



Evaluation de la radiothérapie interne vectorisée augmentée par ultrasons et optimisation de son efficacité par imagerie TEP

Sophie Tran

► To cite this version:

Sophie Tran. Evaluation de la radiothérapie interne vectorisée augmentée par ultrasons et optimisation de son efficacité par imagerie TEP. Médecine nucléaire. Université Paris-Saclay, 2024. Français. <NNT : 2024UP-AST183>. <tel-05428189>

HAL Id: tel-05428189

<https://theses.hal.science/tel-05428189v1>

Submitted on 22 Dec 2025

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.



HAL Authorization

Evaluation de la radiothérapie interne vectorisée augmentée par ultrasons et optimisation de son efficacité par imagerie TEP

*Evaluation of ultrasound-enhanced peptide receptor
radiolabelled therapy and optimization of its efficacy
through PET Imaging*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°575 – Physique et Ingénierie : Electrons, Photons, Sciences du Vivant (EOBE)

Spécialité de doctorat : Physique et imagerie médicale

Graduate School : Sciences de l'ingénierie et des systèmes.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale Paris Saclay (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm)** sous la direction de **Jean-Michel DAUGAS**, Ingénieur de recherche à ILL (Institut Laue-Langevin), le co-encadrement de **Anthony NOVELL**, chercheur CNRS et de **Charles TRUILLET**, chercheur CEA

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 20 décembre 2024, par

Sophie TRAN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Nicolas TAULIER

Directeur de recherche CNRS, Sorbonne Université

Président

Chantal PICHON

Professeur des universités, Université d'Orléans

Rapporteuse & Examinatrice

Marc JANIER

Professeur des universités - praticien hospitalier,
LAGEPP Université Claude Bernard Lyon 1

Rapporteur & Examineur

Emmanuelle SOULAS CANET

Professeur des universités, Université Lyon 1 Claude
Bernard

Examinatrice

Titre : Evaluation de la radiothérapie interne vectorisée augmentée par ultrasons et optimisation de son efficacité par imagerie TEP

Mots clés : Cancer de la prostate ; PSMA ; Sono-perméabilisation ; Ultrasons thérapeutiques ; Thérapie ; Radiothérapie interne vectorisée

Résumé : Depuis plusieurs années, la radiothérapie interne vectorisée (RIV) est devenue une thérapie efficace dans la prise en charge des cancers de la prostate métastatique résistant à la castration, forme rare au pronostic très péjoratif. Cette approche théranostique se repose sur l'administration d'un médicament radiopharmaceutique (MRP), molécule vectrice radiomarquée qui cible spécifiquement l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) surexprimée à la surface des cellules cancéreuses. Le MRP peut être à visée diagnostique permettant une imagerie TEP (tomographie par émission de positons) ou à visée thérapeutique délivrant localement un rayonnement ionisant, initiant des dégâts irréversibles au niveau de l'ADN des cellules tumorales et induisant leur mort.

Malgré des résultats cliniques prometteurs, l'accès à la RIV reste limité et son application est réservée à des patients porteurs de tumeurs à un stade avancé de la pathologie. De plus, une accumulation non négligeable du MRP dans les organes d'élimination (e.g., rein, foie) et les organes du système immunitaire induit des effets indésirables impactant le bien être du patient. L'un des défis consiste à assurer une diffusion rapide dans toute la tumeur des agents de liaison tout en maintenant ou améliorant la fixation spécifique à la tumeur, afin de réduire les doses injectées.

L'émission d'ondes ultrasonores combinée à l'injection intravasculaire de microbulles de gaz fournit des alternatives sans précédent comme méthode adjuvante pour la délivrance locale de molécules thérapeutiques. En effet, la vibration des microbulles sous l'effet des ultrasons entraîne une perméabilisation transitoire des barrières biologiques (e.g., barrière hémato-tumorale). Cette technique, appelée sono-perméabilisation potentialise l'extravasation de molécules thérapeutiques dans la région d'intérêt en augmentant leur biodisponibilité uniquement dans la zone où les ondes sont focalisées.

L'objectif de la thèse est d'optimiser par TEP, la délivrance locale du MRP au sein de la tumeur de la prostate par sono-perméabilisation. Cette approche permettra de répondre aux questions cruciales de la diminution de la dose d'injection et donc de la radiotoxicité sur les organes sains pour aller vers une médecine du futur personnalisée et moins délétère pour le patient.

Pour cela, des études in vitro ont été réalisées afin d'évaluer l'impact de la sono-perméabilisation sur la perméabilité membranaire. Les protocoles ultrasonores ont ainsi été validés sur deux modèles cellulaires : un modèle en suspension de cancer de la prostate métastatique (LNCaP) et un modèle perméabilité épithéliale (MDCKII-MDR1). L'impact de la sono-perméabilisation a été ensuite évaluée dans un modèle préclinique murin sous cutanée du cancer de la prostate. Cette étude in vivo a permis d'évaluer la biodistribution d'un MRP à usage diagnostique dans un premier temps (^{18}F]-F-PSMA-1007), utilisé en routine clinique au sein de notre laboratoire par imagerie TEP/tomodensitométrie (TDM). Le dernier axe actuellement en cours est d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la sono-perméabilisation combinée avec le MRP thérapeutique (^{177}Lu]-Lu-PSMA-617). Cet axe permettra de calculer par la suite la posologie optimale afin d'atteindre la dose thérapeutique efficace tout en minimisant l'accumulation du MRP dans les tissus sains.

Ce projet pourrait ouvrir la voie à des études combinant la sono-perméabilisation avec d'autres traitements comme l'immunothérapie sur les tumeurs prostatiques ou encore des études cliniques pour évaluer l'efficacité de cette technique chez les patients.

Title: Evaluation of ultrasound-enhanced peptide receptor radiolabelled therapy and optimization of its efficacy through PET Imaging

Keywords: Prostate cancer ; PSMA ; Sonopermabilization ; Therapeutic ultrasound ; Therapy ; Peptide receptor radiolabelled therapy

Abstract: For several years, peptide receptor radiolabelled therapy (PRRT) has become an effective therapy for managing metastatic castration-resistant prostate cancer, a rare form with a very poor prognosis. This theranostic approach relies on the administration of a radiopharmaceutical (RP), a radiolabelled vector molecule that specifically targets the prostate-specific membrane antigen (PSMA) overexpressed on the surface of cancer cells. The RP can be diagnostic, allowing for PET imaging (positron emission tomography), or therapeutic, delivering ionizing radiation locally, causing irreversible damage to the DNA of tumor cells and inducing their death.

Despite promising clinical results, access to VIRT remains limited, and its application is reserved for patients with advanced-stage tumors. Additionally, a significant accumulation of the RP in elimination organs (e.g., kidneys, liver) and immune system organs induces adverse effects impacting the patient's well-being. One challenge is ensuring rapid diffusion of binding agents throughout the tumor while maintaining or improving specific tumor binding to reduce injected doses.

The emission of ultrasound waves combined with the intravascular injection of gas microbubbles provides unprecedented alternatives as an adjunctive method for the local delivery of therapeutic molecules. Indeed, the vibration of microbubbles under ultrasound induces transient permeabilization of biological barriers (e.g., the blood-tumor barrier). This technique, called sonopermabilization, enhances the extravasation of therapeutic molecules in the region of interest by increasing their bioavailability only where the waves are focused.

The aim of the thesis is to optimize the local delivery of the RP within the prostate tumor using sonopermabilization through PET. This approach will address crucial questions regarding the reduction of injected doses and thus radiotoxicity to healthy organs, moving towards a future of personalized medicine that is less harmful to the patient.

To achieve this, in vitro studies were conducted to evaluate the impact of sonopermabilization on membrane permeability. Ultrasound protocols were validated on two cellular models: a suspension model of metastatic prostate cancer (LNCaP) and an epithelial permeability model (MDCKII-MDR1). The impact of sonopermabilization was then evaluated in a preclinical murine subcutaneous model of prostate cancer. This in vivo study allowed for the assessment of the biodistribution of a diagnostic RP initially ($[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$), routinely used in our laboratory for PET/computed tomography (CT) imaging. The latest focus is to evaluate the therapeutic efficacy of sonopermabilization combined with the therapeutic RP ($[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$). This will subsequently allow for the calculation of the optimal dosage to achieve an effective therapeutic dose while minimizing accumulation of RP in healthy tissues.

This project could pave the way for studies combining sonopermabilization with other treatments such as immunotherapy for prostate tumors, or clinical studies to evaluate the effectiveness of this technique in patients.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté et pris le temps de lire et d'évaluer ce travail. Un grand merci à Chantal Pichon et Marc Janier en leur qualité de rapporteur et également à Emmanuel Canet Soulas et Nicolas Taulier d'avoir examiné mon travail.

Je remercie Vincent Lebon, directeur de l'unité d'imagerie biomédicale multimodale BioMaps, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie mon directeur de thèse M. Jean-Michel Daugas, chercheur au sein de l'Institut Laue-Langevin et mes encadrants de thèse M. Anthony Novell, chercheur au sein de l'équipe Développements Méthodologiques et Instrumentation et M. Charles Truillet, chercheur au sein de l'équipe Imagerie en Oncologie de BioMaps, pour avoir rendu possible la réalisation de cette thèse en m'accordant la confiance et l'opportunité de travailler sur ce projet de thèse. Je tiens à exprimer ma gratitude pour leur bienveillance, réactivité et leurs conseils durant les phases de rédaction de mon manuscrit de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe Développements Méthodologiques et Instrumentation avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler ou de côtoyer en partageant un café :

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Jean-Luc Gennisson pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe DMI ainsi que pour la motivation qu'il a su insuffler (« On est les meilleurs »). Un grand merci également à Angéline Nemeth, Eliott, Rose-Marie Dubuisson, Catherine Sebré, Claire Barakat et Marie Poirier-Quinot, à Jean-Christophe Ginefri pour leur bienveillance. Un remerciement particulier à Georges Willoquet pour sa réactivité et son expertise pour tous les problèmes informatiques que j'ai rencontrés.

Je souhaite adresser un remerciement particulier à Laurène Jourdain pour son aide précieuse tout au long de ma thèse. En particulier, je suis très reconnaissante pour sa contribution à la mise en place des setups de sono-perméabilisation, un travail essentiel à mes recherches. Sa disponibilité et son expertise m'ont également été d'une grande aide lors des manipulations.

Un remerciement particulier pour les membres de l'équipe Ultrasons avec qui j'ai eu le plaisir de partager des moments enrichissants, que ce soit lors de discussions passionnantes ou pendant notre aventure à Taïwan :

Je tiens à remercier chaleureusement Lénin Chinchilla, pour avoir été un bol d'air frais, toujours prêt à apporter sa bonne humeur et son soutien. Un grand merci également à Anna Ngo pour sa gentillesse et son attitude positive qui ont toujours éclairé mes journées. À Axel Ngierg, merci pour tes anecdotes et

ton humour qui m'ont bien fait rire à chaque fois ! J'ai vraiment hâte d'entendre les autres histoires que tu as en réserve. Un grand merci à Lim-Anna Sieu (aka Grande sœur Lim lim), pour sa douceur et sa bienveillance, toujours présente et à l'écoute de mes petites péripéties, même les plus farfelues. Notre retour en France, bien que mouvementé, restera un très beau souvenir, toujours rempli d'aventures inattendues. Lucie Lépinard, ce fut un véritable plaisir de partager notre séjour à Taïwan ensemble. Ta simplicité, ta bonne humeur et ta bienveillance ont fait de cette expérience un moment inoubliable. J'espère que de belles choses t'attendent pour la suite et ne t'arrête jamais de chanter ! Un immense merci à Ambre Dauba pour m'avoir formée à la sono-perméabilisation, un véritable soutien lors de mes premiers pas en thèse. Ta patience et ton expertise ont été essentielles pour poser les bases de mon travail. Merci à Maxime Leriche pour ton écoute et surtout tes succulents deserts et tes conseils de cuisine. Enfin, un immense merci à Corentin Cornu (aka Coco), avec qui j'ai adoré passer d'innombrables heures à discuter de tout et de rien. Et je te remercie sincèrement et te suis reconnaissante pour ton écoute et ton soutien lors de mes moments de doute.

Mes remerciements vont également aux membres de l'équipe Imagerie en Oncologie de BioMaps :

Je remercie tout d'abord l'équipe technique. Ces travaux de recherche n'auraient pas pu être menés à bien sans leur expertise précieuse. Benoit Jego pour son aide et ses conseils pour mes expériences *in vitro*. Un merci spécial à Coraline Denis, ma Carou, pour avoir toujours été là, pour ton aide dans toutes mes expériences et pour les moments de réconfort en bonbons et de bonne musique, comme on les aime. Et enfin, un immense merci à Dimitri Kereselidze, le Grand frère, cousin ou encore le tonton de labo, pour ta présence à toute épreuve. Merci de m'avoir nourrie de bonnes idées, de motivation, mais surtout de chocolat ! Tu as toujours été là, que ce soit pour les expériences *in vivo* ou pour me donner des conseils, même sur des sujets plus personnels (un Nantais te remerciera). Ta bienveillance et ton soutien ont été inestimables, et je suis vraiment reconnaissante pour ta présence, même dans les moments les plus difficiles.

Un merci à Estelle Porret, même si nos moments ensemble ont été brefs, pour ta gentillesse et ton esprit d'aventure. Grâce à toi, j'ai pu voyager à travers tes récits et découvrir des horizons nouveaux. Un grand merci à Marie Hautère pour ta générosité et ton incroyable canapé en guise de trampoline. Le barython de Massy fait toujours partie de ma to do list. Un grand merci à Goran Stanajic Petrovic pour ta bonne humeur, ta folie, les soirées Purple et bien sûr, ton goût pour le gin qui a apporté une touche de fun à mes journées. Merci aussi à Céline Chevaleyre pour avoir toujours été présente même dans la galère et je dirai même surtout dans la galère et pour les moments de réconfort que j'ai trouvés dans les posts Instagram qu'on s'envoyait. Ces petits échanges ont été une belle source de soutien et de légèreté pendant cette aventure.

Un grand merci à Héléne Quelquejay pour ta bienveillance et nos échanges sur le monde de la recherche

et pour les précieux conseils quant à la suite de mon projet professionnel. Merci à Anne-Laure Grindel pour ton aide précieuse et ta disponibilité surtout lors de mes dernières expériences. Ton soutien a été d'une grande importance et m'a permis d'avancer sereinement dans mes travaux. Encore un immense merci pour votre aide et la relecture de ma thèse.

Je remercie encore tous les chercheurs et le personnel de BioMaps que j'ai eu le plaisir de croiser durant ces 3 années et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail. Un remerciement particulier à Simon Specklin et Mylène Richard pour avoir développé et produit les radiopharmaceutiques utilisés durant ma thèse. Un grand merci également à Antoine Pinon et Phillipe Gervais pour m'avoir fourni les radiopharmaceutiques cliniques nécessaires à mes expériences *in vivo*.

Un grand merci à M. Vincent Brulon et Yohan Fontyn pour m'avoir sauvé à plusieurs reprises lors des bugs TEP. Leur réactivité et leur expertise ont été d'une grande aide pour résoudre ces problèmes techniques. Un remerciement particulier pour Kévin Phansavath, mon frère de labo ! Pour tous les moments d'écoute, de partage, et même de baston. J'aurai ma revanche à la prochaine partie !

Je remercie également Cristina pour les accueils chaleureux de bon matin, mes petites plantes se portent bien grâce à toi. Et un grand merci à Marianne Lafosse pour son aide précieuse et sa gentillesse. Sans toi, le congrès à Taïwan n'aurait jamais eu lieu ! Un énorme merci pour ton implication, ton énergie et ta bonne humeur. Tu as joué un rôle essentiel, et je suis vraiment reconnaissante de t'avoir eu à mes côtés pour cette aventure.

Un remerciement particulier aux personnes du 3ème étage, en commençant par le Bureau des chimistes ! Merci à Julien, Aritza, Zélié Faudemer, Alexandre Hauwelle et Steve Huvelle pour leur bonne humeur constante, toujours à l'affût des informations et d'avoir été une source de bonbons. Un merci spécial à Seb Beuché pour son bon Ricard et ses soirées chèvres mémorables. Et à Eugénie Pincemail, ma Nini, pour avoir été un soutien à toute épreuve, toujours présente pour me remonter le moral et partager tes meilleurs dramas Netflix du moment. Une to do list d'expo et de restaurants nous attend !

Un immense merci à mon binôme de labo, Amélie Soyer, pour m'avoir fait découvrir une passion pour les bobs, la greygoose et surtout les chaussettes ! J'attends que tu m'apprennes à surfer et que tu me fasses déguster la brioche vendéenne ! Et à Gaëlle Hugon, ma Gagou, je te serai toujours reconnaissante de m'avoir sauvée d'un train déboulant en pleine vitesse sur une route. Toujours présente quand il le faut ! Comme on dit, rendez-vous dans dix ans ou dans une heure autour d'un verre ! Merci à vous de m'avoir portée littéralement et pour combien on se la remet pour un Angers 4.0 ?

Un immense merci à ma co-thésarde et co-bureau préférée CamCam (Camille Dubuc). Ces trois années de thèse n'auraient pas eu la même saveur sans ta présence (Mon admiratrice fournisseuse de bonbons secrète e plus si secrete que ça) ! Partager mon bureau avec toi a été un véritable plaisir, du premier jour

à notre dernier jour en tant que doctorantes. Merci également à Nath (Nathalie Barrau) pour ton ouverture d'esprit et m'avoir fait découvrir ton incroyable fanfare, à Ithar Gharmaoui pour ta gentillesse et les discussions à cœur ouvert que nous avons eues autour d'un thé ou en fin de journée dans le bureau, à Alexane Pasquier pour ton enthousiasme et ton implication pour partager les meilleures adresses des bars pas chers de Paris, et enfin à Quentin pour ton calme et ta sérénité. Merci d'avoir partagé un bureau avec moi et, surtout, pour toutes nos pauses café ! Merci à ma petite Anna Reitman pour ta mignonnerie à toute épreuve, la plus jeune et l'enfant reine de bbDMI ! Merci à Sara Benchara pour ta collection de thés délicieux et à Alix Chazottes pour m'avoir fait découvrir le monde de Notion. Un grand merci à Adrien Paillet, membre du trio de galériens, pour tous les moments partagés et les défis que nous avons surmontés. Vous avez tous été des compagnons de route incroyables !

Remerciements spéciaux à mes Pamelaz d'amour (Cassandra Corvo, Sarah Leterrier, Soizic Martin et Léa Zimmerman). Pour toutes nos pauses thé, nos discussions, et pour avoir été des sources infinies de soutien, de réconfort et de bonne humeur. Vous avez été des piliers au SHFJ. Il est difficile de trouver les mots pour exprimer toute la gratitude que je ressens, mais sachez que vous avez marqué cette aventure de manière indélébile. Merci pour chaque éclat de rire, chaque moment partagé (car ils sont bien trop nombreux de Porto à Biarritz ou Branville à nos soirées paillettes cocktails jusqu'aux manip TEP de l'enfer et j'en passe :) et pour avoir été là, tout simplement. Vous êtes piquanté !!!

Mention particulière à toi, Clément Thibault, d'avoir été un véritable pilier et une épaule sur laquelle j'ai pu compter surtout pour cette dernière ligne droite ! Ton soutien a été inestimable, et j'espère de tout cœur être à la hauteur de tout ce que tu m'as apporté !

Je tiens à remercier de nouveau toutes les personnes de BioMaps que j'ai eu le plaisir de côtoyer au quotidien, et qui ont illuminé mes journées. Leur présence, leur bonne humeur et leurs sourires ont vraiment marqué cette expérience et l'ont rendue inoubliable. Merci pour tous ces moments partagés, que ce soit autour d'un repas, d'une bière, d'un jeu, ou lors d'un trajet en RER, en noctilien ou en Uber : : Camille, Nathalie, Sarah, Soizic, Céline, Gaëlle, Eugénie, Anna, Lenin, Clément, Corentin, Sina, Adrien, Gwenaël, Cassandra, Amélie, Steve, Séb, Julien, Sophia, Léa, Kevin, Marie, Précieuse, Alex, Axel, Anna, Ithar, Goran, Sara, Steven, Marc, Inès, Anne-Laure, Hélène, Marc.... Je vous souhaite le meilleur et j'espère avoir l'occasion de vous retrouver autour d'une bière un de ces jours !

Enfin, je remercie mes proches pour leurs attentions et leurs encouragements tout au long de ce projet de thèse ! Vous m'avez appris ce que l'amitié, l'amour et la famille signifient vraiment.

À tous mes copains nancéens : Antho, Hugo et Emilie, merci du fond du cœur pour votre amitié et votre soutien. Vous avez été présents à chaque étape, prêts à m'écouter dans mes moments de doute et à partager vos conseils. Et ça a fait toute la différence ! Un merci particulier à ma Coco, mon binôme de master avec qui on a toujours avancé, même à des kilomètres de distance, partageant nos doutes et nos

moments de galères. On a traversé cette aventure de thèse ensemble et on la terminera ensemble comme on a commencé !

Un énorme merci à Wawa pour être venu me voir et prendre soin de moi pendant des moments où j'en avais vraiment besoin. Tu as été là pour moi, et cela m'a fait un bien fou ! Et un grand merci aussi à Baz pour le séjour à Londres, qui est tombé à pic et m'a permis de souffler à un moment crucial et de repartir avec un nouvel élan.

A mes meilleures amies, mes sœurs de cœur ! Fay, Fred et Ouasila. Il n'y a pas besoin de grand discours pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissante. Depuis nos années de primaire et de collège, vous avez été là, toujours présentes, même pour des appels à des heures impossibles, pour des moments de doute ou de difficultés. C'est grâce à vous que j'ai pu traverser cette aventure avec plus de joie et de sourire. Vous êtes mes piliers, et je suis tellement chanceuse de vous avoir à mes côtés !

Une pensée particulière à ma famille surtout pour mes parents ma tante et mes cousins Ju et Vincent et mes frères Thierry, David et Tommy et ma sœur, ma Mimi d'amour pour leur soutien inébranlable, leur inquiétude sincère. Merci de m'avoir toujours accueillie chaleureusement, surtout quand je rentrais à la maison, avec ces bons plats qui m'ont toujours réchauffé le cœur. Vous avez transformé chaque retour en un moment réconfortant, entre soirées jeux de société, parties interminables de Smash Bros. Merci pour toutes les attentions et tous ces moments où vous avez toujours pensé à moi que cela soit pour des sorties ou des événements. Vous avez su faire en sorte que je ne me sente jamais seule, même dans les moments les plus durs. Je sais que je n'aurais pas pu traverser cette aventure sans chacun de vous. Merci infiniment !

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai croisées, de près ou de loin que je n'ai pas citées car la liste serait bien trop longue !

Un dernier mot pour conclure cette incroyable aventure : Merci !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES FIGURES.....	16
TABLE DES TABLEAUX	27
Liste des abréviations, sigles et acronymes.....	29
AVANT – PROPOS	33
CHAPITRE 1 : NOTIONS GENERALES	36
I. CONTEXTE	38
II. EVOLUTION DU CANCER DE LA PROSTATE : DE LA FORME LOCALISEE A LA METASTASE RESISTANTE A LA CASTRATION	39
II.1 PROSTATE.....	39
II.2 STADES DU CANCER DE LA PROSTATE	42
II.3 PROGRESSION VERS LE CANCER DE LA PROSTATE METASTASIQUE RESISTANT A LA CASTRATION	46
II.3.1 Dissémination et foyers métastatiques	46
II.3.2 Facteurs influençant la survenue des métastases et la résistance aux traitements	47
II.3.3 Microenvironnement tumoral.....	49
II.3.3.1 Hypoxie	50
II.3.3.2 Angiogenèse	51
II.4 PRISE EN CHARGE DU CANCER PROSTATIQUE	53
II.4.1 Détection précoce.....	53
II.4.2 Diagnostic	54
II.4.3 Traitement	56
II.4.3.1 Stade localisé à faible risque.....	56
II.4.3.2 Stade localisé à risque intermédiaire	58
II.4.3.3 Stade localisé à risque élevé ou au stade localement avancé	58
II.4.3.4 Récidive après traitement local.....	59
II.4.3.5 Stade métastatique hormonosensible	59
II.4.3.6 Stade métastatique résistant à la castration.....	60
III. RIADOTHERAPIE INTERNE VECTORISEE AU PSMA	63
III.1 PRINCIPE.....	63
III.2 DIFFERENTS TYPES DE RADIONUCLEIDES	64
III.2.1 Caractéristiques des rayonnements ionisants	64
III.2.2 Effets biologiques	66

III.2.2.1	Effets sur l'ADN	66
III.2.2.2	Effet des ROS.....	67
III.2.2.3	Effets sur l'hypoxie	67
III.2.2.4	Effet bystander	68
III.2.3	<i>Les radionucléides diagnostiques et thérapeutiques</i>	68
III.3	CIBLE THERAPEUTIQUE ACTUELLE : PSMA	70
III.3.1	<i>Structure</i>	70
III.3.2	<i>Ciblage du PSMA</i>	71
III.3.2.1	Les Anticorps	71
III.3.2.2	Les petites molécules.....	72
III.4	APPROCHE THERANOSTIQUE	74
III.4.1.1	Imagerie TEP.....	75
III.4.1.1.1	Principe de détection.....	75
III.4.1.1.2	Reconstruction de l'imagerie TEP.....	76
III.4.1.1.3	Analyse des images	76
III.5	ENJEUX CLINIQUES ACTUELS & PERSPECTIVES	79
III.5.1	<i>Imagerie TEP-PSMA</i>	79
III.5.1.1	Historique des radiopharmaceutiques approuvés sur le marché	79
III.5.1.2	Ligands du PSMA disponibles en France.....	79
III.5.1.3	Recommandations actuelles.....	80
III.5.2	<i>RIV au [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617</i>	82
III.5.2.1	Evolution et essais cliniques actuelles	82
III.5.2.2	Perspectives.....	84
III.5.3	<i>Limites</i>	85
III.5.3.1	Disponibilité des radionucléides.....	85
III.5.3.2	Infrastructure/Logistique	86
III.5.3.3	Effets indésirables et Toxicité	86
IV.	SONO-PERMEABILISATION	89
IV.1	BARRIERE ENDOTHELIALE	89
IV.2	LES ULTRASONS, UNE MODALITE PHYSIQUE DE DELIVRANCE	90
IV.3	MECANISMES.....	92
IV.3.1	<i>Microbulles</i>	92
IV.3.2	<i>Cavitation stable et inertielle</i>	94
IV.4	EFFETS BIOPHYSIQUES	98
IV.5	PARAMETRES ULTRASONORES	100
IV.5.1	<i>Fréquence</i>	101
IV.5.2	<i>Exposition ultrasonore : pression acoustique, intensité acoustique et indice mécanique</i>	102
IV.5.2.1	Pression de raréfaction.....	102
IV.5.2.2	Intensité acoustique	102
IV.5.2.3	Indice mécanique.....	103
IV.5.3	<i>Rapport cyclique</i>	103

IV.5.4	<i>Durée d'exposition</i>	104
IV.6	ESSAIS CLINIQUES.....	104
V.	OBJECTIFS DE THESE	112
CHAPITRE 2 : EVALUATION IN VITRO DE LA DELIVRANCE DE MOLECULES THERAPEUTIQUES PAR ULTRASONNS DANS LE CANCER DE LA PROSTATE.....		113
I.	INTRODUCTION	115
II.	CHALLENGES ET ETUDES IN VITRO ET PRECLINIQUES	115
II.1	PARAMETRES ULTRASONORES	115
II.2	SYSTEME ULTRASONORE	122
II.2.1	<i>Montage</i>	122
II.2.2	<i>Calibration du transducteur et caractérisation du champ acoustique</i>	122
III.	ETUDE DE L'EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE D'UN MODELE CELLULAIRE EPITHELIALE EN MONOCOUCHE	124
III.1	MATERIEL ET METHODES	125
III.1.1	<i>Système de culture (modèle inserts)</i>	125
III.1.1.1	Filtre	126
III.1.1.2	Taille de la porosité	126
III.1.2	<i>Modél cellulaire</i>	129
III.1.2.1	Culture cellulaire	131
III.1.3	<i>Etude TEER</i>	131
III.1.4	<i>Etude de la perméabilité</i>	133
III.1.4.1	Radiopharmaceutique à base de PSMA.....	133
III.1.4.1.1	Radiosynthèse	133
III.1.4.2	Coefficient de perméabilité	136
III.1.5	<i>Analyse statistique</i>	137
III.2	RESULTATS	138
III.2.1	<i>Effet de la sono-perméabilisation dans un modèle in vitro en monocouche</i>	138
III.2.1.1	Etude TEER.....	138
III.2.1.1.1	Génération et caractérisation fonctionnelle du modèle.....	138
III.2.1.1.2	Effet sur la résistance et la perméabilité de la monocouche cellulaire.....	138
III.2.1.2	Coefficient de perméabilité	141
III.2.1.2.1	Sélection de notre molécule	141
III.2.1.2.2	Effet de l'USMB sur la perméabilité moléculaire à travers une barrière épithéliale	143
III.3	DISCUSSION	144
IV.	ETUDE DE L'EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE D'UN MODELE DE TUMEUR PROSTATIQUE EN SUSPENSION	148
IV.1	MATERIEL ET METHODES	148
IV.1.1	<i>Dispositif d'étude</i>	148

IV.1.2	Modèle cellulaire tumorale prostatique	149
IV.1.3	Evaluation de l'efficacité de la sono-perméabilisation	151
IV.1.3.1.1	Etude en cytométrie en flux	152
IV.1.3.2	Etude de viabilité cellulaire	153
IV.1.3.3	Analyse statistique	155
IV.2	RESULTATS	155
IV.2.1	Effet de la sono-perméabilisation dans un modèle in vitro en suspension	155
IV.2.1.1	Analyse de la perméabilité cellulaire à part d'un cytométrie en flux	155
IV.2.1.2	Effet des USMB sur la viabilité cellulaire	162
IV.3	DISCUSSION	164
V.	CONCLUSION	167
CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'IMPACT DE LA SONO-PERMEABILISATION SUR LA		
DISTRIBUTION D'UN TRACEUR A USAGE DIAGNOSTIQUE DANS UN MODELE PRECLINIQUE		
MURIN DU CANCER DE LA PROSTATE 169		
I.	INTRODUCTION	171
I.	MISE EN PLACE D'UN MODELE PRECLINIQUE MURIN	172
I.1	REGLEMENTATION RELATIVE A L'EXPERIMENTATION ANIMALE	174
I.2	HEBERGEMENT DES SOURIS	174
I.3	SUIVI ET SURVEILLANCE DES SOURIS	174
I.4	ANESTHESIE DES SOURIS	175
II.	ETUDE D'IMAGERIE BIMODALE TEP/OPTIQUE DE LA DISTRIBUTION D'UNE NOUVELLE	
	SONDE PSMA	175
II.1	MATERIEL ET METHODES	176
II.1.1	Modèle de tumeur xénogreffe	176
II.1.2	Imagerie TEP	176
II.1.2.1	Evaluation de la pharmacocinétique dérivée de l'image (Dose traceuse)	176
II.1.2.2	Evaluation de la sélectivité par test dit de blocking	177
II.1.3	Imagerie optique par fluorescence	178
II.2	RESULTATS	178
II.2.1	Mise en place d'un modèle préclinique murin	178
II.2.1.1	Evolution de la croissance tumorale in vivo : modèles de xénogreffe sous-cutanée	178
II.2.2	Etude de la biodistribution d'un radiotraceur à usage diagnostique	180
II.2.2.1	Imagerie TEP et biodistribution dérivée de l'image dans un modèle murin humanisé	180
II.2.2.2	Corrélation de la distribution déterminée par imagerie optique et par imagerie TEP	184
II.2.2.1	Evaluation de la sélectivité par test de blocking	186
II.3	DISCUSSION	192
III.	ETUDE DE LA DELIVRANCE D'UN RADIOPHARMACEUTIQUE PAR ULTRASONNS DANS	
	UNE TUMEUR DE LA PROSTATE	194

III.1	MATERIEL ET METHODES	195
III.1.1	Modèle murin	195
III.1.2	Configuration expérimentale ultrasonore	196
III.1.3	Caractérisation de l'ouverture de la barrière endothéliale suite à la sono-perméabilisation	197
III.1.4	Imagerie TEP	198
III.1.5	Biodistribution ex vivo et compteur γ	198
III.1.6	Etude en cytométrie de flux	198
III.1.7	Echographie de contraste.....	199
III.1.8	Immuno-histofluorescence.....	201
III.2	RESULTATS	201
III.2.1	Effet de la sono-perméabilisation sur l'accumulation in vivo du médicament radiopharmaceutique dans les tumeurs	201
III.2.2	Evaluation de l'effet de la sono-perméabilisation sur la perfusion sanguine tumorale	206
III.2.3	Evaluation ex vivo de l'impact de la sono-perméabilisation.....	209
III.2.3.1	Evaluation ex vivo de l'impact de la thérapie ultrasonore sur la délivrance de médicament dans la tumeur	209
III.2.3.1	Evaluation de l'impact de la thérapie ultrasonore sur l'internalisation cellulaire médicament	212
III.3	DISCUSSIONS	216
IV.	ETUDE EN COURS SUR L'EVALUATION DE L'EFFET THERAPEUTIQUE SYNERGIQUE DU [^{177}Lu]LU-PSMA-617 COMBINE AUX USMB.....	220
IV.1	CONTEXTE	220
IV.2	MATERIEL ET METHODES	221
IV.2.1	Synthèse du radiopharmaceutique	221
IV.2.1.1	HPLC analytique	221
IV.2.1.2	Marquage de PSMA-617	221
IV.2.1.3	Stabilité in vitro de [^{177}Lu]-PSMA	223
IV.2.2	Modèle murin	223
IV.2.3	Configuration expérimentale ultrason	223
IV.2.4	Protocole de traitement et conditions expérimentales.....	224
IV.2.4.1	Evaluation de la croissance tumorale.....	225
IV.2.4.2	Étude de survie chez la souris avec [^{177}Lu]Lu-PSMA-617	225
IV.2.4.3	Biodistribution.....	225
V.	CONCLUSION	226
	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	228
I.	EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE CELLULAIRE ET LA DELIVRANCE DE MEDICAMENTS, DANS DEUX MODELES IN VITRO DISTINCTS	230
I.1	SYNTHESE DES RESULTATS.....	230
I.1.1	Effet transitoire de la sono-perméabilisation et un impact sur la perméabilité d'un modèle épithéliale en monocouche cellulaire	230

I.1.2	<i>Impact de la sono-perméabilisation sur la perméabilité membranaire et viabilité cellulaire sur un modèle de cellules tumorales prostatiques en suspension.....</i>	231
I.2	LIMITATIONS	232
I.2.1	<i>Modèle de la barrière épithéliale en monocouche cellulaire</i>	232
I.2.1.1	Variabilité des résultats selon les conditions expérimentales	232
I.2.1.2	Dispositif d'étude	232
I.2.1.3	Modèle <i>in vitro</i> simple.....	232
I.2.2	<i>Modèle in vitro de cellules prostatiques tumorales en suspension.....</i>	233
I.2.2.1	Réponse hétérogène entre les lignées cellulaires	233
I.2.2.2	Limites d'efficacité et cytotoxicité	233
I.2.3	<i>Limitations des modèles in vitro et besoins d'optimisation des paramètres ultrasonores</i>	233
I.3	PERSPECTIVES	234
I.3.1	<i>Modèle de la barrière épithéliale en monocouche cellulaire</i>	234
I.3.1.1	Utilisation de plusieurs marqueurs de perméabilité	234
I.3.1.2	Analyse par microscopie de l'impact de la sono-perméabilisation.....	234
I.3.1.2.1	Accumulation intracellulaire.....	234
I.3.1.2.2	Impact sur l'expression et la localisation des jonctions serrées	234
I.3.1.3	Évaluation de la viabilité cellulaire	235
I.3.2	<i>Modèle in vitro de cellules prostatiques tumorales en suspension.....</i>	235
I.3.2.1	Études comparatives entre d'autres lignées cellulaires	235
I.3.2.2	Évaluation du temps d'ouverture des membranes cellulaires	235
II.	ÉVALUATION DE LA DELIVRANCE D'UN RADIOPHARMACEUTIQUE A USAGE	
	DIAGNOSTIQUE PAR ULTRASONS DANS UNE TUMEUR DE LA PROSTATE.....	236
II.1	SYNTHESE DES RESULTATS.....	236
II.1.1	<i>Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques</i>	236
II.1.2	<i>Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate</i>	237
II.2	LIMITATIONS	238
II.2.1	<i>Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques</i>	238
II.2.1.1	Défis liés à la précision de l'imagerie bimodale.....	238
II.2.1.2	Variabilité de la biodistribution et implications pour la transposition clinique.....	238
II.2.2	<i>Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate</i>	238
II.2.2.1	Dispositif du système de sono-perméabilisation	238
II.2.2.2	Absence d'analyse préalable de la perfusion	239
II.2.2.3	Effets limités sur l'internalisation intracellulaire	239
II.2.2.4	Perturbation tissulaire	239
II.2.2.5	Complexité de l'interprétation des résultats liés à CD31 : impact de l'analyse de la barrière endothéliale tumorale	239

