rayonnements photoniques ou électroniques produits par des accélérateurs, la RIV est une technique basée des rayonnements particulaires émis lors des processus de désintégration radioactive des radioisotopes administrés aux patients sous forme de MRP. En radiothérapie externe, la dose est délivrée par une irradiation à fort débit de dose (de l'ordre du Gy/minute) en plusieurs fractions et selon un étalement dans le temps prédéfini. En RIV, il n'y a pas de fractionnement car l'irradiation est délivrée de manière permanente, selon la période

effective T_{eff} du MRP (issue des périodes physique T_{phys} de l'isotope, et biologique T_{biol} du vecteur : $1/T_{\text{eff}} = 1/T_{\text{phys}} + 1/T_{\text{biol}}$). Les protocoles thérapeutiques reposent le plus souvent sur des injections répétées en fonction de la cinétique et de la toxicité : de 2 à 4 injections en 6 à 8 semaines. Le flux de particules émises par le MRP étant très faible, le débit de dose en RIV est particulièrement bas, bien différent de celui d'un accélérateur de particules. Ainsi, chaque injection provoque une irradiation prolongée à très bas débit, avec des conséquences sur les mécanismes de mort et de réparation cellulaire [72].

En RIV, la posologie n'est pas définie selon l'unité de dose absorbée prescrite, le gray : $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$, mais selon la quantité de MRP injectée rapportée ou non au poids ou à la surface corporelle du patient. Les quantités massiques du vecteur sont très faibles. De ce fait, il n'y a pas d'effet pharmacologique de la molécule vectrice (mis à part pour le *mIBG*). Lorsque les rendements de marquages (ou puretés de marquage) proches de 100 % permettent d'exprimer les posologies non pas en dose absorbée, mais en fonction de l'activité radiologique exprimée en becquerels ($1 \text{ Bq} = 1$ désintégration par seconde).

En RTE, la dose absorbée dans la cible dépend schématiquement de la géométrie et de la balistique du faisceau, et l'index thérapeutique dépend de l'effet différentiel entre les tissus sains et tumoraux induit par le fractionnement et l'étalement de l'irradiation. Dans le cas de la RIV, la dose absorbée dépend de plusieurs paramètres :

- la captation initiale du MRP, qui peut être estimée par l'imagerie diagnostique
- la concentration du MRP dans la cible en fonction du temps, liée à la période effective T_{eff}
- la distribution spatiale du rayonnement et les effets de "tirs croisés"

Ce troisième paramètre est lié à l'homogénéité de la biodistribution du MRP dans la cible, qui est d'autant moins grande que la tumeur est volumineuse. Dans ce cas, les isotopes émettant les rayonnements les plus pénétrants montrent leur intérêt, puisque les particules émises se croisent à une multitude d'endroits dans la tumeur, tout en irradiant plus fortement les tissus sains environnants. C'est ce que l'on observe en comparant les toxicités et efficacités des MRP à ^{190}Y et au ^{177}Lu .

L'efficacité thérapeutique de la RIV repose sur les mécanismes théoriques et propriétés suivantes :

- la possibilité de délivrer localement plusieurs centaines de Gray sans irradier significativement les tissus environnants (si le ciblage est spécifique), du fait du très faible parcours dans la matière des particules émises : un tel ratio est inenvisageable avec un faisceau externe de RTE,
- un blocage du cycle cellulaire sous l'effet des lésions radio-induites,
- une altération de la microvascularisation exercée par les MRP fixés à la périphérie des vaisseaux sanguins,
- la sur-irradiation locale dans la tumeur par effet de "feux croisés" (fig. 19),

- une activation de l'immunité anticorps dépendante (*antibody-dependant cellular cytotoxicity (ADCC)*), et un effet *Bystander* plus marqué à bas débit de dose [73],
- l'apoptose serait un mécanisme de mort cellulaire post-irradiation particulièrement important dans le cas d'une irradiation à bas débit de dose.

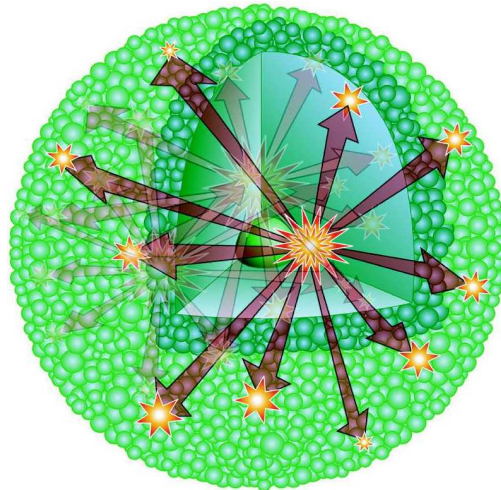


Figure 19 - Principe de l'effet de "feux croisés" : des rayonnements émis à partir de cellules ayant fixé de MRP peuvent atteindre des cellules ne l'ayant pas capté. Une même cellule peut être irradiée par des rayonnements issus de plusieurs points d'émission [74].

Plusieurs inconnues existent encore à propos de la radiobiologie à bas débit de dose. Les lignées cellulaires étudiées et qui ont permis de poser les bases de radiobiologie en radiothérapie n'ont pas spécifiquement concerné les pathologies faisant l'objet de possibilités en RIV, notamment les lignées endocrines. De plus, les conditions expérimentales pour reproduire la RIV sont difficiles à réaliser en culture cellulaire. La dosimétrie personnalisée qui permettra d'adapter les posologies à chaque patient et de prédire l'efficacité et la toxicité par l'imagerie diagnostique est encore en développement, et sa mise en œuvre clinique est complexe.

L'expérience acquise en RIT ainsi que sur le traitement des goitres a permis de montrer que ce mode d'irradiation est probablement peu adapté aux tumeurs rapidement évolutives [75,76]. En effet, l'irradiation à bas débit de dose laisse plus de possibilités pour la réparation des dommages sublétaux, ce qui peut réduire l'efficacité radiobiologique par rapport à la RTE, au même titre des phénomènes de repopulation tumorale entre chaque injection de MRP.

B.2.5. Evaluation de la dose absorbée

Dose absorbée en **gray** (Gy) : elle correspond à la quantité d'énergie en joules d'un rayonnement ionisant absorbée par unité de masse d'un milieu homogène : $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$. Il ne faut pas confondre la dose absorbée et le *kerma* (kinetic energy released per unit mass), exprimé en gray, qui lui représente l'énergie "transférée" par ionisation dans le volume d'intérêt : les particules secondaires créées pouvant aller déposer toute ou partie de leur énergie cinétique en dehors du volume défini. La dose absorbée est utilisée dans un but de prédiction des effets déterministes et stochastiques des irradiations.

B.3. Traitements en RIV

B.3.1. Radioimmunothérapie : anticorps monoclonaux

L'utilisation d'anticorps couplés à des radionucléides ou "radioimmunothérapie" est une branche de l'immunothérapie oncologique. Le marquage de ces anticorps monoclonaux à l'aide de radionucléides émetteurs de rayonnements ionisants α et β augmentent notablement l'effet antitumoral de ces anticorps. Ainsi deux anticorps anti-CD20 radiomarqués ont été proposés dans le traitement des lymphomes : l'*ibritumomab tiuxétan* (le chélateur *tiuxétan* est dérivé du DTPA (*diethylenetriamine pentaacetic acid*)) et le *tositumomab*. Lorsqu'il est conjugué avec un atome de ^{90}Y (nom commercial de la molécule : *Zevalin™*) ou de ^{131}I (*Bexxar™*), il permet l'administration d'un rayonnement cytotoxique au plus près du matériel cellulaire cancéreux. D'autres anticorps radiomarqués sont à l'étude afin d'élargir le champ d'action de la radioimmunothérapie, notamment les anti-CD33, anti-CD45 ou anti-CD66 pour la leucémie myéloïde aigüe (LMA) couplés avec des émetteurs a tels que le bismuth 213 et l'astate 211.

Ces dernières années, de nouveaux médicaments ont été développés, utilisant les antigènes comme porte d'entrée de la cellule cancéreuse [77]. Les anticorps utilisés aujourd'hui en routine clinique sont nombreux, et spécifiques de la cible tumorale : anti-HER2 pour le cancer du sein (*trastuzumab*), anti-VEGF dans les cancers colorectaux et pulmonaires (*bevacizumab*), ou encore anti-CD20 (*rituximab*). Ce dernier cible la protéine antigène CD20 surexprimée par les lymphocytes B et peut être utilisé dans le traitement de certains lymphomes non-Hodgkiniens, des leucémies lymphoïdes chroniques et certains mélanomes [78]. C'est une technique qui n'a pas connu les résultats attendus alors qu'on assiste à un développement formidable de l'immunothérapie en oncologie. Cette évolution permet d'espérer le développement d'anticorps plus efficaces pour la RIT.

B.3.2. Radiopeptidothérapie : ligands peptidiques

A l'instar des anticorps, les thérapies aux peptides radiomarqués (PRRT) font partie des techniques innovantes ayant fait l'objet d'une multitude d'études et de recherches dans le traitement des affections tumorales. Un peptide est un assemblage d'un nombre variable d'acides aminés liés par leurs fonctions carboxy-terminale (COOH) et amino-terminale (NH₂) (fig. 20).

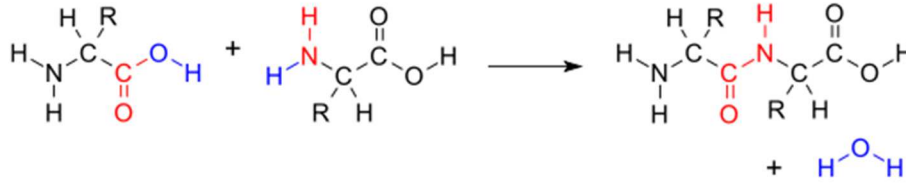


Figure 20 - Liaison peptidique entre deux acides aminés

B.3.2.1. Avantages des radiopeptides

En comparaison aux anticorps radiomarqués et aux autres techniques de radiothérapie "métabolique", les analogues peptidiques utilisés en RIV présentent des avantages non négligeables. Leur structure en assemblages d'acides aminés est aisément modifiable afin de présenter des caractéristiques innovantes. Leur taille relativement faible et leur longue durée de vie biologique donnent une pharmacocinétique efficace et une forte fixation tumorale grâce à l'internalisation du radiopharmaceutique, dans le cas d'un agoniste. De plus, leur activité immunogénique est moindre vis-à-vis des anticorps. De ce fait, l'activité radiologique est concentrée à l'intérieur des cellules tumorales et la cytotoxicité est augmentée.

L'intérêt porté à ces molécules vient de la capacité qu'ont certains peptides à se lier avec des récepteurs membranaires spécifiques que l'on retrouve à la surface des cellules cancéreuses. Naturellement, les peptides du corps humain ont une très grande affinité pour leurs récepteurs membranaires mais une demi-vie biologique relativement courte et ne sont donc pas utilisables comme vecteur. Au cours des trois dernières décennies, la communauté scientifique a donc développé des peptides de synthèse pouvant à la fois être marqués à l'aide d'atomes radioactifs tout en conservant le rôle de vecteur auprès des récepteurs membranaires avec une plus grande demi-vie. Les premiers analogues peptidiques qui ont été mis au point sont des analogues à la somatostatine (cf. partie A.2.1), dont les récepteurs membranaires sont surexprimés à la surface de certains cancers neuroendocriniens. Il existe un nombre conséquent de récepteurs membranaires exprimés par les cellules tumorales, et autant d'analogues hormonaux tels que la bombésine, la gastrine, le RGD (tripeptide *Arg-Gly-Asp*), la neurotensine ou encore la cholécystokinine font aujourd'hui l'objet de recherches pré-cliniques et cliniques en vue d'étoffer l'arsenal diagnostique et thérapeutique (fig. 21) [79]. Les récepteurs internalisent le plus souvent la molécule une fois celle-ci liée au site, le temps de rétention à l'intérieur de la cellule ciblée augmente alors la cytotoxicité du radioligand [80].

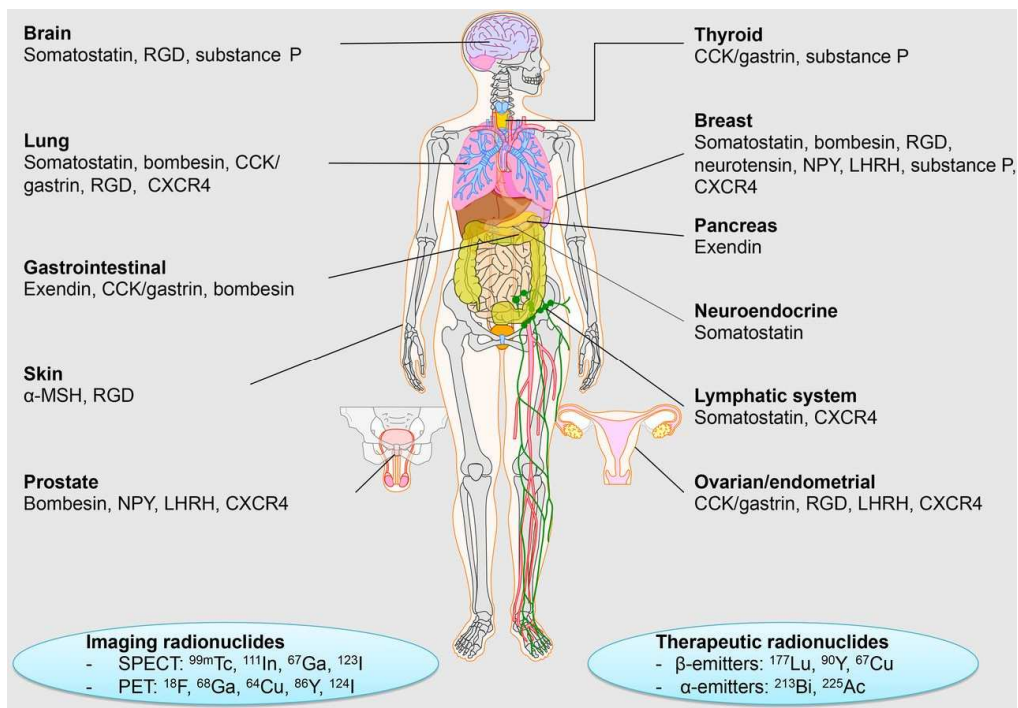


Figure 21 - Analogues peptidiques développés pour différentes localisations tumorales [79]

La structure des peptides radiomarqués se décompose en trois parties distinctes, chacune jouant un rôle précis (cf. fig. 22) :

- Le ligand : il s'agit de l'analogue peptidique synthétisé qui assure la vectorisation de la molécule jusqu'à la cible et sa reconnaissance (récepteur membranaire spécifique de la cellule cible). Si ce ligand est un agoniste du récepteur membranaire, alors le complexe ligand-récepteur peut être internalisé dans la cellule.
- Le chélateur (du grec ancien *χηλή* (*khêlê*) : pince) : lié à une extrémité du ligand, le chélateur est une cage possédant un site pouvant accueillir un métal, ici radioactif, et d'en assurer la complexation stable *in vivo* (conditions de pH et de température).
- Le radioisotope : il s'agit de l'élément actif de la molécule. Cet atome radioactif complexé par le chélateur se désintègre en émettant un rayonnement ionisant.

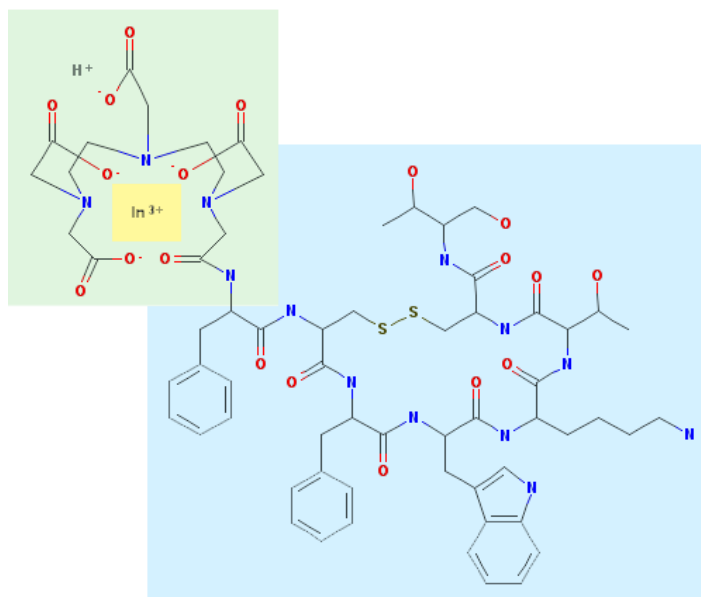


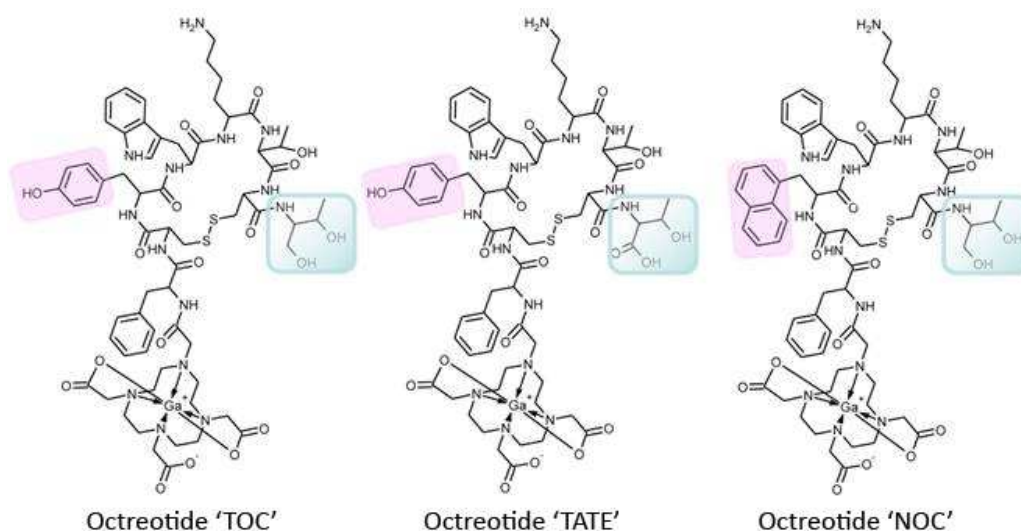
Figure 22 - Structure moléculaire du ^{111}In -Pentetreotide (Octreoscan™) : le ligand analogue de la SST (bleu) est lié au complexe chélateur DTPA (vert) - isotope radioactif ^{111}In (jaune) (National Institute of Health – 2016)

Comme les anticorps radiomarqués, ces trois structures combinées permettent au radiopharmaceutique administré par voie veineuse au patient d'entrer en contact avec les cellules tumorales cibles, qu'elles soient métastatiques ou non, et ainsi de délivrer une irradiation de la cible.

En 1993, le pentétréotide radiomarqué à l'indium 111 (^{111}In -DTPA-octreotide, nom commercial *Octreoscan™*, Mallinckrodt, Irlande) est le premier radiopeptide à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour une utilisation diagnostique en scintigraphie monophotonique des tumeurs endocrines. Depuis, son utilisation expérimentale en thérapie à la suite d'une imagerie diagnostique positive est devenue possible grâce à une augmentation des activités injectées [14].

B.3.2.2. Amélioration de la PRRT

Les évolutions de ces radiopeptides ont porté en premier lieu sur les ligands. Afin de multiplier les portes d'entrée dans la cellule tumorale, de limiter l'accumulation dans les tissus sains, les séquences d'acide aminés des analogues peptidiques ont évolué au fil des années. L'exemple de la somatostatine a permis la mise au point de plusieurs analogues expérimentés en clinique (fig. 23) : octreotide "TOC" (*D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(OH)*), octreotate "TATE" (*D-Phe-Cy-Ty-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr*), octreotide "NOC" (*D-Phe-Cys-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(OH)*) [81].



*Figure 23 - Evolutions de l'octreotide, analogue de la somatostatine.
Les changements apportés apparaissent sur les sections colorées [82]*

Les mêmes évolutions ont eu lieu sur les autres ligands mis au point, par des modifications de l'agencement ou de la longueur des chaînes peptidiques, pour déterminer les espèces les plus efficaces [83,84].

Parmi les chélateurs expérimentés en médecine nucléaire, l'*acide diéthylène-triamine-penta-acétique* (DTPA) est notamment utilisé pour le radiomarquage à l'indium 111 de l'*Octréoscan*, et le marquage du technétium 99 métastable – tous deux émetteurs de photons γ – pour certaines explorations pulmonaires. D'autres structures chélatantes comme le DOTA (*acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique*) ou le NOTA (*acide 1,4,7-triazacyclononane-triacétique*) (fig. 24) permettent la complexation d'autres radioisotopes tels que l'yttrium 90 ou le lutétium 177, émetteurs β^- . Ainsi de nouvelles molécules utilisables à la fois en diagnostic et en thérapie sont en cours de développement afin d'assurer une stabilité maximale du complexe dans son parcours vers les cellules cibles : l'intérêt d'une telle utilisation est d'obtenir une pharmacocinétique identique à chaque étape pour d'une part s'assurer de l'efficacité du traitement mais aussi permettre une évaluation dosimétrique la plus exacte possible.

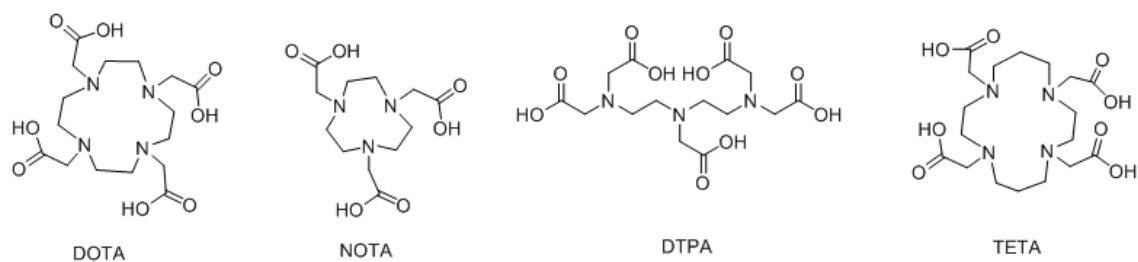


Figure 24 - 4 exemples de chélateurs macrocycliques de métaux radioactifs

B.3.2.3. Limitations de la PRRT des tumeurs neuroendocrines

L'inconvénient majeur des traitements par peptides radiomarqués, notamment des analogues à la somatostatine, est une néphrotoxicité non-négligeable. La pharmacocinétique propre à ces molécules cause une accumulation rénale de la radioactivité et la dose absorbée par les reins limite alors l'activité initiale injectée. Les peptides ne sont pas éliminés lors de l'étape de filtration glomérulaire, la majorité de l'activité étant concentrée dans le tubule contourné proximal (TCP) et non pas dans le glomérule ou le tubule contourné distal [85]. Deux protéines transmembranaires, la mégaline (*gp330*) et la cubuline (*gp280*) ont été décrites comme responsables de la réabsorption de protéines (certaines vitamines) et de peptides [86] dans le TCP par endocytose. En 2005, *de Jong et al.* ont montré le rôle essentiel que joue la mégaline dans la réabsorption dans le TCP du radiopeptide [^{111}In -DTPA]-octreotide (*Octreoscan*[™]) et l'intérêt d'étudier ce processus [87].

Le phénomène de réabsorption et de rétention est aujourd'hui mieux connu et des solutions font l'objet d'études cliniques dans le but d'augmenter les doses injectées ainsi que l'effet antitumoral, tout en limitant la toxicité rénale.

D'autres stratégies axées sur l'optimisation des ligands, notamment les analogues à la cholécystokinine/gastrine, ont permis de mettre en avant certaines structures peptidiques moins susceptibles d'être réabsorbées dans le TCP et d'y déposer une dose néfaste. L'étude de différentes structures et enchainements d'acides aminés, ainsi que de ligands de différentes tailles, ont permis de mettre en avant certains analogues offrant une bonne fixation tumorale et une faible rétention rénale, comme l'analogue minigastrine "PP-F11" [88] et l'analogue de la cholécystokinine "CCK4" [89].

En parallèle, le développement de la dosimétrie personnalisée à l'aide d'imagerie scintigraphique ouvre la possibilité d'évaluer la toxicité rénale en plus de l'efficacité des traitements [90].

C. Optimisation de l'efficacité du traitement en RIV

L'optimisation de la RIV concerne trois aspects du traitement: la cible membranaire, l'analogue peptidique, et l'effet des rayonnements ionisants.

C.1. Index thérapeutique

La RIV étant un traitement cytotoxique, on peut faire l'analogie avec la notion d'index thérapeutique des médicaments. En pharmacologie, l'index thérapeutique est une donnée quantitative reflétant l'efficacité d'une substance médicamenteuse. Il est défini comme le rapport entre la dose thérapeutiquement efficace chez 50 % des individus et la dose létale provoquant une toxicité notable chez 50 % des individus :

$$IT = \frac{DL_{50}}{DE_{50}}$$

Plus l'index thérapeutique est élevé, plus la dose efficace est éloignée de la dose létale. A l'inverse, un index thérapeutique faible est la caractéristique d'une molécule dangereuse nécessitant une certaine maîtrise dans l'administration aux patients de par le faible écart entre efficacité et toxicité.

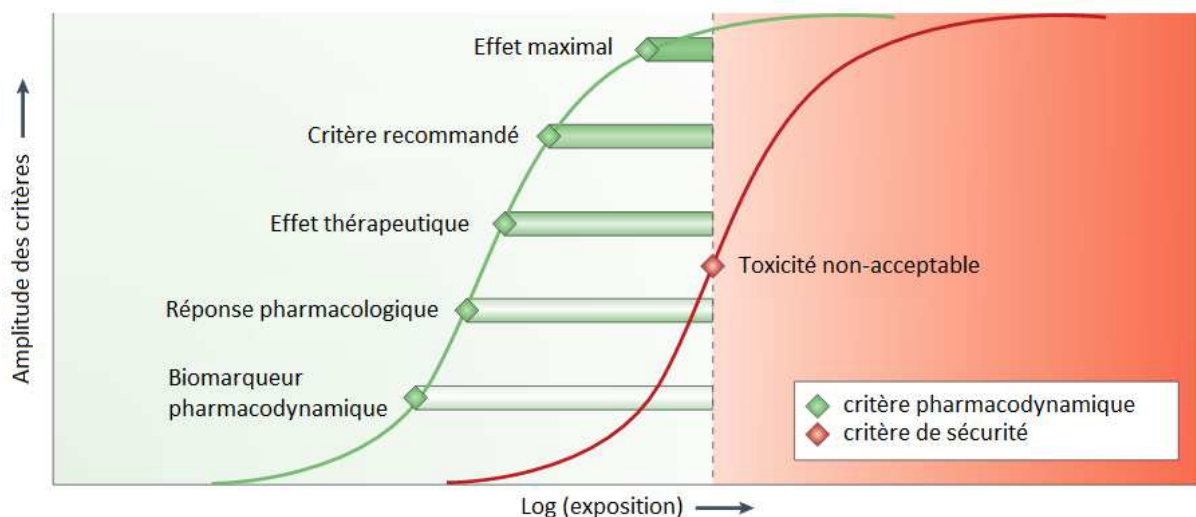


Figure 25 - Index thérapeutique en fonction des critères pharmacologiques
d'après [91]

De ce fait, l'intérêt dans la conception et l'étude d'un médicament est l'augmentation d'un index thérapeutique élevé. Lorsque l'*IT* est faible, des techniques de suivi thérapeutique pharmacologique

(STP) permettent la surveillance des taux sanguins de médicament à l'aide d'essais cliniques préalables, ou bien directement par une étude de la pharmacocinétique.

Dans le contexte de la radiothérapie, l'index thérapeutique est représenté par l'effet différentiel qui existe entre les effets délétères aux tissus tumoraux (contrôle tumoral) et les complications du tissu sain. L'évolution des techniques de radiothérapie ont permis d'augmenter de plus en plus l'index thérapeutique des irradiations en diminuant la proportion de tissu sain exposé (fig. 26, en vert) tout en conservant un contrôle local de la tumeur. L'amélioration des techniques de radiothérapie interne en termes toxicité aux tissus sains conduit à un *IT* élevé équivalent à celui observé en curiethérapie. Dans le cas de la RIV, l'index thérapeutique dépend de plusieurs facteurs : présence de la cible à la surface des cellules tumorales, affinité du vecteur pour cette dernière, fixation non-spécifique des ligands, mais aussi des phénomènes de réparation cellulaire, du fractionnement du traitement et des co-traitements.

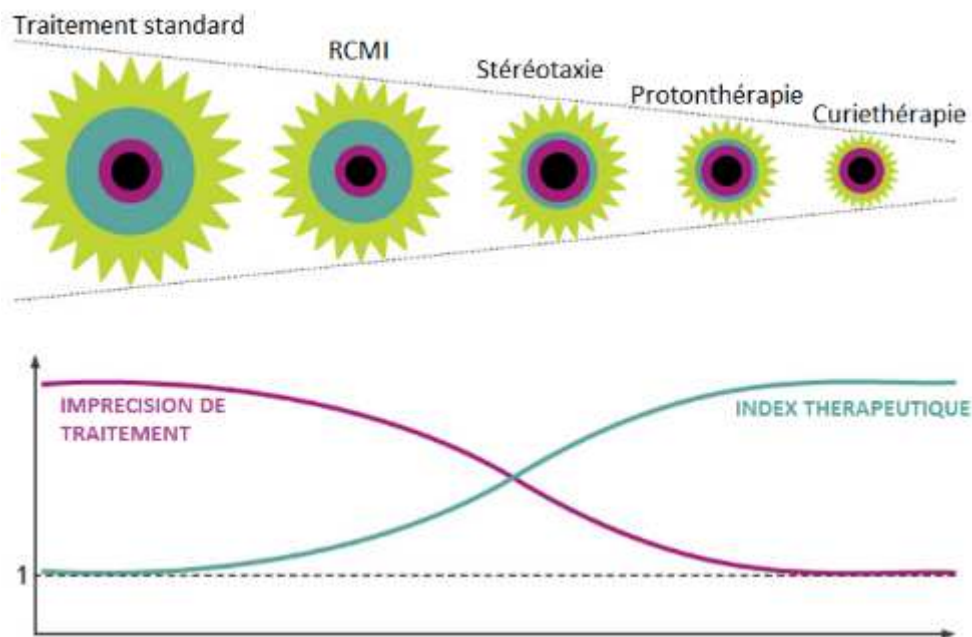


Figure 26 - Index thérapeutique et précision de l'irradiation d'après [92]

C.1.1. Dose létale

Au cours du processus de développement des radiopharmaceutiques, l'étape d'essais pré-cliniques sur des modèles animaux fait intervenir le paramètre de dose létale à 50 % (DL_{50}) dans le calcul de l'index thérapeutique. Concrètement, le paramètre DL_{50} est quantifié sans tenir compte des effets toxiques

non-létaux. Les essais cliniques réalisés sur l'Homme font intervenir la dose toxique à 50 % (DT_{50}) qui caractérise plus spécifiquement les effets toxiques non-désirables. La grande variabilité d'effets toxiques implique de préciser à quel effet se réfère la valeur de DT_{50} obtenue lors du calcul de l' IT :

$$IT = \frac{DT_{50}}{DE_{50}}$$

Autre paramètre utilisé lors d'essais cliniques, la *dose maximale tolérée* (DMT) permet l'estimation de la dose pharmacologique maximale produisant l'effet désiré sans toxicité non-acceptable (mort du sujet) [91].

C.1.2. Dose efficace

Comme vu précédemment, la dose efficace DE_{50} ou concentration efficace EC_{50} est définie comme la dose pharmacologique provoquant l'effet désiré dans 50 % de la population traitée. Cependant, l'importance de l'effet thérapeutique varie en fonction de la dose (fig. 25), et la EC_{50} ne correspond pas à la dose clinique recommandée qui doit tenir compte de ces besoins thérapeutiques ainsi que de la toxicité tolérée.

C.2. Changement de cible

Les récepteurs peptidiques sont présents à la surface des cellules et permettent la modulation de nombreux systèmes physiologiques de l'organisme. Ces récepteurs sont exprimés dans les tissus sains, mais certains tissus tumoraux comme les tumeurs neuroendocrines en expriment certains (tableau 4). L'utilisation de cette spécificité tumorale dans le développement de nouvelles techniques d'imagerie scintigraphique a mené, au fil des années, à élargir l'utilisation des peptides radiomarqués à l'arsenal thérapeutique [93,94].

Historiquement, la radiopeptido-thérapie a été développée à partir des analogues de la somatostatine (SST). Afin de multiplier les voies d'entrée de la cellule tumorale, d'autres récepteurs membranaires surexprimés dans de multiples types de cancers ont été étudiés.

Ainsi des analogues au peptide intestinal vasoactif (VIP), ligand du récepteur le plus représenté dans les adénocarcinomes gastro-intestinaux, ont été marqués au ^{123}I et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et étudiés, mais une dégradation précoce dans la circulation sanguine ainsi qu'une nécessité de purifier le radiopeptide avant son administration ont eu raison de son développement clinique.

Le récepteur GRP (*gastrin-releasing peptide*) est surexprimé dans de nombreux cancers comme le cancer pulmonaire à petites cellules (CPPC), du pancréas, du sein ou encore de la prostate [93]. Des analogues de la bombésine (BN) ont été développés dans le but de cibler ces récepteurs GRP avec une forte affinité [95]. Les évolutions successives de ces peptides, notamment en termes de fixation rénale et intestinale, mais aussi d'internalisation, font de ces molécules des candidats de choix à la fois pour le diagnostic et la thérapie [96,97].

Les analogues de la neurotensine (NT), eux aussi prometteurs pour les cancers pancréatiques, ont été améliorés au fil des études pour pallier les problèmes de dégradation après l'injection au patient. Ainsi, *de Visser et al.* ont démontré l'intérêt *in vivo* des dernières générations d'analogues à la neurotensine marqués à l'indium-111 [98].

Des peptides comprenant le motif d'acides aminés *Arg-Gly-Asp*, ou motif RGD, ont été synthétisés afin d'étudier leur affinité avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (récepteur de la matrice extracellulaire). L'utilisation diagnostique de ces analogues a été mise en avant dans la visualisation de l'angiogenèse des cancers de la prostate et du sein [99].

Parmi les peptides développés pour le traitement des tumeurs neuroendocrines, les analogues de la gastrine et de la cholécystokinine ciblent les récepteurs RCCK2 exprimés exclusivement dans certains cancers, identifiés par *Reubi et al.* [100]. Ainsi, les cancers médullaires de la thyroïde (CMT) surexpriment les récepteurs RCCK2 à 92 %, les cancers pulmonaires à petites cellules (CPPC) à 57 %, les astrocytomes à 65 %, les tumeurs stromales ovariennes à 100 % et les cancers gastroentéropancréatiques à 22 %. La gastrine et la cholécystokinine ayant une affinité élevée et similaire pour le RCCK2, de nombreux analogues des deux peptides sont expérimentés depuis la mise au point et l'étude en 1998 par *Behr et al.* d'un premier dérivé gastrinique radiomarqué à l'iode 131 dans un but diagnostique et thérapeutique des cancers médullaires de la thyroïde (lignée CMT-TT) [101].

L'efficacité supérieure de la détection tumorale par scintigraphie d'un dérivé gastrinique radiomarqué ($^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$), comparativement à une scintigraphie des récepteurs à la somatostatine par l'*Octreoscan™* (94,2 % versus 40,7 %) [102] est un des arguments mis en avant dans le développement de nouveaux analogues ciblant le RCCK2.

En 2007, un projet européen du groupement de coopération *EuroCOST (European Cooperation in Science and Technology)* sous la dénomination "COST Action BM0607" a été constitué dans le but d'évaluer et de sélectionner les analogues à la cholécystokinine/gastrine les plus efficaces dans le ciblage des différentes tumeurs exprimant le récepteur RCCK2. Des groupes de travail distincts se sont focalisés sur 5 objectifs scientifiques : identifier les cibles, synthétiser de nouveaux ligands, évaluer les

approches dosimétriques de la PRRT, adapter de nouveaux radionucléides et enfin améliorer les connaissances en pharmacologie des peptides radiomarqués. Ainsi, les capacités de liaison et d'internalisation de 12 ligands analogues de la CCK couplés au chélateur DOTA et radiomarqués au ^{111}In ont été évaluées par *Aloj et al.* sur les lignées AR42J et A431-CCK2R exprimant le récepteur RCCK2 [84]. La stabilité biologique des analogues peptidiques de la CCK est un facteur limitant l'efficacité thérapeutique. En effet, une fois la molécule en contact avec le milieu biologique, des sites de clivages enzymatiques apparaissent sur les chaînes peptidiques créant des métabolites n'ayant plus la capacité de se fixer aux récepteurs membranaires pour être internalisés [83]. De ce fait, la stabilité des 12 mêmes analogues du groupement COST a été comparée in vitro par le groupe de travail de *Ocak M et al.* et l'analogue de la gastrine radiomarqué ^{177}Lu -PP-F11 (^{177}Lu -DOTA-(DGlu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) a montré une grande stabilité dans le sérum humain et les homogénats tissulaires.

Récepteur peptidique	Type de tumeur
Récepteur de la somatostatine	Tumeurs neuroendocrines (pancréatique, carcinoïde) Cancer pulmonaire à petites cellules Cancer médullaire de la thyroïde Tumeurs du système nerveux (méningiomes, gliomes) Lymphome Hodgkinien
Récepteur au peptide intestinal vasoactif (VIP)	Adénocarcinomes Cancer pulmonaire à petites cellules Tumeurs neuroendocrines Lymphome
Récepteur de la cholécystokinine CCK-B (RCCK2)	Cancer médullaire de la thyroïde Cancer pulmonaire à petites cellules Cancer stromal ovarien Astrocytome Cancers gastro-intestinaux Adénocarcinomes (estomac, colon, pancréas)
Récepteur CCK-A (RCCK1)	Tumeur gastroentéropancréatique Méningiome Neuroblastome Adénocarcinome pancréatique
Récepteur de la substance-P	Cancer médullaire de la thyroïde Cancer pulmonaire à petites cellules Cancer du sein
Récepteur de la bombésine	Cancer du pancréas Cancer de la prostate Cancer pulmonaire à petites cellules Cancer du colon Glioblastome
Récepteur de la neurotensine	Cancer du pancréas Cancer de la prostate Cancer pulmonaire à petites cellules
Récepteur GnRH	Cancer du sein Cancer de la prostate
Récepteur du peptide "glucagon-like"	Insulinome Cancer médullaire de la thyroïde

Tableau 2 - Récepteurs peptidiques surexprimés dans les tumeurs humaines, d'après [103]

C.2.1. Récepteurs à la somatostatine

Nous prendrons l'exemple du ciblage peptidique des récepteurs à la somatostatine (SST). Ces récepteurs sont au nombre de cinq et identifiés *sst1*, *sst2*, *sst3*, *sst4* et *sst5*.