II.2.2.6	Limites liées aux microbulles	240
II.2.2.1	Hétérogénéité de la réponse tumorale : limite du modèle murin	240
II.3	PERSPECTIVES	241
II.3.1	<i>Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques</i>	241
II.3.1.1	Evaluation de la biodistribution ex vivo	241
II.3.1.2	Optimisation de la détection et de l'administration des traceurs pour les tumeurs prostatiques	241
II.3.2	<i>Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate</i>	241
II.3.2.1	Amélioration des techniques d'imagerie	241
III.	PERSPECTIVES GLOBALES : OPTIMISATION DE LA SONO-PERMEABILISATION DANS LES MODELES IN VITRO ET IN VIVO	242
III.1.1	Optimisation des paramètres ultrasonores.....	242
III.1.2	Mesure de la cavitation passive	242
III.1.3	Optimisation du modèle expérimental.....	242
REFERENCES		244

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie et structure histologique de la prostate humaine. La prostate peut être divisée en cinq régions anatomiques : la zone centrale, la région périurétrale, la zone de transition, la zone périphérique et la région fibromusculaire (ou stroma). La plupart des tumeurs prennent naissance dans la zone périphérique. Chaque région comprend des canaux et des acini noyés dans le stroma, qui contient divers types de cellules, principalement des cellules musculaires lisses, mais aussi des fibroblastes, qui jouent un rôle important dans le développement de la prostate. Les canaux et les acini sont constitués d'une seule couche d'épithélium composée de cellules basales, les cellules intermédiaires, de cellules neuroendocrines et les cellules sécrétoires lumenales exprimant le RA (extraite et traduite de Rebello et al. 2021)..... 40

Figure 2 : Voie de synthèse simplifiée du PSA. A. Activation des récepteurs aux androgènes. Des facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor : Facteur de croissance épidermique), l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1 : Facteur de croissance analogue à l'insuline I) et l'IL-6 (Interleukin-6) activent les RA via des récepteurs tyrosine kinase, stimulant ainsi la prolifération cellulaire. B. Synthèse des androgènes La 5 α -réductase convertit la testostérone en DHT, un androgène plus actif, essentiel dans cette voie. C. Fixation de la DHT aux récepteurs aux androgènes. La DHT se lie aux récepteurs aux androgènes dans le cytoplasme, formant un complexe qui se transloque dans le noyau. D. Amplification des récepteurs aux androgènes. Le complexe DHT-RA active l'expression des gènes cibles en se liant à des éléments de réponse aux androgènes, amplifiant ainsi leur transcription. E. Recrutement des coactivateurs. Les coactivateurs agissent comme des protéines chaperonnes corégulatrices en aidant à activer la transcription du gène PSA et ainsi augmenter sa production dans les cellules prostatiques. F. Modification post-traductionnelle des récepteurs aux androgènes. Les récepteurs aux androgènes subissent des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, qui modifient leur activité et régulent l'expression des gènes cibles, y compris le PSA, favorisant la croissance et la survie cellulaire (Makino, Izumi, et Mizokami 2021). 41

Figure 3 : Voie possible de progression du cancer de la prostate chez l'Homme. Chaque stade de progression est corrélé à des altérations génétiques et à la perte de régions chromosomiques spécifiques impliquées dans ce processus. Epithélium normal : L'état initial, où les cellules de la prostate présentent une morphologie et une fonction normales. Lésion dysplasique : Des modifications cellulaires précoces apparaissent, indiquant un risque accru de développement tumoral, mais sans invasion. Néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) : Stade intermédiaire où des cellules anormales sont présentes dans l'épithélium, représentant un précurseur du cancer. Carcinome invasif : La tumeur devient invasive, s'étendant au-delà de la couche épithéliale et atteignant les tissus environnants. Métastases et indépendance des androgènes : La maladie progresse vers des métastases à distance, avec des cellules tumorales devenant résistantes à la thérapie anti-androgénique, ce qui complique le traitement. (Vecchione et al. 2007) 43

Figure 4 : La classification et la stadification du cancer de la prostate. (A) Le système de stadification des tumeurs. Le stade I représente une maladie localisée et le stade IV une maladie avancée avec métastases (B) Le système de classification de Gleason. Le score de Gleason se compose de deux grades, chacun attribué

sur une échelle de 1 à 5. Le premier grade représente le modèle histologique le plus prédominant, tandis que le second grade représente le modèle le moins prédominant. La somme des deux grades donne un score total allant de 2 à 10. Les scores plus élevés indiquent une agressivité accrue de la tumeur. Le grade de Gleason, quant à lui, désigne le niveau d'anormalité des cellules cancéreuses observées au microscope. Un grade de 1 indique des cellules relativement normales, tandis qu'un grade de 5 désigne des cellules très anormales et agressives. Le grade de Gleason est un indicateur clé de la progression du cancer et aide à orienter les décisions thérapeutiques. (Kim et al. 2021). 45

Figure 5 : Processus métastatique de la tumeur primaire à l'envahissement d'autres organes. Le processus métastatique débute par la tumeur primaire, qui se développe et stimule l'angiogenèse pour nourrir sa croissance. Ensuite, des cellules tumorales se détachent de la tumeur, pénètrent dans la circulation sanguine (intravasation) et deviennent des cellules tumorales circulantes. Ces cellules adhèrent à la paroi des vaisseaux sanguins et subissent une extravasation, leur permettant de quitter la circulation. Finalement, elles se prolifèrent pour former une tumeur secondaire dans un autre organe, complétant ainsi le processus métastatique (extraite de Prunier 2015). 46

Figure 6 : Foyers métastatiques dans le cancer avancé de la prostate. La dissémination aux tissus mous est associée à une survie encore plus faible. Les sites courants de dissémination métastatique dans le cancer avancé de la prostate incluent la propagation locorégionale vers les ganglions lymphatiques (99 %) et les os (84 %). Les sites métastatiques moins fréquents comprennent les ganglions lymphatiques distants (10,6 %), les viscères (~10 %) et le cerveau ainsi que la dure-mère (<2 %) (Rebello et al. 2021). 47

Figure 7 : Les différents niveaux d'hétérogénéité tumorale. Les différences entre les tumeurs prostatiques, dues aux caractéristiques variées des patients, constituent le niveau d'hétérogénéité inter-patients. Les variations observées entre les foyers, ainsi qu'entre les tumeurs primaires et métastatiques, définissent le niveau d'hétérogénéité inter-tumorale. Enfin, la diversité intra-tumorale fait référence aux différences entre les cellules tumorales au sein d'un même foyer. Les coupes histologiques à l'hématoxyline et à l'éosine illustrent ces différents niveaux d'hétérogénéité (extraite et traduite de Flores-Téllez et Baena 2022). 48

Figure 8 : Le microenvironnement tumoral hétérogène. Le microenvironnement tumoral présente une topographie dynamique au sein de la tumeur. L'état hypoxique, la vascularisation, l'épigénétique, ainsi que l'instabilité génomique peuvent interagir de manière complexe et dynamique avec les cellules du cancer de la prostate (fibroblastes associés au cancer, de cellules stromales, de cellules immunitaires au sein d'une matrice extracellulaire) (extraite et traduite de Ge, Wang, et Cheng 2022) 49

Figure 9 : Microenvironnement tumoral : structure et rôles dans l'oncogenèse. Les différents éléments du microenvironnement tumoral favorisent la résistance au traitement et l'envahissement tumoral local et à distance, soulignant son importance dans la progression du cancer. Le compartiment mésenchymateux, caractérisé par la desmoplasie de la matrice extracellulaire, contribue à la rigidité tumorale et favorise la croissance des cellules cancéreuses. Le compartiment immunitaire est marqué par une inflammation chronique, qui peut entraîner une altération de la matrice et faciliter l'échappement immunitaire des cellules tumorales, tout en stimulant la prolifération vasculaire pour alimenter la tumeur. L'instabilité du réseau vasculaire tumoral, se traduisant par une hétérogénéité de la densité vasculaire et un débit sanguin irrégulier, limite l'apport en nutriments et en oxygène, aggravant ainsi l'état hypoxique de la tumeur. Cette hypoxie entraîne une sécrétion accrue de facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), favorisant la néo-

angiogénèse, qui alimente la croissance tumorale (Lorion et al. 2016)..... 50

Figure 10 : Les différents mécanismes de l'angiogénèse tumorale. L'angiogénèse se distingue en 7 mécanismes étroitement liés à l'invasion tumorale, aux métastases et à la résistance aux thérapies traditionnelles. L'angiogénèse par bourgeonnement est le processus principal de la vascularisation des tumeurs avec l'émergence de nouvelles branches vasculaires à partir des extrémités et des parois latérales des vaisseaux sanguins préexistants qui finissent par se connecter aux vaisseaux voisins et infiltrer le tissu tumoral. L'angiogénèse par intussusception se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux par la division et l'invagination des vaisseaux préexistants qui se bifurquent et forment des ponts (appelés piliers) pour donner naissance à deux voire plusieurs vaisseaux distincts. La vasculogénèse implique la formation de nouveaux réseaux vasculaires à partir de cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse ou résidant dans la paroi des vaisseaux qui ont été recrutés et se sont différenciés. Le mécanisme de co-option vasculaire ne se repose pas sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins mais sur le système vasculaire préexistant du tissu sain pour assurer l'approvisionnement du tissu tumoral. Le mimétisme vasculogénique décrit la capacité des cellules tumorales de mimer les propriétés des cellules endothéliales en s'intégrant dans les vaisseaux sanguins préexistants, facilitant ainsi le transport des érythrocytes et de l'oxygène dans le tissu tumoral. Dans le processus de trans-différenciation des cellules souches cancéreuses, ces cellules spécialisées acquièrent des phénotypes endothéliaux et se transforment en cellules endothéliales. Enfin le remodelage vasculaire ou « pruning » permet d'optimiser le réseau de ramification pour améliorer les propriétés du transport vasculaire pouvant conduire à la rupture de l'occlusion et formant ainsi deux segments de vaisseaux distincts (Grizzi et al. 2023). 52

Figure 11: Parcours de soins chez les Hommes ayant été diagnostiqués pour le cancer de la prostate. TDM : tomomodensitométrie IRM, imagerie par résonance magnétique ; PSA, antigène spécifique de la prostate. La décision de procéder ou non à une biopsie doit être prise en fonction des résultats du toucher rectal, de l'origine ethnique, de l'âge, des comorbidités, du taux de PSA libre/total, des antécédents de biopsie et des valeurs du patient (extraite et traduite de O'Reilly et O'Kennedy 2017; Parker et al. 2020)..... 55

Figure 12 : Options thérapeutiques en fonction de la maladie. Pour le cancer de la prostate localisé, on recommande généralement un traitement local, tel que la chirurgie ou la radiothérapie. Dans le cas d'un cancer métastatique, les options de traitement incluent l'androgénothérapie (ADT), qui vise à réduire le taux PSA à son niveau le plus bas, connu sous le nom de nadir du PSA. Ce nadir est un indicateur important, car un taux de PSA minimal indique une bonne réponse au traitement. Les médecins surveillent également la progression biochimique (c'est-à-dire les changements des niveaux de PSA) et radiologique (imageries médicales) pour évaluer l'évolution de la maladie. Si le cancer continue de progresser malgré un traitement de première ligne, une seconde ligne d'ADT ou une chimiothérapie peut être envisagée. Tout au long de ce parcours thérapeutique, il est essentiel de prendre en compte l'impact sur la qualité de vie des patients (extraite et traduite de Bousset 2019). 60

Figure 13 : Composition d'un médicament radiopharmaceutique (Anne-Laure Giraudet 2018)..... 63

Figure 14 : Schéma des types de désintégration des radionucléides et des différents types de rayonnements utilisés en clinique. Les particules α sont constituées de deux protons et de deux neutrons, avec une structure similaire à celle d'un noyau de ^4He sans les électrons qui l'entourent. Les radio-isotopes émetteurs de β sont des électrons chargés négativement qui sont émis par un atome radioactif en raison du processus de

désintégration β . Lors de la désintégration β , dans un noyau instable, un neutron est converti en proton, et ce processus crée un électron énergétique (particule β) (extraite et traduite de Peltek et al. 2019).	65
Figure 15 : Représentation de la densité d'ionisation des particules α-, β et des électrons Auger. Les particules α sont considérées comme des rayonnements densément ionisants, les particules β sont faiblement ionisantes et les électrons Auger forment des amas avec une forte densité d'ionisation (extraite et traduite de Gudkov et al. 2015).....	67
Figure 16 : Structure du PSMA. Le PSMA est constitué d'un court domaine intracellulaire contenant un site de liaison qui peut être ciblé par les anticorps 7E11, d'une région transmembranaire hydrophobe et d'une partie extracellulaire du PSMA qui se compose en 3 sections. La première section (vert foncé) contient deux domaines de fonction inconnue et des régions riches en proline et en glycine comme liens. La deuxième section (vert clair) est le grand domaine catalytique, qui contient un site de liaison pour les anticorps J591 ainsi que le site de reconnaissance du substrat actif qui est ciblé par les inhibiteurs du PSMA. La dernière section (orange) est le domaine de fonction inconnu dans lequel est localisé un domaine de dimérisation hélicoïdale. (Maurer et al. 2016)	70
Figure 17 : Concept de pair RP diagnostique et thérapeutique. (1) Une fois le RP diagnostique injecté, (2) l'imagerie moléculaire est réalisée à l'aide de la TEP ou de la TEMP pour identifier les lésions. (3) Le patient est sélectionné en fonction des résultats du scanner et une dosimétrie pré-thérapeutique est effectuée pour calculer la dose thérapeutique personnalisée. (4) Pour la thérapie, la même molécule marquée par un radionucléide thérapeutique est injectée au patient. (5) Les particules α/β - permettent la mort des cellules tumorales et l'évaluation de la réponse se fait par imagerie moléculaire. (extraite et traduite de Chhabra et Thakur 2022).....	74
Figure 18 : Principe physique de la TEP. Suite à l'annihilation d'un positron et d'un électron de la matière, deux photons de 511 keV sont émis dans des directions opposées. Lorsque deux interactions sont détectées simultanément dans un anneau de détecteurs entourant le patient, on suppose qu'une annihilation s'est produite sur la LOR reliant les deux interactions. En enregistrant de nombreuses LOR, la distribution de l'activité peut être reconstruite par tomographie. (Lafforgue et al. 2019)	75
Figure 19 : Protocole d'acquisitions statiques et dynamiques. (A) Les images statiques sont reconstruites en additionnant toutes les informations après un délai après l'injection du traceur prédéfini. (B) Les séquences d'imagerie dynamique sont obtenues par échantillonnage temporel en série à différents moments après l'injection (Morigi, Kovaleva, et Phan 2022).	77
Figure 20 : Exemple de courbe temps-activité des concentrations (TAC) de radioactivité ((Bowen et al. 2011)	78
Figure 21 : Aperçu schématique des essais cliniques théranostiques PSMA sélectionnés en juin 2021 (traduite de H. Zhang et al. 2021)	82
Figure 22 : Perspectives de développement de la RIV Thérapeutique en nombre de patients potentiellement éligible par indication, en France (A. -L. Giraudet et al. 2024).	85
Figure 23 : Méthodes d'administration médiées par des stimuli physiques, chimiques et biologiques. Les stimuli physiques reposent principalement sur la température, le champ électrique, la lumière, les ultrasons, les champs magnétiques et la déformation mécanique. Les stimuli chimiques comprennent le pH, la force ionique, l'oxydoréduction et le solvant. Les stimuli biologiques impliquent généralement des analytes et des	

biomacromolécules tels que le glucose, le glutathion, les enzymes, les récepteurs et les métabolites surproduits dans l'inflammation. (extraite et traduite de Cabane et al. 2012).....	91
Figure 24 : Schéma d'un agent de contraste ultrasonore (Novell, Escoffre, et Bouakaz 2013).....	93
Figure 25 : Illustration de l'oscillation radiale des microbulles lors de l'exposition ultrasonore (extraite et traduite de Kothapalli 2015).....	95
Figure 26 : Mécanismes sous-jacents de la cavitation stable et inertielle. L'extravasation du médicament est augmentée en stimulant les voies paracellulaires (c'est-à-dire la rupture des jonctions serrées) et transcellulaires (c'est-à-dire la transcytose). (Lammertink et al. 2015)	96
Figure 27 : Représentation des 5 mécanismes physiques expliquant la sono-perméabilisation (Frinking et al. 2020)	97
Figure 28 : Mécanismes biologiques induits par la cavitation des microbulles. (A) Les effets mécaniques provoquent la formation de pores dans la membrane cellulaire permettant l'entrée du calcium par diffusion passive. (B) Les effets chimiques induits par la cavitation des MB entraîne la formation de ROS qui module les canaux ioniques ou entraîne une rupture de la membrane par peroxydation lipidique. L'influx de calcium médié par ces ROS stimule l'endocytose et est compensé par l'efflux de potassium via les canaux, ce qui entraîne une hyperpolarisation de la membrane cellulaire. (C) Les contraintes de cisaillement induites par des bulles en cavitation stable peuvent déformer la membrane cellulaire. Les réarrangements du cytosquelette et des différences de tension membranaire, sont détectées par des mécanosenseurs qui vont déclencher une cascade de signalisation qui influence les processus d'endocytose/exocytose. (extraite et traduite de Lentacker et al. 2014).....	98
Figure 29 : Caractéristiques d'une onde ultrasonore (Deprez et al. 2021)	100
Figure 30 : Expansion des Publications sur les Ultrasons Thérapeutiques : Analyse des Études In Vitro et Précliniques	105
Figure 31 : Proportion des sites de recherche selon la thématique des effets biologiques non thermiques des ultrasons thérapeutiques au stade clinique (White et al. 2024)	105
Figure 32 : Interaction des paramètres ultrasonores (pression acoustique et durée d'impulsion) dans la détermination des comportements des microbulles. La transition des comportements des bulles d'un type à un autre dépend des paramètres ultrasonores (Fan, Chen, et Deng 2014)	121
Figure 33: Profil du faisceau thérapeutique mesuré a) Scan latéral ; b) Scan en élévation	123
Figure 34 : Courbe de calibration montrant le pic de pression négative dans l'eau en fonction de la tension appliquée pour l'excitation de notre transducteur. Chaque mesure d'amplitude de pression acoustique, issue de 20 moyennages, a été réalisée avec un espacement de 0,5 mm dans les deux directions du plan étudié	124
Figure 35 : Schéma d'un insert de Transwell. Ce dispositif se compose d'une chambre apicale et d'une chambre basolatérale, séparées par une membrane microporeuse, permettant d'étudier la migration et la perméabilité d'une monocouche cellulaire.	125
Figure 36: Schéma d'illustration du bain de sonication	128
Figure 37 : Radiosynthèse de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA	134
Figure 38: Disposition du synthétiseur AIO pour la radiosynthèse de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA.	135

Figure 39 : Chromatogramme HPLC de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA.....	136
Figure 40 : Évaluation temporelle du TEER normalisée de MDCK II-MDR1 : comparaison entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux A) MB ; B) US1 ; C) US1MB ; D) US2 ; E) US2MB ; F) US3 ; G) US3MB Les cellules MDCK II-MDR1 ont été maintenues dans un bain marie de 37°C pour une densité d'ensemencement de 50000 cellules/puit. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=4). Méthode d'analyse : test ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Dunnett pour les résultats significatifs (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 ; **** p < 0,0001).	139
Figure 41 : Courbes de calibration de la molécule froide marquée à la cyanine 7. L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de 55779 ± 2230, un intercept de 1682 ± 1341 et R ² = 0,9572.	142
Figure 42 : Coefficient de perméabilité apparente moyenne de la molécule froide [¹⁹F]F-Cy7-PSMA à travers une barrière épithéliale MDCKII-MDR1, mesuré sous différentes conditions ultrasonores : sans microbulles et traitement ultrasonore (USMB), avec microbulles uniquement (MB), et avec traitements ultrasonores sans (US1, US2, US3) ou avec microbulles (US1MB, US2MB, US3MB) à divers intervalles (30,60, 90 et 120 minutes) après l'exposition. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=3) et ont été analysées par un test ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Dunnett pour les résultats significatifs (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).	143
Figure 43 : Bain de sonication pour le modèle en suspension. Chaque cuvette transparente en plastique contenant la suspension cellulaire a été positionnée à 3 cm devant le transducteur et placée sous agitation douce avec un agitateur magnétique pour homogénéiser la solution.	149
Figure 44: Principe du test MTS pour évaluer l'activité cellulaire. Le réactif intermédiaire (PES) transfère l'électron du NADH du cytoplasme dans le milieu de culture pour réduire le MTS en une molécule de formazan soluble (Riss et al. 2016)	154
Figure 45 : Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules humaines de LNCaP cultivées in vitro incubées avec de l'iodure de propidium. (A) Graphique représentatif de la hauteur de diffusion avant (FSC-H) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H) afin d'identifier les cellules d'intérêt en fonction de leur taille et de leur granularité. Les cellules tumorales LNCaP (quadrant inférieur droit Q3) ont été distinguées des débris cellulaires (quadrant inférieur gauche Q4). (B) Graphique représentatif de la surface de diffusion latérale (SSC-A) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H). Les événements coïncidents ont été exclus de la population cellulaire. (C) Histogramme représentant le profil de coloration à l'IP avec une estimation du pourcentage de cellules sonoporées avec le pic d'intensité à droite. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'événements de la population parentale est indiqué.	156
Figure 46 : Graphiques représentatifs des expériences de CMF sur les cellules humaines de LNCaP cultivées in vitro incubées avec de l'iodure de propidium pour les différentes conditions expérimentales. La colonne de gauche présente le graphique SSC-H en fonction de FSC-H, la colonne centrale affiche le graphique SSC-A en fonction de SSC-H, et la colonne de droite montre les histogrammes du profil d'absorption de l'IP des cellules tumorales. Les données du groupe témoin (cellules seules) ont été comparées et superposées avec ceux de chaque condition expérimentale (A) cellules non traitées mais uniquement sous agitation ; (B) cellules exposées uniquement aux MB (SonoVue) ; Cellules exposées (C) sans MB et (D) avec MB aux paramètres US1 ; Cellules exposées (E) sans MB et (F) avec MB aux paramètres US2 ; Cellules	

exposées (G) sans MB et (H) avec MB aux paramètres US3.....	158
Figure 47 : Pourcentages de cellules IP positives respectivement pour les deux lignées cellulaires. (A) LNCaP et (B) 22RV après exposition par US médiée par des MB. Toutes données ont été normalisées par rapport au groupe témoin (cellules seules) respectivement pour les lignées cellulaires (C) LNCaP et (D) 22RV1. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à un facteur (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$; **** : $p \leq 0,0001$).	159
Figure 48 : Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules humaines de LNCaP cultivées in vitro incubées avec un ligand ciblant le PSMA marqué à la cyanine 7 (A) Graphique représentatif de la hauteur de diffusion avant (FSC-H) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H) afin d'identifier les cellules d'intérêt en fonction de leur taille et de leur granularité. Les cellules tumorales LNCaP (quadrant inférieur droit Q3) ont été distinguées des débris cellulaires (quadrant inférieur gauche Q4). (B) Graphique représentatif de la surface de diffusion latérale (SSC-A) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H). Les événements coïncidents ont été exclus de la population cellulaire. (C) Histogramme représentant le profil de coloration à l'IP avec une estimation du pourcentage de cellules sonoporées avec le pic d'intensité à droite. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'événements de la population parentale est indiqué	161
Figure 49 : Superposition des analyses de CMF (graphique de diffusion FSC et SSC, histogramme avec profil de fluorescence de traceur ciblant le PSMA marquée à la cyanine 7 pour les cellules LNCaP des groupes témoin (cellules seules) et US3MB.....	161
Figure 50 : (A) Pourcentage de cellules positives au traceur ciblant le PSMA marqué à la cyanine 7 pour la lignée LNCaP après exposition par ultrasons médiée par des microbulles. (B) Toutes les données ont été normalisées par rapport au groupe témoin. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3). 162	
Figure 51 : Viabilité cellulaire mesurée à l'aide d'un test MTS 24h heures après les différents traitements avec ou sans ultrasons assistés ou non par microbulles SonoVue pour (A) la lignée LNCaP et (B) la lignée 22RV1. Chaque bar représente la moyenne de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreur indiquent l'écart type. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey (* : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,01$). 163	
Figure 52 : Evolution de la croissance tumorale in vivo : comparaison des modèles de xénogreffe sous-cutanées de tumeurs prostatiques. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaisons multiples de Tukey (**** $p < 0,0001$).	179
Figure 53 : Images TEP/TDM dynamiques représentatives (coupes axiale et coronale) moyennées de 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes post-injection du traceur [^{18}F]F-Cy7-PSMA chez des souris mâles (n=3) porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), entourées par les cercles blancs en pointillés).....	180
Figure 54 : Quantification in vivo de la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de [^{18}F]F-Cy7-PSMA dans plusieurs organes. Les données ont été obtenues à partir de l'analyse des VOI des organes sur la moyenne des frames TEP 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes après l'injection chez les souris porteuses de xénogreffes LNCaP. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples	

de Dunnett (* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$).....	182
Figure 55 : Quantification in vivo de (A) la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA au sein de la tumeur, du muscle et du compartiment sanguin et (B) le ratio d'absorption tumorale par rapport au compartiment sanguin et au muscle au cours du temps chez les souris (n=3) porteuses de xénogreffes LNCaP. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=3).....	183
Figure 56 : Images optiques in vivo représentatives des chez des souris mâles (n=3) porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), entourées par cercles blancs en pointillés à 2h post-injection du traceur [¹⁸F]F-Cy7-PSMA (n = 3), $\lambda_{exc} = 740$ nm et $\lambda_{em} = 780$ nm.	184
Figure 57 : Courbe de régression linéaire montrant une corrélation significative ($p < 0,05$) entre l'intensité fluorescente (unité arbitraire) et de la concentration en activité (%ID. cm⁻³) du traceur [¹⁸F]F-Cy7-PSMA au sein des tumeurs respectivement à 2h et 1h post-injection pour chaque souris mâle (n=3) porteuse de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+). L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $2923 \pm 217,8$, un intercept de $-1520 \pm 756,5$ et $R^2 = 0,9945$.	185
Figure 58 : Évaluations de (A) l'intensité fluorescente [¹⁸F]F-Cy7-PSMA au sein de la tumeur et du tissu normal et (B) du ratio d'intensité fluorescente entre tumeur et tissu normal à 2h post-injection chez des souris mâles (porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP. Les résultats ont été exprimés en unité arbitraire présentés sous forme de moyenne ± écart-type (n = 3).....	186
Figure 59 : Images TEP/TDM dynamiques représentatives (coupes axiale et coronale) moyennées de 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes post-injection d'une dose bloquante de ligand froid du traceur [¹⁸F]F-Cy7-PSMA chez des souris mâles (n=3) porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), entourées par les cercles blancs en pointillés.	187
Figure 60 : Biodistribution in vivo de la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA avec dose bloquante de ligand froid dans plusieurs organes. Les données ont été obtenues à partir de l'analyse des ROIs des organes sur la moyenne des images TEP de 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes chez les souris porteuses de xénogreffes LNCaP (PSMA+). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Dunnett. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$.	188
Figure 61 : Expériences de blocking avec les radioligands [¹⁸F]F-Cy7-PSMA dans les modèles précliniques LNCaP. Concentrations en activité (%ID.cm⁻³) des radioligands [¹⁸F]F-Cy7-PSMA avec ou sans injection d'une dose bloquante de ligand froid dans les organes sains et dans la tumeur sur la moyenne des images TEP de (A) 0 à 5 minutes, (B) de 15 à 20 minutes, (C) de 35 à 40 minutes et (D) de 55 à 60 minutes chez les souris porteuses de xénogreffes humaines LNCaP. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (n=3 souris par expérience sans blocking et avec blocking) et ont été analysées par le test t de Student bilatéral non apparié (* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$).....	190
Figure 62 : Quantification in vivo de (A) la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA au sein de la tumeur et du (B) compartiment sanguin au cours du temps chez les souris (n=3) porteuses de xénogreffes LNCaP (PSMA+). Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Šidák (* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$).....	191

Figure 63 : Schéma de la configuration expérimentale ultrasonore	196
Figure 64 : Timeline du protocole de sono-perméabilisation	198
Figure 65 : Principaux paramètres de la courbe intensité-temps (El-Bandar et al. 2022). PI : Peak Intensity ou PE : Peak Enhancement = Rehaussement maximal du contraste ou pic d'intensité [u.a] ; WiAUC : Wash-in Area Under the Curve AUC = Aire sous la courbe durant le remplissage (phase de captation/remplissage du produit de contraste) [u.a] ; RT : Rise Time = Temps de montée du produit de contraste ; mTTl : mean Transit Time local = Temps de transit moyen local correspondant à l'intervalle de temps moyen nécessaire à un bolus de produit de contraste pour traverser le réseau vasculaire [s] ; TTP : Time To Peak = Temps au pic d'intensité correspondant au temps nécessaire au bolus pour arriver au pic de rehaussement maximal de contraste [s] ; WiR : Wash-in Rate = Taux de remplissage (pente maximale = pente de la tangente à la courbe au moment du remplissage, prise à mi-hauteur) [u.a] ; WiPI Wash-in Perfusion Index - Indice de perfusion en phase de remplissage (WiAUC / RT) [u.a] ; WoAUC Wash-out AUC - Aire sous la courbe en phase d'élimination du produit de contraste ; WiWoAUC Wash-in and Wash-out AUC - Aire sous la courbe en phases de remplissage et d'élimination [u.a] ; FT Fall Time - Temps de descente [s] ; WoR Wash-out Rate = Taux d'élimination (pente minimale = pente de la tangente à la courbe au moment de l'élimination, prise à mi-hauteur) [u.a] ; QOF Quality Of Fit between the echo-power signal and f(t) = Qualité de la modélisation entre le signal d'intensité et f(t) [%].....	200
Figure 66 : (A) Images TEP (axiales en haut et coronales en bas) obtenues à partir de souris mâles porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), sans USMB, avec la condition US1MB, la condition US2MB et la condition US3MB, 2 heures p.i. du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-. La flèche rouge montre la tumeur, les flèches oranges les reins et jaune, la glande salivaire. (B) Biodistribution in vivo du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 chez des souris portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de LNCaP. Les concentrations en activité dans les organes sains et dans la tumeur (%ID.cm⁻³) ont été extraites des images TEP/TDM, obtenues à 2h post-injection du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=8) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Dunnett. * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001, **** : p < 0,0001.....	202
Figure 67 : Quantification in vivo de (A) la concentration en activité (%ID.cm⁻³) du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 au sein de la tumeur et du ratio d'absorption tumorale par rapport au (B) compartiment sanguin et (C) au muscle à 2h p.i. chez les souris porteuses de xénogreffes LNCaP (PSMA+) sans USMB, avec la condition US1MB, la condition US2MB et la condition US3MB. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=8) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples montrant aucune différence significative.....	203
Figure 68 : Quantification de la concentration en activité (%ID.cm⁻³) du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans les tissus sains par biodistribution ex vivo, 3h p.i. dans les souris portant les xénogreffes humaines de LNCaP (PSMA +). Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=8) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Dunnett. * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001, **** : p < 0,0001.....	205
Figure 69 : Corrélation entre la quantification de l'accumulation du [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans les tissus par biodistribution ex vivo et par analyse des images TEP/TDM. La corrélation entre les valeurs d'activité	

mesurées par les 2 méthodes a été évaluée par le test de Pearson.	205
Figure 70 : A) Images représentatives d'échographie ultrasonore avec contraste (CE-US) des tumeurs sous-cutanées LNCaP chez des souris nues mâles. La tumeur (zone d'intérêt blanche, ROI) de la souris témoin non traitée est montrée. De gauche à droite : image en mode gris (échelle de gris) ; image en mode contraste avant l'injection de l'agent de contraste (avant contraste) ; image en mode contraste après injection au pic d'amélioration du contraste (après contraste).(B) Courbe représentative du temps et de l'intensité de la tumeur (zone d'intérêt blanche, ROI).	206
Figure 71 : Évaluation du pic d'intensité de contraste (mesurée en dB) dans la tumeur chez les souris contrôle non traitées et traitées aux conditions US1MB, US2MB et US3MB. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=8) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples montrant aucune différence significative.	207
Figure 72 : Représentation du pic d'intensité de contraste (mesurée en dB) de la tumeur en fonction de l'absorption tumorale ($\%ID.cm^{-3}$) du radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007 pour chaque souris du groupe contrôle non traitées et traitées aux conditions US1MB, US2MB et US3MB. L'aire de la ROI est prise en compte dans le graphe.....	207
Figure 73 : Courbe de régression linéaire entre absorption tumorale du radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007 ($\%ID.cm^{-3}$) et le pic d'intensité (dB) à 2h p.i. chez des souris mâles porteuse de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+) pour (A) le groupe contrôle montrant une corrélation non significative. L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $-0,5574 \pm 0,5134$, une ordonnée à l'origine de $5,379 \pm 0,8117$ et $R^2 = 0,1908$ (B) le groupe US1MB montrant une corrélation significative ($p < 0,01$). L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $1,643 \pm 0,3752$, une ordonnée à l'origine de $-1,118 \pm 0,9260$ et $R^2 = 0,7616$ (C) US2MB montrant une corrélation significative ($p < 0,01$). L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $2,072 \pm 0,2516$, une ordonnée à l'origine de $3,677e-005 \pm 0,4846$ et $R^2 = 0,9443$ et (D) US3MB montrant une corrélation non significative. L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $0,5287 \pm 0,9675$, une ordonnée à l'origine de $3,941 \pm 1,535$ et $R^2 = 0,05637$.	208
Figure 74 : Images représentatives (x20) de microscopie à fluorescence des coupes de tumeurs LNCaP des souris mâles porteuses de xénogreffes sous cutanées LNCaP colorées avec DAPI (noyaux, fluorescence bleue), anticorps anti-PSMA (fluorescence verte), TRITC-dextran (fluorescence rouge) et anticorps anti-CD31 (violet). Les images fusionnées sont montrées.....	210
Figure 75 : Analyse quantitative du pourcentage de la surface totale de la tumeur LNCaP couverte par les pixels marqués (A) l'anticorps anti- PSMA (B) anticorps-anti CD31(C) le TRITC-dextran entre les différents groupes de souris mâles porteuses de xénogreffes sous-cutanées traitées sans et avec différentes conditions USMB .Toutes les données sont présentées sous forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type (n=8) et analysées par ANOVA à un facteur suivie d'un test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$).	211
Figure 76 : Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules issues de tumeurs de LNCaP (A) Graphique représentatif de la hauteur de diffusion avant (FSC-H) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H) afin d'identifier les cellules d'intérêt en fonction de leur taille et de leur granularité. Les cellules tumorales LNCaP (quadrant inférieur droit Q3) ont été distinguées des débris cellulaires (quadrant inférieur gauche Q4). (B) Graphique représentatif de la surface de diffusion latérale	

(SSC-A) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H). Les évènements coïncidents ont été exclus de la population cellulaire. (C) Les cellules mortes ont finalement été exclues sur l'histogramme Viability-H. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'évènements de la population parentale est indiqué. (D) Histogramme représentant le profil de coloration du dextran avec une estimation du pourcentage de cellules sonoporées avec le pic d'intensité à droite. (D) Histogramme représentant le profil de coloration du PSMA avec une estimation du pourcentage de cellules exprimant le PSMA avec le pic d'intensité à droite. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'évènements de la population parentale est indiqué 213

Figure 77 : Graphiques représentatifs des expériences de cytométrie en flux sur les cellules humaines de LNCaP cultivées in vitro incubées avec de l'iodure de propidium pour les différentes conditions expérimentales. 215

Figure 78 : (A) Quantification de l'internalisation cellulaire de TRITC-dextran et (B) niveau d'expression du PSMA des tumeurs LNCaP des souris porteuses des xénogreffes sous-cutanées LNCaP ayant été traité sans USMB (contrôle) et avec respectivement les conditions US1MB, US2MB et US3MB. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=) et ont été analysées par ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$) montrant aucune différence significative. 216