C.2.1.1. Expression

Ces 5 récepteurs sont surexprimés dans un nombre important de tumeurs "SST-positives" référencées par *Reubi JC et al.* (tableau 3) [104]. La surexpression des récepteurs, notamment des récepteurs *sst2*, dans de nombreux types de cancers neuroendocriniens en font des cibles de choix en RIV [93].

Tumeurs sst-positives	Nombre de cas	Type de récepteur				
		sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
Prédominance sst2						
Neuroblastomes	8	-	+++	-	-	-
Méningiomes	6	-	+++	-	-	-
Médulloblastomes	5	-	+++	-	-	-
Cancer du sein	31	-	+++	-	-	-
Lymphome	7	-	+++	-	-	-
Carcinomes rénaux	7	-	+++	-	-	-
Paragangliomes	10	-	+++	-	-	-
Cancer pulmonaire à petites cellules	2	-	+++	-	-	-
Hépatomes	2	-	+++	-	-	-
Prédominance sst1						
Carcinomes de la prostate	6	+++	-	-	-	-
Sarcomes	9	+++	+	-	+	-
Prédominance sst3						
Adénomes pituitaires inactifs	30	+	++	+++	-	+
Prédominance sst2 + sst5						
Adénomes pituitaires GH	24	-	+++	-	-	++
Prédominance sst2 et/ou sst1						
Tumeurs gastroentéropancréatiques	22	+	++	-	-	+
Phéochromocytomes	19	+	+++	-	-	-

Tableau 3 - Motif d'expression *sst1-sst5* dans les tumeurs humaines, d'après [104]

Cependant, l'expression de ce même *sst2* dans les tissus sains avoisinant les tumeurs (tableau 4) implique qu'une partie de l'activité injectée sous forme d'analogues SST est en partie captée et fixée par ces tissus. En imagerie, cela perturbe le diagnostic en caractérisant des fixations non-tumorales (e.g. faux positifs) et génère un bruit de fond supplémentaire. En thérapie, le problème est plus important du fait que ces tissus sains vont eux aussi recevoir la dose de rayonnement destinée aux tissus tumoraux et en subir les dommages directs.

Tissus sst-positifs	Nombre de cas	Type de récepteur				
		sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
Vaisseaux (veines)	22	-	+++	-	-	-
Plexus nerveux (myentérique)	7	-	+++	-	-	-
Îlots pancréatiques	4	-	+++	-	-	-
Glande médullosurrénale	1	-	+++	-	-	-
Stroma prostatique	2	-	+++	-	-	-
Muqueuse gastrique	4	+++	-	-	-	-
Muqueuse du colon	2	-	++	-	-	-
Rate	2	-	+++	-	-	-
Tissus lymphoïdes	22	-	+++	-	-	-

Tableau 4 - Motif d'expression sst1-sst5 dans les tissus humains sains, d'après [104]

La surexpression des récepteurs SST dans les tumeurs versus dans les tissus sains est à la base de l'imagerie moléculaire et du traitement de ces tumeurs [105,106]. En outre, ces peptides ont une élimination hépatique et surtout rénale, qui pose le problème de toxicité par sur-irradiation des reins.

C.2.1.2. Toxicité non-spécifique des traitements aux analogues SST

Il est reconnu qu'une toxicité rénale peut survenir à la suite d'un traitement de radiopeptide-thérapie, malgré la faible occurrence d'effets secondaires, et ce parfois plusieurs années après. Comme vu précédemment, cette toxicité limite les doses radioactives injectées et plusieurs études ont évalué l'atteinte aux reins et les solutions envisagées pour la réduire. *Imhof A et al.* ont suivi l'évolution des effets hématologiques et rénaux après l'administration de plusieurs cycles de [⁹⁰Y-DOTA]-TOC (octreotide, 3,7GBq.m⁻²) avec injection d'arginine et de lysine avant le traitement afin d'inhiber la réabsorption rénale. Ainsi 12,8 % des patients traités ont développé une affection hématologique transitoire de grade 3 à 4 et 9,2 % une toxicité rénale permanente de grade 4 à 5 (sévère à létale) selon les critères CTCAE v4.0 (*Common Terminology Criteria for Adverse Effects*) [107].

Valkema R et al. ont suivi la clairance de la créatinine chez les patients après traitements par [⁹⁰Y-DOTA]-TOC et [¹⁷⁷Lu-DOTA]-TATE (octreotate) en mettant en avant une diminution de l'activité rénale de 7,3 % par an chez les patients traités au ⁹⁰Y contre 3,8 % par an pour le ¹⁷⁷Lu, malgré l'administration de protecteurs rénaux pendant le traitement. Ces données sont comparables aux pertes de clairance associée à une insuffisance rénale chronique progressive [87]. Une évaluation à long-terme de *Bodei L et al.* sur la toxicité rénale après une thérapie au [⁹⁰Y-DOTA]-TOC et au [¹⁷⁷Lu-DOTA]-TATE a elle aussi permis de montrer une perte de clairance de la créatinine de 5 à 10 % à un an chez 87 % des patients

traités au ^{90}Y , associée à une toxicité de grade 1 (30 % des cas), de grade 2 (4 %) ou de grade 3 (4 %). Aucune toxicité n'a été observée chez les patients traités au ^{177}Lu malgré une perte de clairance de 5 à 10 % [108].

Bergsma et al. ont mis en avant l'intérêt d'estimer la dose absorbée par les reins au cours d'une radiopeptide-thérapie au [^{177}Lu -DOTA]-TATE, pour si besoin diminuer les doses injectées au fil des cycles de traitement sans dépasser 28 Gy aux reins. Le résultat est une absence de toxicité rénale de grade 3 ou 4 dans la cohorte de patients, et aucune diminution de la fonction rénale au-delà de 20 % [109,110]. Conjointement, *Svensson J et al.* ont corrélé la faible fonction rénale avec l'augmentation de la dose absorbée au rein et de la toxicité hématologique au cours du traitement, renforçant encore l'intérêt de la dosimétrie personnalisée [111].

Limiter ainsi la dose aux reins permet de préserver au mieux la fonction rénale, mais cette stratégie présente l'inconvénient majeur de limiter aussi la dose absorbée par le tissu ciblé et le contrôle local de la tumeur. Sur ce point, la différence notable de toxicité aux tissus sains entre le ^{90}Y et le ^{177}Lu est un paramètre important lors du choix thérapeutique.

A l'heure actuelle, de nombreux essais thérapeutiques de PRRT sont proposés dans certains centres de soin. Outre l'utilisation de l'*Octreoscan* en deux temps (diagnostic puis thérapie), présenté dans plusieurs études citées, les premiers résultats cliniques de traitements utilisant le [^{177}Lu -DOTA(0),Tyr3]-octreotate (*Lutathera, Advance Accelerator Application*) sont présentés. *Crespo-Jara et al.* ont notamment mis en avant une réduction métastatique de plus de 50 % chez une patiente de 36 ans dont le sarcome synovial poplité a entraîné l'apparition de ces métastases dans les poumons. Malgré la résistance à 6 stratégies de traitement, la patiente a bénéficié de deux injections de ^{177}Lu -octreotate *Lutathera* (5,55 GBq et 7,4 GBq espacées de 2 mois). Les bénéfices cliniques importants qui ont suivi montrent l'intérêt des radiopeptides marqués au ^{177}Lu et à leur optimisation [112].

C.2.2. Récepteurs à la cholécystokinine

La cholécystokinine (CCK) et la gastrine (G) sont les deux ligands endogènes agonistes des récepteurs RCCK1 et RCCK2 (anciennement RCCK-A et RCCK-B). La forte affinité de ces ligands avec le récepteur RCCK2 en fait une cible privilégiée des analogues CCK/G radiomarqués.

C.2.2.1. Intérêt du ciblage de RCCK2 en cancérologie

L'étude de *Reubi JC et al.* a porté sur 406 tumeurs humaines autoradiographiées à l'iode 125 : les récepteurs RCCK2 sont surexprimés dans un nombre important de cellules tumorales (tableau 5). A l'inverse, les récepteurs RCCK1 sont peu ou pas exprimés dans ces types de cancers, mis à part certaines tumeurs gastroentéropancréatiques, méningiomes et neuroblastomes [100]. L'expression tumorale de ces récepteurs constitue une opportunité parfaite dans le cadre diagnostique et thérapeutique des tumeurs neuroendocrines en oncologie, grâce le fait que les tissus sains avoisinants n'expriment pas ou très peu ces mêmes récepteurs. L'irradiation néfaste qui a été montrée dans les traitements par analogues à la somatostatine est potentiellement plus faible avec des analogues ciblant le RCCK2.

De plus, des affections comme le cancer médullaire de thyroïde (CMT) surexpriment fortement le RCCK2 (92 %) à l'opposé des cancers thyroïdiens différenciés et des adénomes parathyroïdiens qui ne l'expriment pas : un diagnostic différentiel est alors réalisable. Ces résultats constituent un point d'appui intéressant dans le développement de nouvelles solutions utilisant le ciblage des récepteurs RCCK2 par des analogues à la cholécystokinine et à la gastrine dans le but d'identifier et localiser les tumeurs pour, par la suite, les traiter en RIV chez les patients pour lesquels les traitements existants ne sont pas efficaces.

Type de tumeur	Récepteurs CCK-2	Récepteurs CCK-1
Tumeurs neuroendocrines		
Carcinomes médullaires de la thyroïde	22 sur 24 (92 %)	2 sur 24 (8 %)
Cancers pulmonaires à petites cellules	8 sur 14 (57 %)	0 sur 14 (0 %)
Tumeurs gastroentéropancréatiques	7 sur 32 (22 %)	12 sur 32 (38 %)
Adénomes à hormone de croissance	0 sur 9 (0 %)	0 sur 9 (0 %)
Adénomes pituitaires inactifs	0 sur 10 (0 %)	0 sur 10 (0 %)
Phéochromocytomes	0 sur 10 (0 %)	0 sur 10 (0 %)
Paragangliomes	0 sur 10 (0 %)	0 sur 10 (0 %)
Neuroblastomes	1 sur 16 (6 %)	3 sur 16 (19 %)
Adénomes parathyroïdiens	0 sur 4 (0 %)	0 sur 4 (0 %)
Tumeurs du système nerveux		
Astrocytomes	11 sur 17 (65 %)	0 sur 17 (0 %)
Méningiomes	1 sur 27 (4 %)	8 sur 27 (30 %)
Schwannomes	0 sur 13 (0 %)	0 sur 13 (0 %)
Glioblastomes	0 sur 10 (0 %)	0 sur 10 (0 %)
Tumeurs du système de reproduction		
Cancer du sein	5 sur 65 (8 %)	2 sur 65 (3 %)
Carcinomes de l'endomètre	2 sur 16 (13 %)	0 sur 16 (0 %)
Cancers ovariens		
Tumeurs épithéliales	4 sur 28 (14 %)	0 sur 28 (0 %)
Tumeurs stromales	3 sur 3 (100 %)	0 sur 3 (0 %)
Carcinomes de la prostate	1 sur 15 (7 %)	0 sur 15 (0 %)
Carcinomes colorectaux	0 sur 22 (0 %)	0 sur 22 (0 %)
Cancers pulmonaires non-à petites cellules	1 sur 14 (7 %)	0 sur 14 (0 %)
Cancers thyroïdiens différenciés	0 sur 11 (0 %)	0 sur 11 (0 %)
Cancers rénaux	0 sur 14 (0 %)	0 sur 14 (0 %)
Lymphomes non-Hodgkiniens	0 sur 22 (0 %)	0 sur 22 (0 %)

Tableau 5 - Incidence des récepteurs CCK dans 406 tumeurs humaines, traduit de [100]

C.2.2.2. Récepteurs RCCK1 et RCCK2

Les deux types de récepteurs n'ont pas la même affinité de fixation avec les différents peptides. RCCK1 possède une forte affinité avec les ligands CCK sulfatés 500 à 1000 fois plus importante qu'avec la gastrine ou les ligands CCK non-sulfatés [100,113]. RCCK2 quant à lui possède une forte affinité pour les composés de la gastrine et de la cholécystokinine, notamment dans leur forme sulfatée. Les dérivés CCK ayant la séquence de 5 acides aminés C-terminaux en commun (Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) possèdent une forte affinité pour ce récepteur mais ce critère n'est pas exclusif et l'agoniste CCK4 dans lequel la glycine est absente possède lui aussi une forte affinité avec RCCK2 (fig. 27). Il est de ce fait le plus petit peptide CCK activant ce récepteur [114].

Récepteur CCK₁ : activité relative et affinités de fixation

CCK-58 ≥ CCK-8>>> CCK-8 desulfate > gastrine-17, CCK-4

CCK-58 et CCK-8 fixent approximativement aux valeurs K_i de 0,6 à 1 nM, avec une désulfatation de CCK-8 menant à une réduction d'affinité d'un facteur 500, et gastrine et CCK-4 une réduction d'un facteur 1000 à 10000.

Récepteur CCK₂ : activité relative et affinités de fixation

CCK-8, CCK-58 ≥ gastrine-17, CCK-8 desulfate > CCK-4

CCK-8, CCK-58, gastrine, et CCK-8 desulfate fixent aux valeurs K_i de 0,3 à 1 nM, avec une perte d'affinité d'ordre 10 pour CCK-4.

Figure 27 - Relation structure-affinité des ligands naturels CCK et gastrine avec les récepteurs RCCK1 et RCCK2 traduit de [115]

C.2.2.3. Expression, structure et régulation du récepteur RCCK2

L'expression des récepteurs RCCK1 se fait en grande partie dans de nombreuses zones cérébrales (hypothalamus, cortex temporal, système olfactif, amygdales) et certains systèmes périphériques (vésicule biliaire, pancréas, muqueuse gastrique) [116]. Les récepteurs RCCK2 sont aussi présents dans le système nerveux central, notamment au niveau cérébral, mais aussi dans l'estomac, le pancréas, et le nerf vague [116].

Dans le cadre de ce travail, la cible d'intérêt est le récepteur RCCK2 (fig. 28). Ce récepteur possède 7 domaines transmembranaires distincts connectés par des boucles intracellulaires et extracellulaires. Les différences qui existent entre le RCCK1 et le RCCK2 se trouvent notamment sur ces boucles ainsi qu'en bout de chaîne sur les secteurs C-terminaux et N-terminaux.

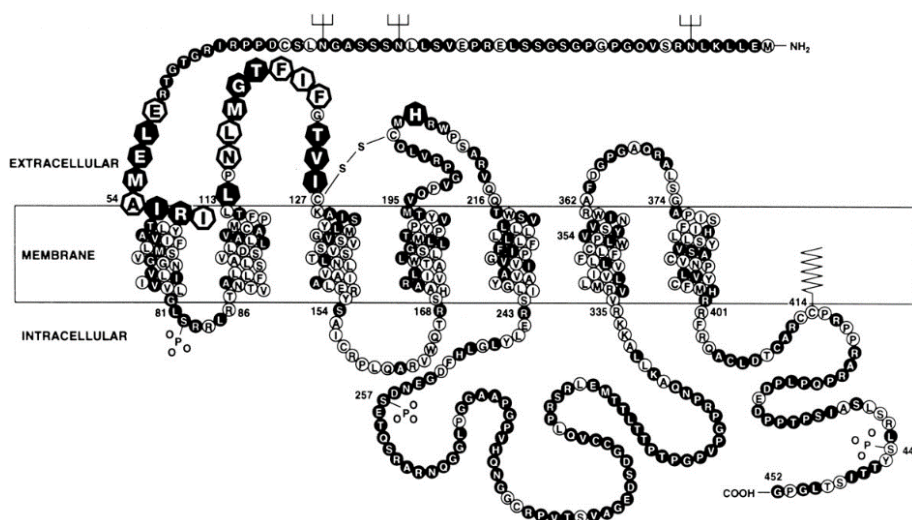


Figure 28 - Structure du récepteur RCCK2 chez le rat [117]

La régulation des récepteurs membranaires RCCK2 se fait en fonction de la stimulation de ce dernier. L'activation du site de réception par un analogue agoniste provoque une endocytose rapide du

récepteur vers les sous-compartiments cellulaires auprès desquels il va relarguer son contenu, c'est-à-dire l'analogue qui y est fixé (fig. 29). Une fois internalisé, le récepteur est majoritairement recyclé vers la membrane cellulaire ou dégradé par les lysosomes. A la suite de ce processus, de nouveaux récepteurs membranaires sont créés à la surface des cellules via l'appareil de Golgi [118].

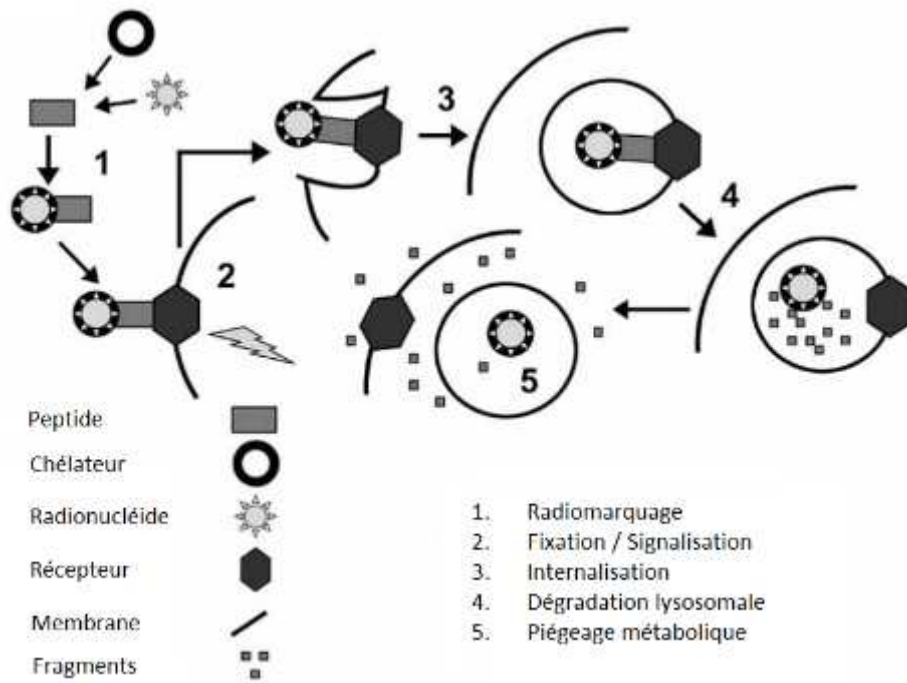


Figure 29 - Internalisation des peptides radiomarqués traduit de [119]

C.3. Augmentation de l'affinité pour le récepteur ciblé

C.3.1. Affinité du ciblage

En RIV, l'affinité du ciblage est définie comme le taux de fixation du radiopeptide sur les récepteurs ciblés lorsqu'ils entrent en contact [120]. L'affinité de liaison des ligands avec les récepteurs membranaires est estimée en imagerie scintigraphique [121] mais aussi à l'aide d'informations directement quantitative comme les constantes de dissociation K_d , K_i ou la concentration efficace EC_{50} [122]. Ces paramètres expriment les concentrations moléculaires nécessaires à l'activation des récepteurs membranaires afin d'obtenir par exemple une action d'internalisation du complexe.

En diagnostic, l'affinité conditionne l'efficacité de détection des affections. Ainsi, des études ont permis de mettre au point des protocoles diagnostiques utilisant les radioligands en comparant les affinités et spécificités pour la détection des tumeurs neuroendocrines [123,124].

C.3.2. Spécificité du ciblage

Les traitements de radiothérapie interne, qu'ils soient non-vectorisés, à base d'anticorps monoclonaux ou de peptides radiomarqués, ne sont pas administrés de manière localisée comme peut l'être la radioembolisation dans les traitements hépatiques par exemple. L'injection des radiopeptides se fait par voie veineuse et c'est la structure moléculaire caractéristique de la molécule qui va lui permettre de cibler les cellules tumorales au cours de son trajet dans la circulation sanguine. La spécificité du ciblage des radiopeptides se définit par leur capacité à se fixer exclusivement sur le récepteur ciblé et sur aucun autre.

La problématique d'adressage des peptides vers les cellules tumorales concerne surtout la partie "ligand" de la molécule, puisque c'est elle qui va, par le biais du site de réception, permettre l'internalisation.

Dans le cas des radiotraceurs, une faible spécificité de marquage entraîne une faible accumulation dans les cellules ciblées et une plus forte accumulation dans les autres tissus, ce qui rend l'imagerie diagnostique impossible, l'effet thérapeutique insuffisant et de potentiels effets indésirables. En définitive, la maîtrise de la biodistribution de l'agent thérapeutique est un des principaux critères de réussite du ciblage mais aussi un moyen de vérifier à la fois l'affinité et la spécificité (e.g. imagerie scintigraphie post-injection).

C.4. Accessibilité de la cible : choix des vecteurs

C.4.1. Ciblage tumoral du RCCK2

La prise en charge des tumeurs neuroendocrines tend à utiliser les techniques vectorisées grâce à leur fort développement au cours des dernières années. La forte expression des récepteurs RCCK2 dans les cancers médullaires de la thyroïde (CMT) et les cancers pulmonaires à petites cellules (CPPC) permet d'envisager une solution thérapeutique lorsque ces derniers développent des métastases, deviennent inopérables ou bien pour lesquels les seules possibilités de soin sont palliatives.

5 à 10 % des cancers thyroïdiens sont des CMT, qui se développent à partir des cellules C parafolliculaires responsables de la production de calcitonine (CT). Les tumeurs conservent ce rôle sécrétoire, ce qui permet aux équipes soignantes de diagnostiquer et de suivre leur évolution par dosage de ce marqueur biologique. Le diagnostic de CMT est confirmé lorsque les dosages basal et sous stimulation par la pentagastrine sont respectivement supérieurs ou égaux à 30 pg.mL⁻¹ et 200 pg.mL⁻¹, avec une sensibilité de 90 % et une spécificité de 80 % [125]. Avec le développement des analogues radiomarqués de la cholécystokinine/gastrine, une confirmation de ce diagnostic devient possible avec par exemple une scintigraphie à l'indium 111. Cet examen complémentaire possède l'avantage non-négligeable de localiser les atteintes tumorales, mais aussi de visualiser les métastases éventuelles dans le but d'adapter la prise en charge des patients. Les solutions de chimiothérapies existantes n'ont pas montré d'efficacité significative ni de bénéfice sur la survie des patients [126–128], à l'instar des traitements d'immunothérapie (anticorps inhibiteurs de la tyrosine kinase *sorafenib*, *cabozantinib*, *vandetanib*) dont les effets sont encourageant sans pourtant apporter de réelle avancée dans la prise en charge [129,130].

Lorsque les atteintes métastatiques sont peu nombreuses et localisées, elles sont traitées par radioembolisation (administration locale d'un agent irradiant), radiofréquence ou par chirurgie palliative [131–133]. Cependant, la survie à 10 ans pour ces cancers métastatiques atteint seulement 30 % des patients, bien moins que les taux de survie des autres formes de cancers thyroïdiens différenciés.

C'est dans ce contexte en manque de solutions thérapeutiques curatives, notamment pour les CMT et les CPPC qui n'expriment pas les récepteurs SST, que s'inscrit l'intérêt et le développement des analogues à la cholécystokinine. La synergie avec les traitements actuels de chimiothérapie et ceux précédemment cités pourrait mener à une réelle efficacité diagnostique et thérapeutique sur l'affection primitive et les potentielles métastases.

C.4.2. Dérivés de la cholécystokinine/gastrine

La cholécystokinine est issue du précurseur pré-procholécystokinine composé de 115 acides aminés. Les dérivés biologiquement actifs de la CCK sont nombreux : CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22, CCK-9, CCK-5, CCK-4, etc. [134]. Toutes ces formes de cholécystokinine possèdent la même structure d'acides aminés terminale *Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂* (*Trp-Met-Asp-Phe-NH₂* pour CCK-4).

En 2011, avec l'appui du groupement COST BM0607, plusieurs études publiées ont mis en avant une douzaine d'analogues ciblant le récepteurs RCCK2. Une étude d'*Aloj et al.* sur la fixation et l'internalisation des peptides montre une haute affinité avec le récepteur et des propriétés d'internalisation satisfaisantes pour tous les analogues expérimentés [84].

Ocak et al. expérimentent la stabilité et le métabolisme des composés. Les résultats montrent des stabilités différentes avec des demi-vies variant de $4,5 \pm 0,1$ heures à $198 \pm 0,1$ heures. Cette étude a permis de mettre en avant des sites de clivage sur tous les dérivés de minigastrine, situés entre les acides aminés Asp et Phe-NH₂ C-terminaux [83].

L'équipe de *Laverman* étudie *in vivo* la biodistribution des 12 analogues. 3 peptides sortent du lot, à savoir l'analogue de la minigastrine PP-F11 (DOTA-(⁶DGlu)₆-minigastrine), l'analogue bivalent MGD5 [135] et le peptide cyclique cyclo-MG1. Ces trois combinent une forte fixation tumorale et une faible rétention rénale [88].

C.4.2.1. Essais et optimisation de l'analogue CCK8

Parmi les nombreux analogues de la cholécystokinine, les équipes de *de Jong* et *Reubi* se sont en premier lieu intéressés au développement de radiopeptides CCK8 dans le cadre du groupement *EuroCOST*. Ainsi, en 1998, ils ont mis au point plusieurs analogues CCK8 non-sulfatés reliés aux chélateurs DOTA et DTPA et ont testé leur affinité dans des tumeurs humaines exprimant les récepteurs RCCK2. Deux composés ont montré les meilleurs résultats, à savoir le DTPA-[Nle^{28,31}]-CCK8 dénommé MP2286 et le DTPA-[²⁶DAsp²⁶,Nle^{28,31}]-CCK8 dénommé MP2288, avec une affinité IC₅₀ de 1,5 nM. A titre comparatif, les composés CCK8 C-terminaux ont une affinité supérieure à 100 nM, et le plus performant des analogues couplés au DOTA (DOTA-[²⁶DAsp²⁶,Nle^{28,31}]-CCK8 présente une IC₅₀ égale à 3,9 nM. Autre point positif, l'affinité de ces analogues avec le récepteur RCCK1 est faible. Les études *in vivo* sur les rats ont montré une clairance et une fixation majoritairement rénale, mais qui restent tout de même plus rapide et moins toxique que pour les dérivés gastriniques [121].

En 1999, *de Jong et al.* ont expérimenté *in vitro* et *in vivo* les capacités diagnostiques du [¹¹¹In-DOTA]-CCK8 versus ¹²⁵I-CCK10 et ¹²⁵I-gastrine sur lignée cellulaire pancréatique de rat CA20948. Des résultats préliminaires ont montré une internalisation spécifique du complexe [¹¹¹In-DOTA]-CCK8 sur la lignée de tumeur pancréatique de rat AR42J. Les essais *in vivo* sur des rats ont eux aussi montré une clairance plus rapide et une meilleure biodistribution pour les dérivés [¹¹¹In-DOTA]-CCK8 et [¹¹¹In-DTPA]-CCK8 (tableau 6) [136].

Tissu	Temps après administration du [¹¹¹ In-DOTA]-CCK8			Temps après administration du [¹¹¹ In-DTPA]-CCK8
	1 h	4 h	24 h	24 h
Sang	0,099 (0,010)	0,018 (0,002)	0,005 (0,001)	0,005 (0,001)
Rate	0,041 (0,004)	0,034 (0,004)	0,033 (0,003)	0,023 (0,003)
Pancréas	0,037 (0,002)	0,013 (0,001)	0,011 (0,000)	0,012 (0,000)
Surrénales	0,066 (0,016)	0,017 (0,002)	0,019 (0,000)	0,018 (0,000)
Reins	0,706 (0,110)	0,439 (0,061)	0,379 (0,050)	0,322 (0,030)
Foie	0,040 (0,011)	0,027 (0,004)	0,026 (0,006)	0,045 (0,007)
Estomac	0,060 (0,020)	0,044 (0,004)	0,028 (0,006)	0,035 (0,007)
Colon	0,041 (0,013)	0,013 (0,003)	0,037 (0,006)	0,010 (0,001)
Muscle	0,012 (0,001)	0,003 (0,000)	0,003 (0,000)	0,003 (0,000)
Fémur	0,035 (0,002)	0,014 (0,001)	0,012 (0,001)	0,012 (0,001)
Hypophyse	0,012 (0,002)	0,004 (0,001)	0,003 (0,000)	-
Tumeur	0,160 (0,021)	0,130 (0,020)	0,082 (0,011)	0,094 (0,020)

La fixation de radioactivité est exprimée en pourcentage de dose injectée (%ID/g), n ≥ 4

Tableau 6 - Biodistribution des analogues CCK8 pour les organes et tumeurs CA20948 de rats traduit de [136]

Une étude clinique a été réalisée en 2000 par *Kwekkeboom et al.* sur 7 patients présentant un CMT. Une scintigraphie au [¹¹¹In-DTPA]-CCK8 a permis la détection de quelques lésions chez deux patients, sans pour autant les visualiser toutes. 48 heures après l'injection, la radioactivité dans la tumeur est toujours visible malgré une faible fixation dans la tumeur et l'estomac (exprimant fortement le RCCK2). Des produits de dégradation du peptide sont présents dans le sérum et l'urine 1 heure après l'injection. Ces résultats prouvent dès lors la nécessité d'optimiser à la fois la fixation et la stabilité de cet analogue CCK8 pour en améliorer la sensibilité et la spécificité de détection scintigraphique [137].

En 2002, l'équipe d'*Aloj* a expérimenté une modification de l'analogue DTPA-CCK8 en y ajoutant un bras espaceur de glycine (DTPA-Glu-G-CCK8) et un espaceur cystéine-glycine-diphenylphosphinopropionyl (PhosGC-CCK8) pour respectivement marquer du ¹¹¹In et du ^{99m}Tc. Les deux composés ont montré des affinités pour le RCCK2 similaires ($K_d = 20-40$ nM), une internalisation après interaction avec le récepteur et des temps de rétention intracellulaire élevés. Le dérivé ¹¹¹In-

DTPAGlu-G-CCK8 a montré un meilleur ratio de fixation cible-tissus, mais une élimination rapide à travers les reins. Le dérivé technétié, plus stable mais éliminé par voie hépatobiliaire, entraîne un bruit de fond élevé dans l'intestin [138].

D'autres études ont expérimenté l'imagerie scintigraphique des récepteurs RCCK2 avec des analogues CCK8 radiomarqués au ^{99m}Tc sans pour autant parvenir à un résultat concluant [139,140].

C.4.2.2. Analogue CCK4

Comme nous venons de le voir, le développement des analogues de la cholécystokinine est en pleine évolution, et plusieurs stratégies sont mises en place par les équipes de recherche. C'est dans ce contexte de que notre équipe a décidé à partir de 2007 de développer un analogue CCK novateur, à partir du dérivé CCK4. Comme vu précédemment, les études *in vivo* utilisant les dérivés gastriniques montrent une forte fixation tumorale, mais aussi une néphrotoxicité élevée, limitant le potentiel thérapeutique des dérivés. Parallèlement, les analogues CCK8 possèdent une fixation rénale plus faible que la gastrine, mais une fixation tumorale aussi plus faible. Le CCK4 quant à lui est le plus petit analogue possédant à la fois une sélectivité et une forte affinité (de l'ordre du nanomolaire) pour le récepteur RCCK2 [141]. Cette petite taille permet notamment de diminuer le risque de dégradation du peptide dans l'organisme.

A l'inverse des études citées auparavant qui ont en majorité modifié pas à pas les différents dérivés CCK/gastrine pour leur conférer de meilleures propriétés d'internalisation, de stabilité ou de toxicité supérieure (méthode dite de "*screening*"), l'analogue CCK4 présenté ici a été développé *in silico*, c'est-à-dire après modélisation numérique de la structure du récepteur peptidique (fig. 30) [142,143]. En effet, les précédentes études notamment réalisées par *Silvente-Poirot et al.* sur la structure du RCCK2 a apporté les connaissances et le modèle nécessaire à la réalisation d'un unique analogue original CCK4 [117,144]. Jusque-là, ce dérivé n'avait jamais été étudié dans un cadre d'imagerie ou de thérapie métabolique.

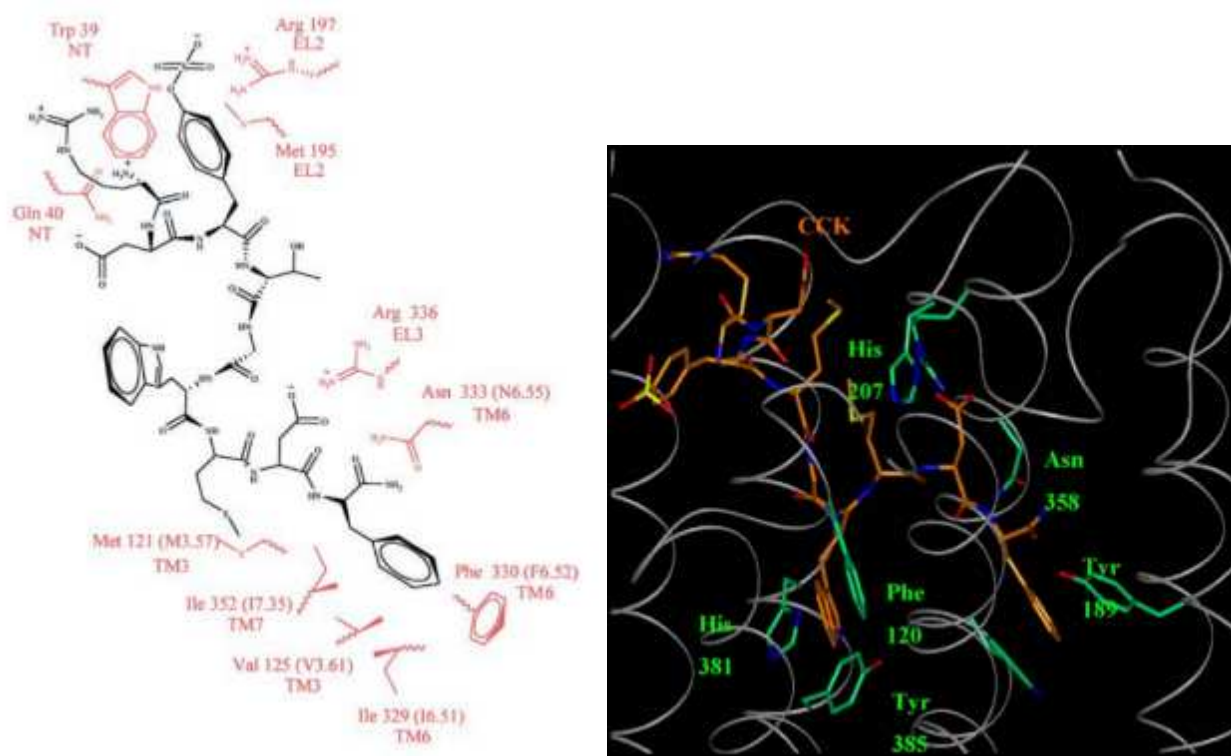


Figure 30 – A gauche : modèle bi-dimensionnel du site de réception du RCCK2 (en rouge) liant l'analogue CCK9 (en noir)
A droite : modèle tri-dimensionnel du RCCK2 [143,145]

En 2007, Brillouet S et al. ont évalué précliniquement plusieurs radioligands analogues CCK sur un modèle de cancer médullaire de la thyroïde (CMT-TT) et une lignée de fibroblastes exprimant une mutant tumorigénique du récepteur RCCK2 actif (NIH-3T3-E151A-RCCK2), xénotransplantés chez la souris *nude*. Ce type de souris possède un système immunitaire diminué permettant la prise de greffe de lignées tumorales. Les deux ligands testés sont le [^{111}In -CHX-A''-DTPA]-CCK8 noté ^{111}In -DTPA-CCK8, et le [^{111}In -CHX-A''-DTPA]-(Ahx) $_2$ -CCK4 noté ^{111}In -DTPA-CCK-derivative (fig. 31) [146]. Élément d'optimisation supplémentaire, l'ajout d'un bras espaceur -(Ahx) $_2$ - (Ahx : 6-aminohexanoic acid) à la structure du ligand permet d'éloigner la partie CCK4 du groupement chélateur-radionucléide pour que ce dernier ne déforme pas le site de liaison du RCCK2 lors de sa fixation. Les conditions du radiomarquage pour cette étude sont similaires à celles utilisées pour l'*Octreoscan*[®] afin d'obtenir une pureté radiochimique (PRC) supérieure ou égale à 95 %, seul médicament radiopharmaceutique commercialisé et utilisé dans le centre.

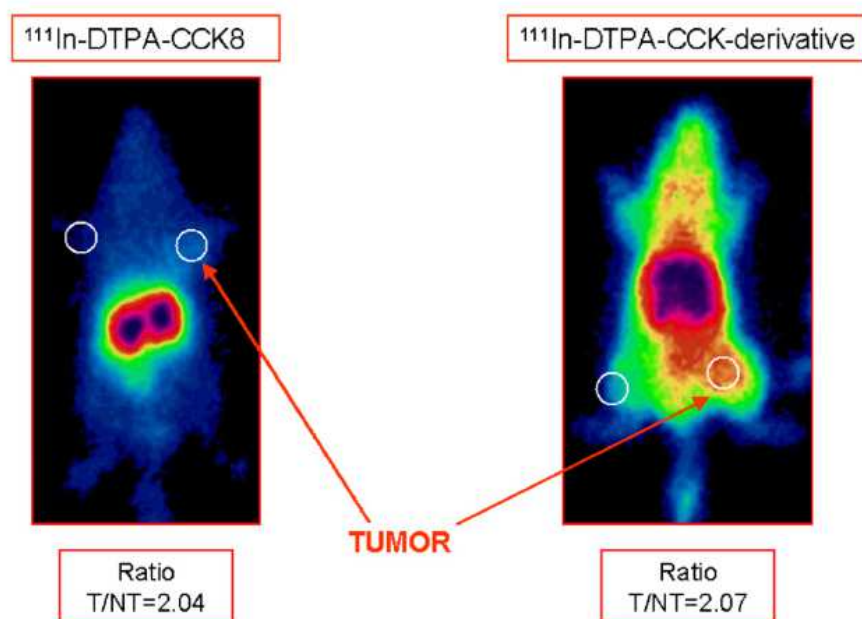


Figure 31 - Scintigraphie de souris xéno-greffée CMT-TT 24 heures après injection [146]

Le dosage des IP3, les inositols triphosphates mis au point dans l'équipe a permis de caractériser la forte affinité des ligands CCK4 mis au point avec le RCCK2, similaire à la référence CCK8 et à la gastrine. La complexation avec l'indium 111 augmente la valeur d' EC_{50} , tout en restant de l'ordre du nanomolaire.

	Ligands		non-complexés		complexés		
	Gastrine	CHX-A"-DTPA-CCK8	CHX-A"-DTPA-CCK4	CHX-A"-DTPA-(Ahx) ₂ -CCK4	¹¹¹ In-CHX-A"-DTPA-CCK8	¹¹¹ In-CHX-A"-DTPA-CCK4	¹¹¹ In-CHX-A"-DTPA-(Ahx) ₂ -CCK4
EC_{50} (nM)	0,407 ± 0,09	0,430 ± 0,37	0,496 ± 0,10	0,455 ± 0,20	1,136 ± 0,67	1,095 ± 0,68	1,010 ± 0,18
E_{max} (%)	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 7 - Dosage des inositols triphosphates des ligands non-marqués et marqués au ¹¹¹In [147]

Ces travaux ont permis, via l'évaluation du dérivé CCK4, de confirmer les conditions de radiomarquage de ces analogues marqués à l'indium 111, mais aussi de montrer qu'à l'aide de la modélisation moléculaire effectuée en amont, l'efficacité de ciblage du RCCK2 en imagerie est améliorée par l'utilisation de ce dérivé. La mise au point de l'imagerie *in vivo* sur le petit animal est établie, prouvant que la fixation tumorale élevée et la biodistribution satisfaisante sont propices à une utilisation diagnostique et thérapeutique et poussent l'équipe à poursuivre le développement de ce radioligand.

Suite à ces travaux, un nouveau radioligand CCK4 est expérimenté *in vitro* et *in vivo* en 2010 par l'équipe, le ¹¹¹In-BPCA-(Ahx)₂-CCK4. Le chélateur original BPCA a été synthétisé à partir de

groupements amino-carboxylates et d'un chromophore bipyridine modifié afin de complexer plusieurs métaux dont le ^{111}In , le ^{86}Y (imagerie TEP), le ^{90}Y (RIV), le Gd (IRM) et des lanthanides de fluorescence (europium ou terbium). La modélisation moléculaire a été une nouvelle fois utilisée pour caractériser l'encombrement stérique de l'analogue sur le RCCK2 (fig. 32).

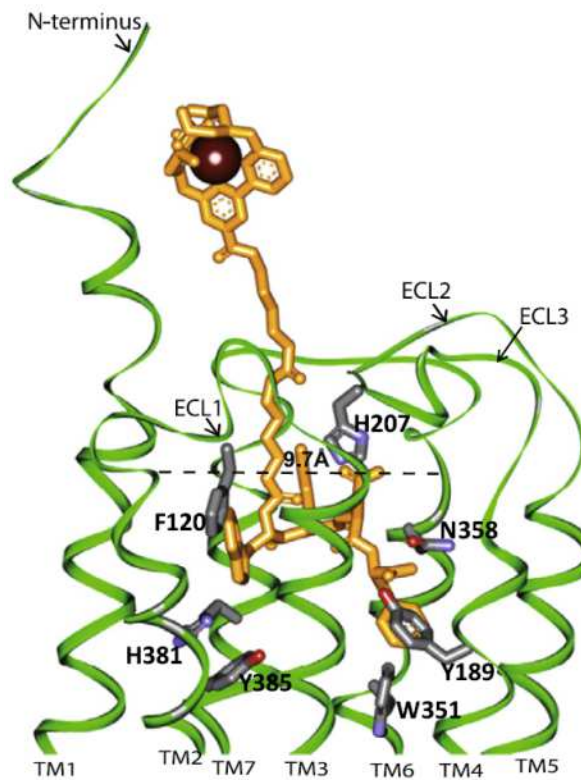


Figure 32 - Vue tridimensionnelle du complexe ^{111}In -BPCA-(Ahx) $_2$ -CCK4-RCCK2 [89]

Les résultats de biodistribution sur les souris xéno greffées (lignée NIH-3T3-E151A) obtenus avec ce nouveau ligand sont présentés sur la figure 38.

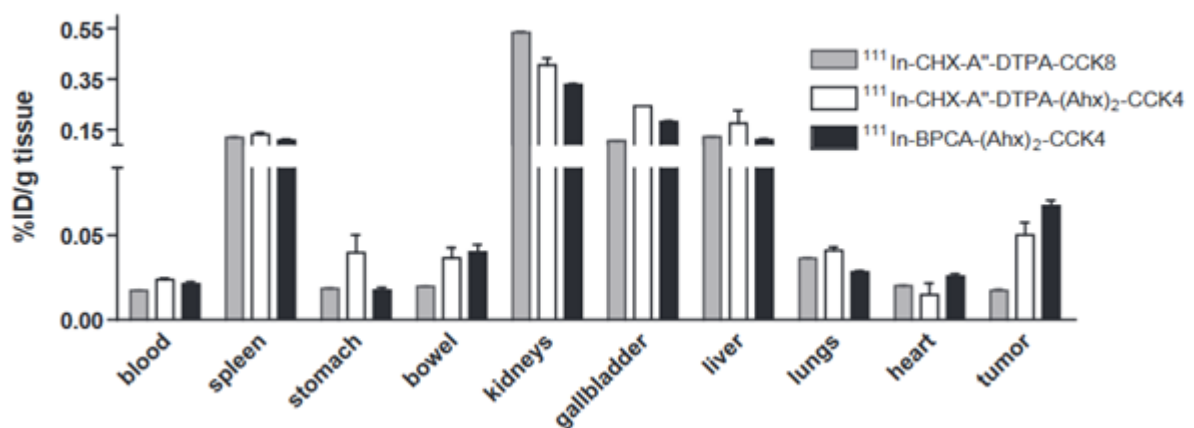


Figure 33 - Biodistribution des conjugués CCK expérimentés sur souris xéno greffées NIH-3T3-E151A (n=6) [89]

La fixation tumorale avec le complexe "BPCA-CCK4" est supérieure à celle des deux complexes "DTPA-CCK8" et "DPTA-CCK4" testés. De plus, la rétention rénale est aussi plus faible. Ce résultat est confirmé par l'imagerie scintigraphique à 24 heures, et qui montre un plus fort ratio de fixation tumeur/muscle pour le ligand $^{111}\text{In-BPCA-(Ahx)}_2\text{-CCK4}$ (fig. 34).

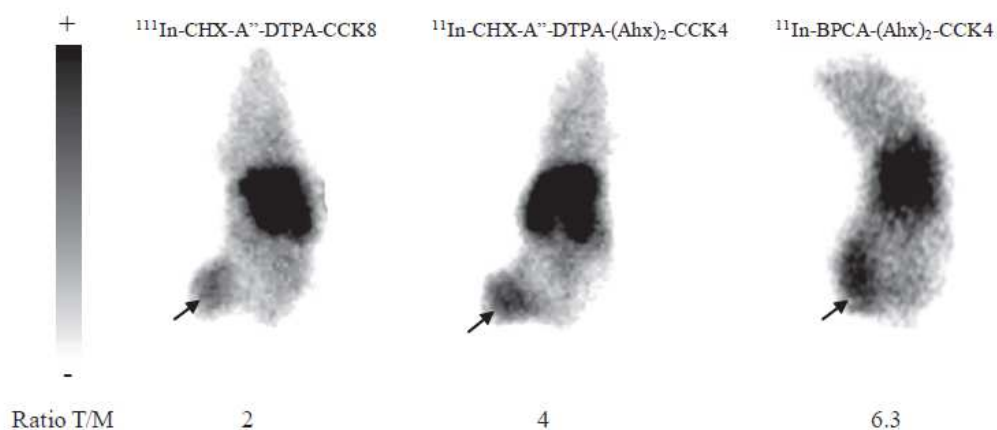


Figure 34 - Scintigraphie à 24 heures post-injection pour 3 ligands sur souris xénotransplantées NIH-3T3-E151A [89]

En outre, l'utilisation du chélateur BPCA permet une complexation rapide (15 minutes) à température ambiante, avec une stabilité du radioligand supérieure à 24 heures et un phénomène de transchélation par les protéines du plasma diminué vis-à-vis du DTPA. La captation tumorale et le ratio tumeur/muscle du $^{111}\text{In-BPCA-(Ahx)}_2\text{-CCK4}$ sont 3 à 4 fois supérieurs à ceux du ligand CCK8 de référence. La fixation rénale mesurée est inférieure à 0,5 %ID/g, ce qui mène à un ratio tumeur/rein 7 fois plus élevé que celui du $^{111}\text{In-CHX-A''-DTPA-CCK8}$.

En définitive, les études d'optimisation réalisées depuis plusieurs années ont mené notre équipe à synthétiser un ligand présentant des propriétés améliorées qui en font un candidat de choix pour la radiothérapie interne vectorisée.

C.5. Diminution de la fixation non-spécifique

La dose de rayonnements absorbée par les tissus sains, due à la fixation des vecteurs radioactifs dans les cellules non-tumorales, est un des phénomènes limitants l'efficacité des traitements. Lors de l'injection d'anticorps radiomarqués, ces derniers ne sont pas strictement spécifiques de la tumeur. Un prétraitement du patient avec une dose d'anticorps "froids", c'est-à-dire non-radioactifs, de même

spécificité, permet de saturer en partie les sites antigéniques présents dans les tissus sains, notamment le foie, tout en préservant un effet antitumoral sur les cellules cancéreuses surexprimant l'antigène ciblé [148].

Dans le cadre des traitements de thérapie peptidique, l'administration en prétraitement d'acides aminés positivement chargés tels que la *L-lysine* et la *L-arginine* a permis d'inhiber l'accumulation rénale chez l'animal et chez l'Homme, en concurrençant directement la fixation aux sites négativement chargés à la surface des cellules épithéliales des tubules proximaux [149–151], et est devenue un standard de protection rénale. D'autres molécules, comme l'*amifostine* ou l'*α-microglobuline*, se fixent sur ces sites de réabsorption et permettent de limiter les dégâts radiologiques aux reins lors de traitements par analogues de somatostatine radiomarqué [152].

C.6. Augmentation de l'efficacité radiobiologique

Enfin, le troisième volet d'optimisation de la RIV passe par le renforcement de son potentiel de destruction tumorale, c'est-à-dire l'efficacité radiobiologique. L'adéquation du rayonnement ionisant, selon la nature du radionucléide ainsi que les potentiels traitements concomitants sont deux paramètres sur lesquels cette optimisation est réalisable.

C.6.1. Choix des radionucléides

La taille des tumeurs neuroendocrines est un facteur variable auquel il est nécessaire d'adapter la stratégie de traitement vis-à-vis de l'énergie du rayonnement β^- . Outre l'irradiation de ces tumeurs, un des intérêts de la vectorisation de l'irradiation réside dans le traitement des métastases de petite taille disséminées dans le patient. Les deux radionucléides couramment employés en PRRT, à savoir le ^{90}Y et le ^{177}Lu déposent leur énergie plus ou moins localement, et ne sont donc pas adaptés aux mêmes types de tumeurs (tableau 8).

^{111}In	^{90}Y	^{177}Lu
-------------------	-----------------	-------------------

Méthode de production	Cyclotron	Générateur	Réacteur
	(p, 2n)		(p)
Cible	^{112}Cd	^{90}Sr	^{176}Lu
Produit de désintégration	^{111}Cd	^{90}Zr	^{177}Hf
<i>Constantes physiques</i>			
$t_{1/2}$ (jours)	2,83	2,71	6,65
Emission particulaire utile	γ	β^-	β^- / γ
Energie des particules	$E_{\gamma 1} = 171 \text{ keV (90 \%)}$ $E_{\gamma 2} = 245 \text{ keV (94 \%)}$	$E_{\beta \text{max}} = 2280 \text{ keV}$ $E_{\beta \text{moy}} = 933 \text{ keV}$	$E_{\beta \text{max}} = 497 \text{ keV}$ $E_{\beta \text{moy}} = 133 \text{ keV}$ $E_{\gamma 1} = 113 \text{ keV (6,4 \%)}$ $E_{\gamma 2} = 208 \text{ keV (11 \%)}$
Parcours maximal dans les tissus (mm)	-	12,0	2,1

Tableau 8 - Caractéristiques physiques des nucléides considérés, d'après [87,153]

Les traitements au ^{111}In (émetteur γ et d'électrons Auger) existent, mais ils ne présentent pas le potentiel thérapeutique des traitements au ^{90}Y et ^{177}Lu et ne seront pas décrits par la suite [154].

Diamètre de sphère (mm)	Energie absorbée (%)	
	^{90}Y	^{177}Lu
50	95	100
30	91	99,6
10	66	97
5	41	93
3	26	88
1	9	67
0,1	1	15

Tableau 9 - Energie absorbée des particules β du ^{90}Y et ^{177}Lu dans des sphères, d'après [155]

Synergie des rayonnements

Récemment, une étude de *de Jong M et al.* a permis de comparer l'efficacité d'un traitement synergistique sur modèle animal, en utilisant une combinaison de [^{90}Y -DOTA]-TOC et [^{177}Lu -DOTA]-TATE versus le traitement de [^{90}Y -DOTA]-TOC seul. Les auteurs concluent sur une efficacité supérieure du point de vue de la survie médiane (>150 jours avec $^{90}\text{Y} + ^{177}\text{Lu}$ versus 75 jours avec ^{90}Y ou ^{177}Lu), mais aussi sur une survie globale plus importante pour tous les traitements lorsque les doses sont administrées en deux injections éloignées d'une semaine, avec toujours une meilleure efficacité pour le traitement synergistique [87]. Les deux radionucléides conviennent pour les traitements de PRRT,

mais ils diffèrent par leur effet sur différentes tailles de tumeurs. Ainsi, le rayonnement de ^{90}Y avec un parcours maximal de 12 mm est optimalement efficace sur des tumeurs de 34 mm, et le ^{177}Lu sur des tumeurs de 2 mm pour un parcours maximal de 2,1 mm (fig. 35) [156]. De ce fait, l'utilisation de ^{90}Y sur des tumeurs de petite taille peut entraîner une forte irradiation des tissus sains environnants, et donc une potentielle toxicité. A l'inverse, l'emploi exclusif de ^{177}Lu est moins toxique pour les tissus sains, mais la capacité de stérilisation des tumeurs décroît rapidement avec l'augmentation de la taille et le développement de cellules tumorales clonogéniques.

Une étude clinique sur une cohorte de 486 patients présentant des cancers neuroendocrines métastatiques a été réalisée par *Villard L et al.* en 2012. Une combinaison de [^{90}Y -DOTA]-TOC et de [^{177}Lu -DOTA]-TOC administrée en moyenne en 3,7 fois a permis une survie supérieure en comparaison avec un traitement de [^{90}Y -DOTA]-TOC administré en 3,9 fois, tout en conservant une toxicité rénale identique [157]. Malgré l'ajout de ^{177}Lu au traitement de ^{90}Y , le vecteur DOTA-TOC employé s'accumule dans les tubules proximaux et le plus faible parcours des particules β^- associées ne leur permet pas d'atteindre des glomérules radiosensibles du cortex rénal [158].

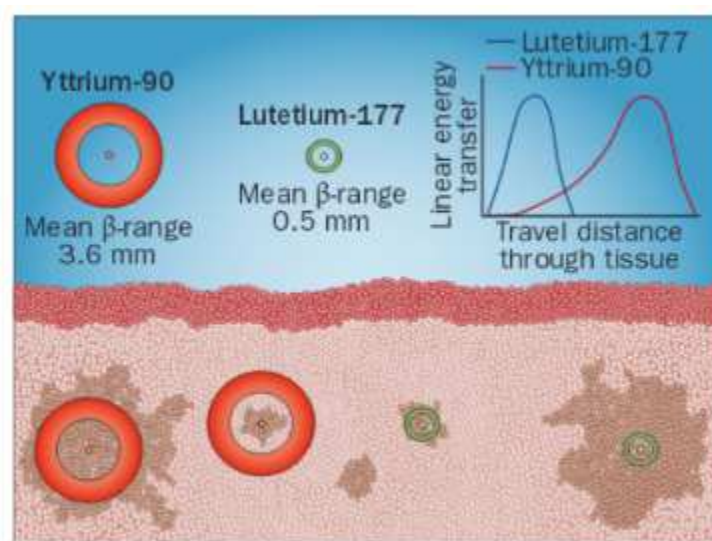


Figure 35 - Parcours des émissions β^- des isotopes ^{90}Y et ^{177}Lu dans les tissus, d'après [159]

Comme vu précédemment, l'optimisation des analogues radiomarqués – notamment du dérivé CCK4 développé dans l'équipe – passe aussi par la complexation de nouveaux nucléides dédiés à la thérapie, tels que l'yttrium 90 et le lutétium 177. Aussi, une partie du travail présenté en seconde partie du manuscrit consistera en l'étude de radiomarquage de ces nucléides par différents complexes chélateur-CCK4 à disposition dans le but d'adapter les futurs traitements à un grand nombre d'affections tumorales.

C.6.2. Association thérapeutique

De nombreux traitements font aujourd'hui intervenir des solutions concomitantes de "radiochimiothérapie". Cette association permet de renforcer l'action antitumorale synergique de chacun des traitements de chimiothérapie et de radiothérapie, et parfois de curiethérapie. Le but recherché est multiple : augmentation des lésions à l'ADN, blocage des phénomènes de réparation, ou encore augmentation du taux d'expression de la cible.

La radiochimiothérapie est évaluée dans plusieurs types de cancers, comme le cancer du col de l'utérus (*cisplatine* + curiethérapie) (fig. 36), le cancer de l'œsophage, ou encore l'astrocytome anaplasique et le glioblastome (*temodal* + radiothérapie externe).



Figure 36 - Protocole de radiochimiothérapie concomitante utilisée dans le cancer du col de l'utérus (INCa – 2016)

C.6.2.1. Exemple du mIBG / Topotecan

Dans le traitement de certains neuroblastomes, l'utilisation conjointe de *mIBG* et de *topotecan* (inhibiteur de l'ADN topoisomérase) améliore la survie des patients, versus les composés administrés seuls. En plus de l'effet toxique du *topotecan*, des études montrent qu'il induit une augmentation de la fixation du *mIBG*, et donc de la dose absorbée par la tumeur [160,161].

D'autres associations n'ont pas l'effet escompté, comme l'ont notamment montré *Courbon et al.* sur le co-traitement par l'iode 131 et l'acide rétinoïque des carcinomes thyroïdiens métastatiques agressifs [162].

C.6.2.2. Radiopeptide thérapie / DDA

C.6.2.2.1. Dendrogénine A

La dendrogénine A (DDA) est un métabolite du cholestérol, découvert dans l'équipe dans différents tissus chez les mammifères, incluant l'Homme [163]. Sa production est diminuée dans les cellules tumorales ou les tumeurs du sein comparé au tissu normal adjacent (fig. 37). Outre sa toxicité sur les cellules tumorales, ses propriétés de re-différenciation en cellules fonctionnelles à faibles doses ont été montrées *in vitro* et *in vivo* dans certains modèles de cancer [163,166] (fig. 38).

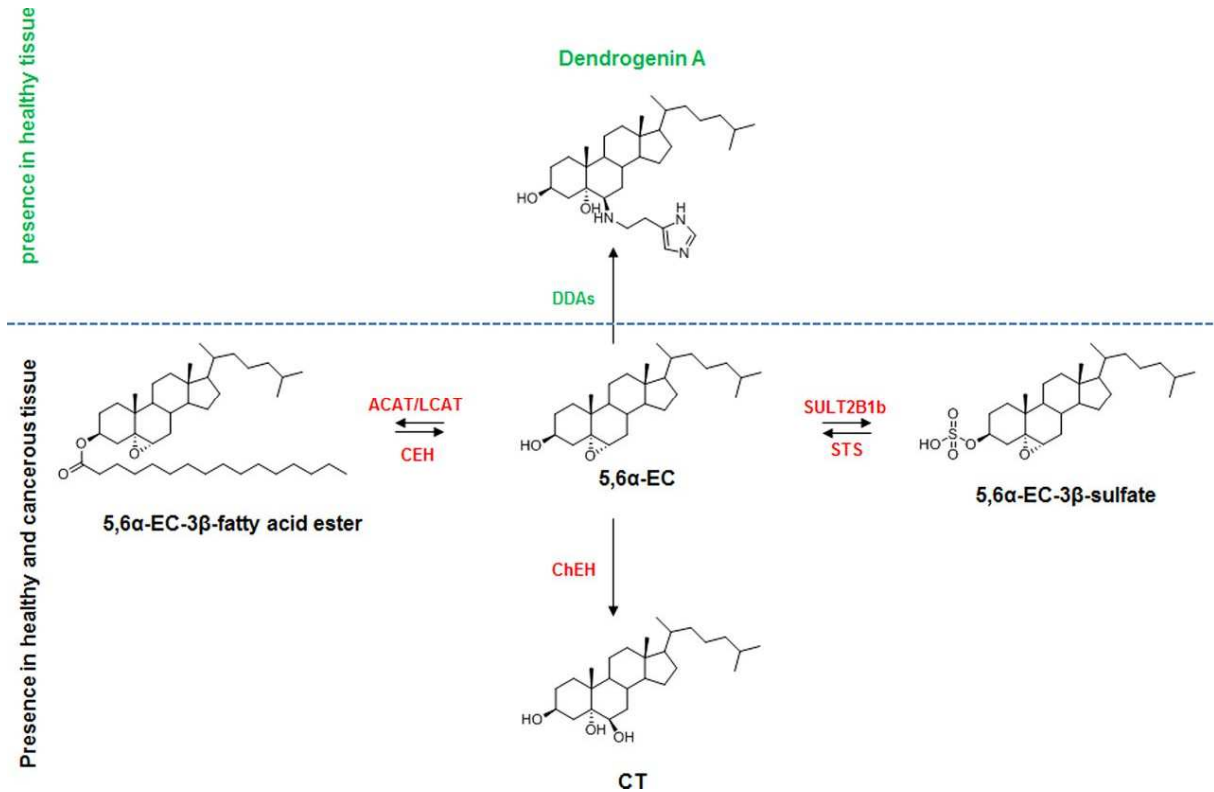


Figure 37 - Métabolisme du 5,6α-EC dans les tissus sains et tumoraux [167]

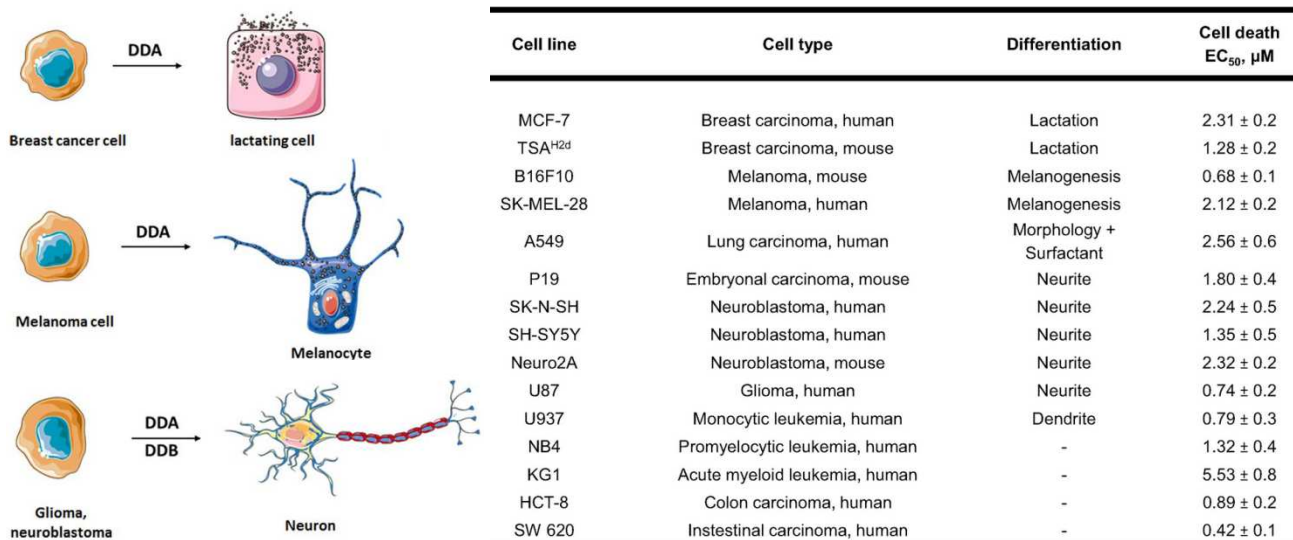


Figure 38 - Effet de la DDA sur cellules tumorales [163,167]

Les propriétés biologiques de la DDA, dont l'expression diminue dans les cellules tumorales, suggèrent une fonction physiologique de maintien de l'intégrité et de la différenciation cellulaire. En parallèle, de nombreuses études décrivent le rôle de la voie de signalisation *Notch* dans la différenciation des cellules tumorales myéloïdes [168] ou les cellules-T, notamment du thymus (thymocytes) [169].

Ainsi, une partie de ces travaux de thèse présentée plus en détail par la suite a consisté en l'évaluation des effets potentiels de la DDA sur la voie de signalisation *Notch* pour les lignées CMT-TT et NIH-3T3-E151A exprimant le RCCK2, dans le but de proposer une association RIV / dendrogénine A.

C.6.2.2.2. Voies de signalisation *Notch* dans les CMT

De nombreuses études ont été réalisées sur le rôle de la voie de signalisation *Notch* en cancérologie. Selon les lignées de cancers étudiées, un rôle oncogène ou suppresseur de tumeur est associé à l'activité de la voie *Notch* (fig. 39) [170,171]. Au sein d'un même organe, l'atteinte tumorale et son lien avec l'activité *Notch* varie : dans 3 types de tumeurs pulmonaires sur 4, le rôle de cette voie de signalisation est promoteur de tumeur, mis à part pour les cancers pulmonaires à petites cellules (CPPC). En effet dans ce type de cancer, qui exprime le RCCK2 à 57 % [100], la surexpression de *NOTCH1* ou *NOTCH2* conduit à un arrêt de la pousse tumorale [172].

Tumour type	Oncogenic	Tumour suppressor	Tumour progression	Tumour maintenance	Drug resistance
Breast	✓	✓	✓	✓	✓
Colorectal	✓		✓		✓
Prostate		✓	✓		
Liver		✓	✓		✓
Pancreatic	✓		✓		✓
Glioblastoma		✓	✓	✓	✓
Cervical	✓		✓		✓
Oral SCC	✓	✓			
Skin		✓			
Head and neck					✓
Medulloblastoma			✓	✓	
Melanoma			✓	✓	
Lung	✓	✓	✓		

Figure 39 - Rôles multiples de la signalisation Notch dans les tumeurs solides [170]

Le récepteur transmembranaire *Notch* se décline, chez l'Homme, en 4 sous-types de *Notch-1* à *Notch-4*.

La cascade de signalisation de la voie *Notch* est complexe, et l'effet protumoral ou antitumoral est un équilibre entre plusieurs phénomènes et interactions autour de cette voie. Le clivage du NICD (*Notch intra-cellular domain*) initie une cascade qui interagit à plusieurs niveaux avec des voies de signalisation parallèles (fig. 40) :

- *Notch* régule négativement l'expression de *PTEN* via l'induction de *HES1*, menant à l'activation de la voie pro-survie *PI3K-ATK* (effet protumoral)
- l'activation des récepteurs de tyrosine kinase *RTK* induit l'expression de facteurs de croissance *EGFR* et *PDGFR* qui conduisent à l'activation de gènes de prolifération cellulaire (effet protumoral)
- l'inhibition des ligands *WNT* à travers l'induction d'*HES1* entrave de ce fait les effets tumorigéniques de la voie *WNT* (effet antitumoral)
- le gène *JAG1* est transcrit par l'activation de la voie *TGFβ* (*transforming growth factor-β*) et la protéine associée va activer la voie *Notch* d'une cellule adjacente. Les deux voies activées induisent la production de l'inhibiteur *p21* permettant l'arrêt du cycle cellulaire (effet antitumoral) [170].

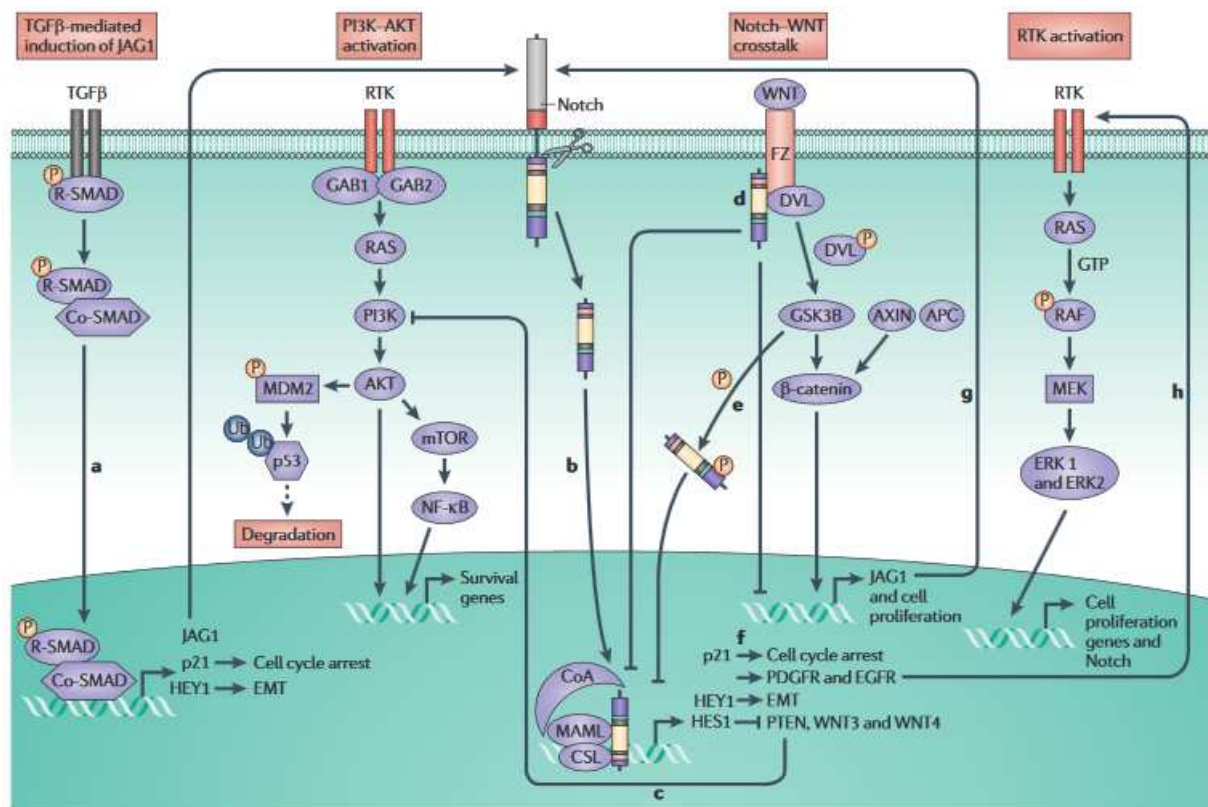


Figure 40 - Phénomènes oncogéniques ou supresseurs de tumeurs de la voie Notch [170]

Récemment, plusieurs études ont aussi mis en avant l'effet suppresseur de tumeur de l'activation de *Notch* dans les CMT. La voie de signalisation *Notch1* est absente dans ce type de cancer, et son activation a montré une diminution *in vitro* de la pousse et des marqueurs tumoraux *ASCL1* (*achaete-scute complex-like 1*) et *CgA* (*chromogranine A*) [173].

En 2011, *Jaskula-Sztul R et al.* ont étudié l'effet de l'activation *in vivo* de *Notch1* sur une lignée de CMT-TT inducible par traitement à la doxycycline. Afin d'identifier l'activité *Notch1* suite à ce traitement et de confirmer les résultats obtenus précédemment, une expérience de Western Blot a été réalisée *in vitro*, qui montre une expression endogène des marqueurs tumoraux pour l'échantillon contrôle, et une diminution avec effet-dose de ces mêmes marqueurs pour les échantillons traités (fig. 41) : une dose de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ augmente fortement l'expression de *NICD1* et diminue très fortement l'expression *ASCL1* et *CgA* [174].

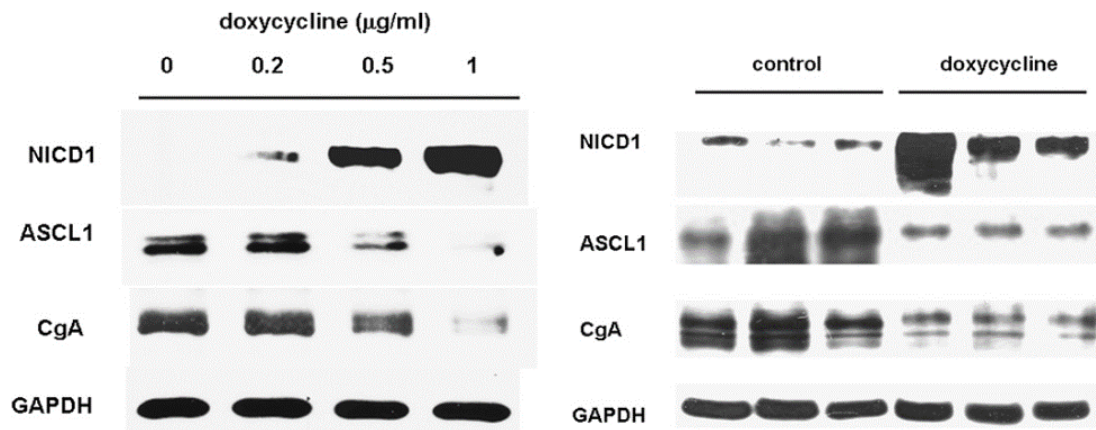


Figure 41 - Réduction des marqueurs tumoraux par activation de Notch1 (NICD1) sur cellules CMT-TT in vitro (à gauche) et in vivo (à droite) [174]

Le suivi de la taille tumorale sur les souris xéno greffées CMT-TT *Notch1*-inductible et traitées à la doxycycline montre une forte diminution de la pousse (fig. 42) ainsi qu'une réduction de la masse tumorale d'environ 57 % ($p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle à 28 jours de traitement, corrélé avec les niveaux d'expression des ARN messagers de *ASCL1* (fig. 43).

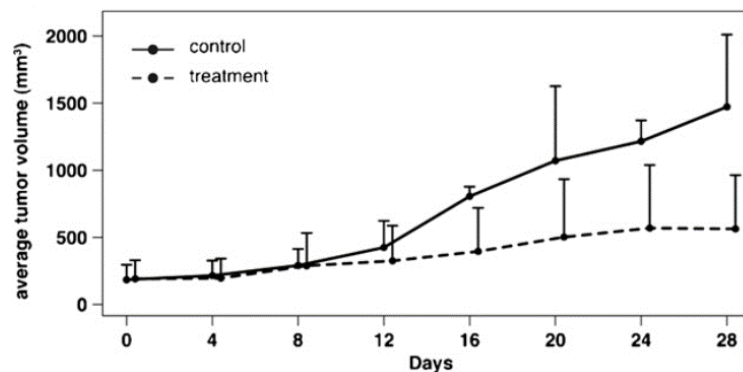


Figure 42 - Suivi de pousse tumorale de CMT-TT chez la souris avec ou sans activité Notch1 [174]

Une fois la voie *Notch1* activée, la protéine *Notch1* se lie au complexe *CBF-1* et régule positivement l'expression de *HES-1*, qui à son tour se lie au promoteur de *ASCL1* et régule négativement l'ARN messager de *ASCL1* [175]. De plus, *Notch1* peut se lier directement à la protéine *ASCL1* et induire une dégradation rapide de cette dernière indépendamment de *HES-1* [176].

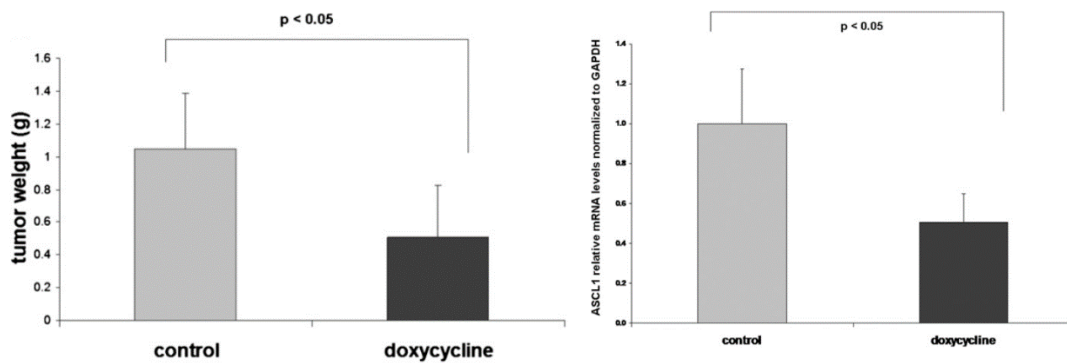


Figure 43 - Taille tumorale (à gauche) et expression ASCL1 (à droite) avec et sans induction Notch1 [174]

Cette étude montre l'intérêt de la voie *Notch1* dans la prise en charge et le traitement optimisés des CMT dont les affections métastatiques agressives touchant le foie, les poumons, les os et le médiastin sont source de nombreuses rechutes [177,178].

En 2013, *Tesfazgui S et al.* ont étudié les effets d'un autre composé, la thiocoraline. Les résultats mettent en évidence un effet direct du traitement sur l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁, et la réduction des marqueurs tumoraux vus précédemment, en activant les récepteurs *Notch1* et *Notch2* (fig. 44) [179]. En parallèle, l'augmentation de l'expression de *p21* et *p27* dont l'effet suppresseur de la pousse tumorale a été démontré [180], ainsi que la diminution de l'expression des cyclines B1 et D1 semblent confirmer l'arrêt cellulaire comme mécanisme d'inhibition de la pousse tumorale.

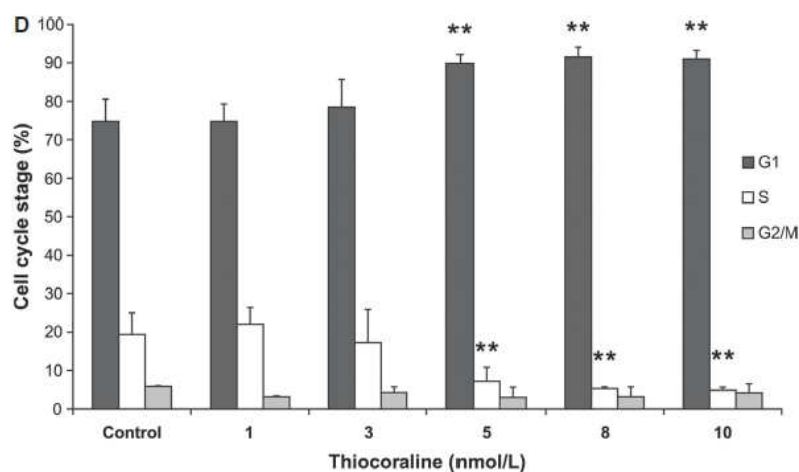


Figure 44 - Effet du traitement de thiocoraline sur le cycle cellulaire des lignées CMT-TT [179]

Parmi les autres études de cette même équipe, *Jaskula-Sztul R et al.* se sont intéressés au rôle du récepteur *Notch3*, dans les CMT (lignées TT et MZ-CRC-1). Le traitement évalué est un composé *AB3*, inhibiteur de HDAC (*histone deacetylase*) de classe 1, qui induit spécialement la voie *Notch3* [181]. Des résultats similaires à ceux présentés ci-dessus sont retrouvés *in vitro* et *in vivo* avec l'activation de

Notch3, à savoir une diminution de la pousse tumorale et une réduction de l'expression des marqueurs tumoraux (*ASCL1*, *CGA*, *SYP* et calcitonine) via la médiation de *CBF-1* et le changement transcriptionnel des gènes *HES* et *HEY* [182]. De plus, le traitement promeut un phénomène d'accumulation d'ADN sub- G_1 dans les cellules, non-observé dans le groupe contrôle, et corrélé à une population croissante de cellules en phase apoptotique ainsi qu'à une forte expression de la protéine p27 et de PARP clivée (*poly(ADP-Ribose) polymerase*), toutes deux reliées au phénomène d'apoptose [183] (fig. 45).