Figure 79 : Marquage de PSMA-617 avec Lu-177 222

Figure 80 : Analyse HPLC du marquage de PSMA-617 avec Lu-177 (15 min à 90°C) 222

Figure 81 : Schéma de la configuration expérimentale 224

Figure 82 : Timeline du protocole de sono-perméabilisation 224

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physiques et biologiques des particules α, β et des électrons Auger (Navalkisoor et Grossman 2018; Peltek et al. 2019 ; Salih et al. 2022).	65
Tableau 2 : Caractéristiques physiques (type d'émission et temps de demi-vie) des radionucléides diagnostiques et thérapeutiques les plus utilisés en clinique (Siafaka et al. 2021 ; Stokke, Kvassheim, et Blakkisrud 2022).	69
Tableau 3 : Exemples d'anticorps ligands du PSMA. (Younes 2023)	72
Tableau 4 : Exemples de ligands du PSMA à base d'urée (Younes 2023)	73
Tableau 5 : Recommandations pour la réalisation d'examens d'imagerie des cancers prostatiques en récurrence biochimique	81
Tableau 6 : Grade de toxicité et effets indésirables selon les critères CTCAE 4.03	86
Tableau 7 : Effets indésirables reportés pour l'étude TheraP et l'étude VISION (Chandran, Figg, et Madan 2024)	88
Tableau 8 : Comparaison des trois principaux agents de contraste ultrasonores sous forme de microbulles commercialisés pour l'imagerie médicale ultrasonore (Paefgen, Doleschel, et Kiessling 2015; Frinking et al. 2020; Melich 2018).	94
Tableau 9 : Liste représentative mais non exhaustive des essais cliniques sur les applications basées sur les effets non thermiques des ultrasons thérapeutiques au cours des 10 dernières années	106
Tableau 10 : : Résumé des paramètres ultrasonores et de leurs effets thérapeutiques dans les études in vitro et in vivo, axées sur la sono-perméabilisation combinée à des thérapies proches de la RIV. Les critères d'éligibilité ont consisté à sélectionner des recherches portant sur cette approche thérapeutique, en s'appuyant principalement sur PubMed.	116
Tableau 11 : Résumé des paramètres ultrasonores et de leurs effets thérapeutiques dans les études in vitro et in vivo, axées sur la sono-perméabilisation appliquées à des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques et des modèles précliniques de tumeurs prostatiques Les critères d'éligibilité ont consisté à sélectionner des recherches portant sur cette approche thérapeutique, en s'appuyant principalement sur PubMed	118
Tableau 12 : Choix des conditions ultrasonores réalisées avec microbulles	121
Tableau 13 : Caractéristiques des membranes Transwell (Inserts de culture cellulaire - Thermo Fisher Scientific)	126
Tableau 14 : Applications courantes des supports perméables ainsi que les tailles de pores recommandées (Inserts de culture cellulaire - Thermo Fisher Scientific)	127
Tableau 15 : Conditions ultrasonores de l'étude in vitro en couche monocellulaire	128
Tableau 16 : Les principales souches MDCK utilisées pour l'étude de la polarité cellulaire épithéliale (Dukes, Whitley, et Chalmers 2011).	130
Tableau 17 : Test de perméabilité des composés dans les cellules et MDCK-MDR1 : Classification selon les	

valeurs de Papp A–B (Jin et al. 2014).	137
Tableau 18 : Propriétés physico-chimiques de [19F]F-Cy7-PSMA	142
Tableau 19 : Conditions ultrasonores pour l'étude dans un modèle en suspension	151
Tableau 20 : Modèles précliniques sous cutanées testées in vivo	174
Tableau 21 : Conditions ultrasonores des différents groupes expérimentaux	197
Tableau 22 : Stabilité de [¹⁷⁷Lu]-PSMA dans le sérum ou le plasma de souris	223
Tableau 23 : Conditions ultrasonores des différents groupes expérimentaux	225

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAC: Autorisation d'accès compassionnel

AAP: Autorisation d'accès précoce

ADT: Thérapie de privation d'androgènes

AFU: Association française d'Urologie

AIUM: American Institute of Ultrasound in Medicine

ALARA: As Low As Reasonably Achievable

AMM: Autorisation de mise sur le marché

ANZUP: Australian and New Zealand Urogenital and Prostate Cancer Trial Group

ARRIVE: Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments

BHE: Barrière hémato-encéphalique

BMUS: British Medical Ultrasound Society

BSA: Albumine sérique bovine

CAPRA: Cancer of the Prostate Risk Assessment

CEUS: Imagerie par échographie de contraste

CGPII: Glutamate carboxypeptidase II

CLIA: Clinical Laboratory Improvement Amendment

CMF: Cytométrie en flux

CNREEA: Comité National de Réflexion Éthique sur l'Expérimentation Animale

CRPC: Cancer prostatique résistant à la castration

mCRPC: Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration

nmCRPC: Cancer de la prostate résistant à la castration non métastatique

DHT: Dihydrotestostérone

EANM: Association européenne de médecine nucléaire

EBR: Efficacité biologique relative

EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique

EGF: Facteur de croissance épidermique

EMA: European Medicines Agency

EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse

FDA: Food and Drug Administration

FSC: Diffusion frontale de la lumière

FUS: Ultrasons focalisés

GS: Score de Gleason

HAS: Haute Autorité de Santé

HBSS: Solution saline équilibrée de Hank

HGPIN: Néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade

HIFU: Ultrasons focalisés de haute intensité

HPLC: Chromatographie en phase liquide haute performance

HUVEC: Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine

mHSPC: Cancer de la prostate métastatique hormonosensible

HTNG: Hormonothérapie de nouvelle génération

IGF-I: Facteur de croissance analogue à l'insuline I

IHC: Immunohistochimie

IM: Indice mécanique

IMRT: Radiothérapie par modulation d'intensité

IP: Iodure de propidium

IRM: Imagerie par résonance magnétique

IRMmp: Imagerie par résonance magnétique multiparamétrique prostatique

JA: Jonction adhérente

JAM: Molécule d'adhésion jonctionnelle

JS: Jonction serrée

LGPIN: Néoplasie intraépithéliale prostatique de bas grade

LHRH: Luteinizing Hormone Releasing Hormone

LNCaP: Cellules humaines cancéreuses (carcinome des ganglions lymphatiques de la prostate)

LOR: Ligne de réponse

MB: Microbulle

MDCK: Madin-Darby canine kidney

MET: Microenvironnement tumoral

MLEM: Algorithme de reconstruction itérative

MRgFUS: FUS guidés par résonance magnétique

MRP : Médicament radiopharmaceutique

NDA: New Drug Application

NEMA: National Electrical Manufacturers Association

NEPC: Neuroendocrine prostate cancer

NLC: Imagerie ultrasonore par contraste non linéaire

P_{app}: Coefficient de perméabilité apparente

PBS: tampon phosphate saline

PC: Polycarbonate

PET: Polyéthylène téréphtalate

PFC: Perfluorocarbures

PI: Indice de perfusion

PIN: Néoplasie intraépithéliale prostatique

PI-RADS: Prostate Imaging-Reporting and Data System

PSA: Antigène spécifique de la prostate

PSMA: Antigène membranaire spécifique de la prostate

PTFE: Polytétrafluoroéthylène

RA: Récepteur aux androgènes

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumours

RIV: Radiothérapie interne vectorisée

ROI: Région d'intérêt

ROS: Espèces réactives de l'oxygène

RP: Radiopharmaceutique

RPD: Radiopharmaceutique de diagnostic

RPT: Radiopharmaceutique thérapeutique

SNMMI: Société de Médecine Nucléaire et d'Imagerie Moléculaire

SSC: Diffusion latérale de la lumière

SUV: Valeur d'absorption normalisée

TAC: Courbe temps-activité

TDM: Tomodensitométrie

TEER: Résistance électrique transépithéliale

TEL: Transfert d'énergie linéaire

TEMP: Tomographie par émission monophotonique

TEP: Tomographie par émission de positons

TIC: Courbe d'intensité temporelle

TOF: Temps de vol

UNSCEAR: Comité scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants

US: Ultrasons

USMB: Ultrasons associés aux microbulles

VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VMAT: Radiothérapie par arc volumétrique modulé

VOI: Volume d'intérêt

AVANT – PROPOS

Le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (mCRPC) représente un défi thérapeutique majeur, notamment en raison de son évolution vers une forme plus agressive après l'échec des thérapies standards actuelles, constituant la phase terminale de la maladie.

En effet, en France, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les Hommes, avec environ 59 800 nouveaux cas diagnostiqués en 2018, et 8100 décès liés à cette maladie. Ce cancer peut résulter de l'évolution d'un stade localisé ou localement avancé, touchant environ 20 à 40 % des patients, ou d'un diagnostic initial au stade métastatique, dans 10 à 15 % des cas. Parmi les patients atteints de métastases, 10 à 20 % développeront un cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC) dans les 5 ans suivant le diagnostic avec une survie médiane d'environ 14 mois (allant de 9 à 30 mois) (Mansinho et al. 2018). Ces patients, souvent plus réfractaires aux traitements systémiques, font face à des difficultés supplémentaires dans le traitement de leur maladie (Henríquez et al. 2021)

Une nouvelle approche thérapeutique, la radiothérapie interne vectorisée (RIV), propose d'utiliser un radiopharmaceutique (MRP), comme le [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, combinant un radionucléide à un vecteur biologique ciblant l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) surexprimée par le tissu prostatique cancéreux. En particulier, dans les cancers de la prostate de haut grade, dans les maladies métastatiques, et au stade de résistance à la castration (CPRC).

Ce traitement, qui bénéficie d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation de cohorte en France depuis décembre 2021, est promis à un large nombre de patients éligibles. Cependant, malgré son efficacité apparente, la pratique clinique actuelle présente plusieurs limitations importantes.

Conformément à la *Question écrite n° 7369* concernant le *manque de services de médecine nucléaire pour le cancer de la prostate* (publiée au Journal officiel le 18 avril 2023), il apparaît que l'accès à ce traitement innovant est freiné par des limitations d'infrastructures et des moyens d'ordre matériel et humain dans les établissements de médecine nucléaire dont très peu disposent des capacités nécessaires pour répondre à la demande croissante de patients éligibles.

Dans sa réponse, le gouvernement indique qu'une réforme importante du régime des autorisations d'exercice a été engagée pour pallier cette insuffisance et améliorer l'offre de soins en médecine nucléaire, notamment en RIV. Cette réforme vise à renforcer la sécurité et la qualité des soins et à favoriser une meilleure organisation des services. Le cadre réglementaire révisé prévoit des autorisations spécifiques pour la médecine nucléaire thérapeutique et encourage l'intégration de cette spécialité dans le parcours de soin du cancer, en complément des autres traitements. De nouvelles autorisations seront délivrées en 2024, selon les besoins identifiés dans les schémas régionaux de santé pour 2023-2028 afin de garantir une couverture territoriale adaptée et améliorer les chances de survie des patients.

Un autre défi majeur subsiste. Le schéma thérapeutique recommandé pour le [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 est de 7 400 MBq par voie intraveineuse (i.v.) toutes les 6 semaines (±1 semaine) jusqu'à un maximum de 6 doses, à moins d'une progression de la maladie ou d'une toxicité inacceptable. Ce traitement repose

sur un protocole standardisé qui administre une dose fixe de MRP à tous les patients, sans prise en compte des variations biologiques et physiopathologiques spécifiques de chaque patient et l'évaluation préalable de la distribution du radiopharmaceutique. Cela peut entraîner des risques de surdosage, avec des toxicités dans des organes à risque comme les reins, la moelle osseuse ou les glandes salivaires, et dont les effets indésirables peuvent entraîner l'interruption temporaire (prolongeant l'intervalle d'administration de 4 semaines, le faisant passer de 6 semaines jusqu'à 10 semaines) ou l'arrêt simple du traitement. A l'inverse, un sous-dosage pourrait rendre le traitement inefficace. La dosimétrie reste ainsi un aspect non personnalisé de la pratique clinique.

Afin de contourner cette limitation, des techniques comme la sono-perméabilisation pourraient jouer un rôle clé. Il s'agit d'une méthode locale de délivrance de traitements thérapeutiques qui combine l'utilisation des ultrasons et l'administration de microbulles de gaz pour augmenter de manière temporaire et réversible la perméabilité des barrières biologiques, telles que les membranes cellulaires et les vaisseaux sanguins. Lors de l'application des ultrasons, les microbulles oscillent et appliquent des contraintes mécaniques sur les barrières cellulaires, augmentant leur perméabilité. Ces effets physiques peuvent favoriser l'extravasation et l'absorption intracellulaire des composés thérapeutiques, en créant des pores dans les membranes cellulaires ou en stimulant les voies paracellulaires et transcellulaires.

Cette technique pourrait répondre efficacement aux défis liés au sur-dosage des traitements. En améliorant la pénétration des radiopharmaceutiques dans les tissus tumoraux, la sono-perméabilisation permettrait non seulement d'optimiser l'efficacité des traitements à des doses plus faibles mais aussi d'améliorer la réponse thérapeutique tout en réduisant la dose nécessaire et limiter les effets secondaires. En allégeant l'intensité des traitements sans compromettre leur efficacité, cette approche permettrait de traiter un plus grand nombre de patients, y compris ceux qui, en raison d'un accès limité aux soins spécialisés ou aux équipements coûteux, ne peuvent bénéficier de schémas thérapeutiques plus complexes.

D'autre part, en intégrant cette technologie avec la RIV, la sono-perméabilisation pourrait offrir une approche synergique, optimisant la distribution et délivrance du traitement et potentiellement augmentant l'efficacité des thérapies ciblées. Elle pourrait ainsi constituer une stratégie complémentaire pour traiter les tumeurs difficiles d'accès telles que les tumeurs pancréatiques ou encore localisées dans les organes profonds comme le foie ou les reins.

L'objectif de cette thèse est d'étudier une approche permettant d'améliorer la délivrance ciblée du MRP aux tumeurs. Il s'agit ainsi d'explorer comment la combinaison de la RIV et de la sono-perméabilisation pourrait améliorer la distribution et le ciblage des traitements. Cette démarche inclut l'utilisation d'outils d'imagerie, tels que l'imagerie tomographie par émission de positons / tomodensitométrie (TEP/TDM), pour suivre la dynamique du MRP avant de définir et ajuster une stratégie thérapeutique en conséquence.

Le manuscrit se compose ainsi de trois chapitres. Le premier chapitre constitue l'introduction et aborde l'évolution du cancer de la prostate, en commençant par une description de la prostate et des stades de la maladie. Il s'intéresse ensuite à la progression vers le cancer métastatique résistant à la castration, en

examinant la dissémination tumorale et les facteurs influençant cette progression, tels que le microenvironnement tumoral, l'hypoxie et l'angiogenèse. La section sur la prise en charge du cancer prostatique couvre la détection précoce, le diagnostic et les différentes options de traitement selon les stades de la maladie.

Le chapitre 2 porte sur l'évaluation *in vitro* de la délivrance de molécules par ultrasons dans le cancer de la prostate. Il explore les défis associés à l'utilisation des ultrasons pour délivrer des traitements dans le cancer de la prostate. Il présente des études *in vitro* sur l'effet des ultrasons sur la perméabilité des membranes cellulaires. Les sections détaillent les paramètres ultrasonores utilisés, les dispositifs expérimentaux, et les résultats concernant l'effet des ultrasons sur la perméabilité cellulaire et l'accumulation des médicaments.

Le chapitre 3 concerne l'étude de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution d'un traceur à usage diagnostique dans un modèle préclinique murin du cancer de la prostate. Ce chapitre se concentre sur l'application de la sono-perméabilisation dans un modèle murin. Il décrit la mise en place du modèle préclinique et les techniques d'imagerie bimodale utilisées pour évaluer la distribution d'un nouveau traceur PSMA. Les résultats portent sur la biodistribution, l'efficacité de la sono-perméabilisation et son impact sur l'accumulation des radiopharmaceutiques dans les tumeurs.

CHAPITRE 1 : NOTIONS GENERALES

CHAPITRE 1 : NOTIONS GENERALES	36
I. CONTEXTE	38
II. EVOLUTION DU CANCER DE LA PROSTATE : DE LA FORME LOCALISEE A LA METASTASE RESISTANTE A LA CASTRATION	39
II.1 PROSTATE.....	39
II.2 STADES DU CANCER DE LA PROSTATE	42
II.3 PROGRESSION VERS LE CANCER DE LA PROSTATE METASTASIQUE RESISTANT A LA CASTRATION	46
II.3.1 Dissémination et foyers métastatiques	46
II.3.2 Facteurs influençant la survenue des métastases et la résistance aux traitements	47
II.3.3 Microenvironnement tumoral.....	49
II.3.3.1 Hypoxie.....	50
II.3.3.2 Angiogenèse	51
II.4 PRISE EN CHARGE DU CANCER PROSTATIQUE.....	53
II.4.1 Détection précoce.....	53
II.4.2 Diagnostic	54
II.4.3 Traitement	56
II.4.3.1 Stade localisé à faible risque	56
II.4.3.2 Stade localisé à risque intermédiaire	58
II.4.3.3 Stade localisé à risque élevé ou au stade localement avancé	58
II.4.3.4 Récidive après traitement local	59
II.4.3.5 Stade métastatique hormonosensible.....	59
II.4.3.6 Stade métastatique résistant à la castration	60
III. RIADOTHERAPIE INTERNE VECTORISEE AU PSMA	63
III.1 PRINCIPE.....	63
III.2 DIFFERENTS TYPES DE RADIONUCLEIDES	64
III.2.1 Caractéristiques des rayonnements ionisants	64
III.2.2 Effets biologiques	66
III.2.2.1 Effets sur l'ADN.....	66
III.2.2.2 Effet des ROS	67
III.2.2.3 Effets sur l'hypoxie	67
III.2.2.4 Effet bystander	68
III.2.3 Les radionucléides diagnostiques et thérapeutiques	68
III.3 CIBLE THERAPEUTIQUE ACTUELLE : PSMA	70
III.3.1 Structure.....	70
III.3.2 Ciblage du PSMA.....	71
III.3.2.1 Les Anticorps	71

III.3.2.2	Les petites molécules	72
III.4	APPROCHE THERANOSTIQUE	74
III.4.1.1	Imagerie TEP	75
III.4.1.1.1	Principe de détection	75
III.4.1.1.2	Reconstruction de l'imagerie TEP	76
III.4.1.1.3	Analyse des images	76
III.5	ENJEUX CLINIQUES ACTUELS & PERSPECTIVES	79
III.5.1	<i>Imagerie TEP-PSMA</i>	79
III.5.1.1	Historique des radiopharmaceutiques approuvés sur le marché	79
III.5.1.2	Ligands du PSMA disponibles en France	79
III.5.1.3	Recommandations actuelles	80
III.5.2	<i>RIV au [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617</i>	82
III.5.2.1	Evolution et essais cliniques actuelles	82
III.5.2.2	Perspectives	84
III.5.3	<i>Limites</i>	85
III.5.3.1	Disponibilité des radionucléides	85
III.5.3.2	Infrastructure/Logistique	86
III.5.3.3	Effets indésirables et Toxicité	86
IV.	SONO-PERMEABILISATION	89
IV.1	BARRIERE ENDOTHELIALE	89
IV.2	LES ULTRASONS, UNE MODALITE PHYSIQUE DE DELIVRANCE	90
IV.3	MECANISMES	92
IV.3.1	<i>Microbulles</i>	92
IV.3.2	<i>Cavitation stable et inertielle</i>	94
IV.4	EFFETS BIOPHYSIQUES	98
IV.5	PARAMETRES ULTRASONORES	100
IV.5.1	<i>Fréquence</i>	101
IV.5.2	<i>Exposition ultrasonore : pression acoustique, intensité acoustique et indice mécanique</i>	102
IV.5.2.1	Pression de raréfaction	102
IV.5.2.2	Intensité acoustique	102
IV.5.2.3	Indice mécanique	103
IV.5.3	<i>Rapport cyclique</i>	103
IV.5.4	<i>Durée d'exposition</i>	104
IV.6	ESSAIS CLINIQUES	104
V.	OBJECTIFS DE THESE	112

I. CONTEXTE

Le cancer de la prostate constitue un enjeu majeur de santé publique. Il représente le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les Hommes dans plus de la moitié des pays du monde (118 des 185 pays/territoires) et la principale cause de décès par cancer chez les Hommes dans un quart des pays du monde (52 sur 185), avec un nombre de nouveaux cas estimés à 1,5 million et de décès estimés à 397 000 en 2022 (Bray et al. 2024a).

Son incidence et sa prévalence sont plus élevées dans les pays développés, mais augmentent également dans les pays en développement (Europe du Nord et de l'Ouest, dans les Caraïbes, en Australie/Nouvelle-Zélande, en Amérique du Nord et du Sud, et en Afrique australe) (Bray et al. 2024b).

Selon l'Institut national du cancer (INCa), le cancer de la prostate occupe la première place en termes d'incidence parmi tous les cancers en France, avec environ 59 800 nouveaux cas estimés en 2018, devançant ainsi le cancer du poumon et le cancer colorectal. En revanche, il figure au troisième rang des causes de décès par cancer chez les Hommes, avec environ 8 100 décès estimés en 2020 (Cancers - Santé Publique France 2024). L'âge est le principal facteur de risque, le diagnostic étant posé en moyenne à 69 ans en France en 2018.

Néanmoins, un recul de la mortalité induite par ce cancer est observé depuis la fin des années 1990 malgré une incidence croissante avec l'âge et du vieillissement de la population. Cette diminution s'explique notamment par l'amélioration des pratiques du dépistage individuel, des outils diagnostiques et des traitements permettant le diagnostic précoce, la stadification, l'évaluation de la réponse au traitement ou la surveillance du cancer de la prostate (Erra et Pradere 2019).

Ainsi le cancer de la prostate est un cancer de bon pronostic car d'évolution lente avec un taux de survie nette à 5 ans de plus de 90 %. Toutefois, le stade de la maladie constitue un des critères qui influent sur le pronostic lors du diagnostic. Alors que les cancers de la prostate diagnostiqués à un stade localisé offrent un pronostic très positif, les cancers de la prostate de stade localement avancé et de stade métastatique présentent une espérance de vie moindre avec la plupart des patients finissant par succomber à leur maladie (Rebello et al. 2021).

Parmi l'arsenal thérapeutique pour les formes les plus avancées, la RIV constitue une véritable stratégie innovante dont le mécanisme d'action diffère des autres classes thérapeutiques telles que les chimiothérapies ou les hormonothérapies de nouvelle génération en délivrant des agents radioactifs qui ciblent spécifiquement la tumeur, minimisant l'irradiation des tissus sains environnants. Elle s'inscrit dans une démarche dite théranostique combinant l'imagerie diagnostique et la thérapie pour une médecine la plus personnalisée possible. Malgré les bénéfices cliniques qu'offre la RIV, son efficacité peut être limitée par plusieurs facteurs tels que l'apparition d'effets secondaires indésirables, la biodistribution et diffusion au sein de la tumeur de l'agent thérapeutique.

Dans le but de concilier efficacité et sécurité de la RIV, des options actuelles existent et visent à améliorer l'absorption tumorale des médicaments. C'est dans ce contexte que la sono-perméabilisation

via l'utilisation des ultrasons associés aux microbulles (USMB) a été proposée comme approche thérapeutique pour augmenter la perméabilité des membranes et faciliter la pénétration des agents thérapeutiques dans la tumeur. La combinaison de la RIV et de la sono-perméabilisation a pour objectif d'augmenter l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses délivrées pour minimiser les complications associées.

Ce premier chapitre abordera les étapes de l'évolution du cancer de la prostate, de sa forme localisée jusqu'à la progression au stade métastatique résistante à la castration avant d'introduire le protocole de diagnostic et stratégie thérapeutique avec la place de la RIV dans le cadre de cette prise en charge. Le principe physique de la RIV et de l'examen d'imagerie nucléaire ainsi que leurs limites respectives seront évoqués. La suite du chapitre mettra en lumière le phénomène de sono-perméabilisation, des mécanismes sous-jacents et effets biologiques induits avant de terminer sur l'ensemble des applications cliniques actuelles.

II. EVOLUTION DU CANCER DE LA PROSTATE : DE LA FORME LOCALISEE A LA METASTASE RESISTANTE A LA CASTRATION

L'évolution du cancer de la prostate constitue un processus complexe pouvant progresser vers une maladie métastatique, souvent résistante à la castration. Pour mieux comprendre cette dynamique, nous aborderons l'anatomie et le fonctionnement de la prostate suivie d'une description de la progression du cancer de la prostate, en explorant les mécanismes impliqués dans l'apparition des métastases et les facteurs influençant la résistance aux traitements en insistant sur le rôle crucial du microenvironnement tumoral. Enfin nous présenterons les stratégies de prise en charge du cancer prostatique, en soulignant l'importance d'une détection précoce, d'un diagnostic précis et de traitements adaptés à chaque stade de la maladie. Cette première partie permettra d'appréhender les enjeux et les défis cliniques liés à la maladie et d'identifier les pistes d'amélioration pour les traitements futurs.

II.1 PROSTATE

La prostate est une petite glande musculo-fibro-glandulaire du système reproducteur masculin. Située devant le rectum et sous la vessie, elle est traversée par l'urètre, canal permettant à l'urine et au sperme d'évacuer, qui dans son trajet prostatique, reçoit les canaux déférents et éjaculateurs. De la taille d'une châtaigne, sa fonction principale est de sécréter le liquide séminal qui avec les sécrétions des vésicules séminales et les spermatozoïdes provenant des testicules constituent le sperme.

Elle est constituée d'une capsule fibroélastique entourant la glande et comprenant deux lobes, classiquement divisée en trois zones anatomiques (**Figure 1**) :

- Centrale entourant l'urètre, siège de 8 % des cancers prostatiques ;
- De transition qui donne naissance à 25 % des carcinomes ;
- Périphérique où se développe la grande majorité des cancers de la prostate (70% des cas).

Sur le plan histologique, chaque zone comprend des canaux et des acini prostatiques enchâssés dans le stroma composé de divers types de cellules, principalement des cellules musculaires lisses, mais aussi des fibroblastes. Les canaux et les acini sont constitués d'une seule couche d'épithélium séparée du stroma par la membrane basale. Au sein de cet épithélium, il existe trois types principaux de cellules : les cellules basales, les cellules intermédiaires et les cellules sécrétoires luminales exprimant le récepteur aux androgènes (RA) (Rebello et al. 2021).

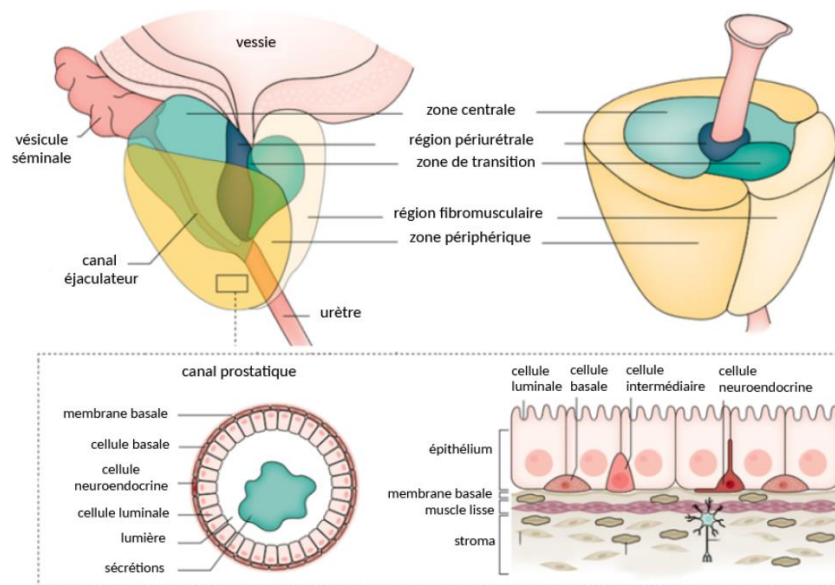


Figure 1 : Anatomie et structure histologique de la prostate humaine. La prostate peut être divisée en cinq régions anatomiques : la zone centrale, la région périurétrale, la zone de transition, la zone périphérique et la région fibromusculaire (ou stroma). La plupart des tumeurs prennent naissance dans la zone périphérique. Chaque région comprend des canaux et des acini noyés dans le stroma, qui contient divers types de cellules, principalement des cellules musculaires lisses, mais aussi des fibroblastes, qui jouent un rôle important dans le développement de la prostate. Les canaux et les acini sont constitués d'une seule couche d'épithélium composée de cellules basales, les cellules intermédiaires, de cellules neuroendocrines et les cellules sécrétoires luminales exprimant le RA (extraite et traduite de Rebello et al. 2021).

Hormonodépendante, le développement de la prostate est sous la dépendance des androgènes dont la testostérone (hormone produite par les testicules). Sa synthèse (**Figure 2**) est régulée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (He et al. 2022) et est convertie par l'enzyme 5 α -réductase en un androgène plus efficace pour promouvoir la prolifération des cellules prostatiques : la dihydrotestostérone (DHT) (Barthélémy 2016; Schreyer et al. 2017). La DHT se fixe au RA des cellules cibles maintenu sous forme inactive dans le cytoplasme par un jeu de protéines chaperonnes corégulatrices (Schreyer et al. 2017). Le RA est un facteur de transcription androgéno-dépendant, contrôlé par des voies de signalisation sous la dépendance de facteurs de croissance (Zerbib et Beuzeboc 2012). Il joue un rôle majeur dans l'homéostasie de la prostate normale et cancéreuse en stimulant

l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, division, survie cellulaire ou l'activité sécrétoire comme celui codant l'antigène spécifique de la prostate (PSA) dont la mesure dans le sang permet de suivre l'évolution du cancer de la prostate (Barthélémy 2016; Schreyer et al. 2017).

Le RA est ainsi exprimé dans tout stade ou grade confondu du cancer de la prostate, jouant ainsi un rôle-clé dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses prostatiques (Aurilio et al. 2020; Schreyer et al. 2017).

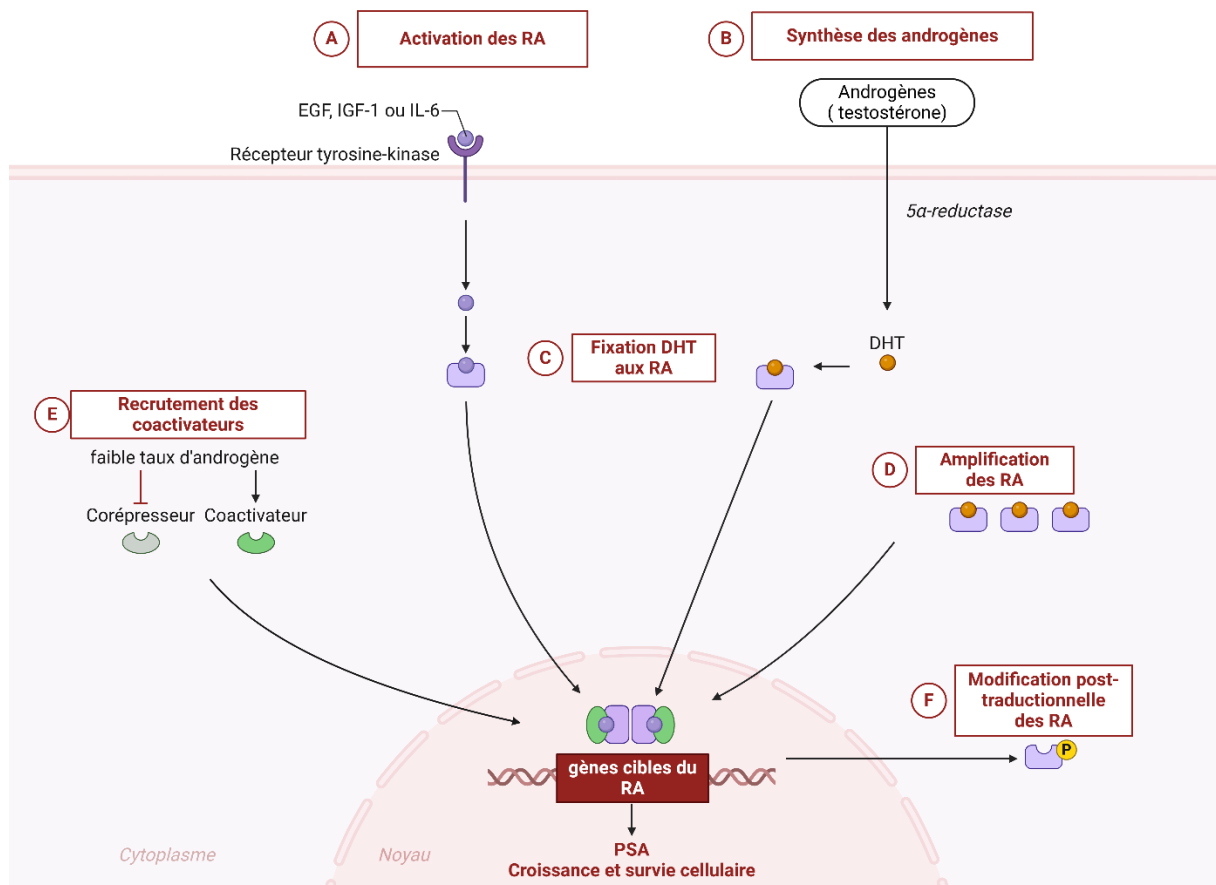


Figure 2 : Voie de synthèse simplifiée du PSA. A. Activation des récepteurs aux androgènes. Des facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor : Facteur de croissance épidermique), l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1 : Facteur de croissance analogue à l'insuline I) et l'IL-6 (Interleukin-6) activent les RA via des récepteurs tyrosine kinase, stimulant ainsi la prolifération cellulaire. B. Synthèse des androgènes La 5α-réductase convertit la testostérone en DHT, un androgène plus actif, essentiel dans cette voie. C. Fixation de la DHT aux récepteurs aux androgènes. La DHT se lie aux récepteurs aux androgènes dans le cytoplasme, formant un complexe qui se transloque dans le noyau. D. Amplification des récepteurs aux androgènes. Le complexe DHT-RA active l'expression des gènes cibles en se liant à des éléments de réponse aux androgènes, amplifiant ainsi leur transcription. E. Recrutement des coactivateurs. Les coactivateurs agissent comme des protéines chaperonnes corégulatrices en aidant à activer la transcription du gène PSA et ainsi augmenter sa production dans les cellules prostatiques. F. Modification post-traductionnelle des récepteurs aux androgènes. Les récepteurs aux androgènes subissent des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, qui modifient leur activité et régulent l'expression des gènes cibles, y compris le PSA, favorisant la croissance et la survie cellulaire (Makino, Izumi, et Mizokami 2021).

II.2 STADES DU CANCER DE LA PROSTATE

La majorité des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes dans 90 à 95 % des cas. Ces adénocarcinomes sont des formes de cancer se développant à partir des cellules luminales ou basales de l'épithélium (Saranyutanon et al. 2019) qui constituent le tissu de revêtement de la prostate et naissent essentiellement dans la zone périphérique, dans 15 % des cas dans la zone de transition et dans la zone centrale dans 5 % des cas (HAS - Biopsies ciblées dans le diagnostic du cancer de la prostate 2023). Les spécialistes décrivent plusieurs types histologiques, en fonction du type de cellules en cause (Arcagy-Gineco 2024) :

- Les adénocarcinomes acineux, dans la majorité des cas, se développent à partir des cellules internes des acini prostatiques ;
- Les adénocarcinomes ductaux se développant à partir des cellules des canaux de la prostate et représentent environ 5 % des tumeurs de la prostate.

Il existe d'autres formes (5 à 10 %) de nature histologique rares (adénocarcinome à cellules transitionnelles ou carcinomes à petites cellules, des tumeurs primitives non épithéliales (sarcomes)), avec un pronostic sensiblement moins favorable.

Le cancer de la prostate (**Figure 3**) est caractérisé par la prolifération incontrôlée des cellules épithéliales qui se multiplient de façon anarchique due à des anomalies ou altérations progressives morphologiques, moléculaires et génétiques (Alizadeh et Alizadeh 2014).

Ce processus de transformation de cellules épithéliales bénignes en un phénotype malin est appelé néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) (Murray 2021). La PIN est considérée comme une lésion précancéreuse du cancer se développant au sein de l'épithélium des acini ou des canaux et est classée en deux grades : faible (LGPIN) et élevée (HGPIN). Seule la HGPIN appelée aussi carcinome *in situ*, se développera en adénocarcinome invasif localisé avant d'évoluer vers des formes métastatiques avancées voire résistantes à la castration (Saranyutanon et al. 2019).

La résistance à la castration met en jeu une multitude de mécanismes qui collectivement activent la prolifération tumorale (Zerbib et Beuzeboc 2012) :

- Des taux élevés de testostérone impliquant une augmentation de la synthèse paracrine de DHT au sein du stroma tumoral ;
- Les altérations du RA de type mutations ou amplifications survenant chez une minorité de patients sont rares dans les tumeurs primaires mais fréquentes dans 50 % des cancers prostatiques résistants à la castration (CRPC) (Rebello et al. 2021). Ces altérations peuvent entraîner une amélioration de l'activité fonctionnelle du récepteur telle qu'une hypersensibilité du RA à de faibles niveaux de ligand voire en absence de ligand ou encore une activation du RA par des ligands non androgènes ;
- La majorité des tumeurs maintiennent également une signalisation par le RA par le biais de sa surexpression ;

- La transactivation du RA via des voies de signalisation dépendantes de facteurs de croissance par exemple l'EGF, l'IGF-1 et des modifications du mode d'action des chaperonnes corégulatrices (coactivateurs et des corépresseurs).