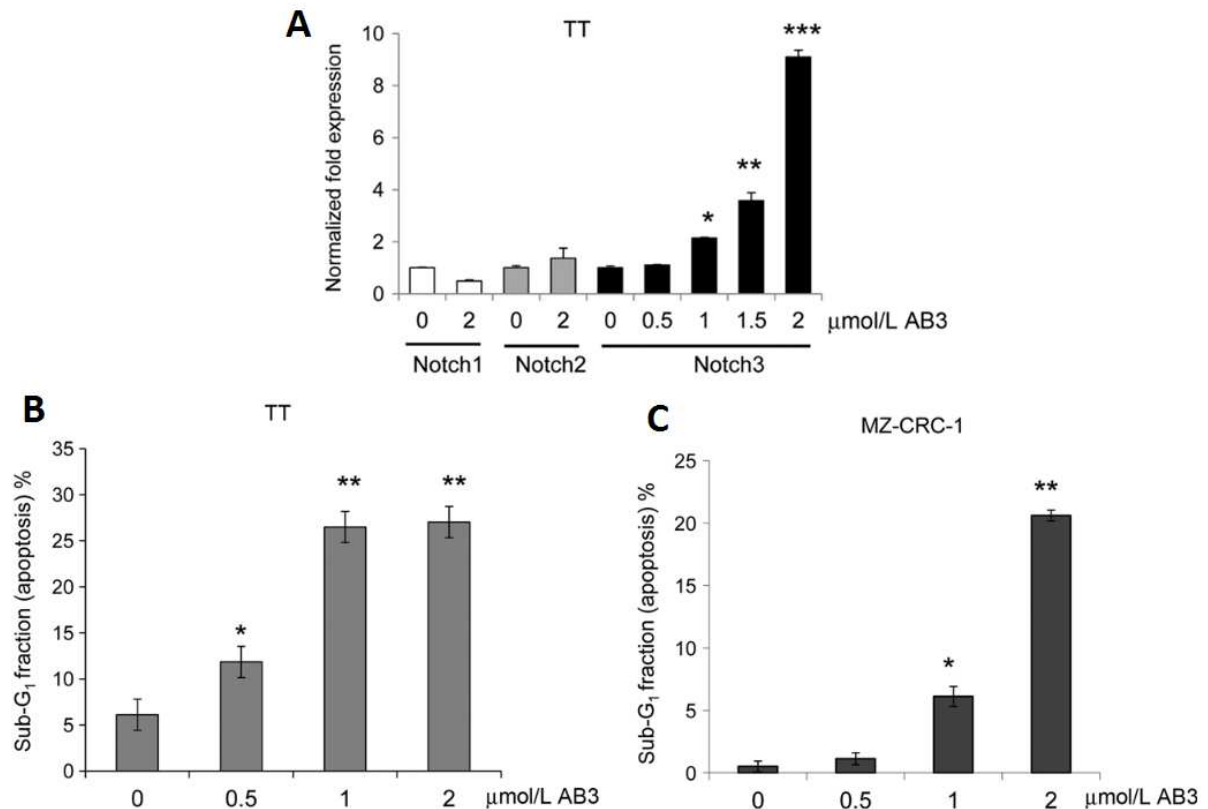


Figure 45 - Expression des récepteurs Notch1-3 (A), effet d'apoptose sur lignées CMT-TT (B) et CMT-MZ-CRC-1 (C) par traitement AB3 [182]

Les résultats présentés ci-dessus sur l'activation de la voie *Notch* via ses récepteurs membranaires mettent en avant une nouvelle approche de traitement concomitant dans le cadre de la RIV, en induisant le ralentissement de la pousse ou la diminution de la taille des tumeurs et des métastases dans les CMT. C'est dans ce contexte que nous avons expérimenté l'activation de la voie *Notch* sur une lignée de CMT-TT à l'aide de la DDA, identifiée et caractérisée sur d'autres types de cancer au sein de notre équipe par les Dr. Poirot et Dr. Silvente-Poirot.

D. Radiomarquage des analogues peptidiques CCK4

D.1. Objectifs du travail

Le radiomarquage est une étape cruciale de la mise en place de traitements vectorisés. Il conditionne la qualité thérapeutique à plusieurs niveaux, de la justesse de l'activité injectée à la dosimétrie en passant par la stabilité, la biodistribution et la durée de vie dans les différents compartiments (circulation sanguine, organe, clairance). En outre, la complexation du radionucléide doit se faire sans déformer la structure moléculaire, c'est-à-dire sans altérer la spécificité de reconnaissance du vecteur employé.

Un radiomarquage de qualité est caractérisé par un critère objectif obtenu en calculant le rapport de comptage entre les nucléides complexés et non-complexés. Ce rapport, exprimé en pourcentage du nombre de désintégrations total correspond à la pureté radiochimique (PRC) du marquage :

$$PRC (\%) = \frac{\text{désintégrations des nucléides complexés}}{\text{total des désintégrations}} \cdot 100$$

La pureté radiochimique (PRC) est le paramètre qualitatif du marquage des radiopharmaceutiques. Lors de l'administration des médicaments radiopharmaceutiques (MRP), les bonnes pratiques cliniques et les recommandations des autorités sanitaires (ANSM, HAS) impliquent une PRC supérieure à ou égale à 95 % [184].

Les études menées ces dernières années sur les analogues de la somatostatine ont porté sur l'utilisation dans un but thérapeutique, à l'aide d'émetteurs β^- tels que le ^{90}Y et le ^{177}Lu . Au sein de notre équipe, *Brillouet et al.* ont démontré l'intérêt des analogues à la cholécystokinine dans le cadre de l'optimisation des analogues peptidiques [89,146]. Ces travaux ont notamment permis le marquage d'analogues CCK4 novateurs au ^{111}In , pour une utilisation diagnostique *in vitro* et *in vivo*.

La finalité de mon travail est donc de réussir le radiomarquage d'un seul et même ligand conjugué avec les isotopes proposés : ^{111}In , ^{90}Y et ^{177}Lu . En effet, l'optimisation du traitement de RIV passe par la nécessité de connaître et identifier le meilleur ligand possible, c'est-à-dire celui qui peut complexer le plus efficacement un grand nombre d'isotopes différents. L'hypothèse faite sur l'utilisation d'un même vecteur dès l'étape de diagnostic et jusqu'au dernier cycle de thérapie pourrait permettre de définir une biodistribution et une dosimétrie au plus proche de la réalité radiobiologique.

Pour répondre à cette problématique, les objectifs de cette étude sont multiples :

- adapter et confirmer un protocole de radiomarquage des ligands selon celui défini par l'équipe sur le marquage au ^{111}In .
- mettre au point et valider le radiomarquage de différents analogues CCK4 à l'aide des émetteurs β^- spécifiques à la thérapie (^{90}Y et ^{177}Lu), et évaluer la pureté radiochimique de ces radiopharmaceutiques.
- évaluer la stabilité chimique des analogues radiomarqués dans des conditions environnementales et de température physiologiques.

D.2. Matériel & Méthodes

Les complexes de ligands peptidiques expérimentés dans cette étude sont au nombre de trois. Synthétisés au laboratoire SPCMIB par les Dr. Picard et Dr. Mestre-Voegtlé (CNRS UMR 5068, Université Paul Sabatier, Toulouse), ils diffèrent par la nature du chélateur lié à l'analogue CCK par le biais d'un bras espaceur (Ahx)₂ (deux groupements d'acide amino-6-hexanoïque, fig. 51). Ce bras permet d'éloigner la partie ligand de la partie chélateur-nucléide afin de ne pas déformer le site de réception du RCCK2.

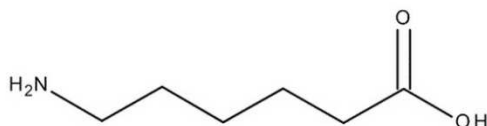


Figure 46 - Bras espaceur Ahx (acide amino-6-hexanoïque)

Le premier chélateur, DOTA (*acide tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique*) a été longtemps étudié dans de nombreuses études similaires et fait figure de référence bibliographique (fig. 47). Il possède la caractéristique principale de pouvoir complexer un nombre important d'ions métalliques comme le ^{111}In , ou le $^{86/90}\text{Y}$. Cependant, il est sensible aux impuretés métalliques et la chélation requiert une étape de chauffe pouvant altérer la structure du ligand [89]. Il a été montré que la complexation par le DOTA nécessite des températures situées entre 80 et 90°C [185].

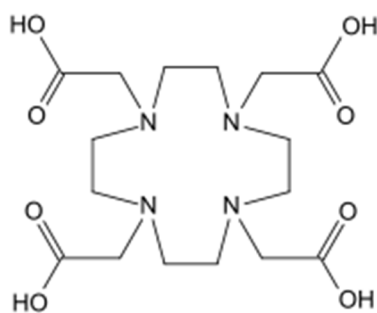


Figure 47 - Chélateur DOTA

Outre une limitation de l'utilisation de vecteurs sensibles à la température, cette étape complexifie et allonge le temps de préparation des RPM. Les développements actuels portent sur des chélateurs complexant à température ambiante de manière rapide et stable les radionucléides. C'est dans ce contexte, avec pour but d'améliorer la complexation du nucléide durant le marquage tout en assurant une meilleure stabilité durant le transport dans la tumeur, que notre équipe a développé un ligand CCK4 couplé au chélateur BPCA.

Le chélateur BPCA (*bipyridine chelating agent*) est basé sur des unités aminocarboxylates et un chromophore 2,2'-bipyridine modifié (fig. 48) Il possède deux sites fonctionnels : le premier est un site de chélation acyclique pouvant complexer efficacement des lanthanides (atomes de la famille des terres rares) et ions métalliques ; le second est un site réactif permettant la bioconjugaison du BPCA avec l'analogue CCK4 [186]. Outre les radionucléides de diagnostic et de thérapie, le BPCA permet la chélation d'autres atomes d'intérêt comme le gadolinium en l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou l'euprimum et le terbium, fluorophores naturels utilisables en imagerie optique et en spectroscopie de fluorescence [187].

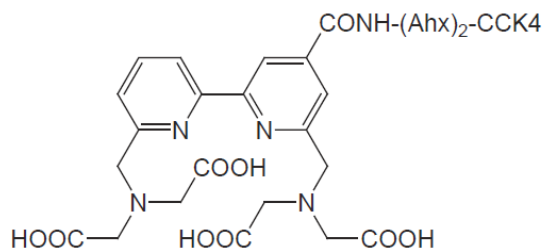


Figure 48 - Structure du chélateur BPCA synthétisé [89]

Le troisième conjugué CCK4 inclue le chélateur PCTA (*acide 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triène-3,6,9-triacétique*) (fig. 49). Des études récentes portant sur ce chélateur macrocyclique ont mis en avant ses propriétés de marquage aussi efficaces en rendement et en stabilité que

pour le NOTA et le DOTA [188,189]. Alors que ce dernier nécessite une chauffe du milieu de réaction pour atteindre un rendement de marquage satisfaisant, le PCTA présente l'avantage de complexer les nucléides à température ambiante et plus rapidement que le DOTA, notamment pour le ^{177}Lu [190,191] et le ^{68}Ga [188].

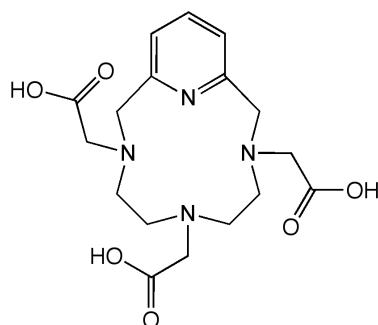


Figure 49 - Chélateur PCTA

D.2.1. Réalisation du marquage

Les trois radionucléides de cette étude sont utilisés à une activité calibrée au jour du marquage sous leur forme chlorée, $^{111}\text{InCl}_3$ (*Mallinckrodt Medical*, Pays-Bas), $^{90}\text{YCl}_3$ et $^{177}\text{LuCl}_3$ (*PerkinElmer*, USA). Chaque condition est évaluée par un échantillon distinct correspondant à une unité de radiomarquage. Pour chaque unité de radiomarquage, 31 μL de solution tampon sont déposés dans un flacon en verre hermétiquement fermé (*Macherey-Nagel*, France), puis 4 μL de solution de ligand conjugué DOTA-(Ahx) $_2$ -CCK4, BPCA-(Ahx) $_2$ -CCK4 ou PCTA-(Ahx) $_2$ -CCK4 à 1,2 mM (*laboratoire SPCMIB*, Université Toulouse 3) ainsi que 5 μL de solution contenant le radionucléide. Pour le marquage du ^{111}In , une solution tampon de citrate de sodium 0,1 M et pH = 5 est utilisée, et d'acétate de sodium 0,1 M et pH = 5 pour le ^{90}Y et le ^{177}Lu . Afin de prévenir la complexation de contaminants métalliques présents à l'état de trace dans les composants, typiquement des ions Fe(III) Ca(II) Cu(II) et Zn(II), et pouvant diminuer le rendement de marquage, un prétraitement des solutions de ligands conjugués et des solutions tampon est réalisé. Ainsi, chaque solution est mélangée avec 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de résine chélatante *Chelex 100* (100-200 mesh, *Bio-Rad Laboratories*, USA) et agitée pendant une heure. Après centrifugation à 1200 tr/min pendant 10 minutes, la solution surnageante purifiée est utilisée pour le radiomarquage. Le volume total de l'unité de radiomarquage de 40 μL est maintenu constant tout au long de l'expérience.

Afin de comparer les capacités de chélation des trois ligands conjugués en fonction de la température du milieu de réaction, deux conditions d'incubation sont expérimentées pour chaque échantillon :

- une heure à température ambiante : 25°C dans le laboratoire de radiomarquage
- une heure à 90°C dans un bain-marie sec (*ThermoFischer, USA*)

Un contrôle de la qualité du radiomarquage par chromatographie sur couche mince est effectué à différents temps après le début de l'incubation : 15, 30 et 60 minutes pour chaque condition.

D.2.2. Contrôle qualité par chromatographie sur couche mince

La pureté radiochimique du radiomarquage des peptides (PRC) est évaluée par une technique de chromatographie sur couche mince sur bandelettes *iTLC-SG* (*instant thin-layer chromatography silica gel, Agilent Technologies, USA*). A chaque temps intermédiaire, un dépôt de 2 μ L d'échantillon est effectué sur une bandelette *iTLC-SG* (phase stationnaire) déposée dans une solution de tampon de citrate de sodium 0,1 M à pH = 5 (phase mobile liquide), afin de permettre la migration chromatographique. Au cours de cette migration, la structure particulière des microfibrilles de verre du support permet la séparation des différents composants de la solution-échantillon en fonction de leur taille. Ainsi les plus petits éléments, notamment les nucléides non-complexés, migrent rapidement avec le front de l'éluant, tandis que les éléments les plus gros comme les ligands conjugués resteront autour de la zone de dépôt.

Par la suite, une détection de la radioactivité par un radiochromatographe *miniGITA* (*Raytest, USA*) permet de localiser les pics d'activité sur un radiochromatogramme (fig. 50). Ainsi, l'activité mesurée au dépôt de l'échantillon correspond aux nucléides complexés par le ligand conjugué (en vert sur les radiochromatogrammes). L'activité mesurée au front de migration (en rouge) correspond aux atomes libres non-radiomarqués.

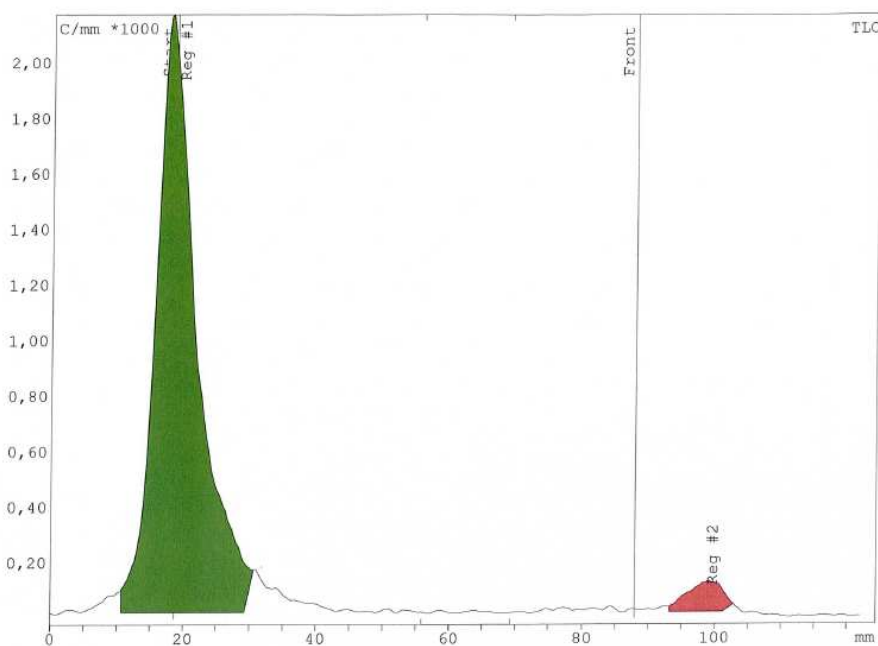


Figure 50 - Radiochromatogramme d'un échantillon de $[BPCA-^{90}Y]-(Ahx)_2-CCK4$
 en vert : pic d'activité au dépôt ; en rouge : pic d'activité au front de migration

D.2.2.1. Pureté radiochimique du marquage

Un contrôle qualité de la migration du radionucléide "libre", est réalisé : 5 μ L de la solution de radionucléide est ajoutée à 31 μ L de solution tampon. Une migration *iTCL-SG* de 2 μ L de cette solution sans ligand conjugué est effectuée à l'aide de la phase mobile de citrate de sodium. Cette étape permet de vérifier que les pics du nucléide complexé et du nucléide libre sont bien distincts, et que ce dernier est bien présent dans sa totalité au front de migration.

Les solutions de radionucléides étant fortement acides, le pH des préparations est contrôlé à l'aide de papier *pH-Fix 0-14 (Fisher Scientific, USA)*, afin que le milieu de réaction soit à pH = 5. Effectivement, un pH trop acide ou basique aurait un effet délétère lors de l'injection à un organisme vivant. De plus, ce paramètre peut faire fortement varier la capacité des molécules à migrer à travers le support *iTCL-SG* et donc perturber l'analyse des résultats de comptage.

Les radiochromatogrammes obtenus sont ensuite exportés sur le logiciel *GINA Star TLC (Raytest, USA)* pour analyse. Après avoir retiré le bruit de fond, délimité les zones de dépôt et le front de migration sur les chromatogrammes, la mesure de l'aire sous la courbe de chacun des pics relevés permet de calculer le rapport de comptage entre les nucléides complexés et non-complexés, c'est-à-dire la PRC.

D.2.2.2. Stabilité du marquage

La stabilité du marquage au cours du temps est évaluée afin de s'assurer de l'intégrité du marquage durant la vectorisation du radionucléide vers la cible. Cette stabilité est estimée en conditions physiologiques à la suite du contrôle qualité des échantillons de radiomarquage, sur ceux ayant donné les meilleurs résultats de PRC pour chaque condition après une heure d'incubation. Un volume de 10 μL d'échantillon est ajouté à un volume de 30 μL de sérum de veau foetal (SVF) (*Dominique Dutscher, France*) contenant $3,1 \cdot 10^{-5}$ M de transferrine humaine (*Sigma-Aldrich, USA*). La solution obtenue est incubée à 37°C et plusieurs contrôles de PRC sont effectués au cours du temps.

La transferrine est une protéine sérique naturelle, présentant deux sites de captation du fer et responsable de son transport dans le corps humain. Elle est aussi le principal concurrent direct des chélateurs de synthèse pour la complexation de l'indium 111, via un phénomène de transchélation (passage d'un chélateur à un autre) [192]. De ce fait, la mesure de la PRC au cours de l'incubation, dans un milieu protéolytique contenant des enzymes pouvant dégrader le ligand et le chélateur, permet de connaître la durée de vie du MRP dans des conditions proches de celles rencontrées lors d'une injection au patient.

Dans le cas où les ligands seraient dégradés par la transferrine ou les composants du SVF, les pics de comptage mesurés sur les radiochromatogrammes seraient divisés en autant de pics que d'espèces dégradées présentes dans le milieu de réaction. La PRC se trouverait dès lors diminuée puisque calculée à l'aide du premier pic situé au dépôt.

D.3. Résultats

Afin d'obtenir des résultats significatifs sur l'ensemble des conditions expérimentées, les radiomarquages des trois ligands conjugués avec les trois radionucléides différents ont été réalisés pour $n = 3$ expérimentations.

D.3.1. Marquage au ^{111}In

Le potentiel hydrogène de la solution de $^{111}\text{InCl}_3$ est mesurée à $\text{pH} = 1$, et celui de la solution finale est maintenu à $\text{pH} = 5$ grâce à la solution tampon de citrate de sodium.

La première étape consiste au contrôle qualité de la migration de l'indium libre (fig. 51). La totalité de l'activité déposée sur le repère 20 mm de la bandelette a migré vers le front de migration en un pic fin situé entre 110 et 120 mm (pic rouge).

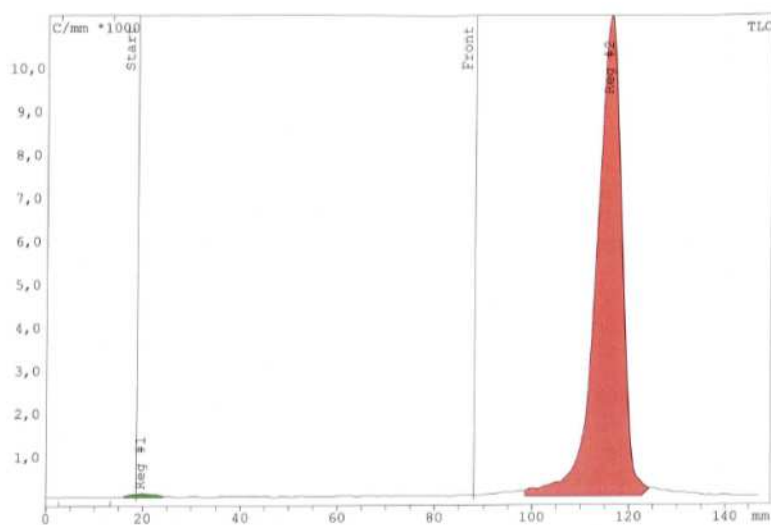


Figure 51 - Radiochromatogramme du ^{111}In libre + citrate de sodium 0,1 M pH = 5

Cette étape permet de distinguer les pics de nucléides non-marqués et marqués par le complexe ligand-chélateur. La migration en présence du ligand conjugué PCTA-(Ahx) $_2$ -CCK4 change le profil du radiochromatogramme, avec un pic d'activité à proximité du dépôt d'échantillon (fig. 52).

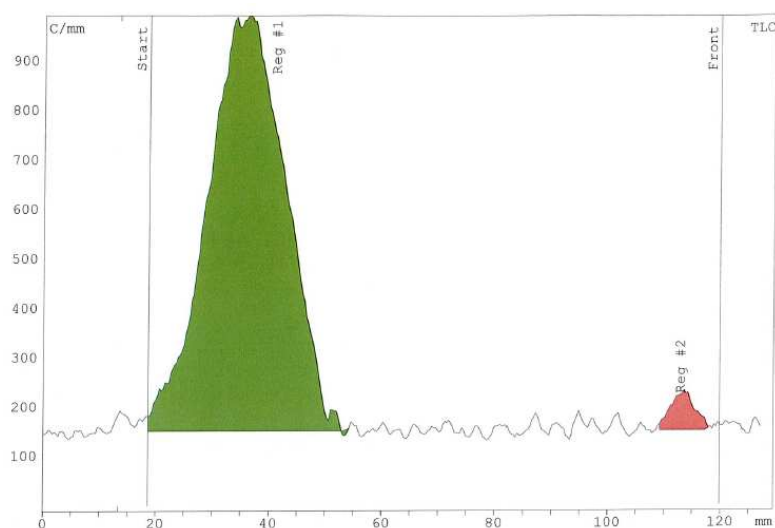


Figure 52 - Radiochromatogramme du ^{111}In + PCTA-(Ahx) $_2$ -CCK4.
A 15 minutes à température ambiante, la PRC mesurée est de 97,6 %

Le graphique ci-dessous présente les PRC obtenues pour chaque échantillon, selon les deux conditions d'incubation du milieu de réaction (fig. 53). Le seuil de PRC = 95 % est représenté par un trait pointillé rouge.

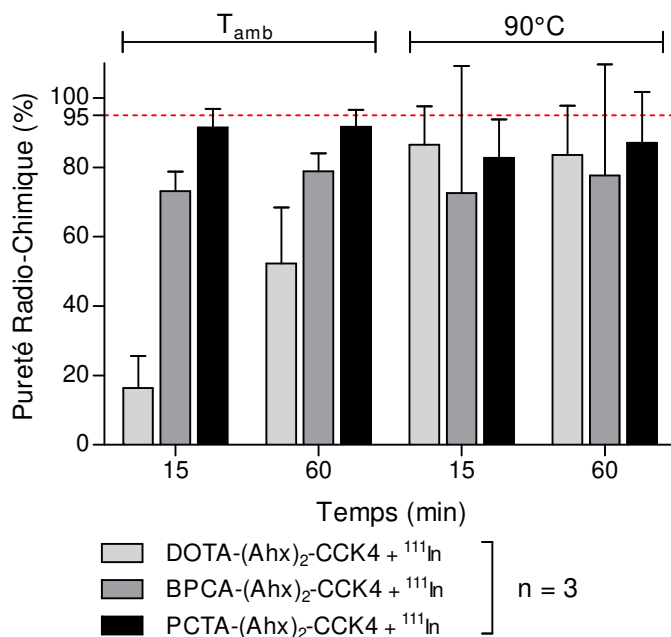


Figure 53 - Pureté radiochimique des marquages au ¹¹¹In pour les 3 ligands à température ambiante (partie gauche) et à 90°C pendant une heure (partie droite)

Sur les trois expériences, la complexation à température ambiante par le ligand DOTA-(Ahx)₂-CCK4 n'a pas atteint une PRC supérieure à 66 % en une heure d'incubation. Ce résultat est conforme aux attentes puisque ce chélateur nécessite une température élevée pour fonctionner. En chauffe à 90°C, la PRC atteint 99 % (PRC_{moy} = 86,5 %, N = 3) dès 15 minutes.

Les trois expériences réalisées à température ambiante donnent une PRC maximale de 78 % à 15 min, qui atteint 84 % à 60 minutes. En chauffe, la PRC maximale atteint une valeur de 96,5 % dès 15 minutes mais n'est pas reproductible à N = 3 (PRC_{moy} = 72,6 %, N = 3). La complexation du ¹¹¹In par le ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4 mène à une PRC de 97,6 % (PRC_{moy} = 91,5 %, N = 3) en 15 minutes à température ambiante (fig. 53). Ce résultat présente l'avantage pour le ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4 de complexer rapidement et à froid ce radionucléide.

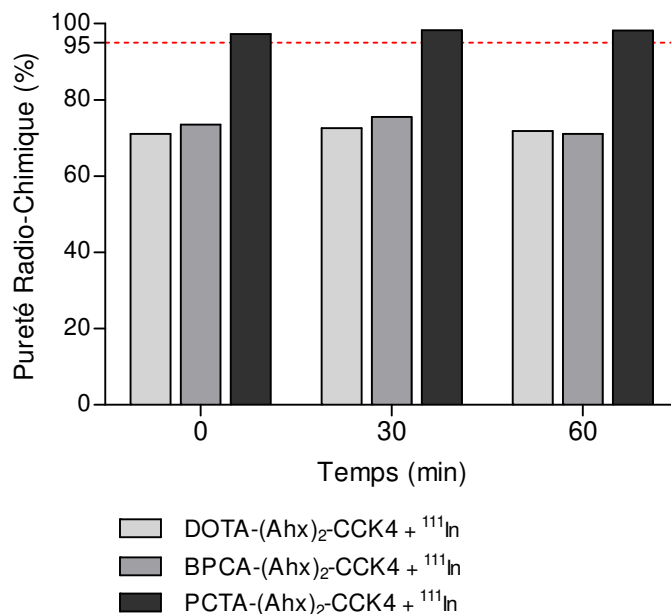


Figure 54 - Stabilité du radiomarquage au ¹¹¹In dans le SVF + transferrine humaine

La stabilité des radiomarquages est réalisée sur les échantillons ayant donné les meilleurs résultats : les PRC de départ (T_0) sont les PRC maximales obtenues au même jour d'expérimentation (fig. 54). La pureté radiochimique est constante sur les 60 minutes d'incubation dans le mélange sérique pour les trois radioligands.

D.3.2. Marquage au ⁹⁰Y

Le protocole de marquage de l'yttrium 90 est identique à celui de l'indium 111 à la différence que la solution tampon utilisée pour la complexation est de l'acétate de sodium 0,1 M à pH = 5. Sur la figure 55 ci-dessous, nous montrons que l'utilisation de citrate de sodium en tant que phase mobile de migration permet de distinguer très clairement l'activité de l'yttrium libre au front de migration (graphique A). Le graphique B montre que l'utilisation d'acétate de sodium en tant que phase mobile ne permet pas d'obtenir deux pics distincts suite au radiomarquage, et sera uniquement employé en tant que solution tampon. Enfin, le graphique C montre que l'utilisation de citrate de sodium en support de la réaction ne permet pas le radiomarquage, puisque la totalité de l'activité se retrouve au front de migration. En définitive, le radiomarquage des ligands peptidiques par le ⁹⁰Y est réalisé à l'aide d'une solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M à pH = 5, et la migration sur bandelette TLC est réalisée à l'aide d'une phase mobile de citrate de sodium 0,1 M à pH = 5.

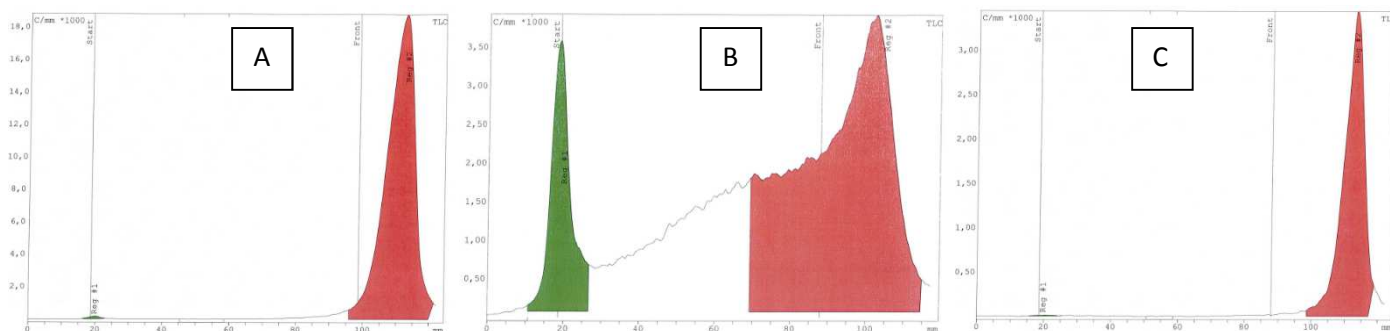


Figure 55 - à gauche : migration de ^{90}Y pur, phase mobile de citrate de sodium
 au centre : migration de ^{90}Y + PCTA-(Ahx)₂-CCK4, phase mobile d'acétate de sodium
 à droite : migration de ^{90}Y + PCTA-(Ahx)₂-CCK4, solution tampon et phase mobile de citrate de sodium

Le pH du milieu de réaction est mesuré et égal à 5. La figure 56 présente les résultats de PRC des radiochromatogrammes obtenus pour les trois ligands conjugués, et pour les deux conditions de température.

A température ambiante, le ligand DOTA-(Ahx)₂-CCK4 complexe le ^{90}Y avec une pureté maximale de 34 % à 15 minutes ($\text{PRC}_{\text{moy}} = 25,7 \%$, $N = 3$), atteignant 59,4 % à 60 minutes ($\text{PRC}_{\text{moy}} = 48,4 \%$, $N = 3$). Chauffé à 90°C, la PRC moyenne obtenue est de 73,6 % à 15 minutes puis 89,3 % à 60 minutes. Il est ici nécessaire de chauffer pour obtenir un marquage satisfaisant.

Le ligand BPCA-(Ahx)₂-CCK4 complexe le ^{90}Y à hauteur de 49 % à 15 minutes et 66,9 % au bout d'une heure à température ambiante. Cependant, lorsque le milieu de réaction est incubé à 90°C, la PRC atteint 95,9 % dès 15 minutes et 99,2 % à 60 minutes. Ce marquage présente l'avantage d'être rapide malgré la nécessité de chauffer le milieu réactionnel.

Enfin, à température ambiante, 94,5 % de l'yttrium libre est complexé par le PCTA-(Ahx)₂-CCK4 dès 15 minutes, et 96,1 % à 30 minutes. Il en est de même pour le marquage en chauffe, qui atteint 97,2 % en 15 minutes. Le chélateur PCTA présente ici le double avantage de complexer efficacement le ^{90}Y rapidement et sans chauffe.

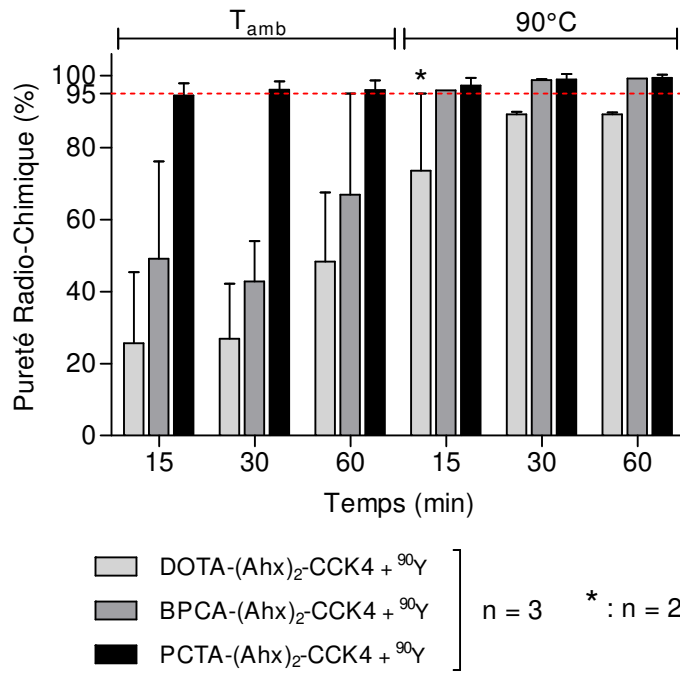


Figure 56 - Pureté radiochimique des marquages au ⁹⁰Y pour les 3 ligands à température ambiante (partie gauche) et à 90°C pendant une heure (partie droite)

L'expérience de stabilité est effectuée sur le ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4. Avec un temps de demi-vie physique de 64 heures (2,7 jours), l'emploi de l'yttrium 90 en thérapie implique qu'il délivre une dose de rayonnement pendant une durée relativement longue, et ce au plus près de la cible (fig. 57). Ainsi, outre les temps de contrôle à 15, 30 et 60 minutes, la stabilité du MRP est évaluée à 2h30 et 5h30 après le démarrage de la réaction : la PRC est stable jusqu'à 2h30 (97,3 %) et présente une relative diminution à 93,6 % au bout de 5h30.

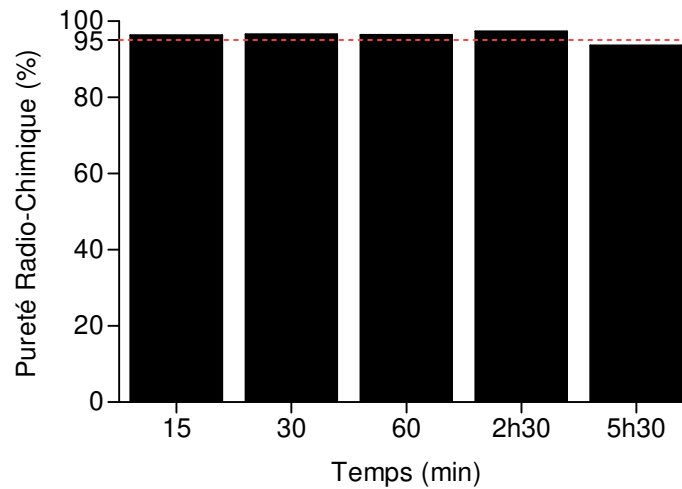


Figure 57 - Pureté radiochimique du [⁹⁰Y-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4 + SVF et transferrine humaine, incubation à 37°C

D.3.3. Marquage au ^{177}Lu

Au même titre que pour le marquage de l'yttrium 90, le marquage au lutétium 177 nécessite l'utilisation d'acétate de sodium en tant que solution tampon. La phase mobile liquide de migration sur bandelette *iTLC-SG* reste du citrate de sodium 0,1 M à pH = 5. Le pH de la solution de marquage est égal à 5.

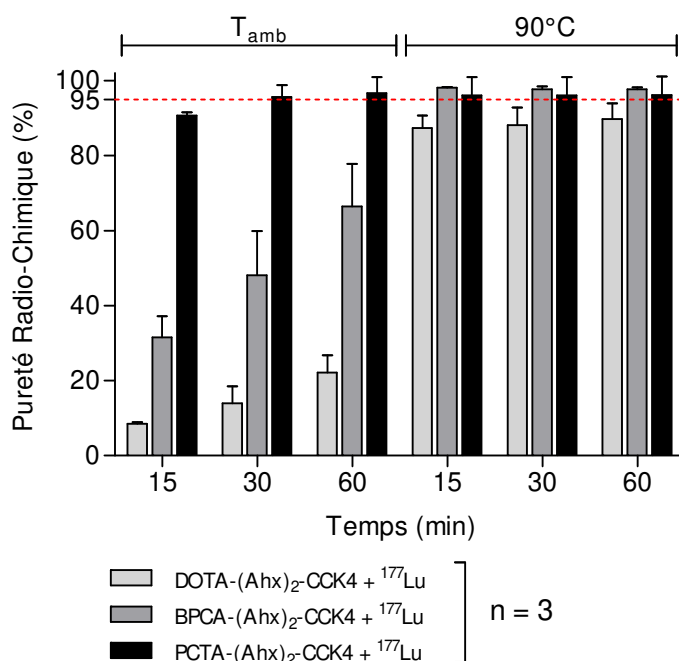


Figure 58 - Pureté radiochimique des marquages au ^{177}Lu pour les 3 ligands à température ambiante (partie gauche) et à 90°C pendant une heure (partie droite)

Le ligand conjugué DOTA-(Ahx)₂-CCK4 complexe 22,1 % du ^{177}Lu disponible 60 minutes après le début du marquage à température ambiante. Lorsque le milieu est chauffé, la PRC atteint 87,4 % en 15 minutes et 89,8 % à une heure (fig. 58).

Pour le marquage du BPCA-(Ahx)₂-CCK4, la pureté radiochimique croît de 31,6 % à 15 minutes, puis 48,1 % à 30 minutes et 66,4 % à une heure, à température ambiante. Lors de la chauffe, le marquage est efficace dès 15 minutes avec une PRC de 98,1 %, constante sur la durée d'incubation.

Enfin, à température ambiante le PCTA-(Ahx)₂-CCK4 complexe 90,7 % du ^{177}Lu en 15 minutes, puis 95,7 % en 30 minutes. Pour la condition de chauffe à 90°C, le marquage est efficace à 96,1 % dès 15 minutes.

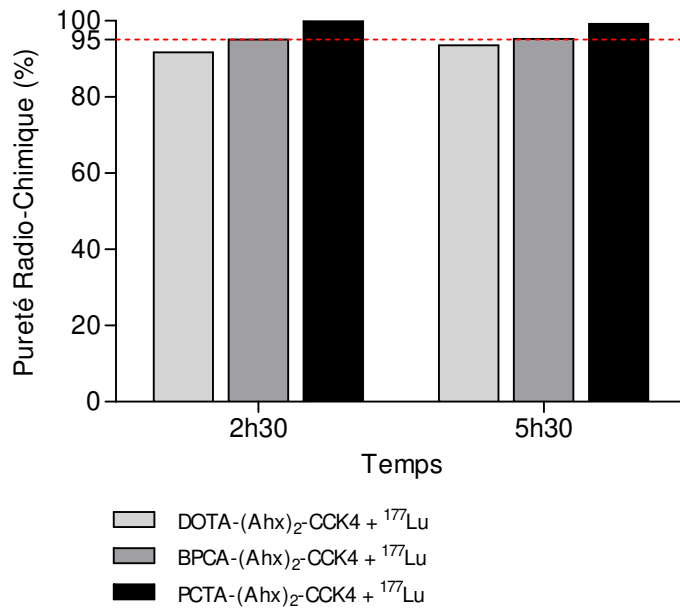


Figure 59 - Pureté radiochimique des 3 ligands + SVF et transferrine humaine, incubation à 37°C

Au même titre que pour l'utilisation du ⁹⁰Y en RIV, la stabilité de la complexation du ¹⁷⁷Lu par les 3 ligands est une nécessité pour la réussite de l'irradiation. Pour rappel, le ¹⁷⁷Lu a un temps de demi-vie relativement long de 6,7 jours. Ainsi les résultats de stabilité sont constants pour *a minima* 5h30 d'incubation à 37°C avec la solution de SVF + transferrine humaine (fig. 59).

D.4. Discussion

L'objet de cette étude était la réalisation du radiomarquage des ligands CCK4 novateurs par des radionucléides de diagnostic d'une part avec le ^{111}In , et de thérapie d'autre part avec le ^{90}Y et le ^{177}Lu . Ainsi, le ligand DOTA-(Ahx)₂-CCK4, dont le chélateur DOTA a été à de nombreuses reprises étudié dans la littérature, a servi de référence comparative. Pour ce ligand, la complexation des isotopes n'a été élevée que lors de l'incubation du milieu de réaction à 90°C pendant une heure. Cependant les puretés radiochimiques obtenues n'atteignent pas les 95 % recommandés avec N = 3 expériences de marquage : les PRC entre 85 % et 90 % sont tout de même satisfaisantes. Dès lors, il est nécessaire de mettre en place une purification *a posteriori* par migration de la solution de marquage à travers un système comprenant une colonne de chromatographie liquide, permettant de séparer physiquement les composants de tailles différentes, comme peuvent l'être le radioligand et le nucléide libre. Les colonnes ou "cartouches" utilisées sont généralement à phase stationnaire solide, modulant la vitesse de transit des molécules. La migration des espèces de petite taille, comme les nucléides non-complexés, est rapide et permet leur élimination en sortie, tandis que les espèces de grande taille ayant complexé les nucléides nécessitent une élution postérieure de la colonne pour être collectées. *Maus et al.* ont récemment détaillé une méthode de purification similaire pour le marquage de peptides DOTA-TATE au ^{177}Lu , pour lesquels les puretés radiochimiques obtenues après incubation à 80°C varient de sont inférieures à 95 % [193].

Les résultats obtenus avec le BPCA-(Ahx)₂-CCK4 montrent ici un marquage possible des trois isotopes de l'étude, suffisant sous certaines conditions. L'incubation d'une heure à température ambiante de le ligand ^{111}In du BPCA-(Ahx)₂-CCK4 permet d'atteindre des PRC de l'ordre de 75 %. Ceci est lié à une mauvaise conservation des peptides avant radiomarquage, conduisant à une dégradation de ces derniers et une PRC non-conforme aux résultats obtenus précédemment. Lorsque le milieu de réaction est incubé à haute température, le marquage est supérieur à 95 % pour le ^{90}Y et le ^{177}Lu lors des 3 expériences, comme pour le ^{111}In . Afin de rendre injectable la solution de [BPCA]-(Ahx)₂-CCK4 ayant complexé un de ces isotopes, deux solutions sont donc possibles : effectuer une purification *a posteriori* de la solution de marquage incubée à température ambiante en tenant compte de l'activité perdue lors de cette opération, ou chauffer la solution à 90°C pendant une heure.

Pour le PCTA-(Ahx)₂-CCK4, la complexation est efficace dès 15 minutes à température ambiante pour le ^{111}In et le ^{90}Y , et dès 30 minutes pour le ^{177}Lu . La chauffe d'une heure à 90°C n'apporte pas d'amélioration notable à la PRC, allant jusqu'à donner de moins bons résultats pour le ^{111}In . De fait, l'utilisation de ce peptide pour le marquage des trois nucléides de cette étude permet de s'affranchir

de l'étape d'incubation à 90°C ainsi que de la purification pour obtenir une PRC supérieure à 95 %, deux processus allongeant la durée du marquage et nécessitant des précautions supplémentaires.

Enfin, la stabilité des trois ligands radiomarqués et notamment du PCTA-(Ahx)₂-CCK4 ne montre pas de dégradation de la structure du peptide dans un environnement physiologique. La taille réduite de l'analogue CCK4 vis-à-vis des autres analogues de la cholécystokinine sont une des raisons de sa grande stabilité, puisque le nombre de sites de clivages possibles de la chaîne peptidique est réduit, notamment vis-à-vis des analogues CCK8 et minigastrine étudiés par le groupement *EuroCOST*. Ces résultats sont à confronter à de futures données *in vivo* sur des échantillons d'urine et de sang lors d'expérimentation animales. A la vue des résultats de stabilité, le phénomène de transchélation de l'indium 111 dans le SVF en présence de transferrine n'a pas eu lieu. Cependant, il est aussi possible qu'une partie du nucléide ait été complexé par cette molécule et que sa détection en CCM la confonde avec le pic correspondant au ligand conjugué. Il est possible de statuer sur cette hypothèse en effectuant un contrôle par chromatographie liquide haute-performance (HPLC), qui distingue les composés d'un mélange par leur temps de rétention dans une colonne de migration, proportionnel au poids moléculaire.

Au même titre que l'optimisation de la longueur de sa chaîne peptidique, l'ajout du double bras espaceur -(Ahx)₂- validé par *Brillouet et al.* ne dégrade pas l'intégrité de cet analogue CCK4 [146], et participe aussi à sa stabilité. En effet, le fait d'éloigner la partie chélateur de la partie ligand aurait pu introduire une zone de fragilité supplémentaire dans la structure de la molécule, plus sensible aux interactions avec le milieu sérique comme l'ont montré *Ocak et al.* pour différents analogues CCK/gastrine [83]. Le bras espaceur -(Ahx)₂- n'étant pas une structure peptidique, cette fragilité n'existe pas. De plus, comme l'ont montré *de Jong et al.*, la combinaison synergétique du ⁹⁰Y et du ¹⁷⁷Lu dans un même protocole thérapeutique apporte un effet antitumoral supérieur à l'utilisation exclusive de ces radionucléides, tout en diminuant la toxicité aux tissus sains, et ce pour le traitement de tumeurs hétérogènes et de tailles différentes [87].

En définitive, le ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4 conjugué répond à la problématique fixée en introduction, qui consistait à réaliser le marquage efficace et stable des radionucléides de diagnostic et de thérapie à l'aide d'un seul et même vecteur peptidique CCK. L'utilisation d'un tel ligand est une avancée supplémentaire de l'optimisation de la RIV : l'hypothèse d'une biodistribution similaire entre le MRP de diagnostic et celui de thérapie, et qui n'a jusqu'ici pas été développée sur les analogues CCK permet d'envisager une dosimétrie personnalisée plus précise, dans un contexte de RIV théranostique adaptée au patient.

E. Optimisation de l'efficacité par association thérapeutique

E.1. Action de la DDA

Aujourd'hui, outre les protocoles de chirurgie des tumeurs solides, de plus en plus de protocoles curatifs utilisent une combinaison de différentes modalités thérapeutiques : chirurgie et radiothérapie externe ou interne, chimiothérapie.

Dans le contexte des tumeurs neuroendocrines, des associations thérapeutiques ont fait l'objet d'études récentes afin d'optimiser et augmenter l'effet antitumoral. Ces associations peuvent être un ensemble de plusieurs éléments cytotoxiques (rayonnements, drogues) qui activent les mécanismes de mort cellulaire, ou bien un élément cytotoxique associé à un élément potentialisateur de l'effet antitumoral (inhibition de voies de signalisation, augmentation de la radiosensibilité).

Ainsi, une combinaison de *mIBG* (métaiodobenzylguanidine marqué au ^{131}I pour la thérapie) et de *Topotecan* (anticancéreux, antinéoplasique et antimitotique) a été expérimentée dans le traitement des neuroblastomes par *McCluskey et al.* et *Kraal et al.*. Ces deux molécules cytotoxiques utilisées de manière concomitante ont montré des résultats positifs chez les patients traités [160,161].

A l'inverse, certaines combinaisons dont les traitements isolés ont montré un intérêt potentiel n'ont pas eu l'effet synergétique ou additif attendu lors des essais cliniques. En 2006, *Courbon et al.* ont expérimenté un traitement à l'iode 131 en association avec l'acide rétinoïque (vitamine A) dont l'effet potentialisateur sur la réexpression du transporteur NIS et la captation d'iode par les cellules thyroïdiennes a été démontré [194]. Les résultats montrent que la combinaison ne permet pas une fixation supérieure de ^{131}I dans les cellules thyroïdiennes avec l'acide rétinoïque, et que les bénéfices cliniques apportés sont faibles [162].

Les recherches de notre équipe sur la dendrogénine A (DDA), un dérivé du cholestérol découvert dans l'équipe, ont montré que cette molécule induit la différenciation et la mort de certaines lignées tumorales de différentes origines (mélanome, leucémie, cancer du sein,...) et qu'elle inhibe la croissance tumorale, *in vivo*, associée à une différenciation des tumeurs [163,166,195]. La DDA induit également la différenciation et la mort des cellules de tumeurs thyroïdiennes différenciées (carcinome papillaire) ou peu différenciées (carcinome anaplasique) [196]. Nous avons vu en introduction que la radiosensibilité des cancers neuroendocriniens dépend de nombreux paramètres, parmi lesquels l'oxygénation des cellules tumorales, est en lien étroit avec la taille des tumeurs (cœurs nécrotiques non oxygénés, angiogenèse périphérique) et l'état de différenciation des cellules.

Différents travaux montrent que l'induction de la voie *Notch* (Notch-1 et -3) dans les cellules de cancers médullaires de la thyroïde par des agents induisant la différenciation cellulaire ou par sa réexpression génique (utilisation de cellules de CMT inductibles par la doxycycline pour induire l'expression de protéines *Notch*) induit une diminution de la croissance des cellules CMT-TT *in vitro* et une diminution des marqueurs neuroendocriniens ainsi qu'une réduction de la croissance de ces tumeurs implantées chez la souris, suggérant que Notch1 et 3 pourrait être des suppresseurs de tumeurs dans les CMT [174,179,182,197]. Il a été montré que les niveaux de Notch1 sont plus faibles dans les tissus primaires de tumeurs de la thyroïde différenciée chez le patient comparé au tissus non-tumoraux et les patients ayant de faible taux de Notch1 ont un taux de rechute plus important [198]. De plus, la surexpression de Notch3 dans les cellules de CMT peut altérer le phénotype malin neuroendocrine à la fois *in vitro* et *in vivo* [182]. Ainsi la réexpression de Notch1 et 3 et/ou son activation pourrait être une nouvelle stratégie pour traiter les patients ayant un CMT. Le but de cette étude est d'estimer l'effet d'un traitement à la dendrogénine A (DDA) sur les lignées exprimant les récepteurs RCCK2.

Du fait que la DDA induit la différenciation et la mort de cellules tumorales de différentes origines incluant les cellules de tumeurs thyroïdiennes différenciées ou non, nous avons émis l'hypothèse que cette molécule pouvait être efficace sur des cellules de CMT. Le but de cette étude a été d'étudier l'efficacité antitumorale d'un traitement à la DDA sur une lignée cellulaire de CMT exprimant les RCCK2 (cellules de CMT-TT) et d'utiliser comme contrôle une lignée tumorale bien caractérisée dans l'équipe exprimant les RCCK2 (NIH-3T3-E151A) [89,141]. Ce travail expérimental avait trois objectifs :

- étudier les effets d'un traitement à la DDA sur la différenciation et la mort des lignées CMT-TT et NIH-3T3-E151A.
- étudier l'effet de la DDA sur l'expression des RCCK2, dans le but de tester ultérieurement une association thérapeutique de la DDA avec les radioligands développés dans la présente étude, et ciblant les RCCK2 : PCTA-(Ahx)₂-CCK4, BPCA-(Ahx)₂-CCK4 et DOTA-(Ahx)₂-CCK4.
- étudier l'action de la DDA sur la voie *Notch*, dont des études ont démontré que l'activation a un effet antitumoral sur la lignée CMT-TT

Plusieurs stratégies d'association thérapeutique peuvent être proposées pour améliorer l'efficacité du traitement. On peut distinguer deux types d'associations :

- les traitements visant à augmenter ou restaurer l'expression des cibles du vecteur utilisé en RIV
- les potentialisateurs de dommages radiobiologiques par accroissement du nombre de liaisons ou bien altération

E.2. Matériel & Méthodes

E.2.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires sont cultivées en laboratoire de niveau 2, équipé de postes de sécurités microbiologiques (PSM) pour éviter tout type de contamination extérieure. Les cellules sontensemencées dans des flasques de 75 mm² de surface utile (*Corning® Falcon®*, USA) contenant 12 mL d'un milieu nutritif de culture additionné de sérum de veau fœtal (SVF), voir ci-dessous (*Dominique Dutscher*, France). Les flasques sont ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ en présence d'humidité. Lorsque le tapis cellulaire atteint environ 90 % de confluence, les cellules sont divisées comme décrit ci-dessous.

Les cellules sont lavées à l'aide d'un tampon phosphate salin (PBS, *phosphate buffered saline*) (*Sigma-Aldrich*, USA) afin de retirer les cellules mortes surnageantes. Une solution de trypsine (*Sigma-Aldrich*, USA) est ajoutée afin de décoller le tapis de cellules adhérentes du fond de la flasque. Une fois décollées, la solution de trypsine est retirée, et 5 mL de milieu de culture additionné de SVF sont ajoutés. Une succession d'aspirations/refoulements du milieu sur le tapis de cellules décollées permet de les récolter et de les individualiser. Un volume de ce milieu contenant les cellules est ensuite transféré dans une nouvelle flasque stérile contenant du milieu de culture neuf additionné de SVF. Les flasques sont replacées dans les incubateurs jusqu'au prochain passage.

E.2.1.1. Lignée NIH-3T3-E151A-RCCK2

La lignée NIH-3T3-E151A est une lignée murine modifiée de cellules NIH-3T3 (fibroblastes). La mutation E151A-CCK2R (résidu *Glu151* remplacé par *Ala* dans le motif E/DRY) engendre une activation de deux enzymes ayant un rôle dans la mitogénèse, la phospholipase C et l'ornithine décarboxylase. L'activité de ce mutant est associée à une forte altération de la morphologie des cellules NIH-3T3, ainsi qu'à une prolifération et une invasion cellulaires augmentées. La conséquence de ce changement de comportement est le développement rapide de tumeurs de grande taille lors de l'injection de ces cellules dans la souris [199]. Ainsi, cette lignée exprimant de façon permanente le récepteur RCCK2 est un modèle cellulaire intéressant pour l'étude des peptides analogues de la cholécystokinine comme le CCK4 [89]. Le milieu nécessaire à la culture de cette lignée est du DMEM + 10 % SVF. Dans la présente étude, cette lignée a servi de lignée contrôle pour ce qui concerne l'expression des récepteurs RCCK2.

E.2.1.2. Lignée CMT-TT

La lignée CMT-TT est une lignée humaine de cancer médullaire de la thyroïde. Ces cellules tumorales sont une cible de choix pour l'évaluation du traitement de RIV à partir de l'analogue CCK4, puisqu'elles surexpriment les récepteurs RCCK2 à 92 % [100]. Le milieu de culture nécessaire à leur développement est le *Ham's F12-K (Kaighn's modification)* + 10 % SVF.

E.2.2. Action de la dendrogénine A : mort cellulaire

La DDA (*Affichem*, France), est diluée dans un volume d'éthanol pur (99,7 %) (*Sigma-Aldrich*, USA). Les concentrations finales de DDA contiennent un volume d'éthanol de 1/1000. Ces solutions sont conservées à -20°C.

Pour évaluer l'action de la DDA, les deux lignées cellulaires sont réensemencées dans des boîtes de plaques de 6 puits (3 mL, 9,6 cm²/puits) (*Corning® Falcon®*, USA). Lorsque la confluence moyenne d'environ 60 à 70 % est atteinte, le milieu de culture est changé afin de retirer les cellules mortes, et le traitement est réalisé par ajout de 3 µL de solution de DDA dans chaque puits de 3 mL. La dilution de 1:1000 obtenue permet de traiter les lignées cellulaires aux concentrations de 0, 1, 2,5, 5 et 10 nM. Chaque condition de concentration en DDA est réalisée en duplicate. 24 heures après le traitement, les cellules sont récoltées après décollement à la trypsine. 10 µL de chaque échantillon de cellules est ajouté à 10 µL de *bleu trypan* (*Life Technologies*, USA). Le mélange obtenu est déposé sur une *cellule de Malassez* permettant le comptage des cellules au microscope. Le *bleu trypan* a pour caractéristique de colorer en bleu les cellules mortes devenues perméables après rupture de leur membrane plasmique : il est dès lors plus aisé de les distinguer des cellules vivantes lors du comptage sous le microscope. Pour chaque échantillon, une centaine de cellules sont comptées et le rapport entre cellules mortes et cellules vivantes est calculé, donnant une information sur l'effet de la dose de DDA.

E.2.3. Expression de protéines : mise au point

L'identification et la détection de l'expression des RCCK2 d'une part et celles liées à la voie *Notch* d'autre part, dans les lignées cellulaires NIH-3T3-E151A et CMT-TT, est évaluée par la technique analytique de *Western Blot*. Cette technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines d'intérêt d'un échantillon selon leur taille et les mettre en évidence à l'aide d'anticorps spécifiques, dirigés contre la protéine d'intérêt, et qui jouent le rôle de sondes. Les

protocoles de détection par WB des *RCCK2*, *Notch-1* et *Notch-3* ont été adaptés des publications publiées dans la littérature [200–203].

E.2.3.1. Lyse des échantillons

Les lignées cellulaires sont ensemencées dans des boîtes de pétri de diamètre 100 mm (*Corning® Falcon®*, USA) contenant 7 mL de milieu de culture, et traitées à la DDA comme vu précédemment. 24 heures après le traitement, les cellules sont lysées avec une solution de PBS, contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases, afin de désintégrer la membrane plasmique et séparer les organites et autres composants intracellulaires, dont les protéines. Cette étape de lyse est réalisée dans un environnement réfrigéré proche de 0°C afin de stopper les réactions de dégradation enzymatique qui ont lieu au sein de la cellule.

Le milieu de culture est retiré des boîtes et les cellules sont rincées au PBS froid. Le grattage du tapis cellulaire est effectué dans un volume de 3 mL de PBS. La solution recueillie est centrifugée à 1200 tr/min à 4°C. Le volume surnageant est éliminé et le culot de cellules est transféré dans un tube conique (*Eppendorf®*, Allemagne) de 1 mL de PBS. Une nouvelle centrifugation à 7000 tr/min à 4°C permet de purifier la solution de cellules en éliminant le surnageant. L'ajout de 150 µL d'une solution de tampon *RIPA buffer* (*Sigma-Aldrich*, USA) et d'inhibiteurs de protéases/phosphatases au culot permet de débiter la lyse, en laissant agir 30 minutes à 1 heure dans la glace. Après plusieurs agitations au vortex, l'étape suivante de sonication (ou ultrasonation) permet d'amplifier la lyse, de détruire la membrane nucléaire et d'accéder aux protéines du noyau. Enfin, une troisième centrifugation à 8000 tr/min à 4°C permet d'éliminer les débris membranaires du culot en ne conservant que le surnageant dans lequel se trouvent les protéines d'intérêt.

E.2.3.2. Dosage des protéines

Les protéines collectées lors de l'étape de lyse sont dosées selon la méthode BCA (*Bicinchoninic acid Assay*) (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, *ThermoFischer Scientific*, USA). Une gamme étalon d'albumine BSA (*bovine serum albumine*) (*Sigma-Aldrich*, USA), de 0 à 20 mg.mL⁻¹, est réalisée afin de déterminer la concentration en protéines de chacun des échantillons lysés précédemment. Une analyse de l'absorbance des échantillons et de la gamme BSA est mesurée au lecteur de plaques *iMark Microplate Reader* (*Bio Rad*, USA) à la longueur d'onde 540 nm.

E.2.3.3. Préparation des échantillons

30 µg de protéines pour la détection du RCCK2 et 60 µg pour la détection de *Notch* est déposé dans un tube *ependorf*, ainsi qu'un volume de tampon de lyse, un volume de réducteur dilué 10 fois (*Novex NuPage*®, *Life Technologies*, USA) ou un mélange de *bêta-mercaptoéthanol* et de *dithiothréitol* (*Sigma-Aldrich*, USA), et enfin un volume de bleu de charge dilué 4 fois (*Novex NuPage*®, *Life Technologies*, USA). Le réducteur permet de casser les ponts disulfures, le bleu de charge a pour rôle de favoriser l'action du réducteur et de diminuer la poussée d'Archimède pour faciliter le dépôt dans les puits ainsi que la migration des échantillons. Afin de dénaturer les protéines, les échantillons sont chauffés 10 minutes à 70°C (pour RCCK2) ou 5 minutes à 95°C (pour *Notch*). Les protéines sont ainsi dénaturées et les sites de reconnaissance des anticorps accessibles.

E.2.3.4. Migration par électrophorèse

Les gels de polyacrylamide *SDS-PAGE 4-12 % Tris-Bis* (pour RCCK2) ou *SDS-PAGE 3-8 % Tris-Acetate* (pour *Notch*) (*Novex NuPage*®, *Life Technologies*, USA) sont disposés dans une cuve de migration (*ThermoFisher Scientific*, USA), contenant 400 mL d'une solution de 20 mL de tampon de migration MOPS 20X (*Life Technologies*, USA) dilué 20 fois dans 380 mL d'eau osmosée. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel correspondant. Un volume de 4 µL de marqueur de taille *Precision Plus Protein Kaleidoscope* (*Bio Rad*, USA) une mixture de contenant 10 différentes protéines colorées, est déposé dans un des puits du gel et sert d'échelle visuelle du poids moléculaire lors des étapes de migration, de transfert et de révélation. La cuve est reliée à un générateur délivrant une tension fixe de 165 V, pour une durée de migration d'environ 1 heure, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

E.2.3.5. Transfert des protéines sur membrane

Cette étape consiste à transférer les protéines du gel sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) (*GE Healthcare*, USA) pour les rendre accessibles à la détection par anticorps. La membrane est placée face au gel entre deux couches de papier *whatman* (*Whatman plc*, UK) dans une cassette de transfert immergée dans 400 mL d'une solution de tampon de transfert. Ce tampon est composé de 40 mL d'une solution de *trishydroxyméthylaminométhane-glycine* 10X (*Sigma-Aldrich*, USA) diluée dans 80 mL de méthanol (*Sigma-Aldrich*, USA) et 280 mL d'eau osmosée. Une tension est appliquée entre les deux électrodes de la cassette de transfert, et le courant créé permet le passage des protéines d'un support à l'autre. Ce transfert est effectué à 20 V pendant une heure à température ambiante

pour la détection de RCCK2, et à 12 V sur la nuit (*overnight*) à 4°C pour la détection des protéines de la voie *Notch*.

Une fois les protéines transférées sur la membrane PVDF, les sites d'interaction non-spécifiques entre la membrane PVDF et les anticorps utilisés par la suite sont saturés durant une heure à température ambiante à l'aide d'une solution de TBS-T (*tris-buffered saline, polysorbate (Tween 20)*) additionnée de lait sans matières grasses (dilué à 5 g pour 100 mL), et préparée au laboratoire. Cette étape permet aux anticorps de se fixer sur les sites spécifiques de la protéine-cible, réduisant par la même le bruit de fond général lors de la révélation et éliminant les faux positifs.

E.2.3.6. Immunoblot

Une solution de TBS-T + 5 % lait contenant les anticorps primaires spécifiques aux protéines d'intérêts est incubée avec la membrane sous agitation modérée *sur la nuit* à 4°C. L'anticorps *anti-CCKBR* (*ab77077*) (*Abcam*, UK) est utilisé pour caractériser l'expression des récepteurs RCCK2, à la dilution de 1:2500. Les anticorps primaires *Notch 1 C-20* (*sc-6014*) et *Notch 3 (M-20)* (*sc-7424*) (*Santa Cruz Biotechnology*, USA) sont respectivement utilisés pour caractériser l'expression des voies *Notch-1* et *Notch-3* à la dilution de 1:500.

Une série de trois lavages successifs de 10 minutes par une solution de TBS-T est effectuée sur les membranes sondées, sous agitation modérée. Une nouvelle solution de TBS-T + 5 % lait additionnée d'anticorps secondaires *anti-goat* dilués à 1:10000 et dirigés contre une portion spécifique des anticorps primaires est incubée avec les membranes durant 1 heure sous agitation modérée. Ces anticorps secondaires sont liés à une peroxydase de raifort ou une phosphatase alcaline qui, lorsque mise en contact avec un agent luminescent, émet une photoluminescence proportionnelle à la concentration en protéines (fig. 60).

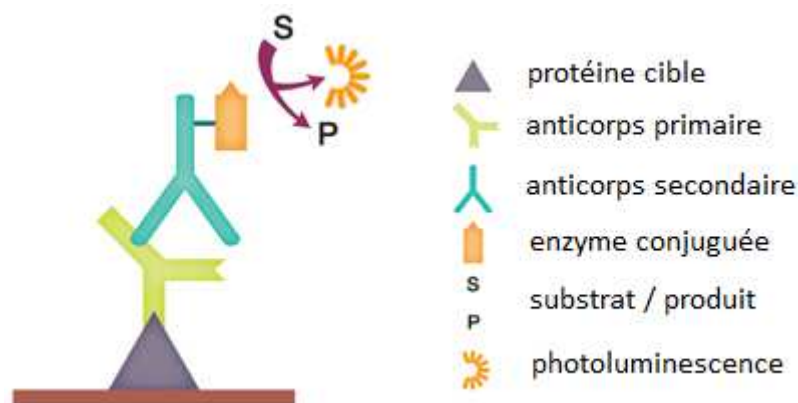


Figure 60 – Principe de révélation des protéines cibles par les anticorps primaires et secondaires traduit de www.bio-rad.com

Trois nouveaux rinçages successifs de 10 minutes au TBS-T sont effectués. Les membranes sont incubées 5 minutes dans la solution d'agent luminescent *ECL Clarity* (Bio Rad, USA), et révélées à l'imageur *PXi* piloté par le logiciel *GeneSys* (Syngene, UK). Le rôle de l'imageur est de collecter le signal de photoluminescence, sous la forme de bandes contrastées correspondant aux protéines révélées et séparées en fonction de leur poids moléculaire.

Le procédé est répété pour l'actine, une protéine de structure dont l'expression ne varie pas entre les échantillons. Ainsi, le taux de la protéine d'intérêt est rapporté à celui de l'actine afin de normaliser les variations dues aux dépôts ou aux variations de transfert sur la membrane. La quantification est réalisée sur le logiciel *ImageJ* (NIH, USA) à l'aide du module *Gels* préinstallé.

E.3. Résultats

E.3.1. Effet de la DDA : mort cellulaire

Un effet dose-dépendant est visible sur les résultats de mort cellulaire après 24 heures de traitement DDA. La dose entraînant 50 % de mort est égale à 5 μM pour la lignée NIH-3T3-E151A ($46,3 \pm 4 \%$), et à la dose de 2,5 μM pour la lignée CMT-TT ($41,5 \pm 6 \%$) (fig. 61). Peu de cellules meurent aux concentrations 0 et 1 μM . La concentration de 10 μM entraîne la mort de 94 % des cellules NIH-3T3-E151A, et de 97 % des cellules CMT-TT.

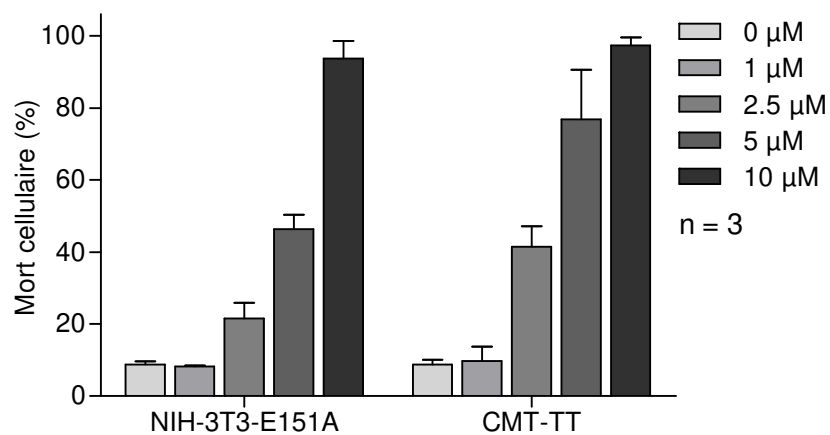


Figure 61 - Mort cellulaire des lignées NIH-3T3-E151A et CMT-TT après traitement DDA de 24 heures

Le même effet dose-dépendant est observé sur les résultats après traitement de 48 heures avec la DDA. Pour les NIH-3T3-E151A, 2,5 μM de DDA entraînent $37,2 \pm 6,5 \%$ de mort et $76,8 \pm 1 \%$ à 5 μM . Pour les CMT-TT, 59,4 $\pm 2,1 \%$ des cellules sont tuées par la concentration 2,5 μM . La concentration de 5 μM entraîne un fort taux de mort des CMT-TT ($96,4 \pm 2 \%$), tout comme la dose de 10 μM pour 94,3 $\pm 7,2 \%$ des NIH-3T3-E151A et 100 % des CMT-TT (fig. 62).

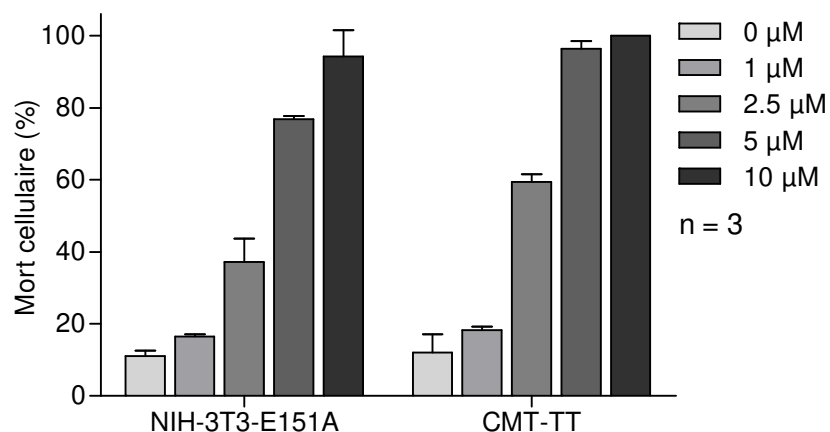


Figure 62 - Mort cellulaire des lignées **NIH-3T3-E151A** et **CMT-TT** après traitement DDA de 48 heures

E.3.2. Expression de RCCK2

J'ai déterminé si la DDA modifiait l'expression du RCCK2 par immunoblot après traitement de 24 heures des deux lignées cellulaires étudiées avec des concentrations croissantes en DDA. L'expression du RCCK2 dans la lignée NIH-3T3-E151A est visible au poids moléculaire 75 kDa (données du fournisseur). Son expression diminue de 25 % environ avec un traitement de 2,5 μM et 5 μM en DDA, comparé au contrôle (non-traité) (fig. 63).

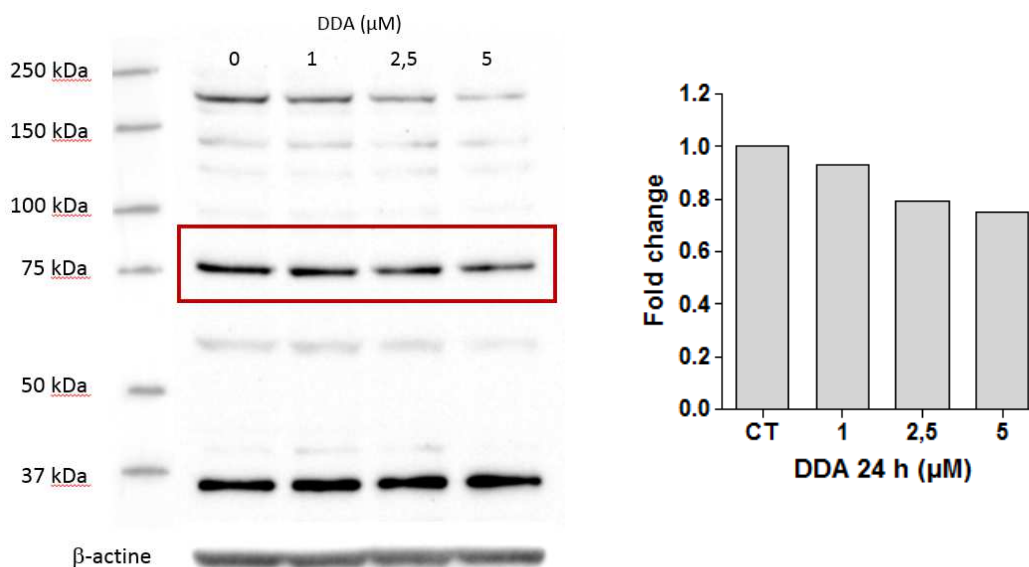


Figure 63 - Western Blot de l'expression du récepteur **RCCK2** dans la lignée **NIH-3T3-E151A** traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)

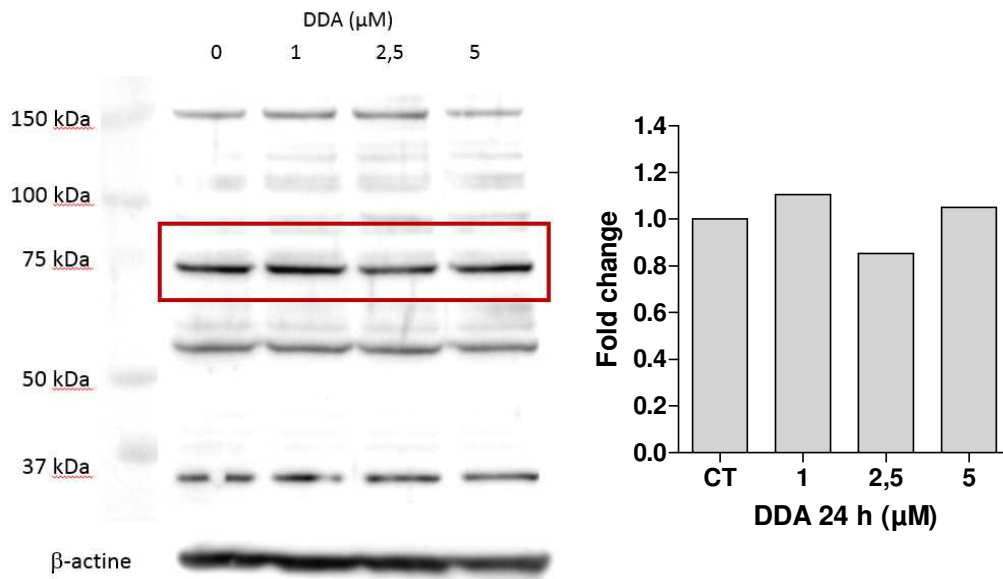


Figure 64 - Western Blot de l'expression du récepteur **RCCK2** dans la lignée **CMT-TT** traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)

Cette expérience de Western Blot a été reproduite 3 fois : il n'y a pas de variations majeures sur l'expression de RCCK2 avec l'échantillon contrôle pour les concentrations en DDA de 1, 2,5 et 5 μM (fig. 65).