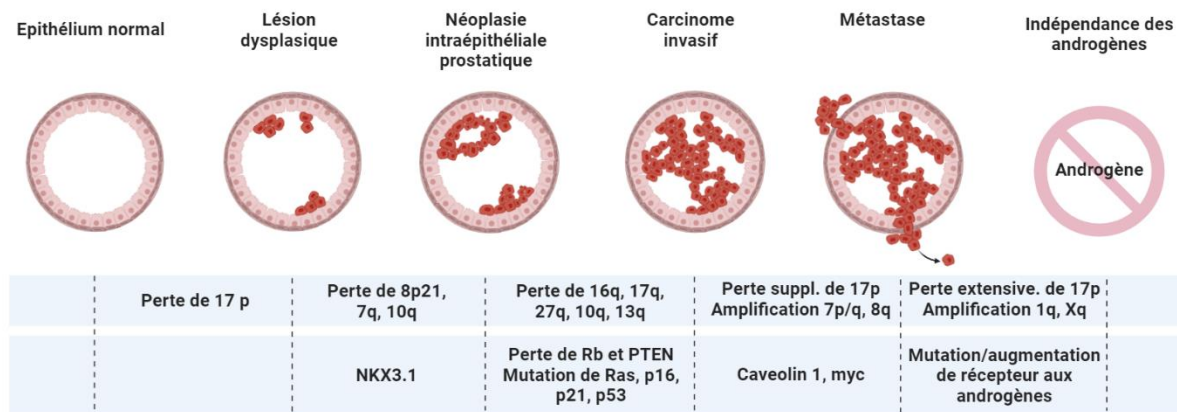


Figure 3 : Voie possible de progression du cancer de la prostate chez l'Homme. Chaque stade de progression est corrélé à des altérations génétiques et à la perte de régions chromosomiques spécifiques impliquées dans ce processus. Epithélium normal : L'état initial, où les cellules de la prostate présentent une morphologie et une fonction normales. Lésion dysplasique : Des modifications cellulaires précoces apparaissent, indiquant un risque accru de développement tumoral, mais sans invasion. Néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) : Stade intermédiaire où des cellules anormales sont présentes dans l'épithélium, représentant un précurseur du cancer. Carcinome invasif : La tumeur devient invasive, s'étendant au-delà de la couche épithéliale et atteignant les tissus environnants. Métastases et indépendance des androgènes : La maladie progresse vers des métastases à distance, avec des cellules tumorales devenant résistantes à la thérapie anti-androgénique, ce qui complique le traitement. (Vecchione et al. 2007)

Sur le plan clinique (**Figure 4A**), on distingue 4 stades différents de cancer de la prostate indiquant l'étendue de la maladie selon la classification internationale TNM (cette classification prend en compte la taille de la tumeur [T], la présence ou non de cellules cancéreuses dans les ganglions [N], la présence ou non de métastases [M]) :

- Le cancer de la prostate localisé ou intracapsulaire sans extension au-delà de la capsule prostatique (enveloppe qui sépare la prostate des tissus voisins) ;
- Le cancer de la prostate localement avancé, qui s'étend au-delà de la capsule prostatique ou aux organes adjacents sans envahissement ganglionnaire ou métastatique à distance ;
- Le cancer de la prostate avec atteinte ganglionnaire pelvienne ;
- Le cancer de la prostate métastatique, avec une (ou plusieurs) métastase(s) à distance. On parle alors de cancer non localisé ou extra-capsulaire (HAS - Cancer de la prostate : Rapport d'orientation 2012).

Le développement du cancer de la prostate est habituellement lent et rarement symptomatique jusqu'à ce qu'il atteigne un stade avancé. À ce stade, une hématurie et des signes d'obstruction de l'évacuation vésicale (p. ex., mictions demandant un effort, retenue mictionnelle, jet urinaire faible ou intermittent, impression d'une évacuation incomplète, goutte retardataire) ou une obstruction urétérale (p. ex., colique

néphrétique, douleur de l'hypochondre, dysfonctionnement rénal) peuvent apparaître. Des douleurs osseuses, des fractures pathologiques ou la compression de la moelle épinière peuvent être dues à des métastases osseuses (en particulier au niveau des vertèbres lombaires, des hanches ou du dos), une perte de poids ou une asthénie inexplicée (Chandrasekar 2023).

Les cancers de la prostate localisés sont classés en 3 sous-catégories en fonction de leur risque d'évolution selon la classification d'Amico (cette classification prend en compte le stade TNM, le score de Gleason, la valeur du PSA (plus le stade est élevé, plus le PSA augmente rapidement) (HAS - Cancer de la prostate : Rapport d'orientation 2012) :

- le cancer de la prostate localisé à faible risque ;
- le cancer de la prostate à risque intermédiaire ;
- le cancer de la prostate localisé à risque élevé.

Le score de Gleason (GS) est un facteur histopronostique majeur du cancer de la prostate établi par l'examen anatomopathologique (**Figure 4B**). Il permet de mesurer l'étendue et le degré d'agressivité de la maladie, et ces éléments seront pris en compte pour déterminer le traitement le plus approprié à proposer. Plus le score est élevé, plus la tumeur est agressive et peu différenciée (HAS - Biopsies ciblées dans le diagnostic du cancer de la prostate 2023) .

Contrairement aux tumeurs bien différenciées, les tumeurs peu différenciées histologiquement progressent rapidement au stade métastatique :

- Le délai moyen entre le diagnostic et l'apparition de métastases varie en fonction du score de Gleason, allant de 5 ans pour les scores de 8 à 10 à plus de 15 ans pour les scores de 2 à 4 ;
- Le décès survient en moyenne 2 à 3 ans après l'apparition des métastases ;
- La progression de la tumeur vers le stade métastatique après 10 ans de suivi concerne moins d'un sujet sur 5 (en fonction des caractéristiques tumorales) (HAS - Cancer de la prostate : Rapport d'orientation 2012).

La présence de métastases peut s'associer ou non à la résistance à la castration. Selon les données du Registre européen du cancer de la prostate, qui constitue la plus grande cohorte de patients atteints de mCRPC recevant un traitement de première ligne, 10 % ont développé une résistance à la castration (nmCRPC) avant les métastases, dans une durée médiane de 6,4 ans. De plus, 35 % ont développé des métastases (mHSPC) avant de devenir résistants à la castration (mHSPC métachrone) tandis que 27 % ont développé des métastases et une résistance à la castration en l'espace de 4 mois ou moins (Verry et al. 2022).

Par conséquent, les patients diagnostiqués au stade métastatique locorégionale ou à distance résistant à la castration dont la prévalence a été estimée entre 1,2 % et 2,1 % des cas de cancer de la prostate (Shore et al. 2021), se heurtent à un pronostic très péjoratif avec un taux de survie à 5 ans de 29 % (Ploussard et Cornu 2019), représentant un enjeu majeur dans le domaine oncologique qui constituera le cœur de ce projet et la suite de mes recherches.

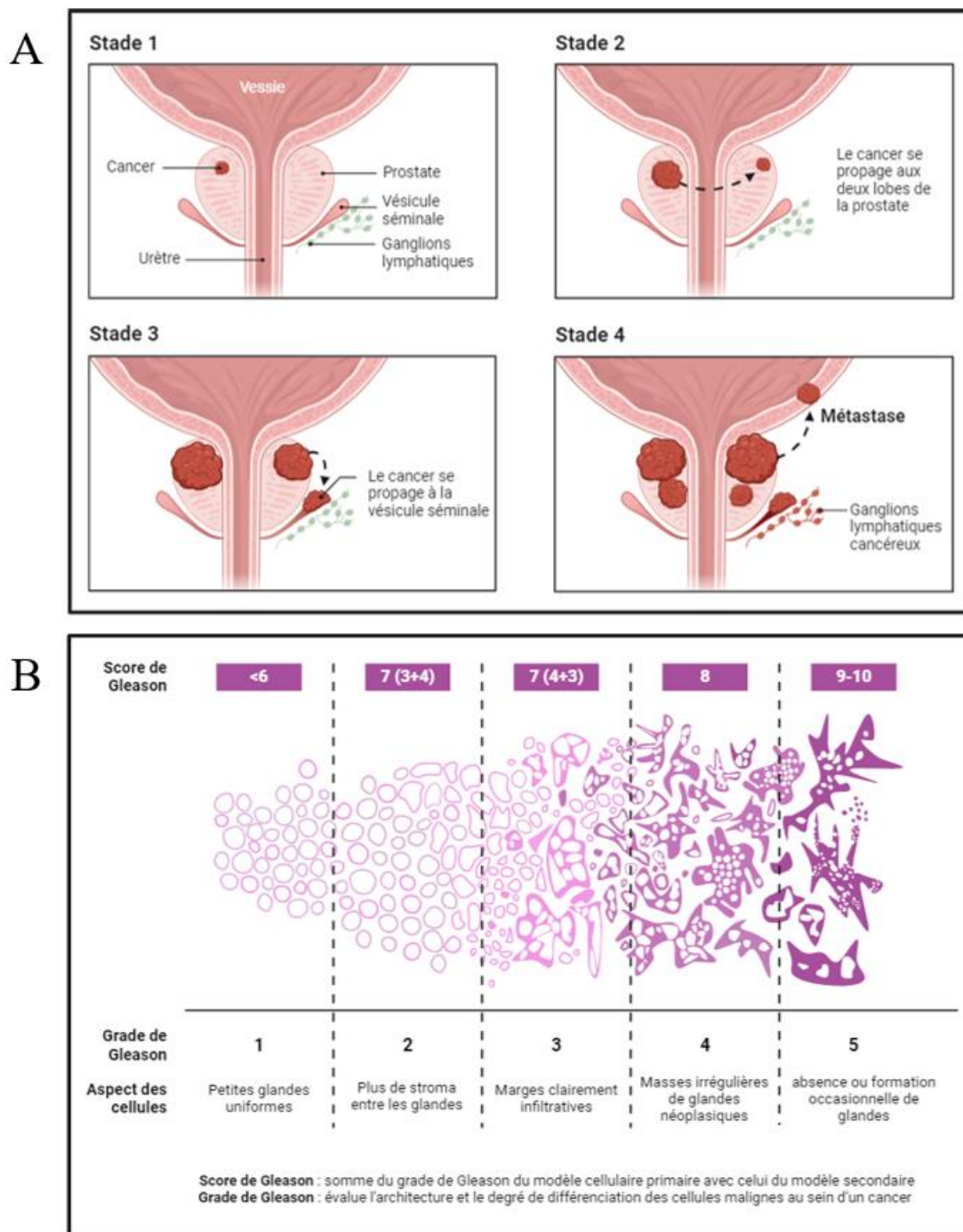


Figure 4 : La classification et la stadification du cancer de la prostate. (A) Le système de stadification des tumeurs. Le stade I représente une maladie localisée et le stade IV une maladie avancée avec métastases (B) Le système de classification de Gleason. Le score de Gleason se compose de deux grades, chacun attribué sur une échelle de 1 à 5. Le premier grade représente le modèle histologique le plus prédominant, tandis que le second grade représente le modèle le moins prédominant. La somme des deux grades donne un score total allant de 2 à 10. Les scores plus élevés indiquent une agressivité accrue de la tumeur. Le grade de Gleason, quant à lui, désigne le niveau d'anormalité des cellules cancéreuses observées au microscope. Un grade de 1 indique des cellules relativement normales, tandis qu'un grade de 5 désigne des cellules très anormales et agressives. Le grade de Gleason est un indicateur clé de la progression du cancer et aide à orienter les décisions thérapeutiques. (Kim et al. 2021).

II.3 PROGRESSION VERS LE CANCER DE LA PROSTATE METASTASIQUE RESISTANT A LA CASTRATION

La transition vers ce stade représente un véritable handicap pour les patients en raison des douleurs qu'elle engendre, affectant ainsi leur qualité de vie. Elle s'accompagne d'une dissémination tumorale entraînant des foyers métastatiques dans divers organes et dont l'apparition et la résistance aux traitements sont influencées par une multitude de facteurs souvent interconnectés au sein du microenvironnement tumoral (MET) dont l'hypoxie et l'angiogenèse.

Ces facteurs peuvent compromettre les chances de survie des patients avec une diminution de l'espérance de vie lorsque le cancer de la prostate a atteint un stade métastatique. Les patients peuvent faire face à des traitements moins efficaces, ce qui accentue le besoin d'approches thérapeutiques innovantes pour améliorer leur pronostic. Ainsi, le suivi régulier et l'évaluation des options de traitement restent essentiels pour maximiser la survie et la qualité de vie des patients dans ce contexte complexe.

II.3.1 Dissémination et foyers métastatiques

La dissémination métastatique est un processus en plusieurs étapes qui se fait via deux voies : sanguine et lymphatique. Elle est le produit de plusieurs événements biologiques (**Figure 5**) tels que les suivants : (i) l'invasion locale ; (ii) l'intravasation ; (iii) la survie dans la circulation ; (iv) l'adhésion au lit vasculaire ; (v) l'extravasation et (vi) la colonisation.

Les cellules tumorales quittent ainsi le site primaire et entrent dans la circulation sanguine et la lymphe : seule une fraction de ces cellules tumorales circulantes possède la capacité d'extravasation vers un site voisin ou distant et de survivre en tant que cellules tumorales disséminées. Seules 0,001%-0,02% de ces cellules circulantes seront capables de coloniser et former des métastases (Manna et al. 2019).

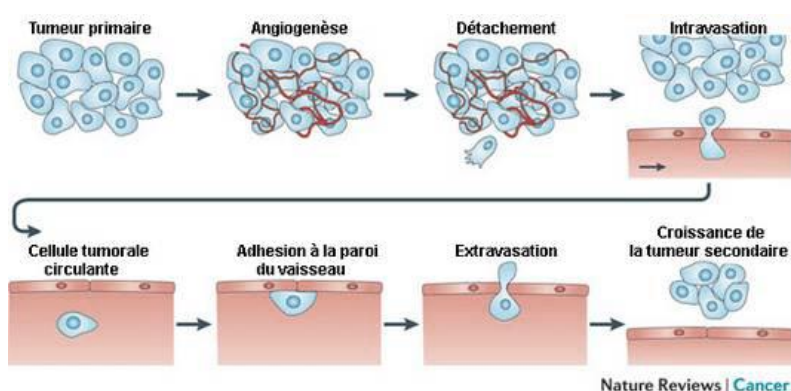


Figure 5 : Processus métastatique de la tumeur primaire à l'invasion d'autres organes. Le processus métastatique débute par la tumeur primaire, qui se développe et stimule l'angiogenèse pour nourrir sa croissance. Ensuite, des cellules tumorales se détachent de la tumeur, pénètrent dans la circulation sanguine (intravasation) et deviennent des cellules tumorales circulantes. Ces cellules adhèrent à la paroi des vaisseaux sanguins et subissent une extravasation, leur permettant de quitter la circulation. Finalement, elles se prolifèrent pour former une tumeur secondaire dans un autre organe, complétant ainsi le processus métastatique (extraite de Prunier 2015).

Ces métastases (**Figure 6**) envahissent préférentiellement des foyers locorégionaux au niveau des ganglions lymphatiques adjacents à la prostate (99%) et les os (84 %) en particulier le bassin et le rachis lombaire (Gandaglia et al. 2014 ; Kang et al. 2022 ; Shiner et al. 2024). Les sites de métastases peu fréquents sont localisés au niveau des ganglions lymphatiques distants (10,6 %), les viscères avec le foie et les poumons (~0,3%), le cerveau et la dure-mère (2 %). La dissémination dans ces tissus mous est associée à des taux de survie encore plus faibles.

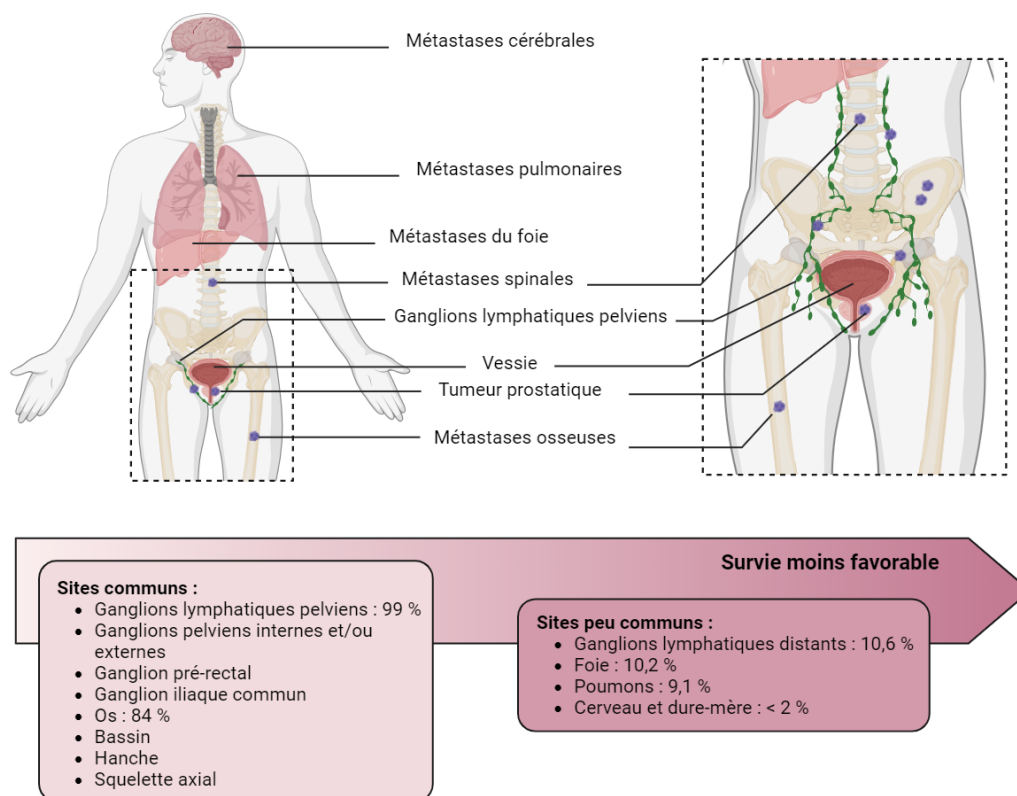


Figure 6 : Foyers métastatiques dans le cancer avancé de la prostate. La dissémination aux tissus mous est associée à une survie encore plus faible. Les sites courants de dissémination métastatique dans le cancer avancé de la prostate incluent la propagation locorégionale vers les ganglions lymphatiques (99 %) et les os (84 %). Les sites métastatiques moins fréquents comprennent les ganglions lymphatiques distants (10,6 %), les viscères (~10 %) et le cerveau ainsi que la dure-mère (<2 %) (Rebello et al. 2021).

II.3.2 Facteurs influençant la survenue des métastases et la résistance aux traitements

Parmi les facteurs critiques favorisant l'émergence de métastases plus agressives, de résistance aux traitements, de récurrence et d'échec thérapeutique (Ji, Wu, et Jiang 2023), l'hétérogénéité tumorale représente un défi majeur face aux objectifs de la médecine de précision (Ge, Wang, et Cheng 2022).

Le cancer de la prostate est une tumeur hétérogène à plusieurs niveaux qui peut être divisée en au moins trois sous-types principaux (**Figure 7**) :

- L'hétérogénéité inter-patients : elle fait référence aux différences tumorales génotypiques, phénotypiques et moléculaires entre des patients dont les caractéristiques cliniques

(classification TNM, taux de PSA, score de Gleason) et le stade (maladie localisée ou métastatique) sont identiques. Ces différences peuvent être liées à des facteurs génétiques, environnementaux, démographiques ou même des réponses individuelles aux traitements ;

- L'hétérogénéité inter-tumorale : elle décrit la situation dans laquelle des tumeurs multifocales (foyers) apparaissent chez un même patient évoluant de façon indépendante et souvent histomorphologiquement différentes ;
- L'hétérogénéité intra-tumorale représente les différences génomiques, épigénétiques, transcriptomiques et phénotypiques au sein d'une masse tumorale. Cela signifie qu'une tumeur individuelle peut contenir plusieurs sous-populations de cellules cancéreuses, ainsi que de cellules non tumorales, y compris des lignées épithéliales et non épithéliales, au sein d'une tumeur (par exemple, les fibroblastes associés au cancer).

Ces trois sous-types présentent des caractéristiques distinctes qui contribuent à cette diversité tumorale complexe (Flores-Téllez et Baena 2022).

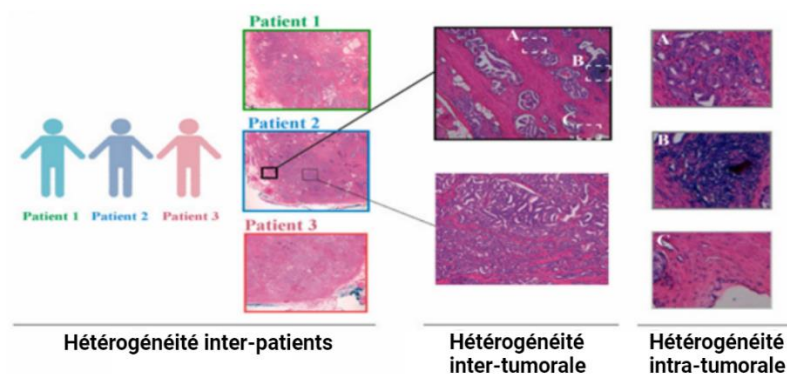


Figure 7 : Les différents niveaux d'hétérogénéité tumorale. Les différences entre les tumeurs prostatiques, dues aux caractéristiques variées des patients, constituent le niveau d'hétérogénéité inter-patients. Les variations observées entre les foyers, ainsi qu'entre les tumeurs primaires et métastatiques, définissent le niveau d'hétérogénéité inter-tumorale. Enfin, la diversité intra-tumorale fait référence aux différences entre les cellules tumorales au sein d'un même foyer. Les coupes histologiques à l'hématoxyline et à l'éosine illustrent ces différents niveaux d'hétérogénéité (extraite et traduite de Flores-Téllez et Baena 2022).

Bien que l'hétérogénéité du cancer de la prostate (**Figure 8**) soit traditionnellement attribuée à la diversité génétique, l'hétérogénéité de la tumeur peut provenir de variabilités non génétiques, notamment du MET (Ge, Wang, et Cheng 2022) qui influence la capacité de formation d'une cellule métastatique et participe aux mécanismes de résistance du mCRPC (Cai et al. 2023).

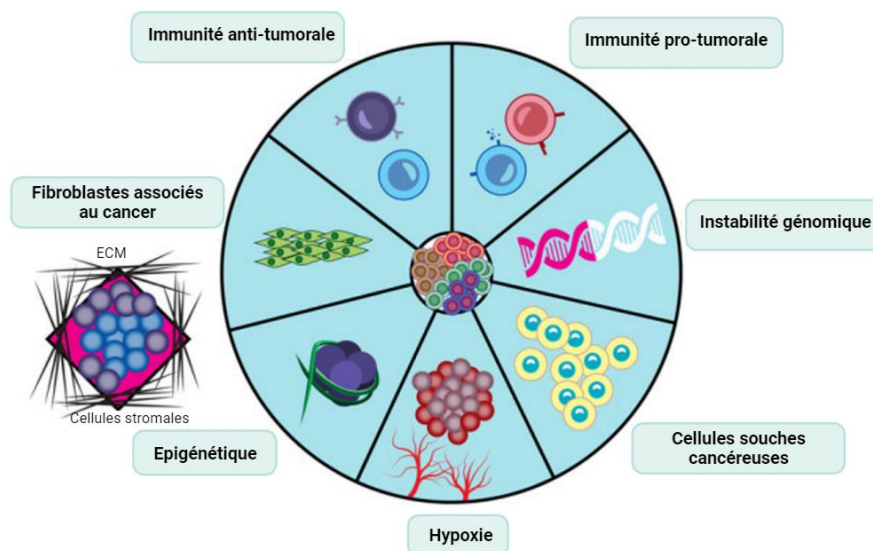


Figure 8 : Le microenvironnement tumoral hétérogène. Le microenvironnement tumoral présente une topographie dynamique au sein de la tumeur. L'état hypoxique, la vascularisation, l'épigénétique, ainsi que l'instabilité génomique peuvent interagir de manière complexe et dynamique avec les cellules du cancer de la prostate (fibroblastes associés au cancer, de cellules stromales, de cellules immunitaires au sein d'une matrice extracellulaire) (extraite et traduite de Ge, Wang, et Cheng 2022)

II.3.3 Microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral du cancer de la prostate appelé stroma tumoral est un réseau complexe et interconnecté composé d'une matrice extracellulaire (fibres, substance fondamentale, macromolécules et glycoprotéines), de divers types de cellules classés dans deux grandes composantes du tissu conjonctif : le compartiment mésenchymateux (cellules souches mésenchymateuses/stromales, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des myofibroblastes) et le compartiment immunitaire (lymphocytes, plasmocytes, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, polynucléaires), qui entre autres, sécrètent des substances telles que des chimiokines, des cytokines, des enzymes dégradant la matrice (Bahmad et al. 2021 ; Brady et Nelson 2023 ; Li et al. 2023).

Ce MET comprend ainsi des éléments de l'hôte détournés de leur fonction primaire afin de favoriser la croissance tumorale et la diffusion métastatique, impliquant un dialogue entre les cellules épithéliales prostatiques et le stroma environnant via une séquence de modifications cellulaires intrinsèques et d'altérations du microenvironnement (**Figure 9**). Cela se traduit par un état d'inflammation chronique, le remodelage de la matrice, l'apparition de points de rupture de la membrane basale, l'échappement immunitaire (local mais aussi en partie à distance) et une prolifération vasculaire augmentée (Saranyutanon et al. 2019 ; Ge, Wang, et Cheng 2022).

Comme les tissus sains, les tumeurs ont besoin d'un apport sanguin accru pour leur croissance. Cependant, le réseau vasculaire tumoral prostatique est décrit comme aberrant et désorganisé entraînant une hétérogénéité de la densité vasculaire, un débit sanguin irrégulier et s'accompagnant souvent d'une compression de ses vaisseaux sanguins et lymphatiques par les cellules cancéreuses.

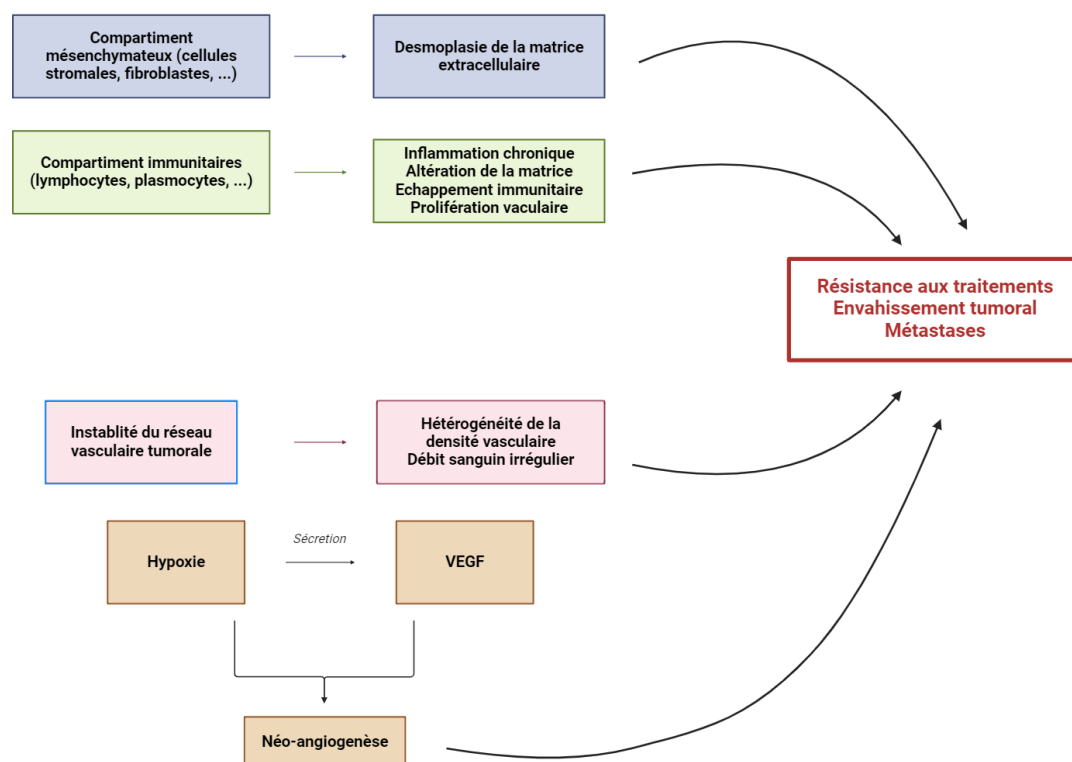


Figure 9 : Microenvironnement tumoral : structure et rôles dans l'oncogénèse. Les différents éléments du microenvironnement tumoral favorisent la résistance au traitement et l'envahissement tumoral local et à distance, soulignant son importance dans la progression du cancer. Le compartiment mésenchymateux, caractérisé par la desmoplasie de la matrice extracellulaire, contribue à la rigidité tumorale et favorise la croissance des cellules cancéreuses. Le compartiment immunitaire est marqué par une inflammation chronique, qui peut entraîner une altération de la matrice et faciliter l'échappement immunitaire des cellules tumorales, tout en stimulant la prolifération vasculaire pour alimenter la tumeur. L'instabilité du réseau vasculaire tumorale, se traduisant par une hétérogénéité de la densité vasculaire et un débit sanguin irrégulier, limite l'apport en nutriments et en oxygène, aggravant ainsi l'état hypoxique de la tumeur. Cette hypoxie entraîne une sécrétion accrue de facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), favorisant la néo-angiogenèse, qui alimente la croissance tumorale (Lorion et al. 2016).

Parmi les facteurs caractérisant le MET, seuls les rôles de l'hypoxie et de l'angiogenèse seront abordés dans le processus de progression, dissémination métastatique et de résistance aux traitements en accentuant une distribution inégale des agents thérapeutiques dans le site tumoral.

II.3.3.1 Hypoxie

L'hypoxie pathologique est un facteur courant dans les tumeurs, entraînant des zones d'hypoxie où l'apport sanguin est réduit, ce qui provoque une mauvaise oxygénation des cellules éloignées des vaisseaux sanguins. Cette situation est exacerbée par la prolifération des cellules tumorales, qui est plus rapide que celle des cellules formant les capillaires sanguins. Par conséquent, il en résulte qu'une plus grande partie des cellules tumorales se retrouve distante du réseau sanguin, contrairement aux cellules normales, pouvant entraîner des défauts de diffusion des médicaments au sein de toute la tumeur.

A l'échelle cellulaire, l'hypoxie peut induire l'activation de plusieurs voies de signalisation notamment

celles des protéines clés appelées facteurs d'hypoxie, notamment HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1- α) et HIF-2 α (Hypoxia-Inducible Factor 2- α). Ces facteurs de transcription jouent un rôle crucial en régulant de nombreux processus tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore l'angiogenèse conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux (Rôle du microenvironnement dans la tumorigenèse et la progression tumorale - Fondation ARC 2013).

Par ailleurs, l'état hypoxique peut aussi stimuler des processus invasifs et métastatiques comme la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), processus par lequel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques adhésives et acquièrent des propriétés mésenchymateuses, telles que la motilité et leur capacité d'invasion. HIF- α joue un rôle clé dans ces mécanismes, et son inhibition pourrait réduire la migration des cellules cancéreuses.

Enfin, l'hypoxie du microenvironnement joue un rôle crucial en influençant divers paramètres biologiques qui peuvent affecter le potentiel malin de la tumeur ainsi que sa résistance aux traitements. Par exemple, la toxicité des rayonnements ionisants dans certaines thérapies dépend de l'oxygène pour produire des ROS (espèces réactives de l'oxygène), qui entraînent des lésions de l'ADN et la mort des cellules tumorales. Dans un environnement hypoxique, les cellules tumorales deviennent donc moins sensibles à la thérapie (Wu et al. 2024). L'hypoxie affecte non seulement les cellules tumorales, mais aussi les cellules stromales et immunitaires, induisant une résistance immunitaire et favorisant la croissance tumorale, soulignant l'importance de cibler à la fois les cellules cancéreuses et leur environnement pour améliorer l'efficacité des thérapies (Muz et al. 2015).

II.3.3.2 Angiogenèse

La relation complexe entre l'hypoxie, la résistance aux traitements et le potentiel malin des tumeurs souligne l'importance de l'angiogenèse (Sooriakumaran et Kaba 2005). Dans des conditions physiologiques d'un tissu prostatique normal, l'angiogenèse résulte d'un équilibre entre les facteurs activateurs et inhibiteurs. La rupture de cet équilibre, à travers l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales stromales environnantes, conduit à une prédominance du processus de néo-angiogenèse en favorisant l'augmentation des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Le VEGF est le facteur de croissance le plus important associé au cancer de la prostate dont l'expression est régulée par l'hypoxie, les variations de concentration de testostérone ainsi que plusieurs facteurs de croissances et cytokines (Lorion et al. 2016).

Divers mécanismes d'angiogenèse tumorale ont été observés dans le cancer de la prostate et englobent un large éventail de processus essentiel à l'initiation, à la progression et à la dissémination métastatique de la maladie (**Figure 10**). La formation de nouveaux vaisseaux peut résulter de différentes manières à partir de vaisseaux existants (par exemple l'angiogenèse par bourgeonnement ou par intussusception) ou à partir de cellules précurseurs endothéliales circulantes (par exemple la vasculogenèse, mimétisme, transformation des cellules souches cancéreuses en cellules endothéliales tumorale) (Grizzi et al. 2023).

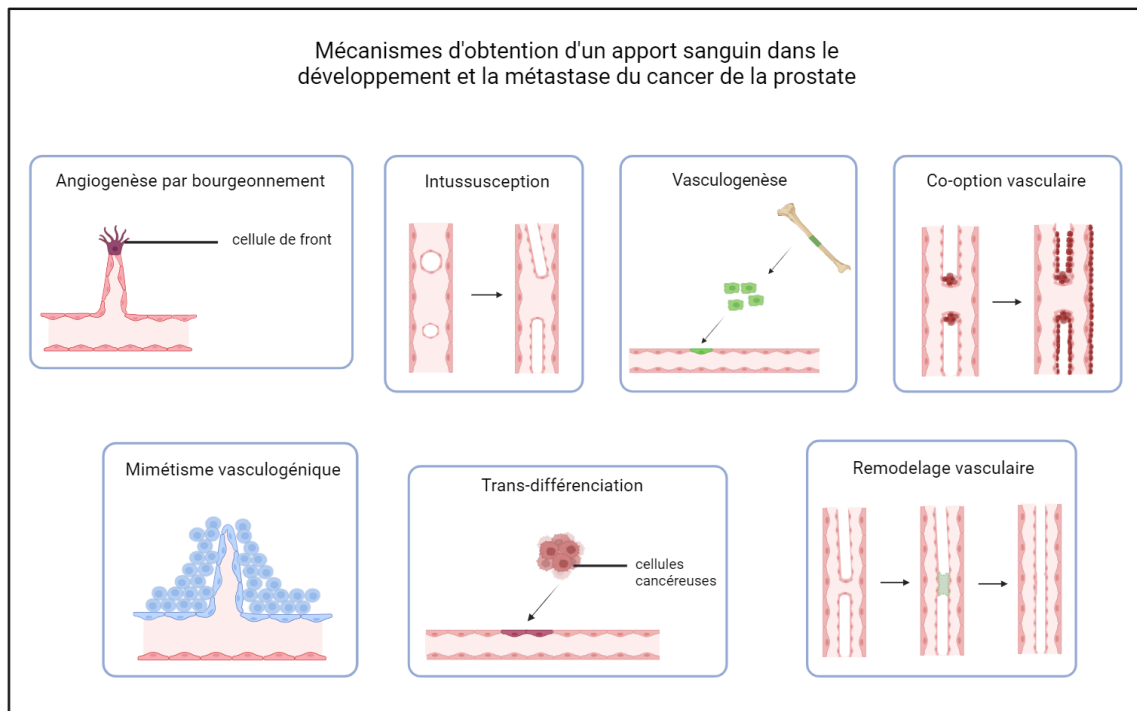


Figure 10 : Les différents mécanismes de l'angiogenèse tumorale. L'angiogenèse se distingue en 7 mécanismes étroitement liés à l'invasion tumorale, aux métastases et à la résistance aux thérapies traditionnelles. L'angiogenèse par bourgeonnement est le processus principal de la vascularisation des tumeurs avec l'émergence de nouvelles branches vasculaires à partir des extrémités et des parois latérales des vaisseaux sanguins préexistants qui finissent par se connecter aux vaisseaux voisins et infiltrer le tissu tumoral. L'angiogenèse par intussusception se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux par la division et l'invagination des vaisseaux préexistants qui se bifurquent et forment des ponts (appelés piliers) pour donner naissance à deux voire plusieurs vaisseaux distincts. La vasculogenèse implique la formation de nouveaux réseaux vasculaires à partir de cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse ou résidant dans la paroi des vaisseaux qui ont été recrutés et se sont différenciés. Le mécanisme de co-option vasculaire ne se repose pas sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins mais sur le système vasculaire préexistant du tissu sain pour assurer l'approvisionnement du tissu tumoral. Le mimétisme vasculogénique décrit la capacité des cellules tumorales de mimer les propriétés des cellules endothéliales en s'intégrant dans les vaisseaux sanguins préexistants, facilitant ainsi le transport des érythrocytes et de l'oxygène dans le tissu tumoral. Dans le processus de trans-différenciation des cellules souches cancéreuses, ces cellules spécialisées acquièrent des phénotypes endothéliaux et se transforment en cellules endothéliales. Enfin le remodelage vasculaire ou « pruning » permet d'optimiser le réseau de ramification pour améliorer les propriétés du transport vasculaire pouvant conduire à la rupture de l'occlusion et formant ainsi deux segments de vaisseaux distincts (Grizzi et al. 2023).