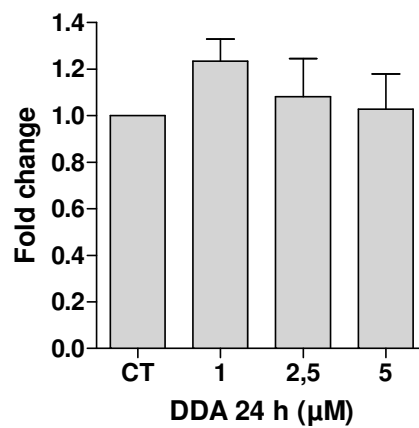


Figure 65 - Quantification de l'expression de **RCCK2** rapportée à l'actine, pour la lignée **CMT-TT** (N = 3)

E.3.3. Expression de Notch-1 et Notch-3

J'ai ensuite déterminé si la DDA modifiait l'expression des protéines *Notch* par immunoblot après traitement de 24 heures des 2 lignées cellulaires étudiées avec des concentrations croissantes en DDA. Notch-1 migre à un poids moléculaire de 120 kDa et Notch-3 à 120 kDa et 280 kDa. Un traitement de la lignée NIH-3T3-E151A avec 5 μ M de DDA pendant 24 heures induit une forte expression de la protéine Notch-1 comparé au contrôle non traité. L'expression de Notch1 n'est pas augmentée aux concentrations 1 et 2,5 μ M de DDA. À 10 μ M, la quasi-totalité des cellules sont mortes (fig. 66).

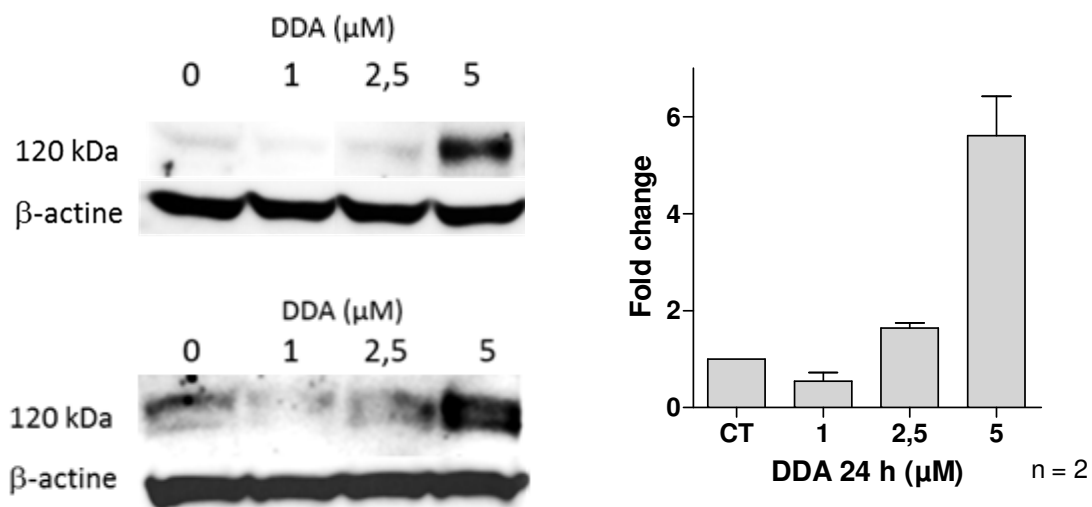


Figure 66 - Western Blot de l'expression de la voie *Notch-1* dans la lignée NIH-3T3-E151A traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)

La même expérience réalisée sur la lignée CMT-TT montre une expression faible de Notch1 sur l'échantillon contrôle. Cette expression diminue pour 1 et 2,5 μ M, et revient au niveau contrôle pour la concentration 5 μ M en DDA (fig. 67).

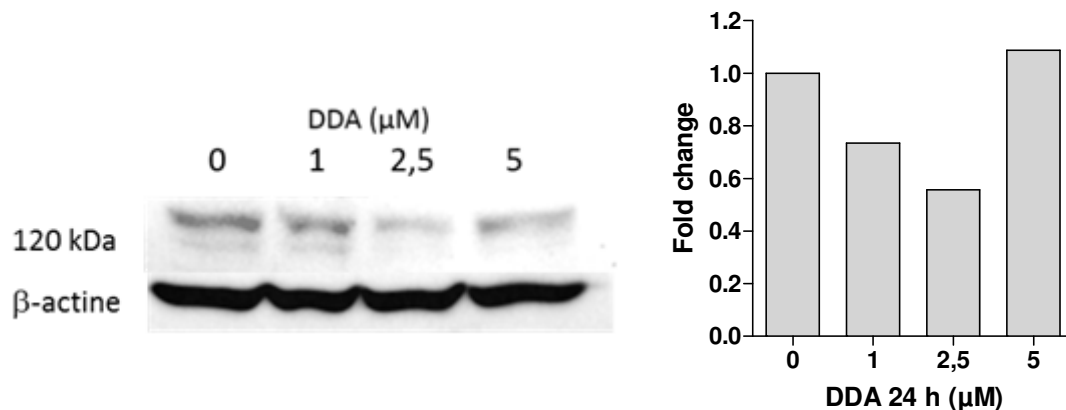


Figure 67 - Western Blot de l'expression de la voie *Notch-1* dans la lignée CMT-TT traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)

Les mêmes expériences ont été réalisées pour mesurer l'expression de la protéine *Notch-3*. L'échantillon contrôle de la lignée NIH-3T3-E151A exprime peu *Notch-3*. Une augmentation de son expression à la concentration 1 μM est visible sur l'expérience A, mais n'est pas retrouvée sur l'expérience B. Cependant, un traitement avec 5 μM de DDA induit une forte augmentation de l'expression *Notch-3* sur les deux expériences (fig. 68).

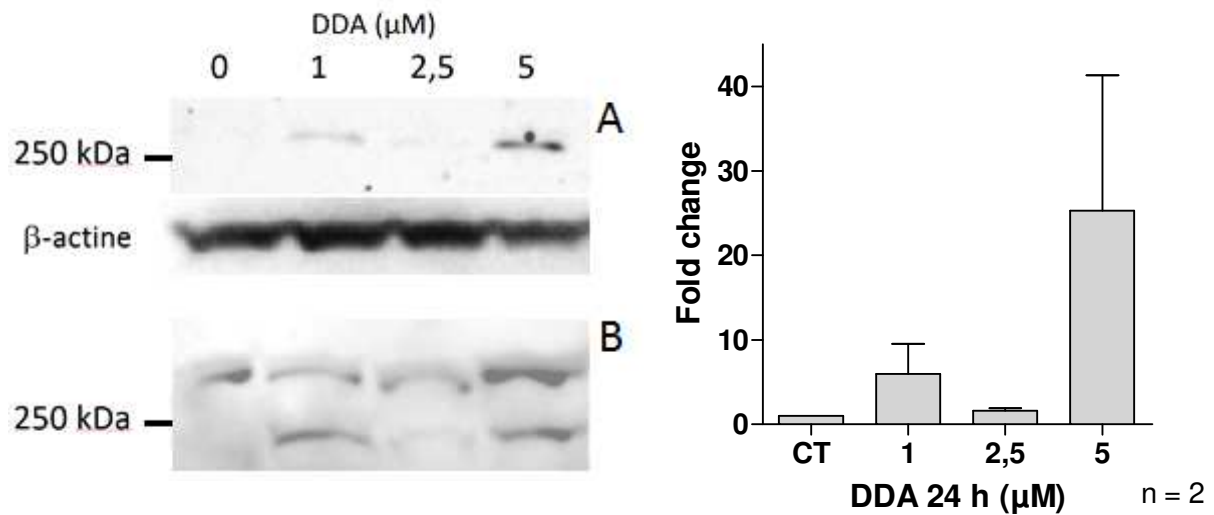


Figure 68 - Western Blot de l'expression de la voie *Notch-3* dans la lignée NIH-3T3-E151A traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)

Dans l'échantillon contrôle (non-traité), l'expression de *Notch-3* est faible. Un traitement de cette lignée avec 1 μM de DDA augmente fortement l'expression sur l'expérience A, et modérément sur l'expérience B. Pour des concentrations supérieures à 1 μM , il n'y a pas d'expression de *Notch-3*, la cytotoxicité de la DDA réduisant drastiquement les possibilités d'expression (fig. 69).

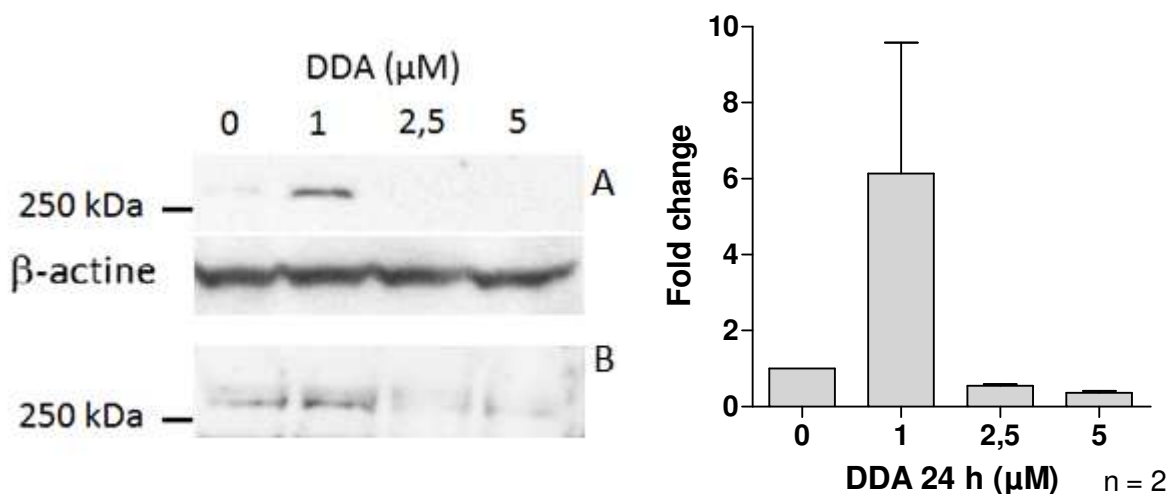


Figure 69 - Western Blot de l'expression de la voie *Notch-3* dans la lignée CMT-TT traitées avec différentes concentrations de DDA pendant 24 heures (à gauche), et quantification de l'expression rapportée à l'actine (à droite)

E.4. Discussion

L'objectif de cette étude était de déterminer l'effet d'un traitement à la dendrogénine A sur la mort et la différenciation cellulaire d'une lignée de CMT exprimant les RCCK2 et d'une lignée non-CMT contrôle surexprimant les RCCK2, mesurer si l'expression des RCCK2 varie avec le traitement DDA, et enfin déterminer si la DDA induit une réexpression des protéines *Notch-1* et *Notch-3*, dont plusieurs études ont montré que leur expression et/ou activation à un effet antitumoral sur la lignée CMT-TT [174,182].

Les essais de mort cellulaire sur les lignées CMT-TT et NIH-3T3-E151A ont montré un effet cytotoxique de la DDA concentration et temps-dépendant. Les concentrations induisant 50 % de la mort cellulaire est 2,5 μ M pour la lignée CMT-TT et de 5 μ M pour la lignée NIH-3T3-E151A. Cette expérience montre la capacité qu'a la DDA à induire un effet antitumoral sur les deux lignées et la sensibilité des cellules CMT à la DDA. La nature radiosensibilisante de cet effet est une hypothèse qui fait l'objet d'une perspective de travail, dans un premier temps par des expériences d'irradiation *in vitro* des lignées étudiées associée ou non à un traitement de dendrogénine A, et dans un second temps *in vivo* sur le modèle animal. En outre, une comparaison des effets de la DDA sur les lignées CMT-TT et NIH-3T3-E151A pourra être réalisée afin de comparer les concentrations utilisées dans les autres modèles tumoraux étudiés dans l'équipe (mélanome, lignées de tumeurs mammaires ou encore leucémiques), et d'estimer l'effet dans le modèle de CMT chez l'animal.

L'étude de l'expression des récepteurs RCCK2 en fonction des concentrations de DDA donne une information cruciale sur l'intérêt du traitement concomitant dans le contexte d'une radiothérapie interne vectorisée basée sur le ciblage de ces récepteurs. En effet, si la DDA avait un effet d'inhibition de l'expression des RCCK2 à la surface des cellules tumorales, le taux de fixation des radiopeptides CCK4 sur les RCCK2 serait et les doses cumulées dans les tumeurs seraient plus faibles, ce qui pourrait affecter l'effet thérapeutique des radiopeptides et limiter l'intérêt de combiner la DDA et les radiopeptides CCK4. Les résultats présentés montrent que, pour la lignée NIH-3T3-E151A, l'expression de RCCK2 est relativement élevée pour les quatre concentrations de DDA, avec toutefois une diminution de l'ordre de 25 % pour la concentration 5 μ M, en comparaison avec l'échantillon contrôle. Pour la lignée CMT-TT, l'expression des récepteurs est élevée et égale à celle de l'échantillon témoin pour les différentes concentrations de DDA. Outre les résultats d'expression présentés, cette étude a permis de mettre au point un protocole permettant de mesurer l'expression de RCCK2 en *Western Blot*. Jusqu'à récemment, les anticorps dirigés contre ce récepteur étaient peu spécifiques et efficaces à le reconnaître et la mesure de l'expression des RCCK2 était réalisée uniquement par des essais de liaison à l'équilibre ou par *qPCR* [117,199]. Ainsi l'identification d'anticorps spécifiques dirigés contre le RCCK2 va permettre la quantification de son expression sur différentes lignées tumorales ou tumeurs

et permettre de diagnostiquer celles pouvant répondre à des ligands ciblant les RCCK2. Au même titre que l'imagerie diagnostique des récepteurs, RCCK2, une analyse des biopsies tumorales permettrait d'identifier en première intention les patients qui pourront suivre un traitement de RIV CCK.

Enfin, l'expression des voies *Notch-1* et *Notch-3* permettent de faire le lien avec les essais de mort cellulaire, puisque les niveaux d'expression de ces voies correspondent avec les concentrations de DDA proches de l' EC_{50} : sur la lignée NIH-3T3-E151A, la DDA a un effet de mort cellulaire et d'expression de *Notch-1* et *Notch-3* à 5 μ M à 24 heures. Sur la lignée CMT-TT, la dendrogénine A n'a pas d'effet spécifique sur l'expression de *Notch-1*, et ce quelle que soit la concentration utilisée, au même temps de traitement. Cependant, l'expression de *Notch-3* est augmentée à la concentration 1 μ M en comparaison avec l'échantillon contrôle. Cette dose de DDA a été mise en évidence par les travaux de l'équipe comme induisant des effets de différenciation sur différentes cellules tumorales étudiées incluant les cellules de cancers de la thyroïde papillaire et anaplasique [163,166,195,196]. Au-delà de 1 μ M, pour les concentrations 2,5 et 5 μ M, la DDA agit comme un agent cytotoxique à part entière en induisant une mort cellulaire directe. L'effet de diminution de la taille tumorale associée à la réexpression de *Notch-3* a été montré par *Jaskula-Sztul et al.* sur la lignée CMT-TT et pourrait donc être en lien avec des effets redifférenciants, induits par la DDA dans notre étude [182]. La différenciation des CMT par la DDA et son lien avec la réexpression de *Notch-3* sera étudiée dans les expériences futures.

Dans les perspectives de ce travail, l'intérêt thérapeutique de la DDA seule ou en association avec un traitement RIV utilisant les radiopeptides CCK4 ciblant les RCCK2 fera l'objet d'une étude préclinique sur le modèle CMT-TT implanté chez la souris *nude*.

F. Expérimentation *in vivo* de la RIV par analogues CCK4 radiomarqués

F.1. Objectifs de l'étude

Cette étude préclinique a pour but d'expérimenter *in vivo* à la fois le comportement des lignées tumorales RCCK2 positives NIH-3T3-E151A et CMT-TT à travers le suivi de la pousse tumorale sur modèle murin, mais aussi l'effet d'un premier traitement à l'aide du peptide radiomarqué étudié précédemment, le [⁹⁰Y-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4, sur ces mêmes lignées tumorales.

F.2. Matériel & Méthodes

F.2.1. *Modèle de souris Swiss Nude*

Les expérimentations sont conduites sur un modèle murin *Swiss Nude* (*Charles River*, USA). Ce modèle de souris présente une mutation génétique du gène *FOXN1*, causant un dysfonctionnement du thymus ou son absence. De ce fait les souris ne peuvent générer de lymphocytes T matures en grand nombre et ne peuvent développer un certain nombre de réponses immunitaires, comme la formation d'anticorps, l'immunité à médiation cellulaire, ou encore le rejet de greffe [204]. Cette dernière particularité fait des souris *Swiss Nude* un modèle de choix pour l'expérimentation préclinique en oncologie. En effet, ces études nécessitent généralement d'obtenir un modèle animal vivant exprimant un certain type de tumeur, humaines ou non, et requiert pouvoir greffer la lignée tumorale au modèle.

F.2.2. *Xéno greffe tumorale des lignées NIH-3T3-E151A et CMT-TT*

Les deux lignées exprimant le récepteur RCCK2 ont été amplifiées en culture cellulaire afin d'obtenir un grand nombre de cellules injectables au modèle animal, soit 10 millions de cellules par souris. Après lavage au PBS et centrifugation, les cellules cultivées sont concentrées dans un volume de 150 µL de PBS et injectées en sous-cutané sur le flanc de l'animal. Les deux lignées sont ainsi inoculées dans différents groupes souris *Swiss Nude*.

F.2.3. Suivi de pousse tumorale

Une première expérience a été réalisée sur deux groupes de 10 souris *Swiss Nude* xénotreffées avec des cellules des lignées NIH-3T3-E151A et CMT-TT afin d'évaluer la prise de greffe et la vitesse de pousse tumorale. Les développements tumoraux des lignées cellulaires ayant une structure ellipsoïdale, la mesure de leur volume est réalisée à partir du jour d'inoculation (J_0) l'aide d'un pied à coulisse de précision afin de mesurer les deux dimensions de longueur a et largeur b (fig. 70), selon le formalisme suivant :

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \frac{a \times b \times c}{8} \approx 0,52 \cdot a \cdot b \cdot c$$

La dimension de profondeur c (épaisseur de la tumeur) n'étant pas mesurable au pied à coulisse, l'hypothèse est émise que la largeur b est égale à la profondeur c . Le volume de la tumeur devient :

$$V = 0,52 \cdot a \cdot b^2$$

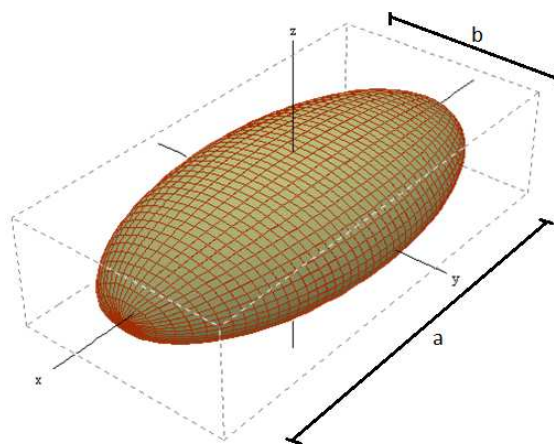


Figure 70 - Modèle tumoral d'ellipsoïde en 3 dimensions

F.2.4. Dose de traitement et dose maximale tolérée

Une seconde expérience a été réalisée sur un groupe de 6 souris *Swiss Nude* afin d'expérimenter deux doses de radioactivité, ainsi que la toxicité immédiate du ligand radiomarqué à l'yttrium 90 (*Cis Bio International*, France). L'injection du peptide [^{90}Y -PCTA]-(Ahx) $_2$ -CCK4 a été réalisée aux activités de 18,5 et 37 MBq : des activités de l'ordre de la vingtaine de mégabecquerels sont employées par la communauté scientifique dans de tels protocoles de recherche préclinique [205–207]. Le radiomarquage a été réalisé comme décrit précédemment, et le contrôle qualité de la PRC est effectué

avant l'injection. Trois souris reçoivent une dose de peptide d'activité 18,5 MBq, les trois autres recevant 37 MBq. Un suivi global de l'état de santé et du comportement des souris est effectué par la suite.

F.2.5. Efficacité du traitement de peptides CCK4 radiomarqués au ⁹⁰Y

Une troisième expérience a consisté en l'évaluation du traitement de RIV CCK à l'aide du peptide [⁹⁰Y-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4 sur le modèle *Swiss Nude* xénotransplanté avec les deux lignées RCCK2 positives. Deux groupes de souris portant des tumeurs NIH-3T3-E151A ont été constitués : le premier groupe de 5 souris a reçu une injection d'activité 37 MBq, tandis que le second composé de 3 souris a servi de groupe contrôle. Deux autres groupes de souris portant des tumeurs CMT-TT ont aussi été composés : 3 souris ont reçu une injection de 37 MBq de peptide radiomarqué, et une souris n'a pas été traitée, à titre de contrôle. Le traitement est injecté à J₃₉ après la greffe tumorale, par injection dans la veine caudale de 200 µL de solution contenant le peptide radiomarqué selon le protocole et la stœchiométrie décrits précédemment. La PRC de la solution de radiomarquage a été contrôlée par chromatographie iTLC-SG, et est égale à 98,5 %. Une importante radioactivité résiduelle due à l'élimination biologique du composé par les souris dans les litières est prise en compte dans cette expérimentation, les cages sont nettoyées et décontaminées tous les 2 jours afin de s'affranchir au possible d'un effet de ces rayonnements externes. Un indicateur de la croissance tumorale est le temps de doublement (TD) du volume tumoral. Il permet de s'affranchir des pertes précoces, et des variations aléatoires des temps de survie [208]. Le TD est calculé selon le formalisme suivant :

$$TD = \frac{\ln(2)}{\ln\left(V_2/V_1/t_2 - t_1\right)}$$

avec V_1 le volume tumoral au jour de traitement t_1 et V_2 le volume tumoral au jour du sacrifice t_2 .

F.3. Résultats

F.3.1. Suivi de la pousse tumorale

La prise de greffe est efficace pour les deux lignées et le premier volume solide mesurable apparait autour de 15 jours : le volume tumoral suit une évolution similaire durant le premier mois de suivi. Au-delà, la taille des tumeurs développées par les souris inoculées avec la lignée NIH-3T3-E151A croit plus rapidement que pour la lignée CMT-TT. Les deux courbes de pousse tumorale se distinguent par la suite : le volume des tumeurs NIH-3T3-E151A double en 6 jours alors que les tumeurs CMT-TT gardent une évolution linéaire, et doublent en 9 jours (fig. 71).

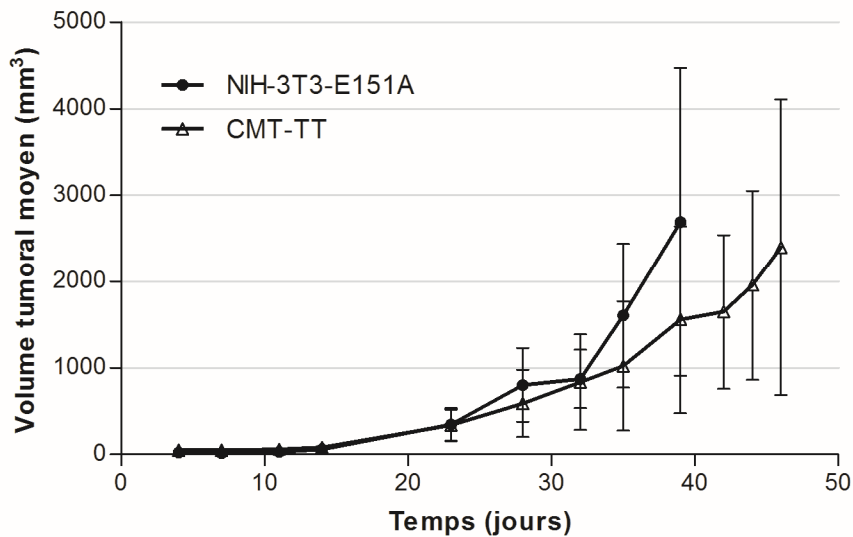


Figure 71 - Pousse tumorale moyenne des lignées NIH-3T3-E151A et CMT-TT chez la souris *Swiss Nude*

F.3.2. Dose maximale tolérée

Le radiomarquage du ligand employé présente une pureté radiochimique supérieure à 99 % pour les deux activités injectées (fig. 72). Les 6 souris utilisées pour cette expérience présentent un comportement et un état de santé général normaux du jour d'injection au 51^{ème} jour du suivi (arrêt du suivi). Il n'y a pas de toxicité immédiate liée à l'administration d'un rayonnement ionisant. La dose maximale tolérée n'est pas atteinte à 37 MBq, cette activité est celle utilisée pour la suite des expérimentations *in vivo*.

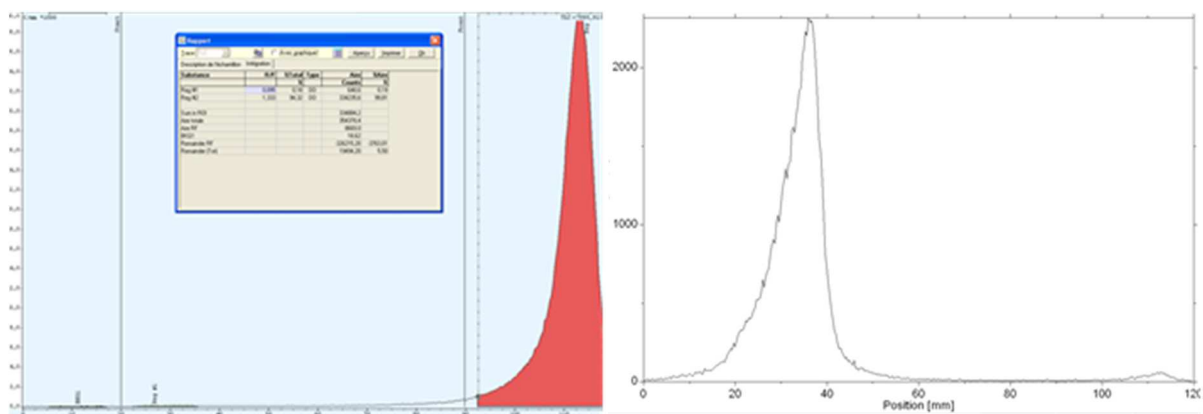


Figure 72 - Radiochromatogramme iTLC-SG de l'yttrium 90 libre (à gauche), du radiopeptide [⁹⁰Y-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4 à 37 MBq (à droite)

F.3.3. Efficacité du traitement de peptides CCK4 radiomarqués au ⁹⁰Y

Les résultats de suivi de la pousse tumorale ci-dessous montrent l'évolution du volume tumoral pour chacune des souris des 4 groupes constitués. Le jour correspondant à l'injection du traitement est représenté par un trait rouge. Les courbes correspondant au groupe de traitement des souris "NIH-3T3-E151A" sont similaires à celles du groupe contrôle. Il n'y a pas d'effet visible du traitement de RIV sur cette lignée cellulaire (fig. 73).

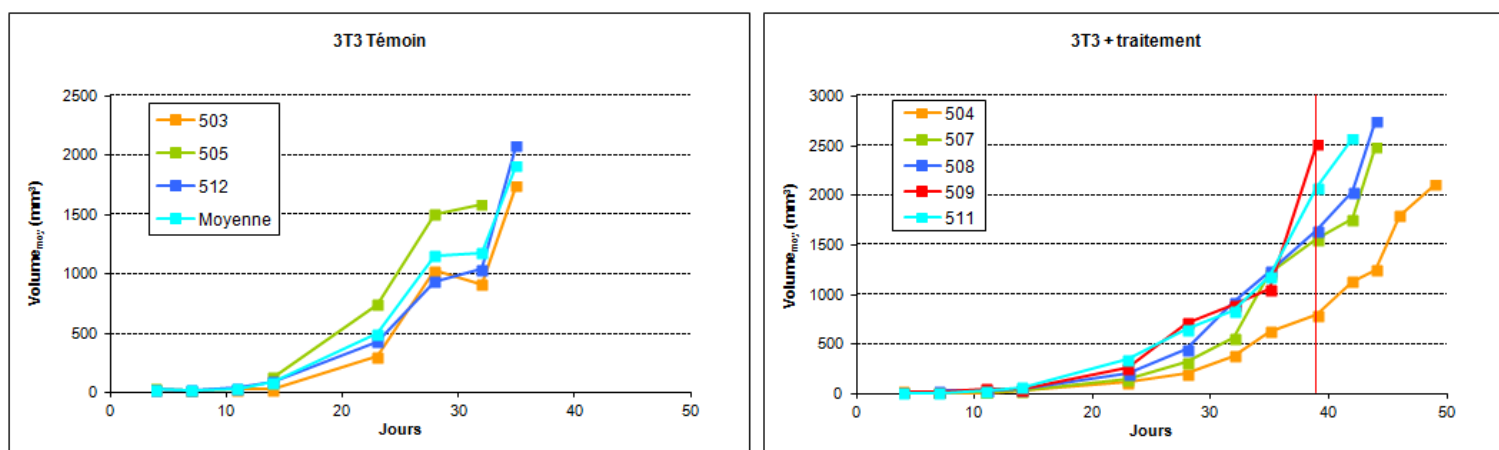


Figure 73 - Volume tumoral des groupes contrôle (à gauche) et traitement (à droite) pour les souris greffées NIH-3T3-E151A. Le jour d'administration du traitement à J39 est symbolisé par le repère rouge

Pour les souris greffées CMT-TT, l'effet antitumoral n'est pas observable sur les courbes. La souris identifiée n°502 a développé une tumeur d'une taille relativement faible vis-à-vis des autres individus, et aucune diminution du volume n'apparaît à la suite du traitement. La souris n°515 présente une

réduction importante du volume tumoral deux jours après l'injection du traitement. Cependant, l'état de santé de l'animal a rapidement décliné et il est décédé 5 jours après l'injection. La souris n°516 a développé une tumeur comparable à celle de l'individu témoin, mais aucun effet antitumoral du traitement n'est visible (fig. 74).

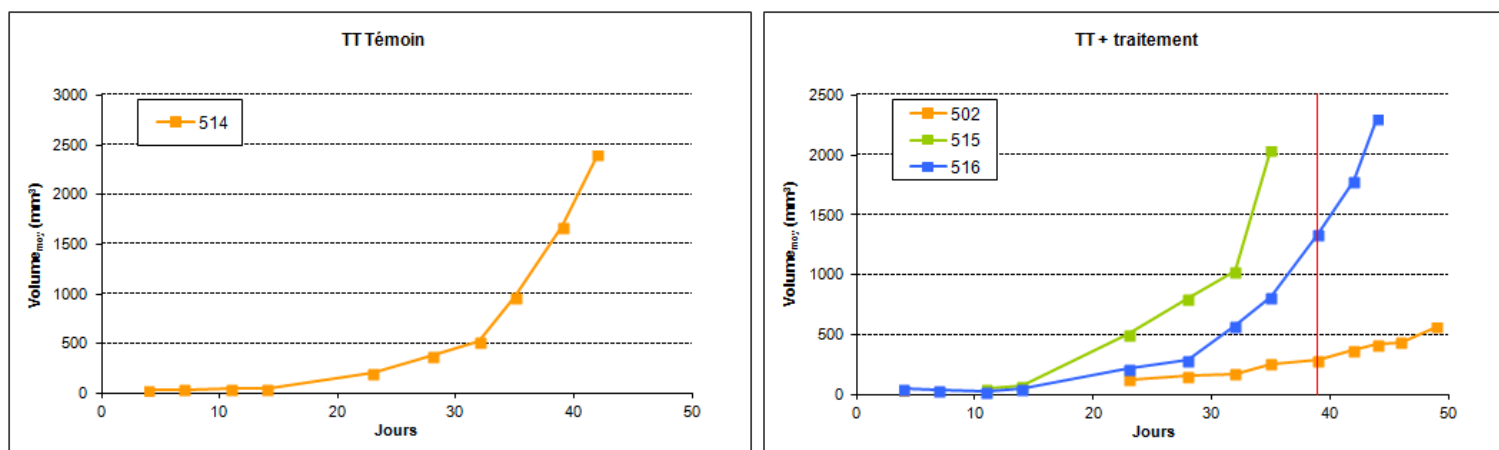


Figure 74 - Volume tumoral des groupes contrôle (à gauche) et traitement (à droite) pour les souris greffées CMT-TT
Le jour d'administration du traitement à J39 est symbolisé par le repère rouge

Un faible temps de doublement indique une activité oncogène importante. A l'inverse, un grand temps de doublement traduit une croissance et une évolution lente. Les résultats ci-dessous montrent un TD similaire entre les sujets témoins et les sujets traités pour les deux modèles tumoraux (tableau 10).

Souris	Lignée	V ₁	V ₂	T ₁	T ₂	TD	Taux de croissance (%/jour)
503	3T3 témoin	3335,5	7619,7	39	49	8,4	8,3
505		6601,9	11333,5	39	49	12,8	5,5
512		2994,5	6614,2	39	49	8,7	8,0
504	3T3 ⁹⁰ γ	797,0	2110,5	39	49	7,1	9,8
507		1559,4	4382,1	39	49	6,7	10,4
508		1650,5	5126,7	39	49	6,1	11,4
509		2515,8	5681,8	39	49	8,5	8,2
511		2078,0	5399,3	39	49	7,3	9,6
514	TT témoin	1676,2	4455,0	39	49	7,1	9,9
502	TT ⁹⁰ γ	290,4	567,9	39	49	10,3	6,8
515		2922,9	2103,0	39	44	-10,5	-6,6
516		1347,8	6214,6	39	49	4,5	15,4

Tableau 10 - Temps de doublement (TD) et taux de croissance tumoral après traitement au [⁹⁰Y-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4

F.4. Discussion

Cette étude avait pour but d'évaluer un premier traitement expérimental *in vivo* sur modèle murin à l'aide du peptide [⁹⁰Y-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4. Les résultats de pousse tumorale ont montré que la greffe des deux modèles tumoraux RCCK2 est possible chez la souris *Swiss Nude*. L'essai de radiothérapie interne vectorisée sur les groupes de souris constitués n'a pas permis de montrer l'effet antitumoral attendu. Les temps de doublement, identiques pour les groupes traités et les groupes non traités confirment les résultats de suivi de la pousse tumorale après injection du peptide radiomarqué. Plusieurs explications peuvent accompagner ces résultats : la première étant que le volume tumoral des greffes était trop élevé au jour de l'injection, avec de ce fait des tumeurs hypoxiques et relativement radorésistantes (présence d'un cœur nécrotique). L'effet de la radiothérapie à dose unique sur ce type de tumeur est connu pour être faible et diminué vis-à-vis de tumeurs de plus petites tailles. La seconde explication se trouve dans la qualité du radiomarquage du peptide à l'yttrium 90. Cette étude ayant été réalisée antérieurement à l'étude de radiomarquage, l'origine du nucléide utilisé pour cette expérience (*Cis Bio International*, France) étant différente de celle utilisée pour la mise au point du radiomarquage (*PerkinElmer*, USA), et les radiochromatogrammes obtenus n'ont pas permis de distinguer avec la même précision la migration de l'yttrium libre de la migration de l'yttrium complexé sur les bandelettes *iTLC-SG*. La stabilité des radiopeptides n'a pas été évaluée comme elle l'a été *a posteriori* dans l'étude de radiomarquage. Il n'est donc pas possible de conclure sur l'efficacité du traitement sur ces deux lignées RCCK2 positives.

Les perspectives de ce travail sont multiples. Lors des prochaines expérimentations sur l'animal, l'injection du traitement sera effectuée lorsque la taille de la tumeur est relativement faible, autour de 500 mm³. De plus, le traitement sera réalisé avec un radiopeptide dont l'intégrité et la stabilité auront été caractérisées et contrôlées, et dont l'origine est celle ayant donné les meilleurs résultats de pureté radiochimique. Enfin, un protocole complet d'expérimentation *in vivo* a été soumis au comité d'éthique pour de futures expérimentations animales. Ce dernier, étalé sur une durée de 3 ans, comporte notamment l'évaluation de traitement sur des groupes plus larges de souris (10 animaux par groupes), mais aussi les essais au ¹⁷⁷Lu et ⁹⁰Y seuls ou en synergie, à des doses radioactives variables. En outre, il intègre une association thérapeutique avec la dendrogénine A, et permettra d'évaluer l'effet de la DDA sur l'efficacité antitumorale de la RIV par le PCTA-(Ahx)₂-CCK4 radiomarqué. Afin de décrire l'effet radiobiologique selon les paramètres d'optimisation de la RIV (fractionnement / étalement des injections, administration séquentielle des doses, injection de co-traitement), ce protocole permettra de mettre en application des modifications selon ces paramètres mais aussi d'observer des résultats histologique et biologiques sur chaque expérience.

G. Discussion générale

Le développement depuis une trentaine d'années des solutions ciblées telles que les anticorps monoclonaux et les peptides radiomarqués a permis de mettre au point des molécules aujourd'hui intégrées aux protocoles utilisés en routine clinique, dans le diagnostic et le traitement de certains cancers. Les analogues peptidiques à la somatostatine (SST) radiomarqués à l'indium 111 sont une de ces solutions comme le montre l'utilisation de l'*Octreoscan*[™] dans une démarche diagnostique des tumeurs neuroendocrines SST-positives. Ces dernières années, ces mêmes solutions sont expérimentées à forte dose, une fois l'étape diagnostique validée, non plus afin d'imager mais de proposer un traitement des tumeurs ciblées. Cependant, l'utilisation de radionucléides tels que le ¹¹¹In, majoritairement ou exclusivement émetteurs de photons et d'électrons *Auger* n'est pas thérapeutiquement optimale. En effet, leur effet radiobiologique est limité vis-à-vis d'autres nucléides comme par exemple les émetteurs β ou α , dont les dégâts induits aux tissus ciblés sont importants. De nombreuses équipes de recherche ont donc développé et étudié des analogues de la somatostatine radiomarqués avec du ⁹⁰Y ou du ¹⁷⁷Lu émetteurs β de rayonnements de haute énergie, bien plus adaptés au contexte thérapeutique de la RIV. *Kwekkeboom et al.* ont montré que l'utilisation de nouveaux peptides tels que le ⁹⁰Y-DOTATOC, le ¹⁷⁷Lu-DOTATATE permettent d'augmenter l'effet antitumoral des cancers exprimant les récepteurs à la somatostatine [209]. Néanmoins, des limitations à l'utilisation des analogues de la somatostatine existent. La clairance majoritairement rénale des peptides entraîne une toxicité notable et impose un ajustement de l'activité maximale injectée en fonction de la dose absorbée par les reins. Malgré la surexpression des récepteurs à la somatostatine dans certains tissus tumoraux, ces derniers sont aussi présents dans les tissus sains, qui captent une partie de l'activité injectée et subissent des dommages. Enfin, certains cancers neuroendocriniens parmi les plus avancés en grade perdent l'expression des récepteurs et deviennent insensibles à la détection diagnostique et aux traitements ciblés de RIV [210]. Pour pallier les limites de la RIV ciblée sur les récepteurs à la somatostatine, de récents développements ont été réalisés sur des peptides ciblant d'autres récepteurs exprimés dans les tumeurs neuroendocrines ont été réalisés, afin de multiplier les portes d'entrée de la cellule tumorale.