Ces vaisseaux tumoraux sont caractérisés par une paroi comportant de larges espaces entre les cellules endothéliales et une membrane basale très fine. Les anomalies architecturales associées à la compression des néo-vaisseaux par la tumeur conduisent à une vascularisation tumorale hétérogène et à l'augmentation de la pression de l'espace interstitiel intra-tumoral. Cette augmentation, provoquant un œdème péri-tumoral, favorise la libération des facteurs pro-angiogéniques vers l'extérieur de la tumeur entraînant des défauts de pénétration et diffusion des médicaments au sein de cette dernière. La stase du flux sanguin à l'intérieur des néo-vaisseaux augmente l'hypoxie locale, qui à son tour favorise la néo-angiogenèse et la résistance à de nombreux traitements nécessitant de l'oxygène pour être efficaces (Lorion et al. 2016).

La relation entre néo-vaisseaux et tumeur est paradoxale : bien que nécessaire au développement tumoral (apport en oxygène, en nutriments), la néovascularisation demeure souvent peu fonctionnelle (par exemple l'hypoxie locale, fréquentes plages de nécrose au sein de la tumeur). Cela conduit à un développement tumoral anarchique et favorise à son tour plus la néo-angiogenèse, créant un cercle vicieux propice à l'apparition des métastases (Grizzi et al. 2023 ; Lorion et al. 2016 ; Manna et al. 2019 ; Rubin et al. 1999).

Plusieurs études (Reeves et al. 2013 ; Bahmad et al. 2021) ont montré que la zone périphérique du cancer de la prostate présente une vascularisation accrue par rapport à la zone de transition de la prostate. Cependant, cette augmentation vasculaire n'est pas constante dans toutes les études. En revanche, les tumeurs de la zone de transition présentent une grande variabilité vasculaire. Elles peuvent être à la fois hypo et hyper vascularisées par rapport au tissu normal de la zone de transition. L'activité angiogénique significative est souvent mesurée par la densité des microvaisseaux, un marqueur bien établi de l'angiogenèse, qui est en corrélation avec des résultats défavorables et à la progression métastatique (Sarkar et al. 2020).

Les patients au stade métastaté présentent un niveau de VEGF plasmatique plus élevé que ceux avec une maladie localisée, jouant un rôle dans le transport et la prolifération des cellules cancéreuses circulantes dans les organes riches en vaisseaux sanguins. Cette surexpression du VEGF est associée à un potentiel métastatique accru et s'accompagne souvent d'un mauvais pronostic (Grizzi et al. 2023).

Le pronostic et l'évolution clinique du cancer de la prostate dépendent directement de l'apparition de métastases pouvant aboutir à des formes très agressives d'où l'importance et la nécessité d'une prise en charge précoce avant la survenue de ces dernières afin de mieux contrôler l'évolution de la maladie et les risques associés en proposant un traitement efficace et adapté au patient.

II.4 PRISE EN CHARGE DU CANCER PROSTATIQUE

En France, le dépistage systématique du cancer de la prostate chez un Homme asymptomatique n'est pas recommandé par la Haute Autorité de Santé (HAS). Malgré cette non-recommandation, le nombre de dépistages individuels est élevé et conduit à la détection de formes précoces du cancer de la prostate. Près de 40 à 50 % des cancers identifiés sont d'évolution lente et ne se seraient jamais révélés au cours de la vie des personnes (Duran 2022).

II.4.1 Détection précoce

L'Association Française d'Urologie (AFU) propose une stratégie de première intention lors d'une suspicion de cancer de la prostate qui se repose sur le dépistage par :

- La recherche de facteurs de risques familiaux et éthiques ;
- Le toucher rectal pour la détection d'une possible anomalie (réalisé préalablement à la

prescription du dosage du PSA total) ;

- Le dosage PSA sérique total, marqueur sérique synthétisé uniquement par la prostate, initialement approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 1986 pour la surveillance de la progression du cancer de la prostate, a été reconnu par la FDA en 1994 comme outil de diagnostic (Kouriefs et al. 2009). Il n'est pas spécifique, il est également augmenté par les pathologies bénignes telles que l'hypertrophie bénigne de la prostate, la prostatite ou l'infection urinaire mais son élévation est statistiquement associée à un risque augmenté de cancer. Une valeur supérieure à 4 ng/ml est généralement considérée comme anormale mais cette valeur doit être interprétée par le médecin en fonction du contexte clinique (HAS - Référentiel de pratiques : Détection précoce du cancer de la prostate 2013)

Le pronostic basé sur le dosage du PSA est insuffisant et peut conduire à un sur-diagnostic, expliquant l'émergence au cours des deux dernières années de deux biomarqueurs tissulaires approuvés par la FDA ou l'EMA (European Medicines Agency), pour augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic. Il s'agit par exemple du proPSA dans le cadre du Prostate Health Index (phi) de Beckman Coulter, Inc. et du PCA3 dans le cadre du Progenza de Gen Probe, Inc. Des nouveaux tests basés sur une combinaison de plusieurs biomarqueurs génomiques ou protéomiques développés dans les laboratoires cliniques certifiés CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendment) sont désormais disponibles et dont certains pourraient être utiles pour différencier les formes agressives des formes non agressives de cancers de la prostate (Sartori et Chan 2014).

II.4.2 Diagnostic

Selon les recommandations du comité de Cancérologie de l'AFU, en cas de suspicion clinique et/ou biologique de cancer de la prostate, une acquisition d'imagerie par résonance magnétique multiparamétrique prostatique (IRMmp) est recommandée avant toute première série de biopsies prostatiques afin d'identifier et cibler les zones suspectes (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022). A partir de l'analyse de l'IRMmp, un score PI-RADS (Prostate Imaging-Reporting and Data System) est établi pour stratifier le risque tumoral. Lorsque l'IRMmp est positive (PI-RADS ≥ 3), une biopsie ciblée doit être effectuée (Parker et al. 2020).

Le diagnostic repose ainsi sur l'examen anatomopathologique de tissus prostatiques prélevés par biopsie guidée par ultrasons transrectaux échoguidés, sous anesthésie locale ou par biopsie transpérinéale (Parker et al. 2020). L'analyse anatomo-pathologique permet de confirmer la présence ou non de cancer, de son type histologique, de la longueur de tissu tumoral, de son grade histologique (score de Gleason).

Ainsi, l'IRMmp constitue le principal examen d'imagerie utile dans le diagnostic mais également dans le bilan d'extension. Ce bilan permet d'explorer l'envahissement local, ganglionnaire et les métastases afin d'évaluer le stade du cancer et le pronostic. Il est réservé aux patients considérés les plus à risque de développer des métastases.

Parallèlement, d'autres techniques d'imagerie complémentaires sont indiquées dans le bilan d'extension.

Il s'agit notamment d'un scanner (abdomen et pelvis), de la TDM (thorax, abdomen et bassin), scintigraphie osseuse par tomographie par émission monophotonique (TEMP) notamment aux phosphonates marqués au technétium-99m (^{99m}Tc) et de la TEP à la choline ou de le PSMA (Erra et Pradere 2019; Parker et al. 2020). Le choix des examens est discuté par l'équipe de soins spécialisée (urologue, oncologue médical, radiothérapeute, radiologue) selon le niveau de risque de la maladie. Les informations obtenues permettront à l'équipe médicale de prendre des décisions éclairées concernant le pronostic et les options sur le parcours de soins (**Figure 11**).

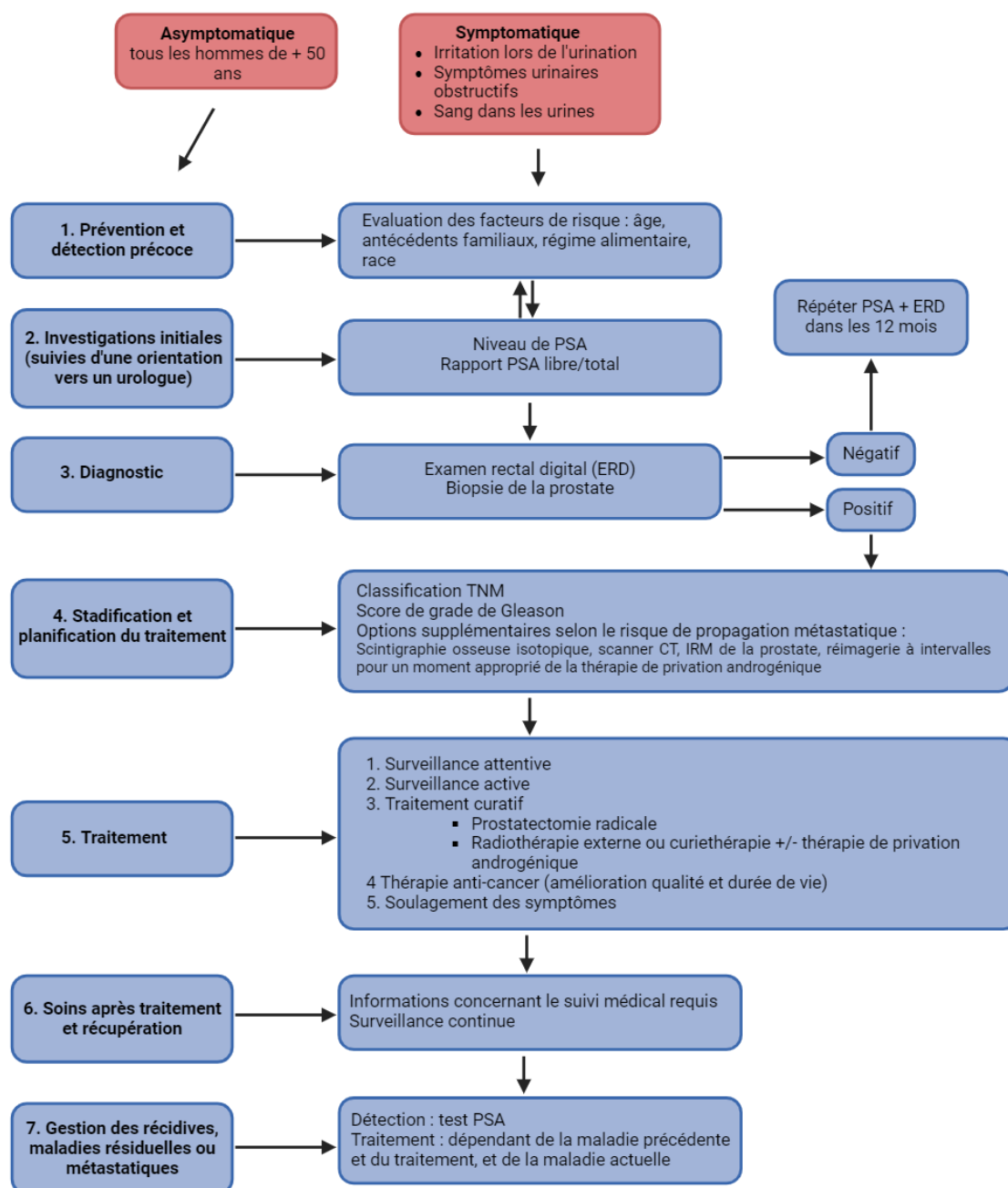


Figure 11: Parcours de soins chez les Hommes ayant été diagnostiqués pour le cancer de la prostate. TDM : tomodensitométrie IRM, imagerie par résonance magnétique ; PSA, antigène spécifique de la prostate. La décision de procéder ou non à une biopsie doit être prise en fonction des résultats du toucher rectal, de l'origine ethnique,

de l'âge, des comorbidités, du taux de PSA libre/total, des antécédents de biopsie et des valeurs du patient (extraite et traduite de O'Reilly et O'Kennedy 2017; Parker et al. 2020).

II.4.3 Traitement

La prise en charge dépend du stade de la maladie dont le risque de progression est évalué sur les données cliniques et critères pronostiques décrits précédemment. Les traitements recommandés par le comité de cancérologie de l'AFU sont proposés selon le risque du cancer de la prostate (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022). Un haut degré de risque se définit biologiquement par l'acquisition d'un potentiel métastatique et d'une résistance aux traitements, exposant à une évolution incontrôlée et mortelle (Masson 2011).

II.4.3.1 Stade localisé à faible risque

La stratégie thérapeutique pour les cancers à faibles risques évolutifs repose principalement sur de la surveillance active ou en option d'un traitement curatif (prostatectomie totale, radiothérapie externe ou curiethérapie interstitielle). Dans le cadre d'essais cliniques ou de registres prospectifs, l'HIFU (Ultrasons Focalisés de Haute Intensité) et la cryothérapie sont proposés comme traitement focal (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- La surveillance simple de type watching waiting (traitement palliatif en cas d'évolution)

C'est une alternative pour les Hommes qui ne sont pas éligibles à recevoir un traitement à visée curative ou qui ne le souhaitent pas (Parker et al. 2020 ; Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- La surveillance active

C'est une option thérapeutique de référence pour les tumeurs de faible risque évolutif dont le but est de déplacer le moment du traitement curatif (et ses effets indésirables) tout en restant dans la fenêtre de curabilité de la maladie. Elle se repose sur des examens réguliers : examen clinique, dosages répétés du PSA, biopsies prostatiques et éventuellement IRM. Si une évolution de la maladie est détectée, un traitement ayant pour objectif de traiter la maladie peut être programmé (Duran 2022; (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- La chirurgie par prostatectomie totale

C'est le traitement de référence du cancer de la prostate localisé. Il consiste à enlever la totalité de la prostate et des vésicules séminales en permettant de respecter les structures responsables de la continence et de l'érection. Les complications de la prostatectomie radicale sont essentiellement l'impuissance et l'incontinence urinaire (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- La curiethérapie exclusive interstitielle

C'est une modalité thérapeutique pour les formes localisées de cancer à faible risque seulement. Elle consiste à implanter dans la prostate tumorale, sous guidage échographique, des sources radioactives de façon permanente (grain d'iode ^{125}I à bas débit de dose) ou temporaire (grains d'iridium ^{192}Ir à haut débit de dose). Ces sources émettent des rayonnements ionisants dont la portée est très faible et détruisent les cellules cancéreuses avoisinantes. Cette technique peut exposer à des complications urinaires immédiates et retardées (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- La radiothérapie externe

C'est un traitement local de référence. Cette technique conformationnelle tridimensionnelle avec modulation d'intensité (IMRT) ou arc volumétrique (VMAT) consiste après repérage préalable de la prostate par scanner ou parfois associée à d'autres examens d'imagerie, à délivrer des rayonnements ionisants (dose de 74-80 Gy en 37-40 séances ou 60 Gy en 20 séances) produits par un accélérateur de particules sur la zone à traiter, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants, dits organes à risque (notamment la vessie et le dernier segment de l'appareil digestif : rectum et canal anal). Elle s'accompagne également d'un risque d'impuissance et éventuellement d'incontinence urinaire, ainsi que d'un risque d'inflammation rectale (rectite radique) (Rebello et al. 2021 ; Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- La radiothérapie stéréotaxique

Cette nouvelle option thérapeutique permet un traitement de précision à des doses de rayons de l'ordre de 35-40 grays en seulement 5 séances (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- L'HIFU (High-Intensity Focused Ultrasound)

Ce traitement focal en cours d'évaluation utilise des ultrasons à haute intensité pour chauffer les tissus à 70°C pour entraîner leur nécrose. Ce traitement est réalisé à l'aide d'un transducteur piézoélectrique, inséré soit par voie transrectale soit transurétrale (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

- La cryothérapie

Ce traitement focal également expérimental repose sur la congélation jusqu'à des températures inférieures à -40 °C de la tumeur conduisant à une destruction des tissus par effet Joule-Thomson (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

II.4.3.2 Stade localisé à risque intermédiaire

Les patients avec un risque intermédiaire constituent un groupe hétérogène présentant des pronostics très différents. Ainsi, les patients sont « favorables » lorsque leur pronostic se rapproche des risques faibles, alors que ceux à risque défavorable se rapprochent des risques élevés (Parker et al. 2020; Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

La prise en charge thérapeutique relève de la surveillance simple, également pour un nombre limité de patients de la surveillance active. La prostatectomie totale peut être recommandée avec un curage ganglionnaire pour les patients avec un risque significatif. Le curage ganglionnaire consiste à l'exérèse des ganglions ilio-obturbateurs, iliaques internes et iliaques externes bilatéraux jusqu'à la bifurcation iliaque. La radiothérapie externe (74 à 80 Gy en normofractionné ou 60 Gy en 20 séances) est proposée seule pour les patients intermédiaires favorables ou associée à une hormonothérapie courte (6 mois) si risque intermédiaire défavorable. La curiethérapie est uniquement préconisée pour le groupe intermédiaire favorable. Les traitements focaux sont réalisés uniquement dans le cadre d'études cliniques (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

II.4.3.3 Stade localisé à risque élevé ou au stade localement avancé

Pour ce groupe hétérogène de patients à haut risque de dissémination métastatique, le traitement doit être à la fois local et général.

L'hormonothérapie de première génération seule (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022)

Elle consiste à empêcher l'action stimulante de la testostérone sur les cellules cancéreuses pour stopper le développement du cancer. Ces hormonothérapies comprennent la pulpectomie, castration chirurgicale de la pulpe du testicule produisant la testostérone, l'utilisation d'agonistes ou antagonistes de l'hormone de libération de la lutéinostimuline ou Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) qui agissent au niveau de l'hypothalamus pour inhiber la production de testostérone, les anti-androgènes bloquant de manière compétitive la liaison entre la DHT (forme plus puissante d'androgène dérivée de la testostérone) et le RA au niveau des cellules tumorales. Même à des niveaux réduits de testostérone, la DHT peut continuer à stimuler la prolifération des cellules tumorales en activant le RA. Cette interaction entre RA, testostérone et DHT contribue à un taux élevé de rechutes (Y. Chen, Sawyers, et Scher 2008; If et al. 2004). La durée de l'hormonothérapie peut être courte (4 à 6 mois) ou longue (2 à 3 ans) mais avec un bénéfice pour une durée longue en termes de survie sans récurrence biochimique, la survie sans récurrence clinique, la survie sans métastase et la survie globale ;

- La radio-hormonothérapie (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022)

Indiquée de manière transitoire, l'hormonothérapie peut être utilisée en concomitance avec la radiothérapie externe avec possiblement un complément en curiethérapie, dans certains cas, en traitement de rattrapage après un traitement local ;

- La chirurgie par prostatectomie élargie avec curage ganglionnaire dans le cadre d'un traitement multimodal associant contrôle local par chirurgie ($\pm$ radiothérapie) et à distance par hormonothérapie prolongée de 12 à 18 mois (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

II.4.3.4 Récidive après traitement local

Le risque de récidive biologique après traitement local est très hétérogène et est basé sur le score CAPRA (Cancer of the Prostate Risk Assessment), développé par l'université de San Francisco, en prenant en compte l'âge, la valeur de PSA, le stade de la tumeur au toucher rectal, les grades primaires et secondaires de Gleason, et le pourcentage de biopsies positives.

Après prostatectomie totale, les options thérapeutiques en cas de récidive locale sont : la radiothérapie de rattrapage (64-66 Gy) devant être réalisée au plus tôt associée ou non à une hormonothérapie (6 mois), l'hormonothérapie continue ou intermittente, la surveillance active (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

Après radiothérapie externe ou curiethérapie, la surveillance peut être proposée ou un traitement local de rattrapage à visée curative par chirurgie, HIFU, cryothérapie ou curiethérapie en cas d'absence d'atteinte à distance. Une suppression androgénique peut être discutée après avoir éliminé la possibilité d'un traitement curatif (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

II.4.3.5 Stade métastatique hormonosensible

A la suite d'une rechute après traitement local, les patients peuvent développer des métastases (métachrones) différents des patients présentant d'emblée des métastases (synchrones ou de novo).

- Une privation d'androgènes (ADT)

Une hormonothérapie de seconde génération (agonistes de la LH-RH et anti-androgènes) administrée en continu constitue le gold standard pour le stade métastatique hormonosensible (Rebello et al. 2021). Elle bloque les effets des androgènes sur les cellules tumorales en agissant sur d'autres cibles (surrénales, inhibition de la liaison DHT et récepteur aux androgènes (RA), la translocation nucléaire du RA et la transcription médiée par le R). La diminution de la testostérone circulante peut être obtenue également par castration chirurgicale (Pignot 2023; Ploussard et al. 2022). L'ADT suivi du docétaxel (chimiothérapie) plus prednisolone était la norme pour le traitement systémique de première intention depuis 2004 jusqu'à l'arrivée de nouvelles hormonothérapies à l'abiratérone (inhibant l'enzyme essentielle à la production de testostérone et d'autres androgènes), l'apalutamide et l'enzalutamide (bloquant le RA). Chez les Hommes qui ne sont pas aptes à recevoir de l'abiratérone, de l'apalutamide, de l'enzalutamide et du docétaxel, l'ADT seule est proposée (Maluf et al. 2021 ; Parker et al. 2020; Pignot 2023; Rebello et al. 2021) ;

- Un traitement hormonal intermittent (Ploussard et al. 2022)

Cette option thérapeutique consiste en une administration intermittente d'agoniste ou d'antagoniste de la LHRH qui a fait l'objet de plusieurs essais ;

- Une intensification du traitement symptomatique avec des antalgiques et biphosphonates pour pallier aux douleurs est proposée (Ploussard et al. 2022).

II.4.3.6 Stade métastatique résistant à la castration

Au stade métastatique, dans la majorité des cas, les patients répondant initialement au traitement anti-androgénique font l'expérience d'une reprise de la croissance tumorale avec apparition de métastases progressant vers un stade léthal de la pathologie.

Ce phénomène d'échappement hormonal, survenant en moyenne au bout de 18 à 24 mois de traitement hormonal, est appelé résistance à la castration. Cette résistance se définit comme la combinaison d'une testostéronémie effondrée avec soit une progression biologique (3 élévations consécutives du PSA à 1 semaine d'intervalle et un PSA > 2 ng/ml), soit une progression radiologique sur des critères Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST) pour les tissus mous ou sur l'apparition d'au moins deux nouvelles lésions osseuses (Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - 2022).

Les options thérapeutiques du mCRPC (**Figure 12**) sont proposées en fonction des traitements antérieurs et ont pour objectifs de contrôler les symptômes et de ralentir la progression (Bousset 2019).

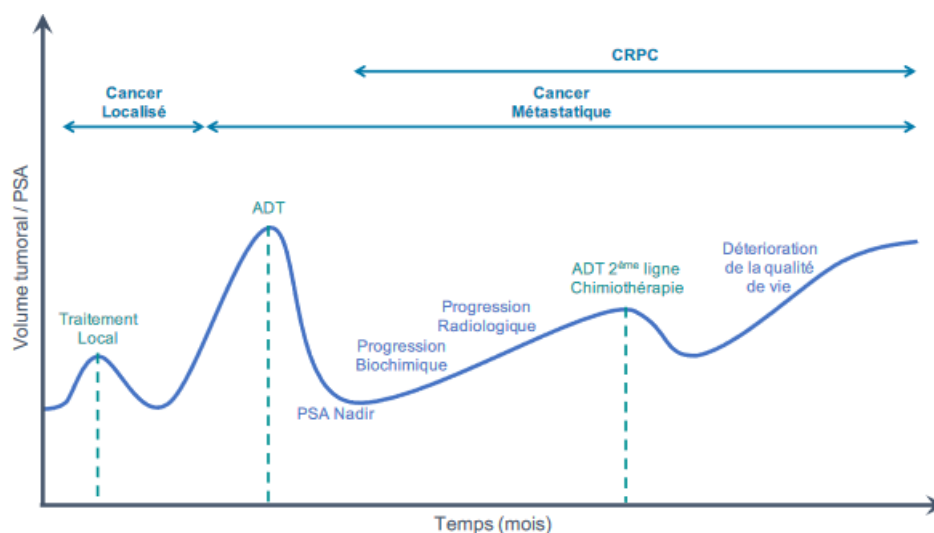


Figure 12 : Options thérapeutiques en fonction de la maladie. Pour le cancer de la prostate localisé, on recommande généralement un traitement local, tel que la chirurgie ou la radiothérapie. Dans le cas d'un cancer métastatique, les options de traitement incluent l'androgénothérapie (ADT), qui vise à réduire le taux PSA à son niveau le plus bas, connu sous le nom de nadir du PSA. Ce nadir est un indicateur important, car un taux de PSA minimal indique une bonne réponse au traitement. Les médecins surveillent également la progression biochimique (c'est-à-dire les changements des niveaux de PSA) et radiologique (imageries médicales) pour évaluer l'évolution de la maladie. Si le cancer continue de progresser malgré un traitement de première ligne, une seconde ligne d'ADT ou

une chimiothérapie peut être envisagée. Tout au long de ce parcours thérapeutique, il est essentiel de prendre en compte l'impact sur la qualité de vie des patients (extraite et traduite de Bousset 2019).

Traitement de première ligne au stade métastatique résistant à la castration

Même si la privation d'androgènes ne fonctionne pas complètement, la majorité des patients restent sous ADT car certaines cellules cancéreuses de la prostate continueront d'y répondre. En fonction du schéma thérapeutique du patient, d'autres traitements supplémentaires existent tels que :

- L'Hormonothérapie de nouvelle génération (HTNG)

La prescription d'une HTNG (enzalutamide, un anti-androgène, abiratérone, un inhibiteur de la synthèse des androgènes, cf. section précédente II.4.3.5) en première ligne représente le choix principal pour les patients ayant un cancer mCRPC peu ou pas symptomatiques, en accord avec les recommandations françaises et européennes (Maluf et al. 2021 ; Ploussard et al. 2022) ;

- La chimiothérapie, traitement systémique recourant à des médicaments anticancéreux ou cytotoxiques pour atteindre et détruire les cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps. Son action est dirigée notamment sur les mécanismes de division cellulaire. La chimiothérapie standard de première ligne par taxane est le docetaxel (75 mg/m² toutes les 3 semaines) possédant l'AMM (autorisation de mise sur le marché), recommandé dès le stade hormonosensible pouvant être en association à la prédnisone ou à la prédnisolone (anti-inflammatoire stéroïdien, 10mg/j) dans le but de soulager la douleur ou maîtriser les symptômes de la maladie (Maluf et al. 2021 ; Parker et al. 2020). Des effets indésirables tels qu'une myélosuppression (neutropénie, thrombocytopénie et/ou anémie) nausées, alopecie, éruption cutanée par exemple sont observés (Ismail et Killeen 2024) ;

- L'immunothérapie comme le sipuleucel-T

Cette thérapie immunitaire active se repose sur un vaccin dérivé du patient conçu pour induire une immunité contre les cellules cancéreuses de la prostate. Ce traitement est principalement utilisé chez les Hommes qui présentent peu ou pas de symptômes mais n'est pas disponible en Europe (Ploussard et al. 2022) ;

- La radiothérapie utilisant le radium ²²³Ra, isotope émettant des particules α qui vont induire des lésions importantes au niveau de l'ADN tumoral et dont le parcours court permet de sauvegarder les tissus sains environnants. Elle est recommandée pour les Hommes atteints d'un mCRPC symptomatique à prédominance osseuse sans métastases viscérales (Parker et al. 2020) ;
- Un traitement à base de modulateur osseux, le denosumab qui est un anticorps monoclonal dirigé contre RANKL utilisé dans les maladies dégénératives de l'os comme l'ostéoporose pour aider à prévenir ou à gérer les douleurs osseuses, les fractures ou autres complications osseuses notamment chez les Hommes atteints de métastases osseuses dues à un CRPC et présentant un risque d'événements liés au squelette cliniquement significatifs (Parker et al. 2020).

Traitement en deuxième ligne au stade métastatique résistant à la castration

Les options en deuxième ligne sont affectées par le traitement choisi en première ligne pour le CRPC.

- La chimiothérapie de deuxième ligne

Le cabazitaxel (médicament de chimiothérapie taxane comme le docétaxel) qui peut avoir une activité dans les tumeurs devenues résistantes au docétaxel. Il est administré avec le stéroïde prednisone, et constitue une option lorsque le docétaxel n'est pas efficace (Rouyer et al. 2019) ;

- La thérapie génique comprend des options médicamenteuses qui peuvent s'avérer utiles pour certains patients dont les tumeurs présentent certaines mutations génétiques. Ces mutations sont découvertes grâce à un processus appelé séquençage génomique du cancer. Elle est recommandée chez les patients ayant des antécédents familiaux de cancer ou présentant des mutations pathogènes dans des gènes à risque de cancer (Parker et al. 2020).

La prise en charge du patient atteint d'un CRPC ne cesse d'évoluer. Les questions de combinaisons de traitement sont étudiées à travers des essais cliniques (Rozet et al. 2020) :

- Trois essais randomisés évaluant la chimiothérapie (docetaxel) associée à la suppression androgénique dans les cancers de la prostate métastatiques hormonosensibles : GETUG 15, CHAARTED et STAMPEDE ;
- Deux essais randomisés évaluant l'acétate d'abiraterone associée à la suppression androgénique dans les cancers de la prostate métastatiques hormonosensibles : LATITUDE et STAMPEDE ;
- Trois essais randomisés évaluant les nouveaux anti-androgènes (Enzalutamide, Apalutamide) associés à la suppression androgénique dans les cancers de la prostate métastatiques hormonosensibles : ARCHES, ENZAMET, TITAN.

En cas d'échec de ces traitements, les options sont plus limitées et la mortalité reste élevée. Cependant chez les patients présentant un CRPC, l'apport des nouvelles thérapies ont émergé avec l'arrivée de la RIV par ligands du PSMA marqué avec du lutétium 177, ¹⁷⁷Lu, qui est présentée par les récentes publications comme une alternative thérapeutique intéressante en 3^{ème} ligne de traitement anti-androgènes de seconde génération et chimiothérapie par taxane. Plusieurs essais cliniques sont également en cours pour évaluer l'utilisation du [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 en association avec une immunothérapie (comme dans l'étude PRINCE ou EVOLUTION), un inhibiteur de PARP (dans l'étude LuPARP), ou à des stades plus précoces de la maladie.

III. RIADOTHERAPIE INTERNE VECTORISEE AU PSMA

Parmi l'arsenal thérapeutique pour les formes les plus avancées, la RIV constitue une véritable stratégie innovante dont le mécanisme d'action diffère des autres classes thérapeutiques telles que les chimiothérapies ou les hormonothérapies de nouvelle génération. La RIV s'inscrit dans une démarche dite théranostique combinant l'imagerie diagnostique et la thérapie pour une médecine la plus personnalisée possible.

Dans cette partie, plusieurs concepts essentiels seront abordés, notamment le principe de la RIV et l'utilisation de divers types de radionucléides, chacun présentant ses propres caractéristiques de rayonnement comme la nature de leurs émissions (α , β ou γ) et leurs effets biologiques associés. Le rôle clé du ciblage du PSMA sera également mis en lumière avant d'explorer en détail l'imagerie TEP, essentielle dans l'approche théranostique. Enfin les enjeux cliniques associés à cette approche seront abordés notamment les bénéfices potentiels en termes de personnalisation et d'amélioration des traitements ainsi que les limites de cette méthode, telles que la variabilité dans la réponse des patients et les défis liés à l'accessibilité des traitements et des technologies d'imagerie.

III.1 PRINCIPE

En RIV, un médicament radiopharmaceutique (MRP) est administré aux patients par différentes voies possibles : orale, loco-régionale, artérielle ou injection intra-tumorale et majoritairement par voie i.v. et va cibler de façon spécifique les caractéristiques de surface des cellules cancéreuses afin de s'y fixer. Ces MRP se composent principalement de deux éléments (**Figure 13**) : un vecteur et un radionucléide. Ce vecteur, pouvant être de différente nature (par un anticorps, un ligand naturel ou synthétique, protéine, agoniste), est lié à un chélateur permettant son couplage au radionucléide, émetteurs de rayonnements β^+ ou γ à visée diagnostique ou émetteurs β^- ou γ ou α à visée thérapeutique. Dans certains cas, le radioisotope constitue à lui seul l'agent radiopharmaceutique (Maluf et al. 2021).

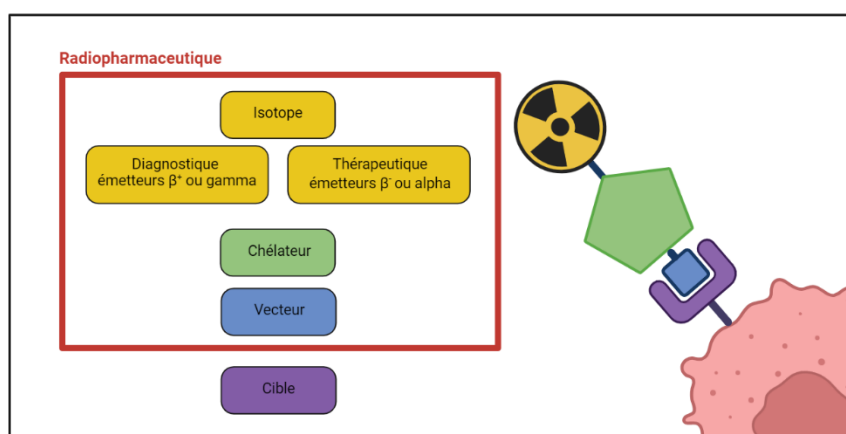


Figure 13 : Composition d'un médicament radiopharmaceutique (Anne-Laure Giraudet 2018).

Dans le cas de la thérapie, ces rayonnements ionisants, capables d'arracher des électrons à des atomes et molécules, vont initier des dégâts irréversibles au niveau de l'ADN par l'activation de différentes voies au niveau des cellules tumorales menant à leur mort cellulaire.

La RIV est un traitement systémique qui délivre une irradiation continue sur une période prolongée, à très faible débit de dose (Petitprin 2024). Son succès et, par conséquent son efficacité thérapeutique anti-tumorale, est conditionné par la sélection du radiopharmaceutique, elle-même déterminée par les caractéristiques physiques du radionucléide (par exemple la période, le type d'émission, l'énergie) et les caractéristiques biologiques du vecteur (par exemple la biodistribution, la cinétique d'élimination).

La sélection du radionucléide doit être minutieuse et dépend des fonctions des caractéristiques biologiques de la tumeur telles que sa taille ou son type. En ce qui concerne les radionucléides utilisés en médecine et en recherche biologique, ils diffèrent selon le type de rayonnements qu'ils émettent permettant de délivrer directement une dose locale ou indirectement par effet « bystander » (effet de voisinage des cellules irradiées sur les cellules non irradiées) ou « crossfire » (cellules tumorales voisines qui n'expriment pas les molécules ciblées sont aussi exposées au rayonnement) (Zukotynski et al. 2016).

III.2 DIFFERENTS TYPES DE RADIONUCLEIDES

III.2.1 Caractéristiques des rayonnements ionisants

Ces rayonnements peuvent être classés en trois catégories (**Figure 14**) : les particules (α), les électrons (Auger, β) et les photons (rayons X, γ) (Sgouros et al. 2020). Ils sont définis par des paramètres physiques et biologiques (**Tableau 1**) qui doivent être pris en considération tels que la longueur de leur trajet, le transfert d'énergie linéaire (TEL) ou encore l'efficacité biologique relative (EBR).

Le TEL correspond à la quantité d'énergie transférée par les rayonnements ionisants lors du trajet parcouru vers la cible. Il dépend de la nature de la radiation, de son énergie et du milieu traversé. Il est d'autant plus grand que l'énergie de radiation est plus faible. L'efficacité biologique relative permet de prédire les effets biologiques d'un rayonnement d'intérêt par rapport à un rayonnement de référence. Elle est directement proportionnelle au TEL. En effet, plus le rayonnement est ionisant, plus les ionisations seront concentrées et plus l'effet sur le tissu irradié sera important. De même, plus la gamme d'énergie d'émission est longue, c'est-à-dire la plage de pénétration dans les tissus, plus le périmètre de la zone de tissu irradié est grand (Damiana et Dalm 2021; Stokke, Kvasheim, et Blakkisrud 2022; Zukotynski et al. 2016).

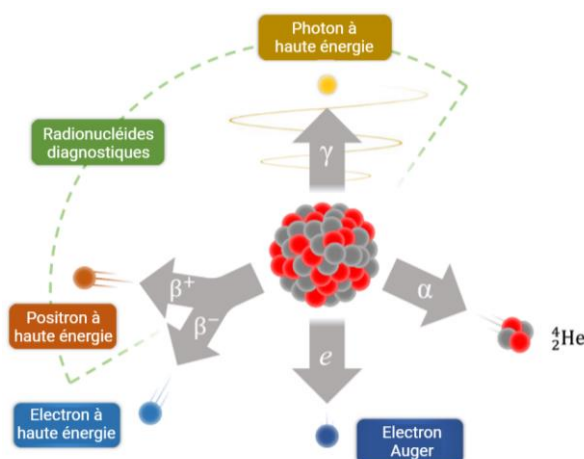


Figure 14 : Schéma des types de désintégration des radionucléides et des différents types de rayonnements utilisés en clinique. Les particules α sont constituées de deux protons et de deux neutrons, avec une structure similaire à celle d'un noyau de ${}^4\text{He}$ sans les électrons qui l'entourent. Les radio-isotopes émetteurs de β sont des électrons chargés négativement qui sont émis par un atome radioactif en raison du processus de désintégration β . Lors de la désintégration β , dans un noyau instable, un neutron est converti en proton, et ce processus crée un électron énergétique (particule β) (extraite et traduite de Peltek et al. 2019).

Tableau 1 : Caractéristiques physiques et biologiques des particules α , β et des électrons Auger (Navalkissoor et Grossman 2018; Peltek et al. 2019 ; Salih et al. 2022).

Type d'émission	α	β	Auger
Type de rayonnement	Noyau d'Helium (2 neutrons et 2 protons)	Electron	Electron
Energie particule/ Energie d'émission	5 – 9 MeV	50 – 2300 keV	25 – 80 keV
Trajet parcouru	50 – 100 μm	0,05 – 12 mm	2 – 500 nm
Oxygénation	Efficace dans les tumeurs hypoxiques	Moins efficace dans les tumeurs hypoxiques	Efficace dans les tumeurs hypoxiques
Energie de transfert linéaire	80- 100 keV/ μm	Autour de 0.2 keV/ μm	4 - 26 keV/ μm
Toxicité	Effective en créant des cassures doubles brins d'ADN	Débits de dose élevés (taux de survie des tumeurs proches de l'exponentielle linéaire). Faibles débits de dose (cassures simple brin), réparables avec l'inversion de la courbe dose-réponse.	Création potentielle de cassures double-brin de l'ADN et de la membrane cellulaire
Effet bystander	Oui	Oui	Oui
Effet cross-fire	Faible	Oui	Oui
Taille de tumeurs	Micro/petite	Tumeur solide de plus grand volume	Micro

Les particules α sont caractérisées par un transfert d'énergie linéaire élevé et une faible distance de déplacement dans les tissus, capables de produire une cytotoxicité beaucoup plus sélective et localisée épargnant les tissus sains. Elles sont généralement employées pour le traitement des petites tumeurs, des micrométastases et des tumeurs malignes du sang ou de la moelle osseuse, maladie résiduelle après chirurgie.

Les électrons Auger possèdent une portée de déplacement subcellulaire et un TEL beaucoup plus faible que les particules α , adaptés au ciblage et à l'éradication de cellules uniques, groupe de cellules cancéreuses ou de petites tumeurs (Kleinendorst et al. 2022).

Les particules β sont soit des positrons (β^+) chargés positivement utilisés à des fins de diagnostic, soit des électrons chargés négativement (β^-) utilisés à des fins thérapeutiques.

Les particules β^- sont considérées comme idéales pour le traitement des tumeurs volumineuses et hétérogènes en raison de leur capacité à parcourir jusqu'à quelques millimètres à travers les tissus.

Les photons (particules composantes de la lumière) se présentent sous deux formes : les rayons X et les rayons γ . Les rayons X, très pénétrants sont utilisés en radiothérapie et en imagerie. Les rayons γ sont également plus pénétrants que les autres types de rayonnements mais sont moins ionisants, entraînant moins d'effets biologiques et sont ainsi utilisables pour l'imagerie diagnostique.

III.2.2 Effets biologiques

Les effets biologiques causés par l'interaction des rayonnements ionisants avec la matière jouent un rôle crucial dans la RIV et le traitement des tumeurs. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents se concentrent sur l'ADN, la génération de ROS, l'hypoxie et enfin l'effet bystander.

III.2.2.1 Effets sur l'ADN

L'ADN peut être endommagé par deux mécanismes différents : un effet direct, qui induit une ionisation directe des molécules d'ADN, et un effet indirect, médié par la radiolyse de l'eau, générant plusieurs ROS. Ce dernier mécanisme sera détaillé dans la section suivante (Pouget, Georgakilas, et Ravanat 2018).

Lors de l'ionisation directe, l'énergie déposée par les rayonnements au niveau du noyau de la cellule tumorale entraîne des modifications moléculaires dans la cellule cible, qui peuvent entraîner la mort de la cellule. Les dommages causés à l'ADN par les rayonnements sont variés : cassures simple brin, cassures double brin et sites d'ADN endommagés à plusieurs reprises. Les rayonnements qui provoquent des cassures double brin ou des sites endommagés multiples ont moins de chances d'être réparés.

En général, les rayonnements à haut TEL provoquent des lésions cellulaires plus graves et moins réparables que les rayonnements à faible TEL (**Figure 15**) : les particules α créent une forte densité d'ionisation, ce qui provoque un grand nombre de cassures double brin par rapport aux particules β qui ont une densité d'ionisation plus faible. L'importance des cassures double brin rend la réparation de

l'ADN plus difficile et donc moins efficace. Les rayonnements à haut niveau d'énergie ont également des effets indirects sur les tumeurs en rendant les dommages cellulaires moins susceptibles d'être réparés. Il s'agit notamment d'une augmentation du temps de division cellulaire, relativement indépendante de la phase du cycle cellulaire, et d'une réduction des mécanismes enzymatiques de réparation (Navalkissoor et Grossman 2018; Ruigrok et al. 2019).

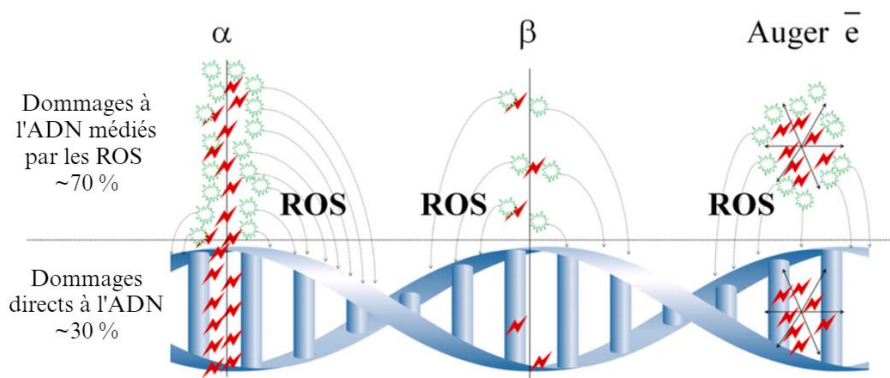


Figure 15 : Représentation de la densité d'ionisation des particules α -, β et des électrons Auger. Les particules α sont considérées comme des rayonnements densément ionisants, les particules β sont faiblement ionisantes et les électrons Auger forment des amas avec une forte densité d'ionisation (extraite et traduite de Gudkov et al. 2015).

III.2.2.2 Effet des ROS

Après irradiation, les molécules d'eau excitées peuvent se dissocier pour générer des radicaux libres ($HO^\bullet$, $H^\bullet$) et électrons libres qui sont les principales sources de dommages tissulaires causés majoritairement par le radical hydroxyle ($HO^\bullet$) (Stokke, Kvassheim, et Blakkisrud 2022). Ces radicaux libres et ces électrons peuvent également réagir avec d'autres molécules d'eau et d'oxygène et générer des radicaux libres secondaires très réactifs, tels que du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) (Kawamura, Qi, et Kobayashi 2018; J. Wei et al. 2019). Ces derniers vont également réagir avec des constituants cellulaires endogènes dont l'ADN et induire un stress oxydatif. Produit de manière endogène, le niveau de ROS induit par radiation peut dépasser leur propre niveau d'antioxydants, la mort des cellules tumorales se produit de diverses manières, notamment par apoptose, autophagie, ferroptose et le biais de différents mécanismes de régulation (J. Wei et al. 2019; Zheng et al. 2023).

III.2.2.3 Effets sur l'hypoxie

L'oxygène joue un rôle important dans les effets biologiques du traitement par la formation de radicaux libres, qui peuvent bloquer les altérations chimiques réparables. Ainsi, l'hypoxie est susceptible d'atténuer les effets des rayonnements ionisants, et le degré d'oxygénation des tumeurs peut avoir un impact important sur leur radiosensibilité. L'effet de l'hypoxie est important pour les rayonnements à faible TEL (c'est-à-dire les émetteurs β), mais minime pour les rayonnements à TEL élevé. La raison pour laquelle le rayonnement à haut TEL est plus résistant aux effets hypoxiques est qu'il produit des

ROS, ce qui renforce les effets cytotoxiques dans les cellules hypoxiques (Gudkov et al. 2015; Navalkissoor et Grossman 2018).

III.2.2.4 Effet bystander

Selon le Comité scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants (UNSCEAR), l'effet bystander est défini comme un effet radiobiologique qui se transmet des cellules irradiées aux cellules voisines non irradiées (Daguenet et al. 2020). Ces cellules subissent un effet de proximité qui est un effet indirect qui se produit en réponse à une lésion induite par radiation (Daguenet et al. 2020; Marín et al. 2014). En général, l'effet de proximité imite les effets directs des rayonnements, notamment une fréquence accrue d'apoptose, des lésions et mutations de brins d'ADN, une modification de l'expression génétique, des niveaux ou de l'activité des protéines et enzymes régulatrices, une réduction de la survie clonogénique. Les cellules de proximité répondent aux signaux transmis directement par communication intercellulaire via les jonctions lacunaires et par des facteurs libérés dans le milieu de croissance tels que les cytokines et les chimiokines. Ces dernières sont identifiées comme de nouveaux médiateurs de communication systémique entre les cellules ou les tissus irradiés et non irradiés (D. Brady, O'Sullivan, et Prise 2013; Marín et al. 2014).

III.2.3 Les radionucléides diagnostiques et thérapeutiques

A l'heure actuelle, la majorité des radionucléides utilisés (**Tableau 2**) pour les radiopharmaceutiques de diagnostic (RPD) sont émetteurs γ ou β^+ et possèdent une vie courte (^{99m}Tc , ^{68}Ga et ^{123}I). Ceux utilisés pour les radiopharmaceutiques thérapeutiques (RPT) sont émetteurs β^- ou α , à demi-vie moyenne (^{67}Ga , ^{177}Lu , ^{90}Y et ^{131}I). L'utilisation de radionucléides contenant des très longues demi-vies en recherche clinique est courante pour la détermination des paramètres d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination des nouveaux systèmes d'administration de médicaments (Damiana et Dalm 2021; Salih et al. 2022; Stokke, Kvassheim, et Blakkisrud 2022).

La demi-vie physique d'un radionucléide correspond au temps nécessaire pour que la moitié des atomes radioactifs d'un radionucléide se désintègrent et restreint l'administration du RP. En outre, une longue demi-vie physique limite la dose de rayonnement et les patients doivent être isolés plus longtemps pour éviter que les personnes environnantes soient exposées à ces doses de rayonnement. Si la demi-vie biologique est trop courte, le radionucléide sera éliminé avec une activité significativement élevée, ce qui entraînera une gestion importante des déchets radioactifs.

Tableau 2 : Caractéristiques physiques (type d'émission et temps de demi-vie) des radionucléides diagnostiques et thérapeutiques les plus utilisés en clinique (Siafaka et al. 2021 ; Stokke, Kvassheim, et Blakkisrud 2022)

Diagnostic			Thérapie		
Radionucléide	Type émission	Temps demi-vie	Radionucléide	Type émission	Temps demi-vie
Carbone-11	$\beta +$	20,4 minutes	Actinium-225	$\alpha, \beta -$	9,92 jours
Fluor-18	$\beta +$	109,8 min	Astate-211	α	7,20 h
Cuivre-64	$\beta +$	12,6 h	Bismuth-213	α	46 min
Gallium-68	$\beta +$	67,8 min	Plomb-212	$\alpha / \beta -$	10,64 h
Gallium-67	γ	3,3 jours	Iode-131	$\beta -$	8,02 jours
Zirconium-89	$\beta +$	78,4 h	Lutétium-177	$\beta -$	6,68 jours
Iode-124	$\beta + / \gamma$	4,2 jours	Rhénium-188	$\beta -$	16,98 h
Iode-123	γ	13,2 h	Yttrium-90	$\beta -$	2,67 jours
Lutétium-177	γ	6,64 jours	Indium-111	Auger	2,8 jours
Technétium-99m	$\beta +$	6h	Iode-125	Auger	59,49 jours
Indium-111	γ	2,8 jours	Radium-223	α	11,4 jours
Iode-131	γ	8,02 jours	Thorium-227	α	18,7 jours

Le choix du radionucléide utilisé se repose non seulement sur les propriétés physiques et chimiques (pureté du radionucléide par exemple) mais aussi sur sa production (mode, coût, disponibilité) et son comportement biologique relatif à l'utilisation (facilité de marquage à la molécule vectrice, fixation, activité spécifique, biodistribution, stabilité, toxicité, élimination). La demi-vie physique des radionucléides par rapport au temps de clairance de la demi-vie biologique du RP doit être prise en compte, en tenant compte à la fois de la pharmacocinétique *in vivo* du vecteur radiomarké, nécessaire à la localisation dans la cible et l'irradiation des tissus normaux. Idéalement, le radionucléide utilisé doit avoir une demi-vie 1,5 à 3 fois plus longue que le temps nécessaire à la molécule vectrice pour atteindre la valeur maximale du rapport tumeur/tissus normaux.

Ces molécules vectrices doivent répondre également à certains critères : avoir une affinité et une spécificité élevées pour la cible, ne pas être toxiques ou immunogènes, faciles à manipuler, être stables avant et après l'administration, être capables de se lier à une variété de radionucléides et elles doivent être facilement disponibles à faible coût (Gudkov et al. 2015; Poletto et al. 2022).

III.3 CIBLE THERAPEUTIQUE ACTUELLE : PSMA

Au cours des dernières années, un biomarqueur a suscité une attention particulière, à la fois sur le plan diagnostique et sur le plan thérapeutique de la maladie métastatique prostatique : l'antigène membranaire spécifique de la prostate. Son ciblage a permis d'améliorer la précision des diagnostics en affinant les techniques d'imagerie et d'optimiser l'efficacité des thérapies ciblées. Cette évolution représente une avancée importante dans la prise en charge du cancer de la prostate.

III.3.1 Structure

Le PSMA, connu sous le nom de glutamate carboxypeptidase II (GCPII) est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 84 kDa et de 750 acides aminés, codée par le gène FOLH1. Sa structure unique comporte trois parties distinctes (**Figure 16**) : une partie membranaire de 24 acides aminés, une queue cytoplasmique de 19 acides aminés et une région extracellulaire de 707 acides aminés, responsables de l'activité GCPII principalement impliquée dans deux processus métaboliques. Le PSMA est ainsi doté d'une activité catalytique qui stimule le glutamate (neurotransmetteur), expliquant son implication dans les maladies neurologiques et la régulation de l'absorption du folate alimentaire dans l'intestin (Zhang-Yin 2020).

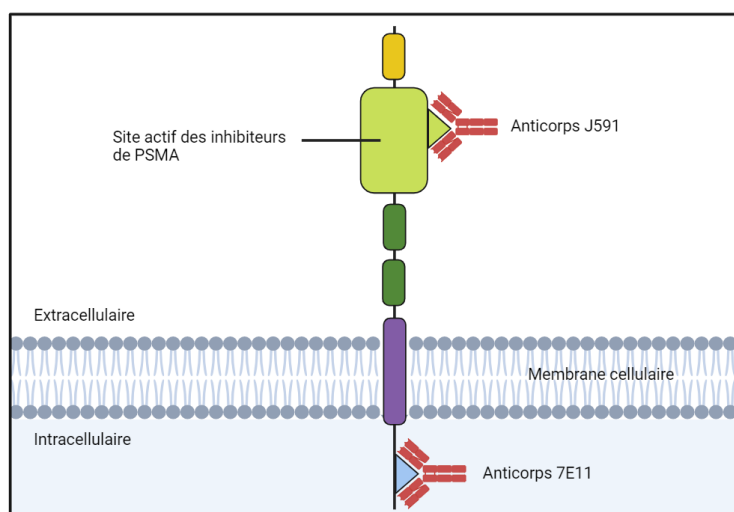


Figure 16 : Structure du PSMA. Le PSMA est constitué d'un court domaine intracellulaire contenant un site de liaison qui peut être ciblé par les anticorps 7E11, d'une région transmembranaire hydrophobe et d'une partie extracellulaire du PSMA qui se compose en 3 sections. La première section (vert foncé) contient deux domaines de fonction inconnue et des régions riches en proline et en glycine comme liens. La deuxième section (vert clair) est le grand domaine catalytique, qui contient un site de liaison pour les anticorps J591 ainsi que le site de reconnaissance du substrat actif qui est ciblé par les inhibiteurs du PSMA. La dernière section (orange) est le domaine de fonction inconnue dans lequel est localisé un domaine de dimérisation hélicoïdale. (Maurer et al. 2016)

Contrairement à son nom, le PSMA n'est pas spécifique à la prostate et est exprimé physiologiquement par plusieurs tissus (glandes salivaires, foie, reins, glandes lacrymales, muqueuse nasale, glandes salivaires, glotte, parties proximales de l'intestin grêle, dans certaines parties du côlon et bien d'autres),

et au niveau de l'épithélium prostatique humain où il est présent à un faible degré (Tateishi 2020).

Cette densité d'expression à la surface cellulaire augmente particulièrement dans 90-95% des cancers de la prostate, avec le niveau d'expression le plus élevé dans le cancer mCRPC, ce qui indique que l'expression du PSMA est corrélée à la progression de la maladie (Erra et Pradere 2019).

Le PSMA est également surexprimé dans l'endothélium néovasculaire de la plupart des tumeurs solides, y compris les cancers du poumon, du colon, du sein, du rein, des cellules transitionnelles et du pancréas, mais il n'est pas exprimé dans le système vasculaire normal (Van de Wiele et al. 2020).

Cependant ces sites d'expression du PSMA dans ces organes ne sont généralement pas exposés à la plupart des traceurs ciblant le PSMA qui ne traversent généralement pas la membrane basale et les jonctions serrées nécessaires pour accéder à ces sites d'expression du PSMA non prostatique.

Le PSMA peut être ciblé par différents agents moléculaires au niveau de son large domaine extracellulaire. Après liaison de ces derniers à sa partie extracellulaire, ils ne sont pas libérés dans la circulation sanguine mais internalisés grâce au domaine intracellulaire du PSMA par endocytose, pour être transportés dans les lysosomes ou libérés dans le cytoplasme. Cette internalisation offre la possibilité de piéger ces agents dans les cellules tumorales. L'ensemble de ces caractéristiques biologiques font du PSMA une cible idéale pour l'imagerie moléculaire et le traitement et ouvre la voie au développement de nouvelles molécules radiomarquées.

III.3.2 Ciblage du PSMA

La majorité des vecteurs ciblant le PSMA se divisent en deux types moléculaires : les anticorps et les petites molécules (peptides, ligands, inhibiteurs). Ils ont des caractéristiques physiques différentes qui influencent la façon dont les molécules circulent dans l'organisme.

III.3.2.1 Les Anticorps

Par sa nature protéique, le PSMA peut être reconnu comme un antigène (Couturier et al. 2023) et, par conséquent, a fait l'objet dans un premier temps d'un ciblage par des anticorps (**Tableau 3**). Ce sont des protéines (~150 kDa ; ~20 nm) composées de deux chaînes lourdes identiques (~50 kDa) et de deux chaînes légères (~25 kDa). Les chaînes lourdes et légères sont maintenues ensemble par des liaisons formant une structure en Y composée de domaines constants et de domaines variables. Les deux domaines variables sont hautement spécifiques de l'antigène cible et forment le fragment de liaison à l'antigène (Fab) (Czerwińska et al. 2020).

L'un des premiers anticorps développés ciblant le PSMA était le capromab (7E11-C5), anticorps monoclonal murin anti-PSMA se liant uniquement à la partie intracellulaire du PSMA dont l'inaccessibilité dans les cellules tumorales viables (Rousseau et al. 2017; Couturier et al. 2023; Gourni et Henriksen 2017) constitue un frein pour la détection du cancer de la prostate. Cette limitation a renforcé le développement d'anticorps de deuxième génération (J591, J533, J415, E99), spécifiques des

épitopes extracellulaires du PSMA humain. L'anticorps monoclonal humanisé J591 (El Fakiri et al. 2021 ; Holland et al. 2010) est présenté comme le candidat le plus prometteur, ayant été le plus radiomarqué avec des radionucléides pour l'imagerie TEP ou la thérapie (Couturier et al. 2023). Il a fait récemment l'objet de plusieurs essais cliniques dont une première étude de phase I, radiomarqué avec l'émetteur α ^{225}Ac et administré chez 32 patients atteints de mCRPC progressif réfractaire ou refusant les options de traitement standard afin d'évaluer la sécurité, l'efficacité et la dose maximale tolérée du médicament (Tagawa et al. 2024). Dans un autre essai de phase II, l'utilisation du J591 chez des patients atteints de cancer de la prostate métastatique a démontré des résultats prometteurs en termes de réponse tumorale et de tolérance au traitement (Tagawa et al. 2013). En parallèle, une étude a révélé des bénéfices en combinant le J591 avec la chimiothérapie (docétaxel) pour un stade avancé du cancer (Batra et al. 2020). Enfin, des recherches sur la survie des patients réfractaires ont confirmé l'impact positif du J591, suggérant une meilleure espérance de vie chez ceux recevant le traitement (Ślusarczyk et al. 2023).

Tableau 3 : Exemples d'anticorps ligands du PSMA. (Younes 2023)

Anticorps monoclonal	
Marqué au ^{89}Zr	$[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-7E11}$
	$[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-J591}$
Marqué au ^{64}Cu	$[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-3/A12}$
	$[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-3/F11}$
	$[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA-3/E7}$
Fragment d'anticorps	
Marqué au ^{89}Zr	$[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Cys-Db}$
Marqué au ^{111}In	$[\text{}^{111}\text{In}]\text{In-JVZ007-cys}$
Marqué au ^{99m}Tc	$[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-J591dia}$

Cependant, les principales limites de ces anticorps sont l'exposition élevée aux radiations en raison des longues demi-vies circulantes de 3 à 8 jours, la faible pénétration cellulaire, leur accumulation non spécifique sur les sites d'inflammation, ce qui signifie une biodisponibilité tumorale réduite et un faible rapport d'absorption « tumeur / tissu sain » (Parsi et al. 2021).

III.3.2.2 Les petites molécules

Afin de répondre à ces problématiques, les petites molécules ciblant le PSMA ont été développées. Elles sont de faible poids moléculaire (~ 1,4 kDa) divisées en trois catégories : les molécules à base d'urée, de phosphore et de thiol.

Les petites molécules à base d'urée sont plus largement utilisées en raison de leur plus grande affinité pour le PSMA que les deux autres (**Tableau 4**). Le ligand du PSMA à base d'urée se compose de trois éléments : un motif de liaison (le motif le plus utilisé est glutamate-urée-lysine [Glu-urée-Lys]), un agent liant appelé linker et un groupement radiomarqué (radionucléide + molécule chélatrice pour le radiomarquage ou groupe prosthétique pour les agents fluorés) (Parsi et al. 2021).

Tableau 4 : Exemples de ligands du PSMA à base d'urée (Younes 2023)

Marquage à ^{123}I	$[^{123}\text{I}]\text{I-MIP-1072}$
Marquage à ^{99m}Tc	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MIP-1404}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MIP-1405}$
	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-DUPA}$
	$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-PSMA-I\&S}$
Marquage à ^{68}Ga	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA}$
	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-THP-rhPSMA}$
	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-I\&T}$
Marquage à ^{18}F	$[^{18}\text{F}]\text{F-SFB}$
	$[^{18}\text{F}]\text{F-CTT-1298}$, $[^{18}\text{F}]\text{F-CTT-1057}$
	$[^{18}\text{F}]\text{F-DCFBC}$, $[^{18}\text{F}]\text{F-DCFPyL}$
	$[^{18}\text{F}]\text{F-YC-88}$
	$[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$, $[^{18}\text{F}]\text{F-rhPSMA-7.3}$
	$[^{18}\text{F}]\text{F-FSU-880}$

Les ligands du PSMA à base d'urée les plus couramment utilisés en imagerie et thérapie sont respectivement PSMA-11, PYIL, MIP-1404 et PSMA-617, PSMA I&T, MIP-1095. Ces trois derniers peuvent être marqués par différents radionucléides pour de l'imagerie.

Ces petites molécules présentent plusieurs avantages par rapport aux anticorps. Elles se caractérisent par un temps de circulation court de l'ordre de quelques heures, et par conséquent une élimination rapide du sang et des tissus non ciblés, ce qui se traduit par une faible activité de fond permettant une meilleure qualité d'image (Blandeau 2020).

Le radiotracer doit présenter plusieurs caractéristiques pour que son utilisation soit pertinente. Le marquage radiochimique entre l'isotope et le ligand ne doit pas modifier le site actif de la molécule par lequel s'effectuera la liaison avec la cible. Le traceur doit présenter à la fois une bonne affinité pour sa cible ainsi qu'une bonne spécificité. Les sites de fixation non spécifiques ne doivent pas être nombreux afin d'avoir un bon ratio signal/bruit. Le métabolisme du radiotracer ne doit pas être trop rapide pour permettre une bonne visualisation des sites de fixation. De plus, le radiotracer ne doit pas être toxique d'un point de vue biologique même s'il est injecté à très faible dose (dose traceuse, quelques μg en général).

Les découvertes sur le ciblage du PSMA ont stimulé le développement de nombreux ligands potentiels pour l'imagerie par TEMP, TEP et le traitement du cancer de la prostate.

III.4 APPROCHE THERANOSTIQUE

La RIV est une méthode théranostique dont le but est d'assurer une thérapie personnalisée de précision avec une prise en charge individualisée, où chaque patient reçoit un traitement adapté, optimal compte tenu des spécificités et des caractéristiques moléculaires de sa tumeur.

Un schéma thérapeutique est alors mis en place avec souvent l'utilisation de paires de radionucléides théranostique (RPD et RPT) partageant la même cible, appartenant au même élément ou à des éléments différents et ayant une chimie et une pharmacocinétique similaires (**Figure 17**). Un RPD est administré au patient et une imagerie moléculaire (TEP, TEMP) est réalisée. La fixation tumorale et l'accumulation du RPD dans les tissus aident à déterminer les éventuels effets indésirables et tumoricide du RPT, donnant ainsi la fenêtre thérapeutique. L'étude dosimétrique associée (estimation de la dose la plus élevée pour l'ensemble du corps et de la dose de rayonnement critique pour les tissus) permet de calculer une dose thérapeutique personnalisée limitant l'irradiation aux tissus sains. Enfin, un RPD post-thérapeutique permet d'évaluer la réponse au traitement ou encore de réaliser des bilans des récidives (Chhabra et Thakur 2022).

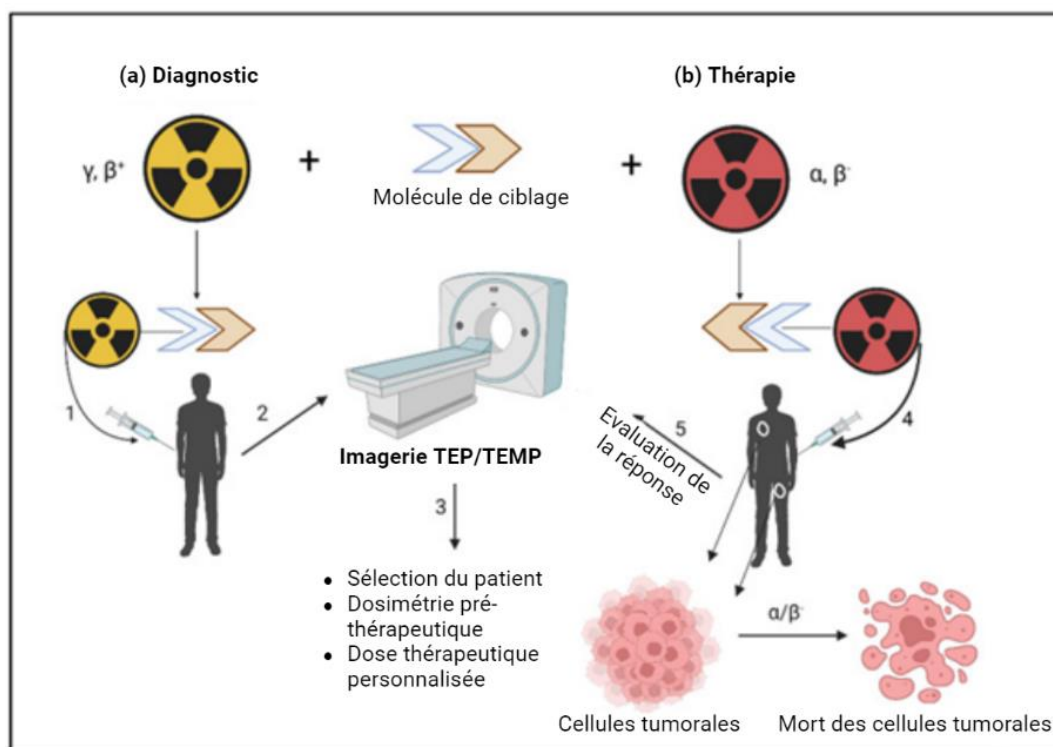


Figure 17 : Concept de pair RP diagnostic et thérapeutique. (1) Une fois le RP diagnostique injecté, (2) l'imagerie moléculaire est réalisée à l'aide de la TEP ou de la TEMP pour identifier les lésions. (3) Le patient est sélectionné en fonction des résultats du scanner et une dosimétrie pré-thérapeutique est effectuée pour calculer la dose thérapeutique personnalisée. (4) Pour la thérapie, la même molécule marquée par un radionucléide thérapeutique est injectée au patient. (5) Les particules α/β - permettent la mort des cellules tumorales et l'évaluation de la réponse se fait par imagerie moléculaire. (extraite et traduite de Chhabra et Thakur 2022)

III.4.1.1 Imagerie TEP

L'imagerie TEP offre la possibilité de visualiser et d'évaluer en temps réel de manière non invasive dans l'ensemble des tumeurs détectables du patient (tumeur primitive et métastases associées, y compris dans celles difficilement atteignables) la biodistribution des RP sans avoir besoin de biopsies répétées dont le résultat immunohistochimique (IHC) risque d'être biaisé par l'hétérogénéité inter et intra-tumorale. Bien que cette technique d'imagerie ne permette pas en revanche de discriminer les différents types cellulaires, elle vient compléter l'IHC dans l'évaluation de l'étendue et de l'activité de la maladie.

III.4.1.1.1 Principe de détection

L'imagerie TEP (**Figure 18**) est basée sur l'administration i.v. d'un RPD dont le radionucléide déficient en neutrons va se désintégrer pour atteindre un état stable en émettant un positron β^+ . Le positron émis parcourt une courte distance dans les tissus durant lequel le positron va perdre son énergie cinétique par diffusion ou collision électron-positron, ce dernier va ainsi interagir et s'annihiler avec un électron de la matière environnante et précisément du tissu tumoral. Ce phénomène d'annihilation induit l'émission simultanée de deux photons gamma γ de haute énergie de 511 keV colinéaires mais des sens diamétralement opposés (angle de 180°). Ces photons sont détectés par la caméra TEP constituée par une couronne de blocs de détecteurs, eux-mêmes constitués d'une multitude de cristaux scintillants.

Lorsque la détection des deux photons d'annihilation est simultanée ou dans une fenêtre temporelle de coïncidence courte (typiquement 1-10 ns), on parle d'événement de coïncidence vraie. Les photons sont considérés comme en coïncidence et issus de la même annihilation dont le lieu se situe sur la ligne de réponse (LOR) qui relie les deux détecteurs ayant détecté ces photons. Plus précisément, le parallélépipède reliant les deux éléments de détection est appelé tube de réponse (Soussan et al. 2011; Vaquero et Kinahan 2015).

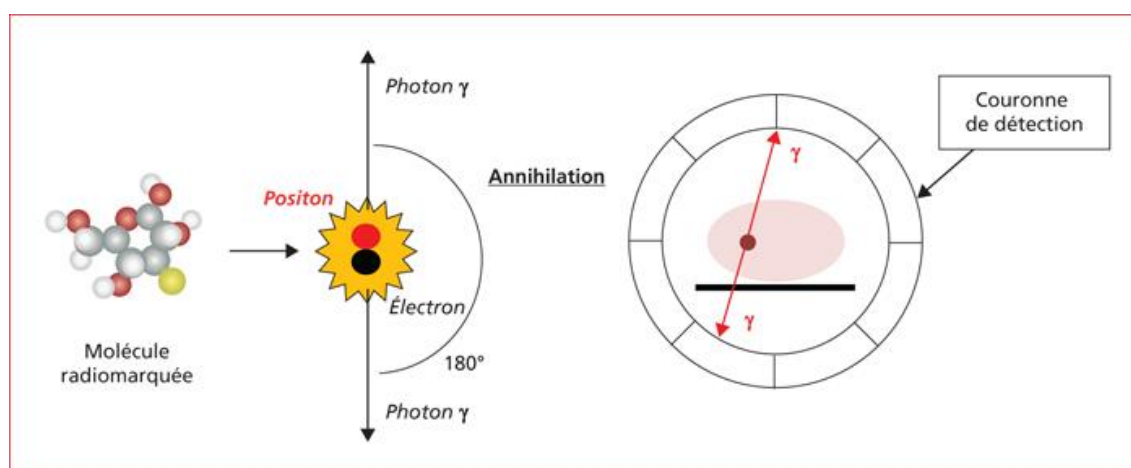


Figure 18 : Principe physique de la TEP. Suite à l'annihilation d'un positron et d'un électron de la matière, deux photons de 511 keV sont émis dans des directions opposées. Lorsque deux interactions sont détectées simultanément dans un anneau de détecteurs entourant le patient, on suppose qu'une annihilation s'est produite sur la LOR reliant les deux interactions. En enregistrant de nombreuses LOR, la distribution de l'activité peut être reconstruite par tomographie. (Lafforgue et al. 2019)

Il est possible de localiser via l'accumulation des lignes de coïncidence, la source de l'annihilation au sein du tissu et d'obtenir la distribution spatiale du RPD. Le nombre total d'événements de coïncidence vraie détectés par les deux éléments de détection sera supposé proportionnel à la quantité totale de radiotraceur contenue dans le tube de réponse. Connaissant le temps de vol (TOF), c'est-à-dire la différence du temps d'arrivée des deux photons détectés en coïncidence, il est possible d'améliorer le contraste et réduire le bruit de fond de l'image.

III.4.1.1.2 Reconstruction de l'imagerie TEP

Les algorithmes de reconstruction les plus souvent itératives (MLEM) permettent de construire une carte de la distribution d'activité tridimensionnelle du radiotraceur à partir des projections (de Dreuille et al. 2004).

Lors de cette procédure de reconstruction, des facteurs de correction des phénomènes physiques (diffusion Compton et atténuation des photons) et des caractéristiques de l'appareillage (événements aléatoires et résolution spatiale) sont appliqués (Kuntner et Stout 2014; Townsend 2004).

L'examen TEP est généralement couplé à un examen TDM, scanner ou IRM qui permet de visualiser les structures anatomiques et morphologiques grâce à l'utilisation de rayons X. La superposition de l'image TEP sur l'image TDM facilite ainsi la localisation anatomique du radiotraceur. L'acquisition TDM est également utilisée pour la correction d'atténuation des photons lors de la reconstruction des images TEP (Bouleau 2021).

Aujourd'hui, la résolution des images TEP obtenues en clinique est de l'ordre de 3 à 4 mm. Pour l'imagerie préclinique, elle est de l'ordre de 0,1 à 1,5 mm permise grâce au faible diamètre de l'anneau détecteur de ces caméras dédiées aux animaux mais également à des améliorations successives notamment la modification des détecteurs ou la numérisation (Soussan et al. 2011).

III.4.1.1.3 Analyse des images

Les protocoles d'acquisition peuvent être réalisés sous deux approches différentes (**Figure 19**) : en statique ou en dynamique (Morigi, Kovaleva, et Phan 2022).

L'imagerie TEP statique consiste à l'acquisition de données d'image sur une seule période de temps prédéfinie après l'injection du radiopharmaceutique afin d'évaluer à instant t la concentration volumique en activité associée au radiotraceur au sein des tissus.

Il existe ainsi plusieurs méthodes d'analyse quantitative dont deux couramment utilisées en TEP préclinique (Kuntner et Stout 2014).