Dans ce contexte, notre équipe a développé un ligand peptidique dont les performances diagnostiques ont été montrées par *Brillouet et al.* [89,146]. Les données obtenues *in vitro* (affinité avec le RCCK2, propriétés agonistes), et *in vivo* (augmentation de la fixation tumorale, diminution de la rétention rénale) avec ce ligand marqué à l'indium 111 confirment son intérêt dans le développement de nouveaux radioligands ciblant le récepteur RCCK2.

Dans ce travail, nous avons pu poursuivre le développement de ce ligand novateur dans le cadre thérapeutique et mettre en avant ses capacités de radiomarquage des radionucléides ^{90}Y et ^{177}Lu émetteurs β^- .

Alors que la plupart des protocoles de marquage exposés dans la littérature nécessitent de chauffer le milieu de réaction entre 80°C et 100°C pendant une heure afin que le nucléide et le chélateur se lient [153,193], nous avons montré que le ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4 permet la complexation de l'yttrium 90, du lutétium 177 ainsi que de l'indium 111 de manière rapide, stable dans le temps et à température ambiante. Plusieurs caractéristiques intéressantes émanent de ces résultats.

La première étant la facilité de création du complexe radionucléide-ligand dans des conditions cliniques : quand ils ne sont pas reçus et administrés encapsulés ou scellés, les traitements proposés aux patients sont élaborés dans le service de médecine nucléaire par la radiopharmacie. Le protocole d'élaboration du médicament radiopharmaceutique à partir du PCTA-(Ahx)₂-CCK4 est similaire à ce qui se fait pour le marquage du pentétréotide lyophilisé par le chlorure d'indium 111 pour former l'*Octreoscan*[™] : une incubation de 30 minutes à température ambiante après mélange des deux composés (*Base de données publique des médicaments – ANSM 2015*).

La seconde spécificité du ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4 est sa stabilité dans le temps, et dans des conditions physiologiques et de température proches de celle que l'on retrouve dans la circulation sanguine et les autres compartiments biologiques impliqués dans la biocinétique des peptides injectés. Nous avons montré qu'une fois radiomarkés, les peptides expérimentés dans cette étude sont stables dans un milieu protéolytique de sérum de veau fœtal, en présence d'un concurrent à la chélation – la transferrine humaine – et cela durant une longue incubation à 37°C. Au bout de 5h30, la stabilité des composés n'est pas altérée.

Ce procédé de marquage efficace, stable et ne nécessitant pas de purification *a posteriori* est une avancée certaine dans l'utilisation de peptides radiomarkés. L'étude répond à une problématique supplémentaire, détaillée en introduction, et qui impliquait jusqu'ici d'utiliser des molécules différentes pour les utilisations diagnostiques et les utilisations thérapeutiques. La possibilité de marquer efficacement le ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4 avec le ^{111}In (imagerie scintigraphique), ^{90}Y et ^{177}Lu répond à cette problématique.

Les études de dosimétrie en médecine nucléaire, qui utilisent la biodistribution des radionucléides de diagnostic comme données d'entrée des algorithmes de calcul *Monte Carlo*, nécessitent d'émettre l'hypothèse que les deux molécules différentes possèdent la même biodistribution [211,212]. L'intérêt d'une molécule unique pour un même protocole théranostique a été montré par *Taïeb D et al.* sur des analogues de la somatostatine [213]. Nous apportons ici une réponse à cette problématique avec un

ligand peptidique au caractère multimodal : cette "trivalence" en termes de rayonnements disponibles à partir d'un seul et même analogue peptidique implique une similitude certaine entre les biodistributions d'imagerie et de thérapie et permet de se limiter à l'hypothèse que le changement de radionucléide n'influe pas sur le comportement biocinétique du radiopharmaceutique.

Dans un second temps, nous avons mené une étude sur l'association thérapeutique entre la dendrogénine A (DDA) et la radiothérapie interne vectorisée dans le but de potentialiser l'effet radiobiologique des rayonnements. Les essais de mort cellulaire sur les lignées RCCK2-positives ont montré un effet cytotoxique de la DDA proportionnel à la concentration administrée aux cellules *in vitro*. Une dose efficace menant à la mort d'environ 50 % des cellules (EC_{50}) est quantifiée à 5 μ M de DDA pour la lignée NIH-3T3-E151A et à 2,5 μ M pour la lignée CMT-TT. En deçà de ces concentrations, la DDA n'a pas d'effet cytotoxique majeur, ce qui signifie que le composé n'agit pas en tant que poison sur les cellules, qu'elles soient saines ou tumorales.

En parallèle, l'étude de la voie de signalisation *Notch* dans les CMT et dont le rôle antitumoral a été montré par *Jaskula-Sztul et al.*, *Tesfazgui et al.* ou encore *Kunnimalaiyaan et al.* [174,179,182], a nécessité d'établir un protocole de *Western Blot* adapté à la visualisation de protéines de fort poids moléculaire, supérieur à 250 kDa, et spécifiques à la voie de signalisation *Notch*. Cette étape de mise au point à partir des données de la littérature a été rendue réalisable après de nombreux essais. Les résultats obtenus sur les récepteurs *Notch-1* montrent un effet de réexpression de la voie de signalisation pour la lignée NIH-3T3-E151A à la concentration 5 μ M de DDA, c'est-à-dire à l' EC_{50} . Aucun effet de la DDA sur le récepteur *Notch-1* n'a pu être montré pour la lignée CMT-TT. L'expérience menée sur le récepteur *Notch-3* a montré une augmentation de l'expression de la voie de signalisation à 5 μ M de DDA pour la lignée NIH-3T3-E151A, et à 1 μ M pour la lignée CMT-TT. Ce dernier résultat est le plus intéressant de l'étude. En effet, les études citées ont démontré le potentiel antitumoral de la voie *Notch* via le récepteur *Notch-3* par une action antiproliférative induisant l'apoptose des cellules traitées [182], ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire via l'expression d'inhibiteurs *p21* et *p27* [170,180]. Nous montrons dans cette étude qu'une réactivation de la voie *Notch* est possible à une dose non-cytotoxique pour les cellules (1 μ M).

De plus, la mise au point d'un protocole de *Western Blot* à partir des recommandations du fournisseur d'anticorps et dédié à l'expression des récepteurs membranaires RCCK2 a permis de d'évaluer l'effet de la DDA sur ces derniers. L'idée derrière cette expérience est de valider le fait que la différenciation induite par la DDA sur les lignées tumorales, et qui régule de nombreuses fonctions cellulaires dont l'expression de certaines voies de signalisation, n'a pas d'effet délétère sur la présence des récepteurs

RCCK2 à la surface des membranes plasmiques pouvant entraîner l'échec du ciblage tumoral en RIV. Les résultats montrent, pour la lignée NIH-3T3-E151A, une diminution progressive de l'expression de RCCK2 atteignant 75 % du niveau d'expression pour de l'échantillon contrôle à 5 μ M. Ceci peut s'expliquer par la dégradation des protéines présentes dans les cellules tuées par le traitement. Cependant, cette possible dégradation n'est pas retrouvée lors de l'expérience sur la lignée CMT-TT, pour laquelle l'expression de RCCK2 est élevée, constante et égale à celle de l'échantillon contrôle pour chaque concentration de DDA, y compris pour 5 μ M. À travers cette étude, nous avons pu montrer que les récepteurs RCCK2 sont effectivement présents sur les deux lignées RCCK2-positives aux concentrations de DDA expérimentées, et que le traitement concomitant ne met pas en péril le ciblage des récepteurs membranaires par les peptides radiomarqués.

En définitive, ce travail permet d'établir un concept de traitement concomitant à la radiothérapie interne vectorisée basé sur la dendrogénine A. Son effet antitumoral via l'activation de la voie de signalisation *Notch* par l'expression des récepteurs *Notch-3*, elle-même responsable de la diminution de la prolifération et de l'arrêt du cycle cellulaire de la lignée CMT-TT, est possible à une dose non-cytotoxique de 1 μ M correspondant aux doses antitumorales étudiées par notre équipe sur d'autres types de cancer [167]. Cet effet antitumoral doit permettre la diminution de la pousse tumorale lors d'expérimentations chez l'animal xéno greffé, augmentant de ce fait la radiosensibilité globale des tumeurs et l'effet radiobiologique de la RIV.

La dernière étude de ce travail a porté sur une première expérimentation *in vivo* sur un modèle de souris xéno greffées. Cette étude a été réalisée chronologiquement avant les études de radiomarquage et d'association thérapeutique. Après une étude de la pousse tumorale spécifique aux deux lignées RCCK2-positives NIH-3T3-E151A et CMT-TT, le ligand peptidique PCTA-(Ahx)₂-CCK4 radiomarqué au ⁹⁰Y a été injecté à plusieurs groupes de souris après une prise en greffe des deux lignées. L'effet antitumoral attendu n'a pas été retrouvé dans les différents résultats, que ce soit sur l'évolution du volume des tumeurs greffées, ou bien sur leur temps de doublement ou leur taux de croissance.

Deux explications sont possibles pour expliquer cette absence d'effet antitumoral. La première est un volume tumoral trop élevée lors de l'injection du radioligand pour que ce dernier ait un quelconque effet toxique visible. En effet, les tumeurs de grande taille présentent un cœur nécrotique hypoxique fortement radiorésistant, au sein duquel l'effet oxygène en grande partie responsable de la mort cellulaire est faible voire inexistant. La seconde explication vient de la qualité relative du radiomarquage du peptide injecté. En effet, un changement temporaire du fournisseur d'yttrium 90 a

été opéré pour cette expérience. Le contrôle qualité réalisé par chromatographie sur couche mince a montré une migration de l'yttrium libre différente de celle attendue, avec un étalement du pic de migration plus grand. De ce fait, et malgré un pic de marquage fin correspondant à l'yttrium complexé présent au dépôt, il a été difficile de distinguer les deux pics aussi clairement que pour les autres études de marquage présentées dans ce travail. Ainsi, l'activité injectée aux souris a pu être apportée par une quantité d'yttrium libre non-négligeable, et dont la vectorisation dans les cellules ciblées n'a pas été possible, diminuant de ce fait l'effet du traitement par une élimination physiologique très rapide. De même, et malgré les essais concluants de stabilité réalisés *a posteriori* sur ce même ligand peptidique, il est possible que le radiopharmaceutique injecté ait été dégradé au cours de la cinétique de ciblage.

Ocak et al. ont montré grâce à une technique de chromatographie HPLC (*high-performance liquid chromatography*) que les analogues à la gastrine/cholécystokinine développés au cours des essais du groupement *EuroCOST* et ciblant le RCCK2 présentaient tous un ou plusieurs sites de clivage sur leur chaîne peptidique [83]. Ces clivages peuvent entraîner une perte de fonctionnalité et une destruction du radiopharmaceutique le rendant totalement inefficace. Nous avons montré la stabilité de la complexation chélateur-radionucléide, et il serait intéressant de mener une étude similaire sur les sites de clivages potentiels de notre ligand CCK4, en effet la modélisation *in silico* mise au point par *Brillouet et al.* (plus petit analogue peptidique de la cholécystokinine induisant l'internalisation du radioligand) doit permettre une forte stabilité en conditions physiologiques en diminuant les potentiels sites de clivage peptidique [146].

H. Conclusion et perspectives

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Afin de poursuivre le développement du ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4, et compte tenu de son fort potentiel de complexation de métaux, des essais de marquage à l'aide nouveaux nucléides d'intérêt sont envisagés. Ainsi, des radioligands marqués au gallium 68, émetteur β^+ utilisé en tomographie par émission de positons (TEP), sont déjà expérimenté en clinique pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines exprimant les récepteurs à la somatostatine, comme le ⁶⁸Ga-DOTA-NOC [214]. Leur développement permet l'amélioration du diagnostic scintigraphique, comme l'ont notamment montré *Lococo et al.* sur des patients atteints de carcinomes pulmonaires [215], *Sharma et al.* sur des insulinomes [216] ou encore *Breer et al.* sur des tumeurs non-détectées à la scintigraphie au ¹¹¹In-octreotide [217].

Dans le but de multiplier les capacités du ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4, le marquage d'atomes non-radioactifs à but diagnostique est une étude intéressante à réaliser, de manière similaires à celles décrites pour le ⁹⁰Y et le ¹⁷⁷Lu. Récemment, plusieurs études ont mis en avant l'intérêt des lanthanides tels que l'euporium et le terbium pour l'imagerie de luminescence [218]. Ces fluorochromes naturels présentent la caractéristique d'émettre un signal lumineux spécifique lorsqu'ils reçoivent et emmagasinent une énergie de source externe. Typiquement, les ces lanthanides fluorochromes sont excités par un rayonnement laser défini de 380 nm et réémettent cette énergie à des longueurs d'onde et selon des durées d'émissions qui leur sont propres, que l'on peut détecter et quantifier [219].

Cette particularité est dénommée "*transfert d'énergie par résonance de type Förster*" (*FRET*). Ce transfert est un échange d'énergie non-radiatif à partir d'une molécule de type "donneur" vers une molécule ou un atome "récepteur" situé à une distance de 10 à 100 Å. Pour que ce transfert s'opère, il est nécessaire que le spectre d'émission du donneur recouvre au moins partiellement le spectre d'absorption du récepteur [220]. La technique de *FRET* a pu être améliorée du point de vue de la sensibilité de détection de luminescence par l'utilisation de chromophores de type cryptands ou chélateurs (dont font partie le DOTA, le BPCA et le PCTA étudiés dans ce travail) et complexant ces lanthanides. Ainsi associés à un cation d'euporium (*Eu(III)*) ou de terbium (*Tb(III)*), les chélateurs jouent le rôle d'antenne de la molécule et captent l'énergie incidente via leurs fonctions cycliques pyridine, bipyridine, terpyridine, salicylate, phénantroline ou encore pyrazole [221]. La proximité avec le lanthanide complexé autorise le transfert d'énergie et l'émission de luminescence.

Ainsi en 2014, *Laurent et al.* ont mis en avant les capacités d'imageries optique de plusieurs complexes présentant une fonction pyridine avec le terbium, mais aussi en imagerie par résonance magnétique (IRM) avec le gadolinium (*Gd(III)*) [222]. Ce nucléide possède des propriétés paramagnétiques qui lui permettent une interaction magnétique forte avec les protons de l'eau, et qui en font une espèce de choix pour accélérer la relaxation nucléaire en IRM [223]. Ces travaux ont été approfondis en 2016 par *Leygue et al.*, qui ont étudié les propriétés d'un système basé sur un ligand acyclique bipyridine [224].

En 2014 toujours, l'équipe du laboratoire SPCMIB qui a synthétisé les ligands et notamment l'analogue PCTA-(Ahx)₂-CCK4, a évalué les propriétés photophysiques des complexes formés avec le terbium et l'euporium, ainsi que la relaxivité du complexe de gadolinium. Il en ressort que les complexes fluorochromes ont une durée de vie d'émission suffisamment grandes pour envisager une utilisation en fluorescence *FRET* en temps résolu. De même, la relaxivité du complexe au Gd(III), due au nombre de molécules d'eau présentes dans la sphère de coordination du métal, est supérieure à celle des agents de contrastes utilisés en analyse clinique (*Magnevist™* et *Dotarem™*). Ces caractéristiques laissent entrevoir des perspectives d'études précliniques d'imagerie de fluorescence et de RMN avec le ligand PCTA-(Ahx)₂-CCK4.

Les résultats sur la voie de signalisation *Notch* ont donné un premier aperçu du fonctionnement de la DDA. Afin de quantifier au mieux les niveaux d'expressions obtenus pour les protéines *Notch-1* et *Notch-3*, l'utilisation de nouveaux anticorps plus qualitatifs provenant d'un nouveau fournisseur pourra confirmer les effets de la DDA décrits sur les lignées cellulaires NIH-3T3-E151A et CMT-TT. L'évaluation de l'expression d'autres marqueurs tumoraux propres aux lignées CMT-TT comme la chromogranine A (CgA) et l'*achaete-scute complex-like 1* (ASCL1) mis en avant par *Jaskula-Sztul et al.* et *Tesfazghi et al.* est une expérience intéressante à mener à la suite d'un traitement à la dendrogénine A des lignées étudiées [179,182].

Les essais d'expérimentation animale n'ont pas donné les résultats attendus. Afin d'investiguer sur l'utilisation *in vivo* de ce radioligand novateur "trivalent", un nouveau protocole d'expérimentation animale sur un modèle de souris *Swiss Nude* de plusieurs centaines d'animaux a été soumis au comité d'éthique dans le courant de l'année 2016. Les objectifs expérimentaux présentés dans ce protocole sont multiples :

- évaluer l'effet du traitement RIV sur la pousse tumorale, dans deux modèles cellulaires surexprimant les récepteurs RCCK2.
- déterminer la réponse au traitement en fonction du radionucléide utilisé, seul ou de manière combinée (yttrium 90 et/ou lutétium 177) comparé à un traitement contrôle (solvant).

Ces deux étapes auront pour but de tester différents protocoles de traitement basés sur les peptides [⁹⁰Y-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4 et [¹⁷⁷Lu-PCTA]-(Ahx)₂-CCK4 injectés seuls ou en synergie, et à des activités et des temps différentes. Dans un premier temps, plusieurs groupes de 10 souris seront constitués afin d'estimer plus précisément les effets physiologiques des rayonnements en injectant des doses d'activités croissantes jusqu'à la dose maximale tolérée, mais aussi afin de quantifier la toxicité liée à ces injections, notamment au niveau hématologique et rénal. Dans un second temps, les tumeurs RCCK2-positives seront xéno greffées à de nouveaux groupes de souris, qui subiront les protocoles de traitement. L'effet antitumoral des traitements sera évalué comme présenté précédemment, à travers un suivi de la mesure du volume des tumeurs.

- estimer les rapports de fixation et de dose entre les tissus tumoraux et les tissus sains, notamment le rein, le foie, l'estomac.

Comme l'ont fait *Brillouet et al.* afin de caractériser la distribution biologique des peptides injectés au sein des organes d'intérêt, le sacrifice des animaux permettra le comptage de l'activité radiologique à différents temps dans les tumeurs, les reins, le foie, l'intestin, le sang, la rate, la vésicule biliaire, etc. [89]. Les résultats obtenus permettront de mettre en avant les deux caractéristiques les plus intéressantes dans l'évaluation des traitements de RIV, à savoir le ratio de fixation tumeur/non-tumeur (muscle, estomac, rein) et la fixation rénale.

- évaluer l'effet de la dendrogénine A (DDA) sur la pousse tumorale

Cette étude, menée sur des groupes de souris indépendants des premiers, permettra de quantifier la potentialisation d'un traitement concomitant de dendrogénine A sur les effets radiobiologiques de la RIV. Le traitement de peptide radiomarqué ayant montré l'efficacité antitumorale la plus importante sur les groupes de souris précédents sera employé dans le but de proposer un protocole d'association thérapeutique intéressant. Un groupe contrôle recevant le traitement RIV permettra de comparer les résultats obtenus avec les groupes ayant reçu des traitements DDA différents en terme de chronologie d'injection et de dose.

Références

1. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **2016**, *66*, 7–30.
2. De Angelis, R.; Sant, M.; Coleman, M. P.; Francisci, S.; Baili, P.; Pierannunzio, D.; Trama, A.; Visser, O.; Brenner, H.; Ardanaz, E.; Bielska-Lasota, M.; Engholm, G.; Nennecke, A.; Siesling, S.; Berrino, F.; Capocaccia, R.; EURO CARE-5 Working Group Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 23–34.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
4. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
5. 9780781771535: Step-Up to Medicine (Step-Up Series) - AbeBooks - Agabegi MD, Steven S.; Agabegi MD, Elizabeth D.: 0781771536 <https://www.abebooks.com/9780781771535/Step-Up-Medicine-Series-Agabegi-Steven-0781771536/plp> (accessed Dec 19, 2016).
6. Asgharian, B.; Turner, M. L.; Gibril, F.; Entsuah, L. K.; Serrano, J.; Jensen, R. T. Cutaneous tumors in patients with multiple endocrine neoplasm type 1 (MEN1) and gastrinomas: prospective study of frequency and development of criteria with high sensitivity and specificity for MEN1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 5328–5336.
7. Cives, M.; Strosberg, J. An update on gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncol. Williston Park N* **2014**, *28*, 749–756, 758.
8. ISBN 9789242545340 - Classification internationale des maladies pour l'oncologie (CIM-O-3) (French Ed | upcitemdb.com <http://www.upcitemdb.com/upc/9789242545340> (accessed Dec 19, 2016).
9. Yao, J. C.; Hassan, M.; Phan, A.; Dagohoy, C.; Leary, C.; Mares, J. E.; Abdalla, E. K.; Fleming, J. B.; Vauthey, J.-N.; Rashid, A.; Evans, D. B. One Hundred Years After “Carcinoid”: Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3063–3072.
10. Müller, E. E.; Locatelli, V.; Cocchi, D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 511–607.
11. Crowley, W. R. Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. *Compr. Physiol.* **2015**, *5*, 255–291.
12. Liu, Y.; Lu, D.; Zhang, Y.; Li, S.; Liu, X.; Lin, H. The evolution of somatostatin in vertebrates. *Gene* **2010**, *463*, 21–28.
13. Kwekkeboom, D. J.; Kam, B. L.; van Essen, M.; Teunissen, J. J. M.; van Eijck, C. H. J.; Valkema, R.; de Jong, M.; de Herder, W. W.; Krenning, E. P. Somatostatin-receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **2010**, *17*, R53-73.
14. De Jong, M.; Valkema, R.; Jamar, F.; Kvols, L. K.; Kwekkeboom, D. J.; Breeman, W. A. P.; Bakker, W. H.; Smith, C.; Pauwels, S.; Krenning, E. P. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32*, 133–140.

15. Virgolini, I.; Britton, K.; Buscombe, J.; Moncayo, R.; Paganelli, G.; Riva, P. In- and Y-DOTA-*lanreotide*: results and implications of the MAURITIUS trial. *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32*, 148–155.
16. Rehfeld, J. F. Four basic characteristics of the gastrin-cholecystokinin system. *Am. J. Physiol.* **1981**, *240*, G255-266.
17. Rehfeld, J. F.; Friis-Hansen, L.; Goetze, J. P.; Hansen, T. V. O. The biology of cholecystokinin and gastrin peptides. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1154–1165.
18. Roach, P. J.; Schembri, G. P.; Ho Shon, I. A.; Bailey, E. A.; Bailey, D. L. SPECT/CT imaging using a spiral CT scanner for anatomical localization: Impact on diagnostic accuracy and reporter confidence in clinical practice. *Nucl. Med. Commun.* **2006**, *27*, 977–987.
19. Röntgen, W. C. On a New Kind of Rays. *Science* **1896**, *3*, 227–231.
20. 0071423087 - Introduction to Health Physics: Fourth Edition by Cember, Herman; Johnson, Thomas - AbeBooks <https://www.abebooks.com/book-search/isbn/0071423087/> (accessed Dec 19, 2016).
21. Rutherford, E. Uranium radiation and the electrical conduction produced by it. *Philos. Mag.* 1899.
22. IAEA, N. D. S. *Livechart of Nuclides*; 2016.
23. Blanc, D. *Precis de physique nucléaire : Premier et deuxième cycle, école d'ingénieurs, 2e édition.*
24. Pouget, J.-P.; Navarro-Teulon, I.; Bardiès, M.; Chouin, N.; Cartron, G.; Pèlerin, A.; Azria, D. Clinical radioimmunotherapy—the role of radiobiology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 720–734.
25. Sigmund, P. *Particle Penetration and Radiation Effects: General Aspects and Stopping of Swift Point Charges* Springer (accessed Dec 20, 2016).
26. Hall, E. J.; Giaccia, A. J. *Radiobiology for the Radiologist*; Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
27. Behr, T. M.; Béhé, M.; Stabin, M. G.; Wehrmann, E.; Apostolidis, C.; Molinet, R.; Strutz, F.; Fayyazi, A.; Wieland, E.; Gratz, S.; Koch, L.; Goldenberg, D. M.; Becker, W. High-Linear Energy Transfer (LET) α versus Low-LET β Emitters in Radioimmunotherapy of Solid Tumors: Therapeutic Efficacy and Dose-limiting Toxicity of ^{213}Bi - versus $^{90\text{Y}}$ -labeled CO17-1A Fab' Fragments in a Human Colonic Cancer Model. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2635–2643.
28. Sastry, K. S. Biological effects of the Auger emitter iodine-125: a review. Report No. 1 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med. Phys.* **1992**, *19*, 1361–1370.
29. Nayak, T. K.; Norenberg, J. P.; Anderson, T. L.; Prossnitz, E. R.; Stabin, M. G.; Atcher, R. W. Somatostatin-receptor-targeted alpha-emitting ^{213}Bi is therapeutically more effective than beta(-)-emitting ^{177}Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 185–193.
30. Miederer, M.; Henriksen, G.; Alke, A.; Mossbrugger, I.; Quintanilla-Martinez, L.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Essler, M. Preclinical evaluation of the alpha-particle generator nuclide ^{225}Ac for somatostatin receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3555–3561.

31. Kim, Y.-S.; Brechbiel, M. W. An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2012**, *33*, 573–590.
32. PhD, E. L. T. B. M. *Primer Of Medical Radiobiology, 2e*; 2 edition.; Mosby: Chicago, 1989.
33. ICRP: ICRP Publication 92.
34. Elsevier: Principles and Practice of Radiation Therapy, 4th Edition: Washington & Leaver.
35. ICRP: ICRP Publication 103.
36. Preston, D. L.; Shimizu, Y.; Pierce, D. A.; Suyama, A.; Mabuchi, K. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. 2003. *Radiat. Res.* **2012**, *178*, AV146-172.
37. Newhauser, W. D.; Berrington de Gonzalez, A.; Schulte, R.; Lee, C. A Review of Radiotherapy-Induced Late Effects Research after Advanced Technology Treatments. *Front. Oncol.* **2016**, *6*, 13.
38. Suit, H.; Goldberg, S.; Niemierko, A.; Ancukiewicz, M.; Hall, E.; Goitein, M.; Wong, W.; Paganetti, H. Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: a review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects. *Radiat. Res.* **2007**, *167*, 12–42.
39. Tubiana, M. Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2009**, *91*, 4-15–3.
40. Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **1991**, *13*, 641–648.
41. Hennequin, C.; Quero, L.; Favaudon, V. [DNA repair and tumour radiosensitivity: focus on ATM gene]. *Bull. Cancer (Paris)* **2011**, *98*, 239–246.
42. Valerie, K.; Povirk, L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **2003**, *22*, 5792–5812.
43. Böglér, O.; Weller, M. Apoptosis in gliomas, and its role in their current and future treatment. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2002**, *7*, e339-353.
44. Prise, K. M.; O’Sullivan, J. M. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 351–360.
45. Havaki, S.; Kotsinas, A.; Chronopoulos, E.; Kletsas, D.; Georgakilas, A.; Gorgoulis, V. G. The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 43–51.
46. Kumar, C.; Shetake, N.; Desai, S.; Kumar, A.; Samuel, G.; Pandey, B. N. Relevance of radiobiological concepts in radionuclide therapy of cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 173–186.
47. Boyd, M.; Ross, S. C.; Dorrens, J.; Fullerton, N. E.; Tan, K. W.; Zalutsky, M. R.; Mairs, R. J. Radiation-induced biologic bystander effect elicited in vitro by targeted radiopharmaceuticals labeled with alpha-, beta-, and auger electron-emitting radionuclides. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1007–1015.

48. Mairs, R. J.; Boyd, M. Optimizing MIBG therapy of neuroendocrine tumors: preclinical evidence of dose maximization and synergy. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35 Suppl 1*, S9-20.
49. Mairs, R. J.; Boyd, M. Preclinical Assessment of Strategies for Enhancement of Metaiodobenzylguanidine Therapy of Neuroendocrine Tumors. *Semin. Nucl. Med.* **2011**, *41*, 334–344.
50. Kingsley, D. P. An interesting case of possible abscopal effect in malignant melanoma. *Br. J. Radiol.* **1975**, *48*, 863–866.
51. Robin, H. I.; AuBuchon, J.; Varanasi, V. R.; Weinstein, A. B. The abscopal effect: demonstration in lymphomatous involvement of kidneys. *Med. Pediatr. Oncol.* **1981**, *9*, 473–476.
52. Wersäll, P. J.; Blomgren, H.; Pisa, P.; Lax, I.; Kälkner, K.-M.; Svedman, C. Regression of non-irradiated metastases after extracranial stereotactic radiotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **2006**, *45*, 493–497.
53. Postow, M. A.; Callahan, M. K.; Barker, C. A.; Yamada, Y.; Yuan, J.; Kitano, S.; Mu, Z.; Rasalan, T.; Adamow, M.; Ritter, E.; Sedrak, C.; Jungbluth, A. A.; Chua, R.; Yang, A. S.; Roman, R.-A.; Rosner, S.; Benson, B.; Allison, J. P.; Lesokhin, A. M.; Gnjjatic, S.; Wolchok, J. D. Immunologic Correlates of the Abscopal Effect in a Patient with Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 925–931.
54. Frey, B.; Rubner, Y.; Wunderlich, R.; Weiss, E.-M.; Pockley, A. G.; Fietkau, R.; Gaipl, U. S. Induction of abscopal anti-tumor immunity and immunogenic tumor cell death by ionizing irradiation - implications for cancer therapies. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1751–1764.
55. Grimaldi, A. M.; Simeone, E.; Giannarelli, D.; Muto, P.; Falivene, S.; Borzillo, V.; Giugliano, F. M.; Sandomenico, F.; Petrillo, A.; Curvietto, M.; Esposito, A.; Paone, M.; Palla, M.; Palmieri, G.; Caracò, C.; Ciliberto, G.; Mozzillo, N.; Ascierto, P. A. Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy. *Oncoimmunology* **2014**, *3*, e28780.
56. Multhoff, G.; Gaipl, U. S.; Niedermann, G. [The role of radiotherapy in the induction of antitumor immune responses]. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft AI* **2012**, *188 Suppl 3*, 312–315.
57. Gameiro, S. R.; Ardiani, A.; Kwilas, A.; Hodge, J. W. Radiation-induced survival responses promote immunogenic modulation to enhance immunotherapy in combinatorial regimens. *Oncoimmunology* **2014**, *3*, e28643.
58. Deloch, L.; Derer, A.; Hartmann, J.; Frey, B.; Fietkau, R.; Gaipl, U. S. Modern Radiotherapy Concepts and the Impact of Radiation on Immune Activation. *Front. Oncol.* **2016**, *6*, 141.
59. Fowler, J. F. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **1989**, *62*, 679–694.
60. Andisheh, B.; Edgren, M.; Belkić, D.; Mavroidis, P.; Brahme, A.; Lind, B. K. A comparative analysis of radiobiological models for cell surviving fractions at high doses. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2013**, *12*, 183–192.
61. Guerrero, M.; Carlone, M. Mechanistic formulation of a lineal-quadratic-linear (LQL) model: split-dose experiments and exponentially decaying sources. *Med. Phys.* **2010**, *37*, 4173–4181.

62. Hall, E. J.; Brown, J. M.; Cavanagh, J. Radiosensitivity and the oxygen effect measured at different phases of the mitotic cycle using synchronously dividing cells of the root meristem of *Vicia faba*. *Radiat. Res.* **1968**, *35*, 622–634.
63. Gravina, G. L.; Festuccia, C.; Marampon, F.; Popov, V. M.; Pestell, R. G.; Zani, B. M.; Tombolini, V. Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 305.
64. Suh, J. H.; Stea, B.; Nabid, A.; Kresl, J. J.; Fortin, A.; Mercier, J.-P.; Senzer, N.; Chang, E. L.; Boyd, A. P.; Cagnoni, P. J.; Shaw, E. Phase III study of efaproxiral as an adjunct to whole-brain radiation therapy for brain metastases. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 106–114.
65. Dumont, F.; Altmeyer, A.; Bischoff, P. Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: novel molecularly targeted approaches. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 775–799.
66. Lindén, O.; Hindorf, C.; Cavallin-Ståhl, E.; Wegener, W. A.; Goldenberg, D. M.; Horne, H.; Ohlsson, T.; Stenberg, L.; Strand, S.-E.; Tennvall, J. Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTA-conjugated, 90Y-radiolabeled, humanized anti-CD22 monoclonal antibody, epratuzumab. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2005**, *11*, 5215–5222.
67. DeNardo, G.; DeNardo, S. Dose intensified molecular targeted radiotherapy for cancer-lymphoma as a paradigm. *Semin. Nucl. Med.* **2010**, *40*, 136–144.
68. Bodei, L.; Cremonesi, M.; Grana, C. M.; Fazio, N.; Iodice, S.; Baio, S. M.; Bartolomei, M.; Lombardo, D.; Ferrari, M. E.; Sansovini, M.; Chinol, M.; Paganelli, G. Peptide receptor radionuclide therapy with ¹⁷⁷Lu-DOTATATE: the IEO phase I-II study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 2125–2135.
69. Liu, D.; Balkin, E. R.; Jia, F.; Ruthengael, V. C.; Smith, C. J.; Lewis, M. R. Targeted antisense radiotherapy and dose fractionation using a (177)Lu-labeled anti-bcl-2 peptide nucleic acid-peptide conjugate. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42*, 704–710.
70. Martinive, P.; Defresne, F.; Bouzin, C.; Saliez, J.; Lair, F.; Grégoire, V.; Michiels, C.; Dessy, C.; Feron, O. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11736–11744.
71. Begg, A. C.; Haustermans, K.; Hart, A. A.; Dische, S.; Saunders, M.; Zackrisson, B.; Gustaffson, H.; Coucke, P.; Paschoud, N.; Hoyer, M.; Overgaard, J.; Antognoni, P.; Richetti, A.; Bourhis, J.; Bartelink, H.; Horiot, J. C.; Corvo, R.; Giaretti, W.; Awwad, H.; Shouman, T.; Jouffroy, T.; Maciorowski, Z.; Dobrowsky, W.; Struikmans, H.; Wilson, G. D. The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1999**, *50*, 13–23.
72. Enger, S. A.; Hartman, T.; Carlsson, J.; Lundqvist, H. Cross-fire doses from β -emitting radionuclides in targeted radiotherapy. A theoretical study based on experimentally measured tumor characteristics. *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53*, 1909.
73. Mairs, R. J.; Fullerton, N. E.; Zalutsky, M. R.; Boyd, M. Targeted radiotherapy: microgray doses and the bystander effect. *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.* **2007**, *5*, 204–213.
74. Mairs, R. J.; Boyd, M. Targeting Radiotherapy to Cancer by Gene Transfer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, *2003*, 102–109.

75. Kassis, A. I. Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. *Semin. Nucl. Med.* **2008**, *38*, 358–366.
76. Dale, R.; Carabe-Fernandez, A. The Radiobiology of Conventional Radiotherapy and Its Application to Radionuclide Therapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2005**, *20*, 47–51.
77. Press, O. W.; Rasey, J. Principles of radioimmunotherapy for hematologists and oncologists. *Semin. Oncol.* **2000**, *27*, 62–73.
78. Fang, D.; Nguyen, T. K.; Leishear, K.; Finko, R.; Kulp, A. N.; Hotz, S.; Belle, P. A. V.; Xu, X.; Elder, D. E.; Herlyn, M. A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9328–9337.
79. Chatalic, K. L. S.; Kwekkeboom, D. J.; Jong, M. de Radiopeptides for Imaging and Therapy: A Radiant Future. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 1809–1812.
80. Mariani, G.; Erba, P. A.; Signore, A. Receptor-mediated tumor targeting with radiolabeled peptides: there is more to it than somatostatin analogs. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1904–1907.
81. van Essen, M.; Krenning, E. P.; Kam, B. L. R.; de Jong, M.; Valkema, R.; Kwekkeboom, D. J. Peptide-receptor radionuclide therapy for endocrine tumors. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2009**, *5*, 382–393.
82. Velikyan, I. Prospective of ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics* **2013**, *4*, 47–80.
83. Ocak, M.; Helbok, A.; Rangger, C.; Peitl, P. K.; Nock, B. A.; Morelli, G.; Eek, A.; Sosabowski, J. K.; Breeman, W. A. P.; Reubi, J. C.; Decristoforo, C. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 1426–1435.
84. Aloj, L.; Aurilio, M.; Rinaldi, V.; D’ambrosio, L.; Tesauro, D.; Peitl, P. K.; Maina, T.; Mansi, R.; Guggenberg, E. von; Joosten, L.; Sosabowski, J. K.; Breeman, W. A. P.; Blois, E. D.; Koelewijn, S.; Melis, M.; Waser, B.; Beetschen, K.; Reubi, J. C.; Jong, M. de Comparison of the binding and internalization properties of 12 DOTA-coupled and ¹¹¹In-labelled CCK2/gastrin receptor binding peptides: a collaborative project under COST Action BM0607. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 1417–1425.
85. Melis, M.; Krenning, E. P.; Bernard, B. F.; Barone, R.; Visser, T. J.; de Jong, M. Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32*, 1136–1143.
86. Verroust, P. J.; Christensen, E. I. Megalin and cubilin--the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **2002**, *17*, 1867–1871.
87. de Jong, M.; Breeman, W. A. P.; Valkema, R.; Bernard, B. F.; Krenning, E. P. Combination radionuclide therapy using ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-labeled somatostatin analogs. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2005**, *46 Suppl 1*, 13S–7S.
88. Laverman, P.; Joosten, L.; Eek, A.; Roosenburg, S.; Peitl, P. K.; Maina, T.; Mäcke, H.; Aloj, L.; von Guggenberg, E.; Sosabowski, J. K.; de Jong, M.; Reubi, J.-C.; Oyen, W. J. G.; Boerman, O. C. Comparative

biodistribution of ^{111}In -labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 1410–1416.

89. Brillouet, S.; Dorbes, S.; Courbon, F.; Picard, C.; Delord, J. P.; Benoist, E.; Poirrot, M.; Mestre-Voegtlé, B.; Silvente-Poirrot, S. Development of a new radioligand for cholecystokinin receptor subtype 2 scintigraphy: from molecular modeling to in vivo evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5400–5412.

90. Guerriero, F.; Ferrari, M. E.; Botta, F.; Fioroni, F.; Grassi, E.; Versari, A.; Sarnelli, A.; Pacilio, M.; Amato, E.; Strigari, L.; Bodei, L.; Paganelli, G.; Iori, M.; Pedroli, G.; Cremonesi, M. Kidney dosimetry in ^{177}Lu and ^{90}Y peptide receptor radionuclide therapy: influence of image timing, time-activity integration method, and risk factors. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 935351.

91. Muller, P. Y.; Milton, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 751–761.

92. Chargari, C.; Magne, N.; Guy, J.-B.; Rancoule, C.; Levy, A.; Goodman, K. A.; Deutsch, E. Optimize and refine therapeutic index in radiation therapy: Overview of a century. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *45*, 58–67.

93. Reubi, J. C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 389–427.

94. Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Peptide-Based Probes for Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 1735–1738.

95. Scopinaro, F.; De Vincentis, G.; Varvarigou, A. D.; Laurenti, C.; Iori, F.; Remediani, S.; Chiarini, S.; Stella, S. $^{99\text{mTc}}$ -bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 1378–1382.

96. Lin, K.-S.; Luu, A.; Baidoo, K. E.; Hashemzadeh-Gargari, H.; Chen, M.-K.; Brennehan, K.; Pili, R.; Pomper, M.; Carducci, M. A.; Wagner, H. N. A new high affinity technetium- $^{99\text{m}}$ -bombesin analogue with low abdominal accumulation. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 43–50.

97. Rogers, B. E.; Bigott, H. M.; McCarthy, D. W.; Della Manna, D.; Kim, J.; Sharp, T. L.; Welch, M. J. MicroPET imaging of a gastrin-releasing peptide receptor-positive tumor in a mouse model of human prostate cancer using a ^{64}Cu -labeled bombesin analogue. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 756–763.

98. de Visser, M.; Janssen, P. J. J. M.; Srinivasan, A.; Reubi, J. C.; Waser, B.; Erion, J. L.; Schmidt, M. A.; Krenning, E. P.; de Jong, M. Stabilised ^{111}In -labelled DTPA- and DOTA-conjugated neurotensin analogues for imaging and therapy of exocrine pancreatic cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 1134–1139.

99. Brust, P.; Haubner, R.; Friedrich, A.; Scheunemann, M.; Anton, M.; Koufaki, O. N.; Hauses, M.; Noll, S.; Noll, B.; Haberkorn, U.; Schackert, G.; Schackert, H. K.; Avril, N.; Johannsen, B. Comparison of $^{18\text{F}}$ FHPG and $^{124/125\text{I}}$ FIAU for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 721–729.

100. Reubi, J. C.; Schaer, J. C.; Waser, B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1377–1386.

101. Behr, T. M.; Jenner, N.; Radetzky, S.; Béhe, M.; Gratz, S.; Yücekent, S.; Raue, F.; Becker, W.

Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 424–430.

102. Gotthardt, M.; Béhé, M. P.; Beuter, D.; Battmann, A.; Bauhofer, A.; Schurrat, T.; Schipper, M.; Pollum, H.; Oyen, W. J. G.; Behr, T. M. Improved tumour detection by gastrin receptor scintigraphy in patients with metastasised medullary thyroid carcinoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33*, 1273–1279.

103. Béhé, M.; Behr, T. M. Cholecystokinin-B (CCK-B)/gastrin receptor targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other CCK-B receptor expressing malignancies. *Biopolymers* **2002**, *66*, 399–418.

104. Reubi, J.; Waser, B.; Schaer, J.-C.; Laissue, J. A. Somatostatin receptor sst1–sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 836–846.

105. Reubi, J. C.; Schaer, J. C.; Waser, B.; Mengod, G. Expression and Localization of Somatostatin Receptor SSTR1, SSTR2, and SSTR3 Messenger RNAs in Primary Human Tumors using in Situ Hybridization. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3455–3459.

106. Pepe, G.; Moncayo, R.; Bombardieri, E.; Chiti, A. Somatostatin receptor SPECT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39 Suppl 1*, S41-51.

107. Imhof, A.; Brunner, P.; Marincek, N.; Briel, M.; Schindler, C.; Rasch, H.; Mäcke, H. R.; Rochlitz, C.; Müller-Brand, J.; Walter, M. A. Response, Survival, and Long-Term Toxicity After Therapy With the Radiolabeled Somatostatin Analogue [90Y-DOTA]-TOC in Metastasized Neuroendocrine Cancers. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2416–2423.

108. Bodei, L.; Cremonesi, M.; Ferrari, M.; Pacifici, M.; Grana, C. M.; Bartolomei, M.; Baio, S. M.; Sansovini, M.; Paganelli, G. Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with 90Y-DOTATOC and 177Lu-DOTATATE: the role of associated risk factors. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 1847–1856.

109. Bergsma, H.; Konijnenberg, M. W.; van der Zwan, W. A.; Kam, B. L. R.; Teunissen, J. J. M.; Kooij, P. P.; Mauff, K. A. L.; Krenning, E. P.; Kwekkeboom, D. J. Nephrotoxicity after PRRT with (177)Lu-DOTA-octreotate. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 1802–1811.

110. Wessels, B. W.; Konijnenberg, M. W.; Dale, R. G.; Breitz, H. B.; Cremonesi, M.; Meredith, R. F.; Green, A. J.; Bouchet, L. G.; Brill, A. B.; Bolch, W. E.; Sgouros, G.; Thomas, S. R. MIRD Pamphlet No. 20: The Effect of Model Assumptions on Kidney Dosimetry and Response—Implications for Radionuclide Therapy. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 1884–1899.

111. Svensson, J.; Berg, G.; Wängberg, B.; Larsson, M.; Forssell-Aronsson, E.; Bernhardt, P. Renal function affects absorbed dose to the kidneys and haematological toxicity during 177Lu-DOTATATE treatment. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *42*, 947–955.

112. Crespo-Jara, A.; González Manzano, R.; Lopera Sierra, M.; Redal Peña, M. C.; Brugarolas Masllorens, A. A Patient With Metastatic Sarcoma was Successfully Treated With Radiolabeled Somatostatin Analogs. *Clin. Nucl. Med.* **2016**, *41*, 705–707.

113. Silvente-Poirot, S.; Dufresne, M.; Vaysse, N.; Fourmy, D. The peripheral cholecystokinin receptors. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *215*, 513–529.

114. Dufresne, M.; Seva, C.; Fourmy, D. Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 805–847.
115. Miller, L. J.; Gao, F. Structural basis of cholecystokinin receptor binding and regulation. *Pharmacol. Ther.* **2008**, *119*, 83–95.
116. Noble, F.; Wank, S. A.; Crawley, J. N.; Bradwejn, J.; Seroogy, K. B.; Hamon, M.; Roques, B. P. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, Distribution, and Functions of Cholecystokinin Receptors. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 745–781.
117. Silvente-Poirot, S.; Escrieut, C.; Wank, S. A. Role of the Extracellular Domains of the Cholecystokinin Receptor in Agonist Binding. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 364–371.
118. Koenig, J. A.; Edwardson, J. M. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 276–287.
119. Dijkgraaf, I.; Boerman, O.; Oyen, W.; Corstens, F.; Gotthardt, M. Development and Application of Peptide-Based Radiopharmaceuticals. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 543–551.
120. Flanagan, C. A. Chapter 10 - GPCR-radioligand binding assays. In *Methods in Cell Biology*; Shukla, A. K., Ed.; G Protein-Coupled Receptors Signaling, Trafficking and Regulation; Academic Press, 2016; Vol. 132, pp. 191–215.
121. Reubi, J. C.; Waser, B.; Schaer, J. C.; Laederach, U.; Erion, J.; Srinivasan, A.; Schmidt, M. A.; Bugaj, J. E. Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 481–490.
122. Volante, M.; Bozzalla-Cassione, F.; Papotti, M. Somatostatin receptors and their interest in diagnostic pathology. *Endocr. Pathol.* **15**, 275–291.
123. Adams, S.; Baum, R.; Rink, T.; Schumm-Dräger, P. M.; Usadel, K. H.; Hör, G. Limited value of fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography for the imaging of neuroendocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 79–83.
124. Sainz-Esteban, A.; Olmos, R.; González-Sagrado, M.; González, M. L.; Ruiz, M. Á.; García-Talavera, P.; Gamazo, C.; Villanueva, J. G.; Cobo, A.; de Luis, D. Contribution of ¹¹¹In-pentetreotide SPECT/CT imaging to conventional somatostatin receptor scintigraphy in the detection of neuroendocrine tumours. *Nucl. Med. Commun.* **2015**, *36*, 251–259.
125. Iacobone, M.; Niccoli-Sire, P.; Sebag, F.; De Micco, C.; Henry, J.-F. Can sporadic medullary thyroid carcinoma be biochemically predicted? Prospective analysis of 66 operated patients with elevated serum calcitonin levels. *World J. Surg.* **2002**, *26*, 886–890.
126. Nocera, M.; Baudin, E.; Pellegriti, G.; Cailleux, A. F.; Mechelany-Corone, C.; Schlumberger, M. Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. Groupe d'Etude des Tumeurs à Calcitonine (GETC). *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 715–718.
127. Orlandi, F.; Caraci, P.; Berruti, A.; Puligheddu, B.; Pivano, G.; Dogliotti, L.; Angeli, A. Chemotherapy with dacarbazine and 5-fluorouracil in advanced medullary thyroid cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **1994**, *5*, 763–765.

128. Stein, R.; Chen, S.; Reed, L.; Richel, H.; Goldenberg, D. M. Combining radioimmunotherapy and chemotherapy for treatment of medullary thyroid carcinoma: effectiveness of dacarbazine. *Cancer* **2002**, *94*, 51–61.
129. de Castroneves, L. A.; Negrão, M. V.; de Freitas, R. M. C.; Papadia, C.; Lima, J. V.; Fukushima, J. T.; Simão, E. F.; Kulcsar, M. A. V.; Tavares, M. R.; Jorge, A. A. de L.; de Castro, G.; Hoff, P. M.; Hoff, A. O. Sorafenib for the Treatment of Progressive Metastatic Medullary Thyroid Cancer: Efficacy and Safety Analysis. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **2016**, *26*, 414–419.
130. Bikas, A.; Vachhani, S.; Jensen, K.; Vasko, V.; Burman, K. D. Targeted therapies in thyroid cancer: an extensive review of the literature. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2016**, *0*, 1–15.
131. Fromigué, J.; De Baere, T.; Baudin, E.; Dromain, C.; Leboulleux, S.; Schlumberger, M. Chemoembolization for liver metastases from medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 2496–2499.
132. Al-Salameh, A.; Baudry, C.; Gautier, J. F.; Toubert, M.-E.; Bihan, H.; Cohen, R. Late liver metastasis of medullary thyroid cancer with low calcitonin levels - successfully cured by radiofrequency. *Endokrynol. Pol.* **2016**, *67*, 326–329.
133. Raue, F.; Frank-Raue, K. Long-Term Follow-up in Medullary Thyroid Carcinoma. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Prog. Dans Rech. Sur Cancer* **2015**, *204*, 207–225.
134. Eysselein, V. E.; Reeve, J. R.; Eberlein, G. Cholecystokinin--gene structure, and molecular forms in tissue and blood. *Z. Gastroenterol.* **1986**, *24*, 645–659.
135. Sosabowski, J. K.; Matzow, T.; Foster, J. M.; Finucane, C.; Ellison, D.; Watson, S. A.; Mather, S. J. Targeting of CCK-2 Receptor-Expressing Tumors Using a Radiolabeled Divalent Gastrin Peptide. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 2082–2089.
136. de Jong, M.; Bakker, W. H.; Bernard, B. F.; Valkema, R.; Kwekkeboom, D. J.; Reubi, J. C.; Srinivasan, A.; Schmidt, M.; Krenning, E. P. Preclinical and initial clinical evaluation of ¹¹¹In-labeled nonsulfated CCK8 analog: a peptide for CCK-B receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 2081–2087.
137. Kwekkeboom, D. J.; Bakker, W. H.; Kooij, P. P.; Erion, J.; Srinivasan, A.; de Jong, M.; Reubi, J. C.; Krenning, E. P. Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, *27*, 1312–1317.
138. Aloj, L.; Panico, M.; Caraco, C.; Del Vecchio, S.; Arra, C.; Affuso, A.; Accardo, A.; Mansi, R.; Tesauro, D.; De Luca, S.; Pedone, C.; Visentin, R.; Mazzi, U.; Morelli, G.; Salvatore, M. In vitro and in vivo characterization of Indium-111 and Technetium-99m labeled CCK-8 derivatives for CCK-B receptor imaging. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2004**, *19*, 93–98.
139. Laverman, P.; Béhé, M.; Oyen, W. J. G.; Willems, P. H. G. M.; Corstens, F. H. M.; Behr, T. M.; Boerman, O. C. Two technetium-99m-labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptides for scintigraphic imaging of CCK receptors. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 561–568.
140. Aloj, L.; Panico, M. R.; Caracó, C.; Zannetti, A.; Del Vecchio, S.; Di Nuzzo, C.; Arra, C.; Morelli, G.; Tesauro, D.; De Luca, S.; Pedone, C.; Salvatore, M. Radiolabeling approaches for cholecystokinin B receptor imaging. *Biopolymers* **2002**, *66*, 370–380.

141. Dorbes, S.; Mestre-Voegtli, B.; Coulais, Y.; Picard, C.; Silvente-Poirot, S.; Poirot, M.; Benoist, E. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of new oxorhenium- and oxotechnetium-CCK4 derivatives as molecular imaging agents for CCK2-receptor targeting. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 423–429.
142. Paillasse, M. R.; Deraeve, C.; Medina, P. de; Mhamdi, L.; Favre, G.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. Insights into the Cholecystokinin 2 Receptor Binding Site and Processes of Activation. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1935–1945.
143. Galés, C.; Poirot, M.; Taillefer, J.; Maigret, B.; Martinez, J.; Moroder, L.; Escrieut, C.; Pradayrol, L.; Fourmy, D.; Silvente-Poirot, S. Identification of Tyrosine 189 and Asparagine 358 of the Cholecystokinin 2 Receptor in Direct Interaction with the Crucial C-Terminal Amide of Cholecystokinin by Molecular Modeling, Site-Directed Mutagenesis, and Structure/Affinity Studies. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 973–982.
144. Silvente-Poirot, S.; Wank, S. A. A segment of five amino acids in the second extracellular loop of the cholecystokinin-B receptor is essential for selectivity of the peptide agonist gastrin. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14698–14706.
145. Brillouet, S.; Dorbes, S.; Silvente-Poirot, S.; Mestre-Voegtli, B.; Picard, C.; Poirot, M.; Courbon, F. Ciblage peptidique en oncologie nucléaire : intérêt de la modélisation moléculaire. *Médecine Nucl.* **2010**, *34*, 289–294.
146. Brillouet, S.; Caselles, O.; Dierickx, L. O.; Mestre, B.; Nalis, J.; Picard, C.; Favre, G.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S.; Courbon, F. Preclinical evaluation of new radioligand of cholecystokinin/gastrin receptors in endocrine tumors xenograft nude mice. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.* **2007**, *571*, 160–164.
147. Brillouet, S. Développement de nouveaux ligands peptidiques radiomarqués pour l'oncologie nucléaire: application au ciblage tumoral des récepteurs de la cholécystokinine/gastrine. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier: Toulouse, France, 2009.
148. Beatty, B. G.; O'Conner-Tressel, M.; Do, T.; Paxton, R. J.; Beatty, J. D. Mechanism of decreasing liver uptake of ¹¹¹In-labeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody by specific antibody pretreatment in tumor bearing mice. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 846s–851s.
149. Jamar, F.; Barone, R.; Mathieu, I.; Walrand, S.; Labar, D.; Carlier, P.; de Camps, J.; Schran, H.; Chen, T.; Smith, M. C.; Bouterfa, H.; Valkema, R.; Krenning, E. P.; Kvols, L. K.; Pauwels, S. 86Y-DOTA0)-D-Phe1-Tyr3-octreotide (SMT487)--a phase 1 clinical study: pharmacokinetics, biodistribution and renal protective effect of different regimens of amino acid co-infusion. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 510–518.
150. Rolleman, E. J.; Valkema, R.; de Jong, M.; Kooij, P. P. M.; Krenning, E. P. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 9–15.
151. Verwijnen, S. M.; Krenning, E. P.; Valkema, R.; Huijmans, J. G. M.; Jong, M. de Oral Versus Intravenous Administration of Lysine: Equal Effectiveness in Reduction of Renal Uptake of [¹¹¹In-DTPA]Octreotide. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 2057–2060.
152. Rolleman, E. J.; Melis, M.; Valkema, R.; Boerman, O. C.; Krenning, E. P.; de Jong, M. Kidney

protection during peptide receptor radionuclide therapy with somatostatin analogues. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 1018–1031.

153. Breeman, W. A. P.; Jong, M. de; Visser, T. J.; Erion, J. L.; Krenning, E. P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ⁹⁰Y, ¹¹¹In and ¹⁷⁷Lu at high specific activities. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 917–920.

154. Parus, J. L.; Mikolajczak, R. Beta-emitting radionuclides for peptide receptor radionuclide therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 2686–2693.

155. Siegel, J. A.; Stabin, M. G. Absorbed fractions for electrons and beta particles in spheres of various sizes. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **1994**, *35*, 152–156.

156. O'Donoghue, J. A.; Bardiès, M.; Wheldon, T. E. Relationships between Tumor Size and Curability for Uniformly Targeted Therapy with Beta-Emitting Radionuclides. *J. Nucl. Med.* **1995**, *36*, 1902–1909.

157. Villard, L.; Romer, A.; Marincek, N.; Brunner, P.; Koller, M. T.; Schindler, C.; Ng, Q. K. T.; Mäcke, H. R.; Müller-Brand, J.; Rochlitz, C.; Briel, M.; Walter, M. A. Cohort study of somatostatin-based radiopeptide therapy with [(90)Y-DOTA]-TOC versus [(90)Y-DOTA]-TOC plus [(177)Lu-DOTA]-TOC in neuroendocrine cancers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 1100–1106.

158. Vegt, E.; Jong, M. de; Wetzels, J. F. M.; Masereeuw, R.; Melis, M.; Oyen, W. J. G.; Gotthardt, M.; Boerman, O. C. Renal Toxicity of Radiolabeled Peptides and Antibody Fragments: Mechanisms, Impact on Radionuclide Therapy, and Strategies for Prevention. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1049–1058.

159. Hutchinson, L. Neuroendocrine cancer: Combining two radiopeptide therapies improves survival. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, *9*, 250–250.

160. McCluskey, A. G.; Boyd, M.; Gaze, M. N.; Mairs, R. J. [¹³¹I]MIBG and topotecan: A rationale for combination therapy for neuroblastoma. *Cancer Lett.* **2005**, *228*, 221–227.

161. Kraal, K. C. J. M.; Tytgat, G. A. M.; van Eck-Smit, B. L. F.; Kam, B.; Caron, H. N.; van Noesel, M. Upfront treatment of high-risk neuroblastoma with a combination of ¹³¹I-MIBG and topotecan. *Pediatr. Blood Cancer* **2015**, *62*, 1886–1891.

162. Courbon, F.; Zerdoud, S.; Bastie, D.; Archambaud, F.; Hoff, M.; Eche, N.; Berry, I.; Caron, P. Defective efficacy of retinoic acid treatment in patients with metastatic thyroid carcinoma. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **2006**, *16*, 1025–1031.

163. de Medina, P.; Paillasse, M. R.; Segala, G.; Voisin, M.; Mhamdi, L.; Dalenc, F.; Lacroix-Triki, M.; Filleron, T.; Pont, F.; Saati, T. A.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Silvente-Poirot, S.; Poirot, M. Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1840.

164. Dalenc, F.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. Dendrogenin A: A Mammalian Metabolite of Cholesterol with Tumor Suppressor and Neurostimulating Properties. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3533–3549.

165. Silvente-Poirot, S.; de Medina, P.; Record, M.; Poirot, M. From tamoxifen to dendrogenin A: The discovery of a mammalian tumor suppressor and cholesterol metabolite. *Biochimie* **2016**, *130*, 109–114.

166. Silvente-Poirot, S.; Poirot, M. Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science* **2014**, *343*, 1445–1446.
167. Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. When cholesterol meets histamine, it gives rise to dendrogenin A: a tumour suppressor metabolite. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 631–637.
168. Cheng, P.; Kumar, V.; Liu, H.; Youn, J.-I.; Fishman, M.; Sherman, S.; Gabrilovich, D. Effects of notch signaling on regulation of myeloid cell differentiation in cancer. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 141–152.
169. Backer, R. A.; Helbig, C.; Gentek, R.; Kent, A.; Laidlaw, B. J.; Dominguez, C. X.; de Souza, Y. S.; van Trierum, S. E.; van Beek, R.; Rimmelzwaan, G. F.; ten Brinke, A.; Willemsen, A. M.; van Kampen, A. H. C.; Kaech, S. M.; Blander, J. M.; van Gisbergen, K.; Amsen, D. A central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 1143–1151.
170. Ranganathan, P.; Weaver, K. L.; Capobianco, A. J. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 338–351.
171. Lobry, C.; Oh, P.; Aifantis, I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1931–1935.
172. Sriuranpong, V.; Borges, M. W.; Ravi, R. K.; Arnold, D. R.; Nelkin, B. D.; Baylin, S. B.; Ball, D. W. Notch Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3200–3205.
173. Kunnimalaiyaan, M.; Vaccaro, A. M.; Ndiaye, M. A.; Chen, H. Overexpression of the NOTCH1 Intracellular Domain Inhibits Cell Proliferation and Alters the Neuroendocrine Phenotype of Medullary Thyroid Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 39819–39830.
174. Jaskula-Sztul, R.; Pisarnturakit, P.; Landowski, M.; Chen, H.; Kunnimalaiyaan, M. Expression of the active Notch1 decreases MTC tumor growth in vivo. *J. Surg. Res.* **2011**, *171*, 23–27.
175. Chen, H.; Thiagalingam, A.; Chopra, H.; Borges, M. W.; Feder, J. N.; Nelkin, B. D.; Baylin, S. B.; Ball, D. W. Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 5355–5360.
176. Sriuranpong, V.; Borges, M. W.; Strock, C. L.; Nakakura, E. K.; Watkins, D. N.; Blaumueller, C. M.; Nelkin, B. D.; Ball, D. W. Notch signaling induces rapid degradation of achaete-scute homolog 1. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 3129–3139.
177. Chen, H.; Sippel, R. S.; O'Dorisio, M. S.; Vinik, A. I.; Lloyd, R. V.; Pacak, K.; North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS) The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. *Pancreas* **2010**, *39*, 775–783.
178. Ball, D. W. Medullary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2007**, *36*, 823–837, viii.
179. Tesfazghi, S.; Eide, J.; Dammalapati, A.; Korlesky, C.; Wyche, T. P.; Bugni, T. S.; Chen, H.; Jaskula-Sztul, R. Thiocoraline alters neuroendocrine phenotype and activates the Notch pathway in MTC-TT cell line. *Cancer Med.* **2013**, *2*, 734–743.

180. Lefort, K.; Dotto, G. P. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.* **2004**, *14*, 374–386.
181. Tang, W.; Luo, T.; Greenberg, E. F.; Bradner, J. E.; Schreiber, S. L. Discovery of histone deacetylase 8 selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2601–2605.
182. Jaskula-Sztul, R.; Eide, J.; Tesfazghi, S.; Dammalapati, A.; Harrison, A. D.; Yu, X.-M.; Scheinebeck, C.; Winston-McPherson, G.; Kupcho, K. R.; Robers, M. B.; Hundal, A. K.; Tang, W.; Chen, H. Tumor-suppressor role of Notch3 in medullary thyroid carcinoma revealed by genetic and pharmacological induction. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 499–512.
183. Aslan Koşar, P.; Tuncer, H.; Cihangir Uğuz, A.; Espino Palma, J.; Darıcı, H.; Onaran, İ.; Çiğ, B.; Koşar, A.; Rodriguez Moratinos, A. B. The efficiency of Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) cleavage on detection of apoptosis in an experimental model of testicular torsion. *Int. J. Exp. Pathol.* **2015**, *96*, 294–300.
184. Acomen *Les radiopharmaceutiques (ACOMEN)*; EDP Sciences, 2012.
185. Lewis, M. R.; Raubitschek, A.; Shively, J. E. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 565–576.
186. Sun, Y.; Anderson, C. J.; Pajean, T. S.; Reichert, D. E.; Hancock, R. D.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E.; Welch, M. J. Indium(III) and Gallium(III) Complexes of Bis(aminoethanethiol) Ligands with Different Denticities: Stabilities, Molecular Modeling, and in Vivo Behavior. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 458–470.
187. Havas, F.; Leygue, N.; Danel, M.; Mestre, B.; Galaup, C.; Picard, C. 6,6'-Dimethyl-2,2'-bipyridine-4-ester: A pivotal synthon for building tethered bipyridine ligands. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7673–7686.
188. Ferreira, C. L.; Lamsa, E.; Woods, M.; Duan, Y.; Fernando, P.; Bensimon, C.; Kordos, M.; Guenther, K.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. Evaluation of Bifunctional Chelates for the Development of Gallium-Based Radiopharmaceuticals. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 531–536.
189. Yapp, D. T. T.; Ferreira, C. L.; Gill, R. K.; Boros, E.; Wong, M. Q.; Mandel, D.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. Imaging tumor vasculature noninvasively with positron emission tomography and RGD peptides labeled with copper 64 using the bifunctional chelates DOTA, oxo-DO3a, and PCTA. *Mol. Imaging* **2013**, *12*, 263–272.
190. Pandey, U.; Gamre, N.; Kumar, Y.; Shetty, P.; Sarma, H. D.; Dash, A. A systematic evaluation of the potential of PCTA-NCS ligand as a bifunctional chelating agent for design of ¹⁷⁷Lu radiopharmaceuticals. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2015**, *307*, 187–194.
191. Le Fur, M.; Beyler, M.; Lepareur, N.; Fougère, O.; Platas-Iglesias, C.; Rousseaux, O.; Tripier, R. P cyclen Tri-n-butylphosphonate Ester as Potential Chelator for Targeted Radiotherapy: From Yttrium(III) Complexation to ⁹⁰Y Radiolabeling. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 8003–8012.
192. Reilly, R.; Lee, N.; Houle, S.; Law, J.; Marks, A. In vitro stability of EDTA and DTPA immunoconjugates of monoclonal antibody 2G3 labeled with indium-111. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* **1992**, *43*, 961–967.
193. Maus, S.; Blois, E. D.; Ament, S. J.; Schreckenberger, M.; Breeman, W. A. P. Aspects on

radiolabeling of ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE: After C18 purification re-addition of ascorbic acid is required to maintain radiochemical purity. *Int. J. Diagn. Imaging* **2014**, *1*.

194. Grünwald, F.; Menzel, C.; Bender, H.; Palmedo, H.; Otte, R.; Fimmers, R.; Risse, J.; Biersack, H. J. Redifferentiation therapy-induced radioiodine uptake in thyroid cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **1998**, *39*, 1903–1906.

195. de Medina, P.; Paillasse, M. R.; Payré, B.; Silvente-Poirot, S.; Poirot, M. Synthesis of New Alkylaminooxysterols with Potent Cell Differentiating Activities: Identification of Leads for the Treatment of Cancer and Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7765–7777.

196. Bauriaud-Mallet, M. *Master de recherche - INSERM UMR1037, eq.12*; 2013.

197. Somnay, Y. R.; Yu, X.-M.; Lloyd, R. V.; Levenson, G.; Aburjania, Z.; Jang, S.; Jaskula-Sztul, R.; Chen, H. Notch3 expression correlates with thyroid cancer differentiation, induces apoptosis, and predicts disease prognosis. *Cancer* **2016**, n/a-n/a.

198. Yu, X.-M.; Jaskula-Sztul, R.; Georgen, M. R.; Aburjania, Z.; Somnay, Y. R.; Levenson, G.; Sippel, R. S.; Lloyd, R. V.; Johnson, B. P.; Chen, H. Notch1 Signaling Regulates the Aggressiveness of Differentiated Thyroid Cancer and Inhibits SERPINE1 Expression. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3582–3592.

199. Galés, C.; Sanchez, D.; Poirot, M.; Pyronnet, S.; Buscail, L.; Cussac, D.; Pradayrol, L.; Fourmy, D.; Silvente-Poirot, S. High tumorigenic potential of a constitutively active mutant of the cholecystokinin 2 receptor. *Oncogene* **2003**, *22*, 6081–6089.

200. Franko-Tobin, L. G.; Mackey, L. V.; Huang, W.; Song, X.; Jin, B.; Luo, J.; Morris, L. M.; Liu, M.; Fuselier, J. A.; Coy, D. H.; Wu, L.; Sun, L. Notch1-mediated tumor suppression in cervical cancer with the involvement of SST signaling and its application in enhanced SSTR-targeted therapeutics. *The Oncologist* **2012**, *17*, 220–232.

201. Ventura, S.; Aryee, D. N. T.; Felicetti, F.; De Feo, A.; Mancarella, C.; Manara, M. C.; Picci, P.; Colombo, M. P.; Kovar, H.; Carè, A.; Scotlandi, K. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF-κB signaling. *Oncogene* **2016**, *35*, 3944–3954.

202. Zhang, H.; von Gise, A.; Liu, Q.; Hu, T.; Tian, X.; He, L.; Pu, W.; Huang, X.; He, L.; Cai, C.-L.; Camargo, F. D.; Pu, W. T.; Zhou, B. Yap1 is required for endothelial to mesenchymal transition of the atrioventricular cushion. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 18681–18692.

203. Pelullo, M.; Quaranta, R.; Talora, C.; Checquolo, S.; Cialfi, S.; Felli, M. P.; te Kronnie, G.; Borga, C.; Besharat, Z. M.; Palermo, R.; Di Marcotullio, L.; Capobianco, A. J.; Gulino, A.; Screpanti, I.; Bellavia, D. Notch3/Jagged1 circuitry reinforces notch signaling and sustains T-ALL. *Neoplasia N. Y. N* **2014**, *16*, 1007–1017.

204. Fogh, J. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*; Elsevier, 2014.

205. Rogers, B. E.; Zinn, K. R.; Lin, C.-Y.; Chaudhuri, T. R.; Buchsbaum, D. J. Targeted radiotherapy with [⁹⁰Y]-SMT 487 in mice bearing human nonsmall cell lung tumor xenografts induced to express human somatostatin receptor subtype 2 with an adenoviral vector. *Cancer* **2002**, *94*, 1298–1305.

206. Zhang, M.; Yao, Z.; Garmestani, K.; Yu, S.; Goldman, C. K.; Paik, C. H.; Brechbiel, M. W.; Carrasquillo, J. A.; Waldmann, T. A. Preclinical Evaluation of an Anti-CD25 Monoclonal Antibody, 7G7/B6, Armed

with the β -Emitter, Yttrium-90, as a Radioimmunotherapeutic Agent for Treating Lymphoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24*, 303–309.

207. Yoshida, C.; Tsuji, A. B.; Sudo, H.; Sugyo, A.; Kikuchi, T.; Koizumi, M.; Arano, Y.; Saga, T. Therapeutic efficacy of c-kit-targeted radioimmunotherapy using 90Y-labeled anti-c-kit antibodies in a mouse model of small cell lung cancer. *PLoS One* **2013**, *8*, e59248.

208. Schwartz, M. A biomathematical approach to clinical tumor growth. *Cancer* **1961**, *14*, 1272–1294.

209. Kwekkeboom, D. J.; Teunissen, J. J.; Bakker, W. H.; Kooij, P. P.; de Herder, W. W.; Feelders, R. A.; van Eijck, C. H.; Esser, J.-P.; Kam, B. L.; Krenning, E. P. Radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2754–2762.

210. Buscail, L.; Saint-Laurent, N.; Chastre, E.; Vaillant, J.-C.; Gespach, C.; Capellà, G.; Kalthoff, H.; Lluís, F.; Vaysse, N.; Susini, C. Loss of sst2 Somatostatin Receptor Gene Expression in Human Pancreatic and Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1823–1827.

211. Marcatili, S.; Pichard, A.; Courteau, A.; Ladjohounlou, R.; Navarro-Teulon, I.; Repetto-Llamazares, A.; Heyerdahl, H.; Dahle, J.; Pouget, J. P.; Bardiès, M. Realistic multi-cellular dosimetry for (177)Lu-labelled antibodies: model and application. *Phys. Med. Biol.* **2016**, *61*, 6935–6952.

212. Sarrut, D.; Bardiès, M.; Bousson, N.; Freud, N.; Jan, S.; Létang, J.-M.; Loudos, G.; Maigne, L.; Marcatili, S.; Mauxion, T.; Papadimitroulas, P.; Perrot, Y.; Pietrzyk, U.; Robert, C.; Schaart, D. R.; Visvikis, D.; Buvat, I. A review of the use and potential of the GATE Monte Carlo simulation code for radiation therapy and dosimetry applications. *Med. Phys.* **2014**, *41*, 064301.

213. Taïeb, D.; Garrigue, P.; Bardiès, M.; Abdullah, A. E.; Pacak, K. Application and Dosimetric Requirements for Gallium-68-labeled Somatostatin Analogues in Targeted Radionuclide Therapy for Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *PET Clin.* **2015**, *10*, 477–486.

214. Kagna, O.; Pirmisashvili, N.; Tshori, S.; Freedman, N.; Israel, O.; Krausz, Y. Neuroendocrine tumor imaging with 68Ga-DOTA-NOC: physiologic and benign variants. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2014**, *203*, 1317–1323.

215. Lococo, F.; Perotti, G.; Cardillo, G.; De Waure, C.; Filice, A.; Graziano, P.; Rossi, G.; Sgarbi, G.; Stefanelli, A.; Giordano, A.; Granone, P.; Rindi, G.; Versari, A.; Rufini, V. Multicenter comparison of 18F-FDG and 68Ga-DOTA-peptide PET/CT for pulmonary carcinoid. *Clin. Nucl. Med.* **2015**, *40*, e183-189.

216. Sharma, P.; Arora, S.; Karunanithi, S.; Khadgawat, R.; Durgapal, P.; Sharma, R.; Kandasamy, D.; Bal, C.; Kumar, R. Somatostatin receptor based PET/CT imaging with 68Ga-DOTA-Nal3-octreotide for localization of clinically and biochemically suspected insulinoma. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Of* **2016**, *60*, 69–76.

217. Breer, S.; Brunkhorst, T.; Beil, F. T.; Peldschus, K.; Heiland, M.; Klutmann, S.; Barvencik, F.; Zustin, J.; Gratz, K.-F.; Amling, M. 68Ga DOTA-TATE PET/CT allows tumor localization in patients with tumor-induced osteomalacia but negative 111In-octreotide SPECT/CT. *Bone* **2014**, *64*, 222–227.

218. Procházková, S.; Hraníček, J.; Kubíček, V.; Hermann, P. Formation kinetics of europium(III) complexes of DOTA and its bis(phosphonate) bearing analogs. *Polyhedron* **2016**, *111*, 143–149.

219. Seveus, L.; Väisälä, M.; Syrjänen, S.; Sandberg, M.; Kuusisto, A.; Harju, R.; Salo, J.; Hemmilä, I.;

Kojola, H.; Soini, E. Time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cytometry* **1992**, *13*, 329–338.

220. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.

221. Hemmilä, I.; Laitala, V. Progress in Lanthanides as Luminescent Probes. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 529–542.

222. Laurent, S.; Vander Elst, L.; Galaup, C.; Leygue, N.; Boutry, S.; Picard, C.; Muller, R. N. Bifunctional Gd(III) and Tb(III) chelates based on a pyridine–bis(iminodiacetate) platform, suitable optical probes and contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**, *9*, 300–312.

223. Shen, C.; New, E. J. Promising strategies for Gd-based responsive magnetic resonance imaging contrast agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 158–166.

224. Leygue, N.; Boulay, A.; Galaup, C.; Benoist, E.; Laurent, S.; Vander Elst, L.; Mestre-Voegtli, B.; Picard, C. Optical and relaxometric properties of monometallic (Eu(III), Tb(III), Gd(III)) and heterobimetallic (Re(I)/Gd(III)) systems based on a functionalized bipyridine-containing acyclic ligand. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003** **2016**, *45*, 8379–8393.

Optimisation de l'effet radiobiologique d'un traitement de radiothérapie interne vectorisée des tumeurs neuroendocrines

Optimization of the radiobiological effect for peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumors

Auteur / Author : Nicolas ROSSETTO

Directeur de thèse / Supervisor : Pr. Frédéric COURBON

Co-directrice de thèse / Supervisor : Dr Séverine BRILLOUET

Lieu, date de soutenance / Place, date of defense : Toulouse, France, 1^{er} février 2017 / February 1st, 2017

Résumé

Les médicaments radiopharmaceutiques ciblant les récepteurs peptidiques tels que les analogues de la somatostatine ont un réel potentiel et un fort intérêt pour à la fois le diagnostic et le traitement des tumeurs neuroendocrines (TNE) non-opérables, par radiothérapie interne vectorisée (RIV). La toxicité des traitements par radiopeptides analogues de la somatostatine limite leur développement clinique. Le développement de nouveaux peptides ciblant d'autres types de récepteurs tels que le ceux de la cholécystokinine (CCK) est une solution dont l'intérêt a été montré par les travaux de notre équipe, basés sur un analogue CCK novateur.

Ce travail en trois volets décrit dans un premier temps le radiomarquage de l'analogue CCK, par des radionucléides émetteurs β^- tels que l'yttrium 90 et le lutétium 177 adaptés à la thérapie, en plus de l'indium 111 pour le diagnostic, les capacités de complexation et la stabilité de ce nouvel analogue peptidique CCK. Une étude *in vivo* préliminaire sur modèle murin a permis d'étudier la faisabilité d'un traitement de RIV. Une troisième étude a été réalisée *in vitro* sur deux lignées cellulaires tumorales par le traitement à l'aide d'une molécule antitumorale caractérisée dans notre équipe, à travers la réexpression d'une voie de signalisation cellulaire. Ce travail a permis de montrer l'intérêt potentiel de l'utilisation des analogues CCK en RIV en association thérapeutique pour la prise en charge de certaines TNE.

Abstract

Radiopharmaceuticals targeting peptide receptors such as somatostatin analogues have a real potential and a strong interest in both diagnosis and treatment of non-operable neuroendocrine tumors (NET) in peptide receptor radionuclide therapy (PRRT). The toxicity of somatostatin radiopeptide analogs treatments limits their clinical development. The development of new peptides targeting other receptors such as cholecystokinin (CCK) receptors is a new solution, based on an innovative CCK analog that has been developed and studied in our team.

This three-part study first describes the radiolabeling of the CCK analogue by β^- emitting radionuclides adapted to therapy such as yttrium 90 and lutetium 177, in addition indium 111 for diagnosis, the complexation and stability capacities of this novel peptide analogue CCK. In a preliminary *in vivo* study on a murine model we experiment the feasibility of a treatment of RIV. A third study was carried out *in vitro* on two tumor cell lines by treatment with an antitumor molecule characterized in our team, through the reexpression of a cell signaling pathway. This work allowed us to show the potential interest of using this original CCK analog in RIV with therapeutic association for the control of NET cancer.

Mots-clés : radiothérapie interne vectorisée – analogues peptidiques radiomarqués – cholécystokinine – RCCK2 – association thérapeutique.

Keywords: peptide-receptor radionuclide therapy – peptide analogs radiolabeling – cholecystokinin – CCK2R – therapeutic association.

Laboratoire / Laboratory: Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

UMR 1037 INSERM – Université Toulouse 3

2 avenue Hubert Curien – IUC-T Oncopôle – CS 53717

31037 TOULOUSE CEDEX 1 - FRANCE