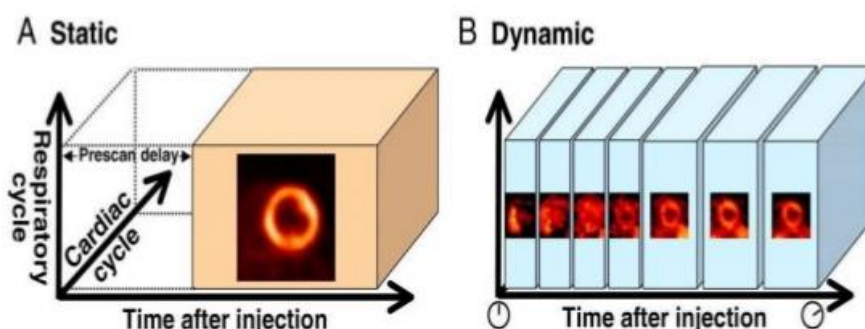


Figure 19 : Protocole d'acquisitions statiques et dynamiques. (A) Les images statiques sont reconstruites en additionnant toutes les informations après un délai après l'injection du traceur prédéfini. (B) Les séquences d'imagerie dynamique sont obtenues par échantillonnage temporel en série à différents moments après l'injection (Morigi, Kovaleva, et Phan 2022).

La première méthode permet donc de quantifier la concentration volumique en activité associée au radiotraceur dans les tissus d'intérêt. Elle correspond au rapport entre l'activité dans un tissu (exprimée en kBq/cc ou en mCi/cc) et l'activité corrigée de la décroissance injectée à l'animal (exprimée en kBq ou en mCi). Ce rapport est défini comme le pourcentage de dose injectée par centimètre cube (ou millilitre) de tissu (%ID.cm⁻³ ou %ID/mL). En supposant une densité de 1 g/cc dans le tissu et l'absorption est souvent définie en %ID/g (Bouleau 2021).

La deuxième méthode est le calcul du SUV (standardized uptake value) c'est-à-dire valeur d'absorption normalisée où l'absorption du traceur mesurée (et corrigée de la décroissance) en MBq/ml ou en %ID.cm⁻³ à partir de l'image TEP (Muzi et al. 2012) est normalisée par la quantité d'activité injectée et le volume de distribution ou du poids de l'animal (en g) (Beattie et al. 2022).

L'utilisation du SUV pose de nombreux problèmes, tels que la dépendance à l'égard de la composition corporelle (graisse vs. muscle), l'absorption variable du radiotraceur, les durées d'imagerie et la définition du volume d'intérêt (VOI). Souvent, une activité résiduelle substantielle peut être présente au site d'injection et n'est donc pas disponible pour la biodistribution, ce qui entraîne des inexactitudes dans la dose injectée et les valeurs de SUV (Kuntner et Stout 2014).

Plusieurs schémas de correction impliquant la glycémie, la surface corporelle (superficie du revêtement cutané d'une personne, calculée en fonction de sa taille et de son poids) et la masse maigre (poids total du corps moins celui de la masse grasse) ont été proposés dans des études cliniques pour tenter d'améliorer la précision de la méthode SUV et sont maintenant utilisés dans certains centres cliniques de TEP (de Dreuille et al. 2004). Ainsi le SUV reste le paramètre le plus utilisé pour l'analyse de la plupart des traceurs en oncologie et est de plus en plus utilisé dans les études cliniques, en plus des évaluations visuelles.

L'imagerie TEP dynamique implique la reconstruction en continue d'une série d'images statiques, chacune d'une durée prédéterminée, après l'injection. Contrairement à l'imagerie statique, elle permet d'évaluer des paramètres physiologiques notamment la cinétique d'absorption et de rétention du traceur (**Figure 20**) par l'extraction de courbes temps-activité (TAC) des volumes d'intérêt choisis (Muzi et al.

2012).

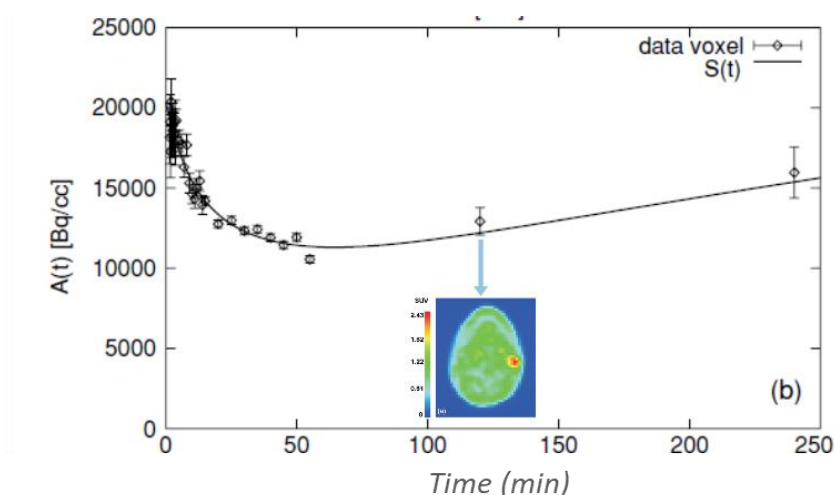


Figure 20 : Exemple de courbe temps-activité des concentrations (TAC) de radioactivité ((Bowen et al. 2011)

La cinétique d'un traceur peut être décrite par des constantes de vitesse du premier ordre (de Dreuille et al. 2004) dans un modèle compartimental basé sur l'hypothèse d'un échange dans le temps entre les compartiments qui représentent soit une étape du métabolisme du traceur, soit à une étape de la fixation du traceur à une molécule (de Dreuille et al. 2004; Laporte, Cohalan, et Carrier 2023). Les modèles les plus couramment utilisés en TEP sont les modèles à 2 et 3 compartiments tissulaires. Un modèle bi-compartimental convient aux RP qui ne subissent pas d'autres étapes métaboliques tandis qu'un modèle tri-compartimental convient aux RP qui sont transportés et subissent ensuite une étape métabolique, comme le 18F-FDG (Dimitrakopoulou-Strauss, Pan, et Sachpekidis 2021).

Ce modèle implique un premier compartiment d'échange soit le compartiment plasmatique $C_p(t)$, correspondant à la fonction d'entrée c'est-à-dire, la concentration du traceur libre dans le plasma artériel ou la courbe sanguine en fonction du temps. Les deux compartiments suivants correspondent aux deux compartiments tissulaires ($C_1(t)$ et $C_2(t)$), représentant les concentrations de traceur lié de manière spécifique au récepteur. Les compartiments sont reliés par quatre constantes de cinétique: k_1 , k_2 qui sont les constantes de vitesse d'absorption et de clairance ainsi que les paramètres k_3 et k_4 qui décrivent l'échange entre les compartiments tissulaires C_1 et C_2 (Dimitrakopoulou-Strauss, Pan, et Sachpekidis 2021).

Ainsi l'évaluation des données TEP est généralement basée sur une évaluation visuelle ainsi que des mesures quantitatives avec la SUV ou des paramètres pharmacocinétiques du traceur guidant le diagnostic oncologique et le choix de la thérapie.

III.5 ENJEUX CLINIQUES ACTUELS & PERSPECTIVES

L'imagerie par TEP-TDM aux ligands du PSMA est devenue une norme en France en routine clinique pour la prise en charge des cancers prostatiques métastatiques résistant à la castration. En effet, les recommandations actuelles des sociétés savantes (AFU, EAU, EANM, ESTRO...) soulignent le caractère indispensable de la réalisation d'une TEP-PSMA en cas de récurrence biologique des cancers de la prostate après traitement local mais surtout dans l'évaluation de l'éligibilité à un traitement par RIV (Calais 2023; Chanchou et Robin 2023; Hennrich et Eder 2021; Stokke, Kvassheim, et Blakkisrud 2022).

III.5.1 Imagerie TEP-PSMA

III.5.1.1 Historique des radiopharmaceutiques approuvés sur le marché

En 2016, le premier essai clinique sur l'imagerie TEP à base de [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 a vu le jour aux Etats-Unis en cas de récurrence biochimique du cancer de la prostate après traitement initial. Ce n'est qu'à partir du 1^{er} décembre 2020, près de 10 ans après sa découverte, que le [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 a été approuvé par la FDA en tant que premier produit radiopharmaceutique marqué au ^{68}Ga pour l'imagerie TEP du cancer de la prostate PSMA-positif. La demande d'AMM (NDA : New Drug Application) a été ainsi accordée au Biomedical Cyclotron Facility de l'Université de Californie à Los Angeles (UCLA) et le Radiopharmaceutical Facility de l'Université de Californie à San Francisco (UCSF) (Calais 2023).

Il faudra attendre l'année suivante pour que la FDA approuve le [^{18}F]F-DCFPyL ou [^{18}F]F-piflufolastat (Pylarify[®], Progenics Pharmaceuticals), deuxième radiopharmaceutique ciblant le PSMA en TEP.

Tout comme le [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, le Pylarify est indiqué pour les patients présentant une suspicion de métastase du cancer de la prostate potentiellement guérissables par la chirurgie ou un autre traitement et chez les patients soupçonnés de récurrence du cancer de la prostate en raison d'un taux élevé de PSA dans le sang.

Après l'approbation de ces deux RPD, la FDA a donné son feu vert à un troisième RPD le 25 mai 2023 : le [^{18}F]F-rhPSMA-7.3 ou [^{18}F]F-flotufolastat (POSLUMA[®], Blue Earth Diagnostics). Ce dernier est indiqué aux États-Unis dans la prise en charge de patients suspectés de métastases ou de récurrence.

III.5.1.2 Ligands du PSMA disponibles en France

En France, le paysage des radiopharmaceutiques ciblant le PSMA est en constante évolution. A ce jour, de nombreux ligands du PSMA marqués au Gallium-68 (^{68}Ga) ou au Fluor-18 (^{18}F) sont désormais disponibles. Trois d'entre eux, actuellement utilisés en routine clinique, se démarquent au sein de la littérature et des recommandations des Sociétés savantes : le [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, le [^{18}F]F-DCFPyl et le [^{18}F]F-PSMA-1007 (Chanchou et Robin 2023). Le [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, présentant une affinité élevée pour le PSMA, s'accumule rapidement dans les tumeurs et est utilisé pour la détection précoce des cancers de la prostate. En revanche, le [^{18}F]F-PSMA-1007 offre une biodistribution plus homogène, une

excrétion plus lente, et est privilégié pour sa qualité d'image supérieure et son évaluation précise des métastases.

- **PSMA radiomarqués au ^{68}Ga**

En France, le [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 n'a pas d'AMM actuellement mais dispose d'une Autorisation d'Accès Compassionnel (AAC) depuis janvier 2022 dans diverses indications chez des patients porteurs du cancer de la prostate. D'autres ligands du PSMA marqués au ^{68}Ga sont également décrits, comme le PSMA-617 ou le PSMA I&T. Le PSMA-11 reste cependant le ligand du PSMA marqué au ^{68}Ga le plus étudié dans la littérature et en France (Stokke, Kvassheim, et Blakkisrud 2022).

Néanmoins, le développement des ligands [^{68}Ga]Ga-PSMA est limité par la nécessité de posséder un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ onéreux à durée de vie limitée au sein d'un laboratoire de synthèse dédié avec une autorisation de dispensation selon les bonnes pratiques de fabrication. Ces générateurs ont un faible rendement (quantité de PSMA radiomarké au ^{68}Ga dépendante de l'activité élue par le générateur) et sont commercialement peu intéressants (coût de production avec le cyclotron, élution du générateur, le ligand, les consommables et la dispensation, les réactifs, l'entretien, et l'élimination des déchets radioactifs). La TEP-PSMA est en attente de kit commercialisé de ligands du PSMA pour le marquage au ^{68}Ga (Brenot-Rossi 2019).

- **PSMA radiomarqués au ^{18}F**

Au fil des années, les traceurs radiomarqués au ^{18}F ont été synthétisés et évalués par rapport au [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 en termes de performance diagnostique et de coût de production, notamment le [^{18}F]PSMA-1007 (Evangelista et al. 2022; Huang et al. 2023). Ce dernier (RADELUMIN®, ABX Advanced Biochemical Compounds) est commercialisé depuis décembre 2022 (disponible en accès précoce en France de mai 2021 à décembre 2022), pour le moment uniquement en France chez les patients en récurrence biologique d'un cancer de la prostate mais possède une AMM dans la stadification initiale et la récurrence biologique dans 5 pays (France, Pays-Bas, Autriche, Belgique, Espagne et Grèce) (HAS - Autorisation d'accès précoce octroyée à la spécialité RADELUMIN 2022). Le ^{18}F est théoriquement capable d'offrir une meilleure résolution spatiale des images TEP-TDM en raison de l'énergie d'émission de son positon et de sa demi-vie plus longue. Le [^{18}F]PSMA-1007 est fabriqué par cyclotron dans des sites industriels et peut être livré vers des sites environnants qui ne disposent pas d'installation de cyclotron.

Cependant, contrairement au [^{18}F]F-PSMA-1007, la production du [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 est indépendante de l'industrie pharmaceutique. Lorsqu'il est disponible, il offre une facilité d'accès permettant une exposition plus faible aux rayonnements en raison de sa demi-vie plus courte.

III.5.1.3 Recommandations actuelles

Actuellement en France, la réalisation d'une TEP-PSMA est recommandée (**Tableau 5**) :

- Chez les patients en récurrence biologique d'un cancer de la prostate traité initialement de façon radicale pour lesquels les examens cliniques, biologiques et d'imagerie (obligatoirement une

TEP à la Choline ou [¹⁸F]F-Fluciclovine) sont négatifs ou discordants.

La Choline est un précurseur de la biosynthèse des phospholipides, composants essentiels des membranes cellulaires. Sa captation est augmentée dans les cellules du cancer prostatique du fait de l'augmentation de leur métabolisme lipidique. En France, la [¹⁸F]F-Choline (FCH) dispose d'une AMM depuis 2010, initialement pour la recherche de métastases osseuses de cancer de la prostate puis pour le bilan de la récurrence biologique après un traitement radical.

La Fluciclovine, est un acide aminé de synthèse analogue de la leucine internalisé dans les cellules, avec une activité accrue dans les cellules du cancer de la prostate. Elle dispose également d'une AMM en France depuis 2018 dans le bilan de la récurrence biologique et présente des performances diagnostiques globalement similaires à la FCH.

- Dans le cadre de l'Autorisation d'Accès Précoce (AAP) au traitement RIV par [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 après un bilan d'extension comportant une TEP à la FCH.

La réalisation d'une TEP-PSMA est systématique dans l'immense majorité des cas, une TEP PSMA-Ga, telle que prévue par l'AMM du radiopharmaceutique. Parfois une TEP PSMA-F est réalisée s'il existe une difficulté d'accès à la synthèse du gallium (mais sans AMM pré-thérapeutique). Ainsi le choix du radiopharmaceutique dépend de la disponibilité des traceurs, avec l'avantage de la production et distribution industrielle pour ceux marqués au ¹⁸F et de la flexibilité de la synthèse locale pour les traceurs marqués au ⁶⁸Ga (A. -L. Giraudet et al. 2024).

A noter que la TEP Choline était obligatoire en vue de l'obtention d'une TEP-PSMA, ce n'est que plus tard que cette obligation a été levée (A. -L. Giraudet et al. 2024).

Tableau 5 : Recommandations pour la réalisation d'examens d'imagerie des cancers prostatiques en récurrence biochimique

Recommandations	Après prostatectomie radicale	Après radiothérapie externe
EAU Conférence de Consensus 2022	Haut risque, TD < 1 an, si PSA > 0,2 ng/mL : TEP-PSMA Patients pN0M0 et absence de négativation 4-8 semaines après PR : TEP-PSMA	TEP-PSMA, quel que soit le niveau de risque ou le délai de récurrence
Consensus EAU/EANM avril 2022	TEP-PSMA	TEP-PSMA
AFY 2022-2024	PSA < 1 ng/mL : pas d'imagerie ou TEP-PSMA PSA > 1 ng/mL : ¹⁸ F-choline ou TEP-PSMA	[¹⁸ F]F-choline ou TEP-PSMA IRM en cas de suspicion de récurrence locale isolée accessible à un traitement de rattrapage
Consensus ESTRO-ACROP 2022	TEP-PSMA	TEP-PSMA

Les ligands du PSMA sont ainsi voués à supplanter la FCH dans presque tous les stades de la prise en charge des cancers de la prostate en médecine nucléaire (Gauthé 2024; Metz 2023).

III.5.2 RIV au [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Le bilan pré-décisionnel vu précédemment, basé sur les paramètres biologiques et radiologiques classiques, PSA, scintigraphie osseuse puis sur la TEP-PSMA, permet de guider la prise de décision thérapeutique.

Ces dernières années, la RIV via les ligands du PSMA marqués avec du ^{177}Lu a ouvert des nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients atteints d'un CRPC. Elle est caractérisée par l'utilisation du ^{177}Lu , un radio-isotope émetteur β qui a une énergie moyenne de 133,6 keV, avec une profondeur de pénétration maximale < 2 mm et une demi-vie de 6,7 jours. En raison de ses propriétés physiques et de la faisabilité d'une évaluation scintigraphique après traitement, le [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 est devenu l'un des radiopharmaceutiques les plus étudiés à ce jour.

III.5.2.1 Evolution et essais cliniques actuelles

Depuis 2015, le nombre d'études cliniques (**Figure 21**) ne cesse de croître faisant état de résultats très encourageants en termes d'efficacité, de tolérance et de bénéfice de la qualité de vie chez les patients (Hofman et al. 2021 ; Morris et al. 2021 ; Sartor, de Bono, et al. 2021 ; H. Zhang et al. 2021).

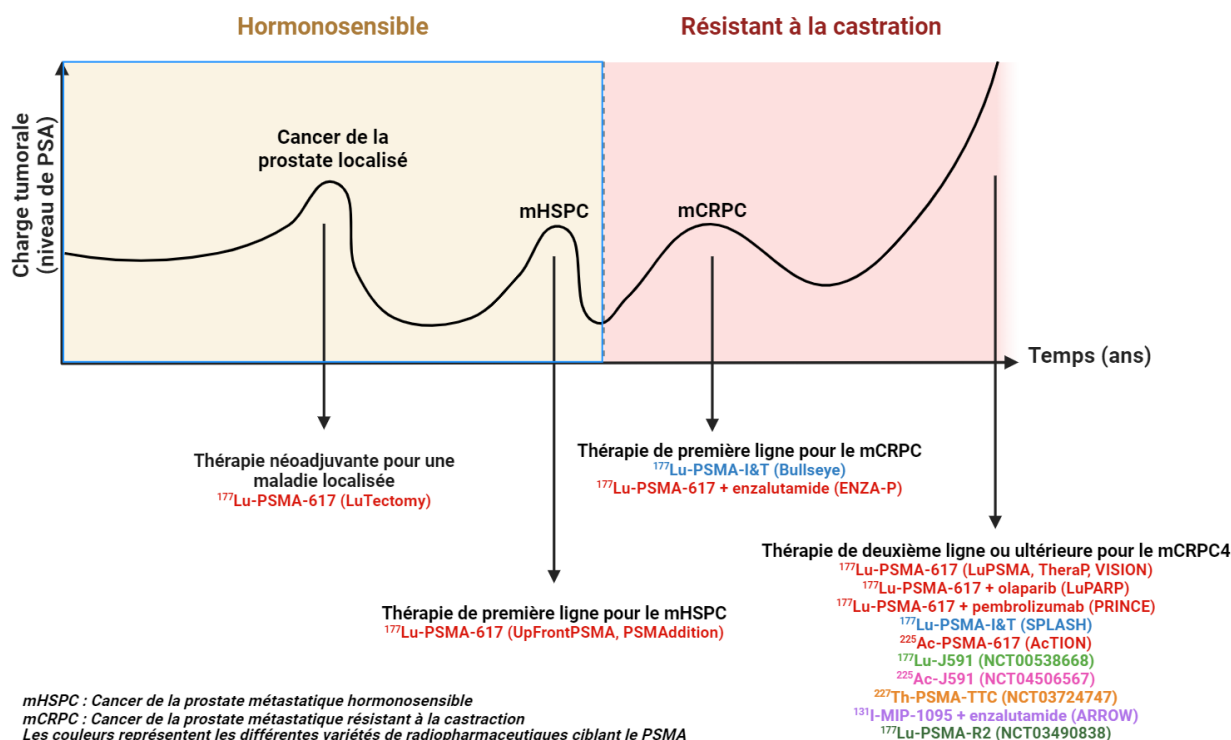


Figure 21 : Aperçu schématique des essais cliniques théranostiques PSMA sélectionnés en juin 2021 (traduite de H. Zhang et al. 2021)

La place de la RIV au [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 dans la prise en charge thérapeutique du cancer de la prostate métastatique a été marquée par 3 essais principaux : l'étude LuPSMA, TheraP et l'étude VISION.

- Etude LuPSMA

Cette étude clinique pionnière a été menée au Peter MacCallum Cancer Center de Melbourne sur des patients atteints de mCRPC lourdement prétraités (chimiothérapie à base de Taxanes et hormonothérapie de nouvelle génération). Dans cet essai prospectif de phase 2 à un seul bras, les patients ont reçu jusqu'à 4 cycles de [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 à 6 semaines d'intervalle. Le critère d'évaluation principal de l'étude était la réponse du PSA (définie comme une diminution de plus de 50 % par rapport aux valeurs initiales selon les critères du Prostate Cancer Clinical Trial Work Group) ainsi que la toxicité. Aucun décès n'a été enregistré suite au traitement, une baisse du PSA > 50% a été observée chez 57% des patients avec une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale de 7,6 mois et 13,5 mois, respectivement (Chandran, Figg, et Madan 2024; H. Zhang et al. 2021).

- Etude TheraP

Il s'agit d'un essai clinique randomisé de phase 2 mené par l'Australian and New Zealand Urogenital and Prostate Cancer Trial Group (ANZUP) chez des patients atteints d'un mCRPC qui ont été prétraités par chimiothérapie docétaxel (en première intention), 90 % d'entre eux avaient reçu une nouvelle hormonothérapie. Le traitement au [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (6.0–8.5 GBq, administré toutes les six semaines pour un maximum de six cycles) a été comparé au traitement de chimiothérapie cabazitaxel (généralement utilisé en deuxième intention, administré toutes les trois semaines pour un maximum de 10 cycles). Le groupe [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 a obtenu un meilleur taux de réponse au PSA (réduction du PSA ≥ 50 %) de 66 % contre 37 % pour le cabazitaxel avec une survie sans progression supérieure, un profil de tolérance acceptable avec des effets secondaires moindres (Chandran, Figg, et Madan 2024; H. Zhang et al. 2021).

- Etude VISION

L'étude VISION est une étude randomisée de phase III menée auprès de patients atteints d'un mCRPC traités par au moins 1 inhibiteur de la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes et par taxane (1 ou 2). L'objectif était de comparer l'efficacité du [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 associé aux meilleurs soins de référence par rapport aux meilleurs soins de référence seuls. 831 patients ont été divisés en deux groupes : le groupe traité (581 patients) a reçu un traitement standard plus [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (7,4 GBq toutes les six semaines × six cycles) et le groupe témoin (280 patients) a reçu un traitement standard uniquement (groupe témoin). Cet essai s'est avéré positif sur ses 2 critères de jugement principaux avec une amélioration significative de la survie globale (15,3 mois contre 11,3 mois) et de la survie sans progression radiologique (9,7 mois contre 3,4 mois) en faveur du [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. Il s'agit de l'étude prospective la plus importante et la plus récente à ce jour portant sur le [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 dans le traitement du mCRPC (Chandran, Figg, et Madan 2024; Rohith 2021; H. Zhang et al. 2021).

Suite aux résultats de l'étude TheraP et particulièrement de l'étude VISION, la FDA a autorisé le lutétium ^{177}Lu vipivotide tétraxétan (^{177}Lu]Lu-PSMA-617, Novartis Pluvicto™) dans le cadre du traitement du mCRPC, progressif et positif pour le PSMA. Depuis Août 2022, en France, le ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 dispose d'une AAP dans l'indication « traitement des adultes atteints d'un cancer de la prostate progressif, métastatique, résistant à la castration, exprimant des récepteurs au PSMA et qui ont été traités par une chimiothérapie par taxane (pour les patients éligibles) et au moins une hormonothérapie dite de seconde génération ».

Plusieurs essais thérapeutiques évaluant l'utilisation du ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 sont en cours à un stade plus précoce de la maladie (PSMAfore) ou en combinaison avec d'autres thérapies comme l'Olaparib (LuPARP) ou le Nivolumab (EVOLUTION) (Auberger 2022).

Dans l'attente de la démocratisation et de la mise en place d'un parcours de soins de l'utilisation du Pluvicto, d'autres thérapies existent notamment le radium ^{223}Ra (Xovigo, radiopharmaceutique émetteur α), présent sur le marché européen depuis 2013. Ce traitement a démontré son efficacité dans le cas des cancers de la prostate avec métastases osseuses, en réduisant les douleurs générées par ce cancer et en offrant en outre un allongement non négligeable de l'espérance de vie (Auberger 2022).

III.5.2.2 Perspectives

D'autres stratégies de RIV basées sur le PSMA suscitent également beaucoup d'intérêt en particulier ceux développées à partir des émetteurs α . C'est le cas de l'actinium-225 [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 qui est la thérapie par particules α ciblant le PSMA la plus étudiée et fait l'objet de nombreux essais cliniques (Tagawa et al. 2024).

Actuellement en France hors essais clinique, 4 types de cancers sont traités par RIV : cancer de la thyroïde, tumeurs neuroendocrines, lymphome et cancer de la prostate (Deshayes 2022).

Cependant son utilisation pourrait s'étendre à d'autres tumeurs solides métastatiques à forte incidence, notamment les cancers du sein triple négatifs, du poumon à petites cellules, du rein et les glioblastomes. Ces développements cliniques sont à différents stades de la phase I à la phase III et les résultats s'échelonneront sur les 10 années à venir (**Figure 22**).

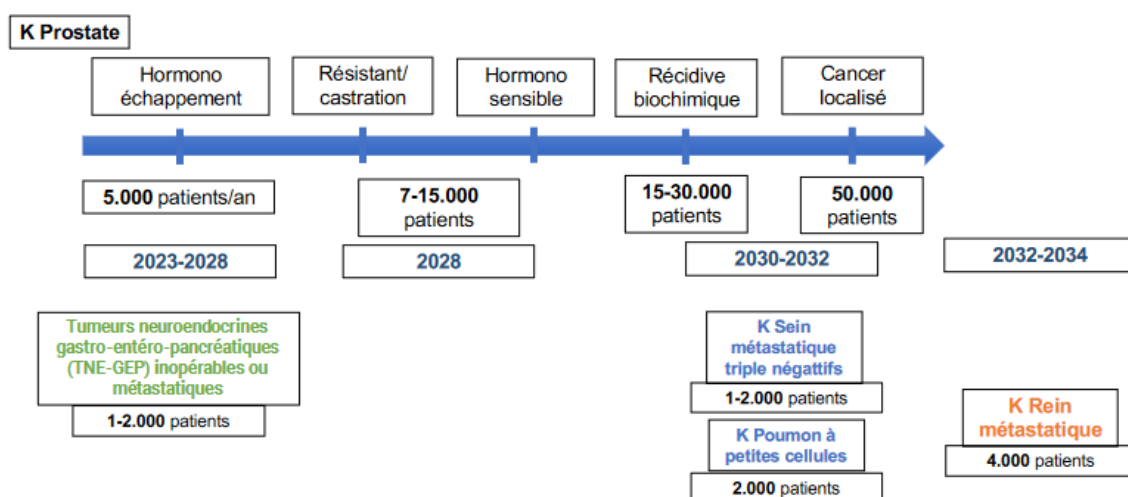


Figure 22 : Perspectives de développement de la RIV Thérapeutique en nombre de patients potentiellement éligible par indication, en France (A. -L. Giraudet et al. 2024).

III.5.3 Limites

Bien que la RIV ait prouvé son intérêt thérapeutique dans la prise en charge des patients, plusieurs facteurs limitants impactent le déploiement de la RIV.

III.5.3.1 Disponibilité des radionucléides

La chaîne d'approvisionnement constitue un défi majeur. La mise en œuvre de la RIV a souffert d'une pénurie de radionucléides pour la recherche et les essais cliniques dont la production est dépendante de l'industrie pharmaceutique ou encore du nombre limité des services de médecine nucléaire possédant des générateurs. En effet, une suspension temporaire de la production de [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 par Novartis en raison d'un problème de qualité potentiel dans ses installations, a empêché de nombreux patients de recevoir des [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 et a contribué au retard dans leur accès au traitement. Un rapport du Dana-Farber Cancer Institute de Boston, concernant 146 patients référés entre mai et octobre 2022, a mesuré un retard d'environ 8 semaines avant de commencer [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, 6 patients sur 127 approuvés (5 %) étant décédés pendant cette attente (Ravi et al. 2023).

Ce retard entre la TEP-PSMA et l'accès au [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 peut impacter l'orientation de la stratégie thérapeutique à poursuivre le traitement actuel ou commencer un nouveau.

Autres problèmes logistiques pour les radionucléides de courte demi-vie sont la distribution du radionucléide aux hôpitaux et l'exécution de la chimie nécessaire pour créer le produit radiopharmaceutique conjugué. Inversement, si la demi-vie est trop longue, le patient recevra une dose sur une longue période avec un débit de dose lent et risque de ne pas recevoir le bénéfice thérapeutique de la radiothérapie.

III.5.3.2 Infrastructure/Logistique

Une source de problème supplémentaire concerne l’augmentation en devenir sur les prochaines années de l’activité liée à la RIV-PSMA. Actuellement, il existe un écart entre le nombre de patients pouvant être pris en charge et les besoins réels des patients éligibles à la RIV-PSMA. La capacité d’accueil pour la prise en charge des patients dont le nombre pourrait être multiplié par 10, viendrait rapidement à saturer avec le déploiement du traitement RIV-PSMA et l’introduction de nouveaux traitements (A. -L. Giraudet et al. 2024).

Cette demande croissante soulève des questionnements capacitaires et organisationnels (coordination, organisation des soins et harmonisation des pratiques) et nécessite un besoin de formation et de recrutement des personnels engagés dans le parcours du patient, ainsi que la création de protocoles de coopération entre les professionnels de santé tels que les radiopharmaciens, médecins médicaux.

Un des obstacles à l’utilisation de la RIV est son coût du fait du prix des injections mais aussi du besoin en locaux spécifiques (chambre dédiée) et d’un circuit logistique particulier, ce qui implique l’optimisation de la radioprotection en suivant le principe de précaution ALARA (As Low As Reasonably Achievable) en minimisant le temps d'exposition, en augmentant la distance et en utilisant un blindage approprié (Yeung 2019).

III.5.3.3 Effets indésirables et Toxicité

Bien que le traitement par [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 dans les études cliniques notamment VISION et TheraP soit bien toléré avec une prolongation de la survie sans progression radiographique et de la survie globale (Hofman et al. 2024; Sartor, Bono, et al. 2021), son utilisation est réservée pour les patients à un stade avancé de la pathologie, généralement en phase terminale et est associée à l’apparition d’effets indésirables et d’une toxicité aiguë et subaiguë évalués (**Tableau 6**) en fonction de leur sévérité en 5 grades selon les critères CTCAE 4.03.

Tableau 6 : Grade de toxicité et effets indésirables selon les critères CTCAE 4.03

Grades de toxicité	Description
1	Léger ; asymptomatique ou symptômes légers ; diagnostic à l’examen clinique uniquement ; ne nécessitant pas de traitement
2	Modéré ; nécessitant un traitement minimal, local ou non-invasif ; interférant avec les activités instrumentales de la vie quotidienne
3	Sévère ou médicalement significatif mais sans mise en jeu immédiate du pronostic vital ; indication d’hospitalisation ou de prolongation d'hospitalisation ; invalidant ; interférant avec les activités élémentaires de la vie quotidienne
4	Mise en jeu du pronostic vital ; nécessitant une prise en charge en urgence
5	Décès lié à l’EI

Selon le guide de procédure conjoint à l'Association européenne de médecine nucléaire (EANM) et Société de Médecine Nucléaire et d'Imagerie Moléculaire (SNMMI) pour l'utilisation de la radiothérapie ciblant la PSMA marquée au ^{177}Lu (^{177}Lu]Lu-PSMA-RLT), les organes à risques recevant les doses de rayonnement les plus élevées comprennent les glandes salivaires, les glandes lacrymales, les reins et la moelle osseuse avec des effets secondaires attendus comme la fatigue, la toxicité hématologique aiguë et rénale chronique, ou la toxicité chronique pour les glandes salivaires (Kratochwil et al. 2023).

Dans les essais cliniques menés à ce jour et notamment l'essai VISION (Sartor, Bono, et al. 2021), les effets indésirables les plus fréquents (**Tableau 7**) sont de grade 1 et 2 (survenus chez plus de 30 % des patients traités avec le ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 le meilleur traitement standard). Bien que l'incidence des effets indésirables de grade 3 à 4 reste faible (chez < 10 % des patients) (Kratochwil et al. 2023), la majorité implique une toxicité salivaire et hématologique entraînant une diminution significative de la qualité de vie des patients.

Dans l'étude VISION (Sartor, Bono, et al. 2021), les toxicités hématologiques sont fréquentes en raison de l'irradiation β circulant dans le sang et par l'irradiation diffuse provenant des métastases osseuses expliquant les effets toxiques sur les cellules hématopoïétiques (Groener et al. 2021) avec des patients présentant un grade 3 ou 4 de l'anémie (13 %), de la thrombocytopénie (8 %), de la lymphopénie (8 %), de la neutropénie (3 %) et de la leucopénie (3 %). La toxicité gastro-intestinale est un autre effet indésirable fréquent lié au traitement. 35,3 % des patients traités par ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 présentaient des nausées, 20,2 % de la constipation et 18,9 % de la diarrhée ou des vomissements (tous grades confondus). Une sécheresse buccale provoquée par la toxicité salivaire est rapportée par 38,8 % des patients (tous grades confondus). Enfin, les patients présentant des métastases osseuses symptomatiques peuvent également ressentir une augmentation de la douleur osseuse dans les premiers jours de traitement.

Le succès de la RIV est impacté par ces effets indésirables qui selon leur sévérité peuvent entraîner une réduction, une interruption voire un arrêt du traitement. En raison d'une vascularisation anarchique et de l'hétérogénéité de la tumeur, de son expression hétérogène du PSMA et des organes à risques exprimant également le PSMA, le médicament RP n'atteint pas toujours la cible souhaitée. La distribution du RP peut entraîner une accumulation inégale dans différentes régions de la tumeur conduisant à des réponses inégales et à des doses insuffisantes, ce qui réduit l'efficacité ou des doses trop élevées, ce qui augmente le risque d'effets indésirables.

De plus, des mécanismes de résistance de la tumeur, des modifications de la radiosensibilité ainsi qu'une diminution de l'expression de la molécule ciblée au cours de la progression de la maladie et après exposition à d'autres thérapies anticancéreuses sont d'autres facteurs impactant la diffusion tumorale, compliquant ainsi la gestion des effets indésirables.

La recherche d'une stratégie comme méthode adjuvante pour potentialiser la délivrance d'agents thérapeutiques voit tout son intérêt notamment pour des organes et tissus cibles difficilement accessibles.

Tableau 7 : Effets indésirables reportés pour l'étude TheraP et l'étude VISION (Chandran, Figg, et Madan 2024)

Effets indésirables	TheraP		VISION	
Groupe	Lu-PSMA (n=98)	Cabazitaxel (n=85)	Lu-PSMA/SC (n=529)	SC (n=205)
Fatigue (%)				
Grade 1-2	70,4	71,8	37,2	21,5
(Grade ≥ 3)	(5,1)	(3,5)	(5,9)	(1,5)
Nausée (%)				
Grade 1-2	39,8	34,1	34,0	16,1
(Grade ≥ 3)	(1,0)	(0)	(1,3)	(0,5)
Bouche sèche (%)				
Grade 1-2	60,2	21,2	38,8	0,5
(Grade ≥ 3)	(0)	(0)	(0)	(0)
Yeux secs (%)				
Grade 1-2	29,6	3,5	3,0	1,0
(Grade ≥ 3)	(0)	(0)	(0)	(0)
Anémie (%)				
Grade 1-2	19,4	12,9	18,9	8,3
(Grade ≥ 3)	(8,2)	(8,2)	(12,9)	(4,9)
Thrombocytopénie (%)				
Grade 1-2	18,4	4,7	9,3	3,4
(Grade ≥ 3)	(11,2)	(0)	(7,9)	(1)
Leucopénie (%)				
Grade 1-2	10,2	5,9	10,0	1,5
(Grade ≥ 3)	(1,0)	(1,2)	(2,5)	(0,5)
Neutropénie (%)				
Grade 1-2	7,1	4,7	5,1	1,0
(Grade ≥ 3)	(4,1)	(12,9)	(3,4)	(0,5)
Diarrhée (%)				
Grade 1-2	18,4	51,8	18,1	2,4
(Grade ≥ 3)	(1,0)	(4,7)	(0,8)	(0,5)
Augmentation de la créatinine sérique (%)				
Grade 1-2	4,1	2,4	5,1	2,0
(Grade ≥ 3)	(0)	(0)	(0,2)	(0,5)
Lu-PSMA = [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 ; SC = soins standard				

IV. SONO-PERMEABILISATION

L'un des défis principaux consiste à assurer une diffusion rapide des molécules thérapeutiques au sein de la tumeur tout en maintenant ou améliorant leur fixation spécifique à la tumeur, afin de réduire les doses injectées. Le premier obstacle à ce challenge pouvant limiter l'efficacité du traitement est l'existence des barrières physiologiques pour atteindre les tissus tumoraux, la barrière endothéliale étant le 1er obstacle suivi ensuite du microenvironnement tumoral (dont les facteurs limitants ont été décrits précédemment (Deprez et al. 2021 ; Xia et al. 2021)). Les agents thérapeutiques doivent ainsi sortir des vaisseaux sanguins, traverser les régions interstitielles pour pénétrer les tissus tumoraux.

Dans cette section, plusieurs thématiques seront explorées en commençant par présenter la barrière endothéliale, qui limite l'accès des agents thérapeutiques aux tumeurs pour ensuite aborder les généralités sur les ultrasons. Les mécanismes impliqués dans la perméabilité cellulaire tels que le phénomène de cavitation et les biophysiques seront également discutés ainsi que les paramètres ultrasonores qui influencent l'efficacité de cette méthode. Enfin, un point sera fait sur les essais cliniques pertinents évaluant l'application de la sono-perméabilisation dans des contextes médicaux réels et ses perspectives d'avenir dans le traitement du cancer.

IV.1 BARRIERE ENDOTHELIALE

Le passage des molécules à travers la barrière endothéliale est étroitement régulé et s'effectue par deux voies de transport spécifiques : la voie transcellulaire (transcytose) impliquant des vésicules provenant des cavéoles de la surface cellulaire pour le transport de macromolécules et de cellules et la voie paracellulaire dont le passage des composés se fait au niveau des espaces intercellulaires entre les cellules endothéliales adjacentes restreignant la diffusion des macromolécules d'une taille supérieure à 3 nm (Minshall et Malik 2006). Les cellules endothéliales sont reliées par des jonctions cellulaires qui s'ouvrent et se ferment de manière coordonnée pour permettre ou empêcher le passage. Les barrières endothéliales spécialisées impliquent différentes jonctions, les plus importantes pour la sélectivité de la barrière étant les jonctions serrées (JS) et les jonctions adhérentes (JA) (García-Román et Zentella-Dehesa 2013; Peruzzi et al. 2018).

Les JS sont des jonctions intercellulaires adjacentes aux extrémités apicales de la surface latérale de la membrane. Elles sont responsables de la régulation du transport transmembranaire des ions et des solutés (fonction de clôture) et du maintien de la polarité cellulaire en définissant des domaines membranaires apicaux et basolatéraux (fonction de barrière) (Shang, Cui, et Yi 2014).

- (i) La JS est un complexe jonctionnel composé de trois classes de protéines (García-Román et Zentella-Dehesa 2013; Shang, Cui, et Yi 2014) : Transmembranaires intégrales comprenant les occludines, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM). Ces molécules se lient à des protéines homologues des cellules voisines. Les claudines

(claudine-5 étant l'isoforme principale) agissent comme des canaux permettant le passage paracellulaire et sélectif d'ions et de molécules.

- (ii) Protéines cytoplasmiques qui servent d'ancrage périphérique, telles que les protéines Zonula Occludens ZO-1, ZO-2 et ZO-3 de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK). Les protéines transmembranaires sont fixées à la cellule via l'interaction de leurs domaines cytoplasmiques (extrémité C-terminale) avec la famille des protéines ZO qui joue le rôle de pont qui les relie au cytosquelette d'actine.
- (iii) Régulatrices associées à la JS telles que la PKC (protéine kinase C) et Src proto-oncogènes codant des tyrosine kinases, qui sont liées aux protéines MAGUK, qu'elles régulent, ainsi qu'aux protéines transmembranaires.

De même que les JS, les constituants des JA incluent des protéines transmembranaires telles que la VE-cadhérine et les nectines, des protéines d'ancrage telles que les caténines a, b, c, et la p120-caténine et des protéines régulatrices telles que la kinase Src et plusieurs phosphatases comme VE-PTP, Shp2, Dep-1 et PTP-l (García-Román et Zentella-Dehesa 2013). Les JA contribuent également au processus de polarité cellulaire et, dans une moindre mesure, au contrôle de la perméabilité vasculaire.

La perméabilisation de l'endothélium permet de faciliter l'administration de médicaments à la tumeur. Cependant, les vaisseaux sanguins ne sont pas constitués uniquement de cellules endothéliales, mais également de cellules musculaires (lisses), de matrice extracellulaire et de tissu conjonctif pouvant influencer l'administration de médicaments induite par les ultrasons (Deprez et al. 2021).

IV.2 LES ULTRASONS, UNE MODALITE PHYSIQUE DE DELIVRANCE

Au cours de ces dernières années, les méthodes de délivrance médiées par des stimuli sont apparues comme une solution pour accroître l'efficacité et le ciblage des médicaments (Rodriguez-Devora et al. 2012). Ces stimuli peuvent être subdivisés en trois catégories (**Figure 23**) : physiques (par exemple, pression osmotique, pression de vapeur, lumière, champ magnétique et/ou électrique, ultrasons, température, hydratation), chimiques (pH, force ionique, oxydoréduction, glucose et hydrolyse) et biologiques (enzymes et récepteurs endogènes) (Liao et al. 2020 ; Lopes et al. 2013) et dont la combinaison peut être réalisée et améliorer la réponse de la libération du médicament (Liao et al. 2020).

Parmi les techniques d'administration de médicaments basées sur des sources physiques, les ultrasons focalisés combinés à l'injection de microbulles offrent de nombreux avantages tels qu'un meilleur contrôle spatio-temporel du ciblage des médicaments, un meilleur contrôle en profondeur de la zone ciblée, une biodisponibilité intratissulaire élevée des substances thérapeutiques, une réduction des conséquences du ciblage non spécifique et une activation du stimulus à la demande (Bouakaz et Michel Escoffre 2024; Rodriguez-Devora et al. 2012).

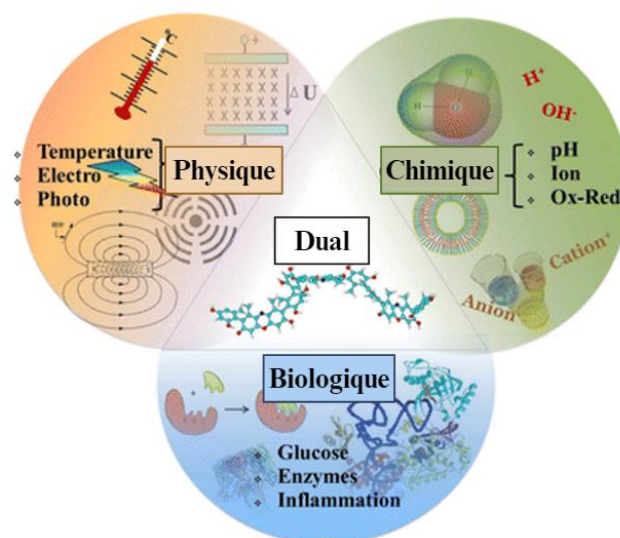


Figure 23 : Méthodes d'administration médiées par des stimuli physiques, chimiques et biologiques. Les stimuli physiques reposent principalement sur la température, le champ électrique, la lumière, les ultrasons, les champs magnétiques et la déformation mécanique. Les stimuli chimiques comprennent le pH, la force ionique, l'oxydoréduction et le solvant. Les stimuli biologiques impliquent généralement des analytes et des biomacromolécules tels que le glucose, le glutathion, les enzymes, les récepteurs et les métabolites surproduits dans l'inflammation. (extraite et traduite de Cabane et al. 2012)

Dans le domaine médical, les ultrasons présentent un certain nombre d'avantages : ce sont des ondes acoustiques non invasives, non ionisantes et faciles à mettre en œuvre (Tanter 2019). Bien qu'il existe certains risques associés à leur utilisation, les appareils cliniques sont spécifiquement conçus avec des dispositifs de sécurité pour limiter ces risques et garantir la sécurité des patients.

Comme les ondes sonores, les ultrasons (US) sont des ondes mécaniques qui se matérialisent par la propagation d'une onde sinusoïdale dans le milieu traversé caractérisée par une alternance de phases de compression et dilatation résultant en la mise en vibration des molécules présentes dans le milieu. Par définition, les fréquences utilisées se situent entre 20 kHz et 200 MHz, soit au-delà des fréquences audibles par l'oreille humaine. L'oscillation des molécules constituant la matière se diffuse de proche en proche, dans une direction donnée à partir du point d'initiation. Dans les matériaux solides, les US peuvent se propager sous forme d'ondes longitudinales et transversales ; cependant, dans les fluides et dans la majorité des tissus mous, la propagation est principalement longitudinale.

La propagation de l'onde acoustique à travers le corps humain est un phénomène complexe, du fait de l'hétérogénéité des tissus explorés. En effet, selon la densité du milieu traversé, les US se propagent à une vitesse plus ou moins élevée : un matériau est défini par son impédance acoustique. Ce paramètre dépend principalement de la densité du tissu et de la célérité de l'onde dans ce milieu (Pitt, Hussein, et Staples 2004). L'interaction des ondes acoustiques avec les interfaces qui existent entre les différents tissus provoque une altération de l'énergie des US. Lorsque ces ondes pénètrent des tissus présentant des valeurs différentes d'impédance acoustique, une partie de l'énergie de l'onde est réfléchiée tandis que le reste traverse le tissu dans un processus appelé transmission. Un autre phénomène physique est la diffusion de l'onde acoustique. Elle dépend de la taille de l'interface et renvoie une partie du signal dans de multiples directions. En outre, une partie de l'énergie est également absorbée par les tissus, pouvant

engendrer localement une augmentation de la température. Par conséquent, cette onde perd progressivement de l'énergie en raison de la réflexion, la réfraction, la diffusion et l'absorption qui sont des phénomènes responsables de l'atténuation acoustique (Fateh et al. 2021; Powles et al. 2018).

Les US sont largement utilisés dans la pratique clinique comme mode d'imagerie diagnostique notamment avec l'échographie qui est de loin l'application médicale la plus connue des US de nos jours. Cette technique d'imagerie se repose sur l'émission des US par une sonde (ou transducteur), de forme linéaire, convexe, ou encore sectorielle, via une impulsion électrique émise dans un cristal piézoélectrique polarisé constituant le transducteur. Ces ondes réfléchies par les interfaces entre les différents tissus ou structures du corps sont recueillies et converties en impulsions électriques. La sonde est à la fois un émetteur et un récepteur d'US (Abu-Zidan, Hefny, et Corr 2011; Powles et al. 2018), pouvant être non focalisée (générant des ondes planes) ou focalisée (Peruzzi et al. 2018).

Au-delà de l'application diagnostique, les US sont utilisés depuis des décennies à des fins thérapeutiques (ablation de tissus tumoraux médiée par les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU), physiothérapie, broyage de calculs rénaux par lithotripsie) (D. Miller et al. 2012). Depuis quelques années, une des applications thérapeutiques des US faisant l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques, a suscité une attention particulière pour des applications cliniques potentielles, à savoir l'amélioration de la délivrance d'agents thérapeutiques par sono-perméabilisation (Delalande et al. 2015 ; Klazina Kooiman et al. 2020 ; Y. S. Li et al. 2009a ; Qin, Wang, et Willmann 2016).

IV.3 MECANISMES

La sono-perméabilisation est le processus par l'activation de microbulles par ultrasons à proximité de barrières biologiques (e.g., barrière hémato-tumorale, barrière hémato-encéphalique, membrane cellulaire), afin d'augmenter transitoirement et localement leur perméabilité et favorisant ainsi la pénétration de molécules thérapeutiques dans les tissus cibles tout en réduisant les effets indésirables.

Outre leur rôle principal d'agents de contraste en imagerie ultrasonore, les microbulles sont de plus en plus reconnues comme agents théranostiques en tant que vecteur de perméabilité membranaire.

IV.3.1 Microbulles

Les microbulles (MB) sont constituées d'un gaz hydrophobe lourd, tel que les perfluorocarbures (PFC), et stabilisées par une enveloppe biocompatible, généralement lipidique ou protéique, pouvant être modifiée par fonctionnalisation de ligands ou d'anticorps pour cibler un tissu pathologique (**Figure 24**). Injectées par voie i.v., en bolus ou par infusion, les MB ont une distribution de taille comprise en général entre 1-10 μ m leur permettant de rester confinées dans le compartiment vasculaire. Elles ont une durée de vie en circulation de l'ordre de quelques minutes (typiquement moins de 10 min), puis sont éliminées de la circulation par dissolution par le système réticulo-endothélial hépatique et splénique, ainsi que par le système immunitaire pour les molécules qui stabilisent l'interface gaz/liquide (Dauba et al. 2020). Le

gaz contenu dans les MB est éliminé du corps par l'expiration (L. Wang 2016). Les propriétés physico-chimiques de l'enveloppe et du gaz des MB influencent fortement leur stabilité et donc leur durée de vie mais aussi leur capacité d'encapsulation et d'administration de molécules (Dindyal et Kyriakides 2011).

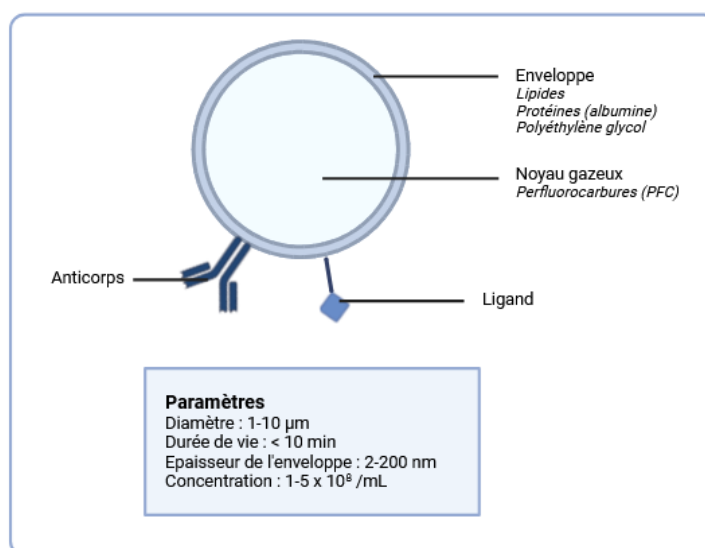


Figure 24 : Schéma d'un agent de contraste ultrasonore (Novell, Escoffre, et Bouakaz 2013)

Depuis plus de vingt ans, plusieurs agents de contraste sont autorisés en clinique pour l'échographique de contraste (Tranquart, Bettinger, et Hyvelin 2014) : Definity™ (Lantheus Medical Imaging, North Billerica, MA, États-Unis), SonoVue®/Lumason® (Bracco, Milan, Italie), Optison™ (GE Healthcare, Milwaukee, WI, États-Unis) et Sonazoid® (GE Healthcare, Milwaukee, WI, États-Unis). Ces agents commerciaux sont également détournés de leur application clinique et utilisés dans des protocoles de sono-perméabilisation (Dauba et al. 2020).

A l'heure actuelle, Le SonoVue® est le seul agent de contraste cliniquement approuvé en France. L'extension de son application vers la thérapie suscite actuellement un intérêt considérable pour la recherche.

Bien que certains types de microbulles soient homologués pour un usage clinique comme illustrés dans le **Tableau 8**, ou comme Vevo MicroMarker® (Fujifilm, Toronto, ON, Canada) d'autres comme BR-38® (Bracco Suisse SA, Genève, Suisse) ou les microbulles fabriquées par Targeson Inc. (San Diego, CA, États-Unis) sont utilisés de manière expérimentale ou en recherche à des fins thérapeutiques. Les agents de contraste peuvent être fabriqués en laboratoire en jouant sur la composition du gaz ou de l'enveloppe pour répondre à des besoins spécifiques, notamment pour l'évaluation de biomarqueurs dans le cadre d'une imagerie ciblée (Dauba et al. 2020).

Tableau 8 : Comparaison des trois principaux agents de contraste ultrasonores sous forme de microbulles commercialisés pour l'imagerie médicale ultrasonore (Paefgen, Doleschel, et Kiessling 2015; Frinking et al. 2020; Melich 2018).

	SonoVue®/ Luma-son®	Definity™/Luminity®	Optison™	Sonazoid®
Compagnie	Bracco Diagnostics	Lantheus Medical Imaging	GE Healthcare	
Enveloppe	Phospholipides	Phospholipides	Protéine HSA réticulée	Phospholipides
Gaz	Hexafluorure de soufre (SF_6)	Octafluoropropane (C_3F_8)	Octafluoropropane (C_3F_8)	Perfluorobutane (C_4F_{10})
Diamètre	1,5 – 2,5 μm	1,1 – 2,5 μm	3-4,5 μm	2-3 μm
Distribution	99% < 10 μm	98% < 10 μm	95% < 10 μm Taille	99% < 7 μm Taille
Première autorisation d'utilisation clinique	2001/2014	2001/2006	1998	2007
Pays ayant une autorisation	Amérique du Nord, Europe dont la France, Brésil, Asie	Amérique du Nord, Europe, Australie	Amérique du Nord, Europe	Japon, Corée du Sud, Norvège, Taiwan, Chine
Applications approuvées par la FDA (* uniquement dans certains pays)	Définition de la limite endocardique / opacification du ventricule gauche Echographie : sein*, foie*, vasculaire*, voies urinaires	Définition de la limite endocardique / opacification du ventricule gauche Echographie : sein*, foie*, vasculaire*	Définition de la limite endocardique / opacification du ventricule gauche	Perfusion myocardique Echographie : sein*, foie*, vasculaire*

IV.3.2 Cavitation stable et inertielle

Leur noyau gazeux hautement compressible permet aux MB de réagir de manière dynamique aux ultrasons. Au passage des ondes acoustiques sinusoïdales (**Figure 25**), les MB oscillent en suivant une alternance de phases de compression et de décompression (expansion et rétrécissement). Ces oscillations sont à l'origine du rehaussement du signal échographique en imagerie de contraste. En effet, les MB

vont rétrodiffuser un signal écho dans toutes les directions (y compris vers la sonde), se comportant comme un oscillateur non linéaire grâce à la forte compressibilité de l'agent. Le comportement non linéaire de la MB est induit par : (i) le phénomène de résonance : la MB possède une fréquence propre pour laquelle les amplitudes d'oscillations seront maximales ; (ii) l'asymétrie entre les phases de compression/dilatation de la MB. En effet lorsque le gaz à l'intérieur de la MB est comprimé, il exerce une force qui résiste à la compression. L'inertie de la MB est principalement assurée par le liquide environnant, qui est mis en mouvement lorsque la paroi de la MB se déplace (Humphrey 2007; Leighton 2004).

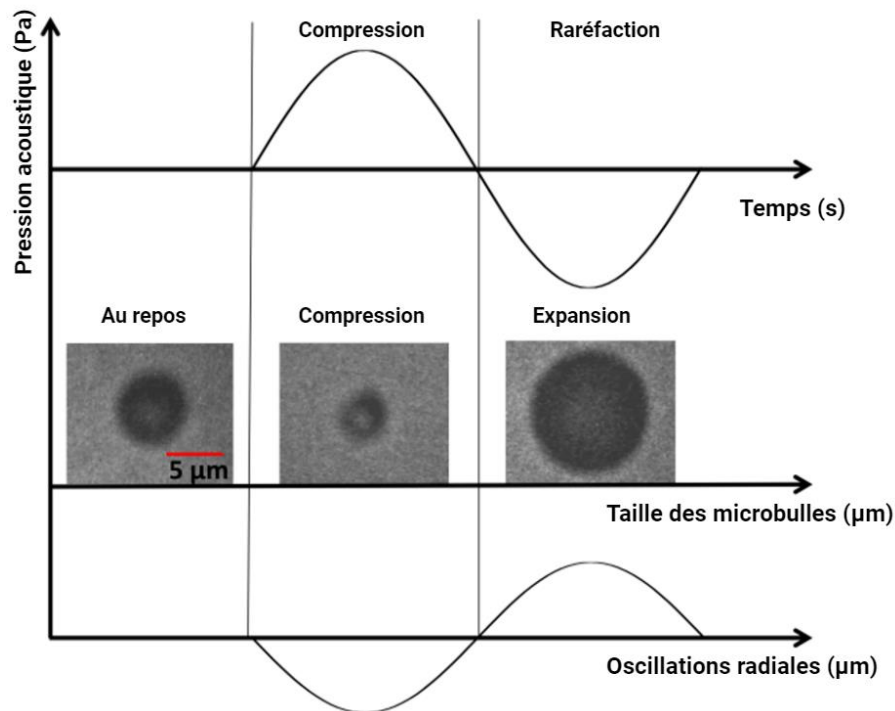


Figure 25 : Illustration de l'oscillation radiale des microbulles lors de l'exposition ultrasonore (extraite et traduite de Kothapalli 2015)

La cavitation est le phénomène physique de création, des oscillation radiales de bulles de gaz et de vapeur dans un liquide soumis à une dépression. Il existe deux régimes dits de cavitation (**Figure 26**) : stable et inertielle (Humphrey 2007; Kothapalli 2015; Lentacker et al. 2014).

Les MB sont dans un régime de cavitation stable pour des pressions acoustiques de faibles à modérées (typiquement de quelques centaines de kPa). Pour de faibles pressions (de l'ordre de quelques dizaines de kPa), les oscillations radiales sont symétriques et faiblement non linéaires autour d'un rayon d'équilibre où la taille de la MB varie légèrement et linéairement avec l'amplitude de la pression. En augmentant la pression acoustique, les bulles entrent dans un régime d'oscillation non linéaire stationnaire où les oscillations deviennent asymétriques, avec des volumes d'expansion bien plus importants que pour la contraction. Bien que non linéaires, ces fortes vibrations vont durer dans le temps pouvant induire des contraintes mécaniques au niveau des barrières biologiques : massage cellulaire contre la paroi endothéliale, forces de cisaillement générées par des micro-flux (Lammertink et al. 2015).

En augmentant la pression acoustique jusqu'à atteindre d'un certain seuil, la cavitation devient inertielle.

Les MB sont alors instables et les oscillations sont fortement non linéaires et irrégulières et conduisent à la fragmentation et à l'effondrement des MB. Il en résulte des phénomènes mécaniques secondaires, notamment des jets de liquide et des ondes de choc. Cette instabilité peut certes favoriser la perméabilité membranaire mais la rendre possiblement définitive et non plus transitoire et être ainsi potentiellement néfaste avec des dégâts irréversibles pour des applications touchant le cerveau (Lammertink et al. 2015).

Ces phénomènes de cavitation peuvent être obtenus par l'injection systémique de MB mais également par l'existence de noyaux gazeux présents dans tous les liquides et les tissus pouvant servir de noyaux de cavitation (Humphrey 2007; Lentacker et al. 2014) ou par la formation naturelle de MB sous l'influence des ondes ultrasonores (Jain et al. 2018).

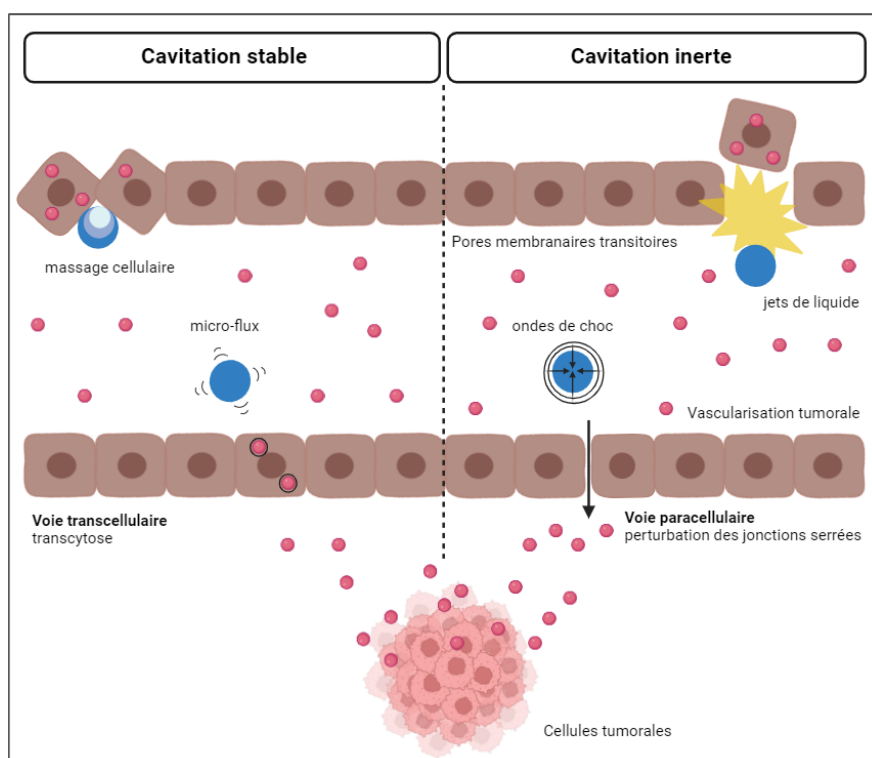


Figure 26 : Mécanismes sous-jacents de la cavitation stable et inertielle. L'extravasation du médicament est augmentée en stimulant les voies paracellulaires (c'est-à-dire la rupture des jonctions serrées) et transcellulaires (c'est-à-dire la transcytose). (Lammertink et al. 2015)

Ainsi, le phénomène de sono-perméabilisation (**Figure 27**) conduisant à la perméabilité des barrières biologiques peut être obtenu par la présence de cinq mécanismes physiques identifiés à ce jour (Delalande et al. 2012; Escoffre et Bouakaz 2019; Jain et al. 2018; Peruzzi et al. 2018; Pitt, Hussein, et Staples 2004; Postema et al. 2011) :

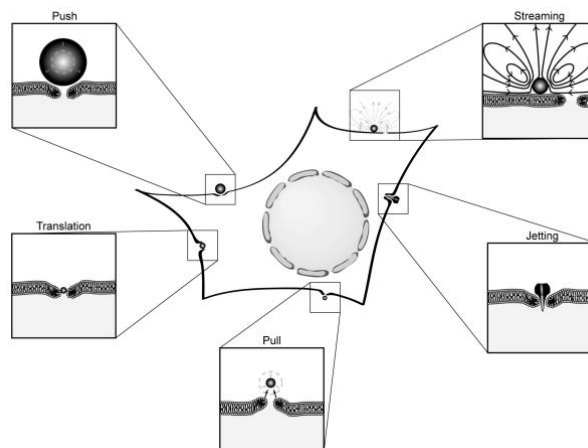


Figure 27 : Représentation des 5 mécanismes physiques expliquant la sono-perméabilisation (Frinking et al. 2020)

- Mécanisme de « Push/Pull »

En cas de cavitation stable, les oscillations des MB sont à l'origine du processus de traction/poussée appelé également massage cellulaire. Pendant la phase d'expansion de la MB, la membrane plasmique est poussée vers l'intérieur de la cellule et pendant la phase de compression, le plasma qui remplit le vide laissé par la MB en contraction va attirer la membrane cellulaire vers la microbulle, c'est-à-dire vers l'extérieur. Ces mouvements répétés de traction et de poussée génèrent des contraintes de cisaillement cyclique sur la membrane, entraînant des déformations pouvant conduire à la formation transitoire d'un pore.

- Mécanisme de micro-flux

Les oscillations stables conduisent à un écoulement local régulier du fluide autour de la MB. Ces micro-flux formant des tourbillons circulants qui s'organisent au niveau de la MB entraînent des contraintes de cisaillement à proximité des barrières biologiques, permettant de propulser les agents thérapeutiques, par exemple.

- Mécanisme d'ondes de choc

Lors de la cavitation inertielle, les oscillations des MB deviennent chaotiques et violentes provoquant leur effondrement. Une énergie concentrée connue sous le nom d'onde de choc est alors émise dans le liquide environnant. La pression de l'onde de choc diminue inversement avec l'augmentation de la distance de propagation (c'est-à-dire la distance entre la MB et la cellule de la barrière biologique) ;

- Mécanisme de microjetting

L'effondrement asymétrique de la MB lié à la cavitation inertielle est responsable de la génération de microjets de liquide à grande vitesse qui se propagent à travers la paroi de la MB pour se projeter vers la barrière biologique. Ces microjets sont comparables à des micro-aiguilles pouvant percer les parois biologiques, censés produire des pores temporaires. Il est à noter que des groupes de recherche ont

montré que les MB étaient capables de pénétrer dans la cellule directement à travers la membrane ou les canaux membranaires (Beekers et al. 2022). La MB peut perdre une partie de son enveloppe pendant la translation et se dissoudre rapidement après avoir pénétré dans la cellule.

IV.4 EFFETS BIOPHYSIQUES

L'interaction des ultrasons avec les tissus induit des effets thermiques résultant de l'absorption de l'énergie acoustique dans les tissus (non détaillés dans ce manuscrit), des effets mécaniques et chimiques. L'ensemble de ces phénomènes conduit à des mécanismes biologiques impactant les membranes biologiques.

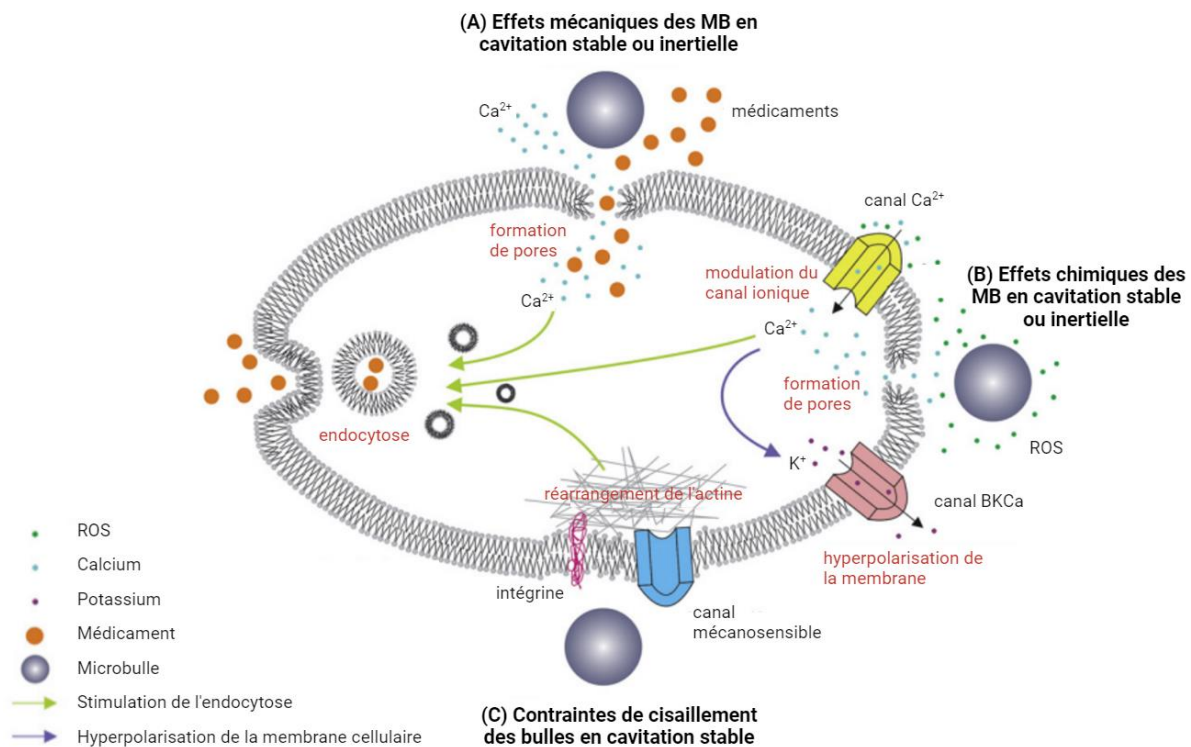


Figure 28 : Mécanismes biologiques induits par la cavitation des microbulles. (A) Les effets mécaniques provoquent la formation de pores dans la membrane cellulaire permettant l'entrée du calcium par diffusion passive. (B) Les effets chimiques induits par la cavitation des MB entraîne la formation de ROS qui module les canaux ioniques ou entraîne une rupture de la membrane par peroxydation lipidique. L'influx de calcium médié par ces ROS stimule l'endocytose et est compensé par l'efflux de potassium via les canaux, ce qui entraîne une hyperpolarisation de la membrane cellulaire. (C) Les contraintes de cisaillement induites par des bulles en cavitation stable peuvent déformer la membrane cellulaire. Les réarrangements du cytosquelette et des différences de tension membranaire, sont détectées par des mécanosenseurs qui vont déclencher une cascade de signalisation qui influence les processus d'endocytose/exocytose. (extraite et traduite de Lentacker et al. 2014)

Le phénomène de cavitation stable et inertielle va résulter en 3 processus principaux participant à la perméabilisation de la barrière biologique (**Figure 28**) :

- La formation de pores (Escoffre et Bouakaz 2019; Lammertink et al. 2015; Peruzzi et al. 2018)

La perméabilité membranaire est augmentée par la formation transitoire de pores au niveau de la barrière favorisant la diffusion passive des molécules. Ce processus peut conduire l'entrée de Ca^{2+} stimulant ainsi l'exocytose des lysosomes. Ainsi le transport et la fusion de ces vésicules lysosomales avec la membrane plasmique vont former un patch à travers la région perméabilisée favorisant la refermeture des pores. Cette fermeture peut également se reposer sur un processus passif médié par la réorganisation spontanée des composants de la membrane et celle du cytosquelette d'actine induite par les US. La refermeture des pores de la membrane est un processus rapide et de courte durée (plusieurs minutes), s'ensuit le processus de réparation des cellules qui est quant à elle une étape de plus longue durée (plusieurs heures).

Toutefois, les cinétiques de formation et de fermeture de pores dépendent de la physiologie cellulaire (cellules adhérentes, suspension cellulaire) et particulièrement des conditions ultrasonores (paramètres ultrasonores, dose et taille de MB, etc.) qui vont conditionner notamment la taille des pores. D'une manière générale, les pores relativement petits (de plusieurs dizaines à quelques centaines de nanomètres) sont généralement générés par la cavitation stable tandis que les grands pores (de plusieurs centaines de nanomètres à plusieurs micromètres) sont favorisés par la cavitation inertielle, avec un risque que ces derniers ne se referment pas lorsqu'ils atteignent une taille supérieure à $100\ \mu\text{m}^2$ (Hu, Wan, et Yu 2013). Des études *in vitro* sur la dynamique d'ouverture et de fermeture des pores membranaires ont montré que les pores inférieurs à $30\ \mu\text{m}^2$ se refermaient en moyenne en 1 min (allant de quelques secondes à 120 secondes) (Hu, Wan, et Yu 2013; van Rooij et al. 2016 ; van Wamel et al. 2006 ; Y. Zhou et al. 2012).

- La formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Lafond 2016; Lammertink et al. 2015 ; Peruzzi et al. 2018)

La cavitation conduit à un stress oxydatif et à la formation conséquente de radicaux libres, principalement des ROS comme H_2O_2 et le superoxyde. Les radicaux libres peuvent induire des lésions cellulaires via la peroxydation des lipides, ce qui peut entraîner un réarrangement de la bicouche lipidique et une rupture de la membrane. Les radicaux libres jouent un rôle important dans la perméabilité de la membrane cellulaire en modulant les canaux ioniques existants, tels que les canaux Ca^{2+} voltages dépendants.

- Endocytose (Lammertink et al. 2015 ; Peruzzi et al. 2018)

C'est un processus de transport actif intracellulaire sans intervention extérieure médié par des invaginations de la membrane plasmique suivie de la formation de vésicules s'isolant dans le cytoplasme. Indépendamment de la formation de pores, elle est contrôlée par plusieurs molécules et organites qui guident des voies d'endocytose spécifiques permettant l'absorption de macromolécules issues du milieu extérieur qui ne peuvent pas être transportées par les pores. La formation de ces

invaginations est directement liée à la délivrance de molécules par-delà la barrière (Zeghimi, Escoffre, et Bouakaz 2015). Le flux intracellulaire de Ca^{2+} et de H_2O_2 renforce le processus d'endocytose par l'hyperpolarisation produite par l'activation des canaux BKCa causée par l'entrée de calcium.

L'ensemble des 3 phénomènes participent à la stratégie de la sono-perméabilisation qui est d'augmenter la concentration d'agent thérapeutique et donc son efficacité dans le tissu tout en limitant le dépôt dans le tissu sain et les effets indésirables induits.

Ces effets biologiques soumis aux mécanismes de cavitation permettant la perméabilisation de la barrière biologique dépendent fortement des paramètres ultrasonores appliqués.

IV.5 PARAMETRES ULTRASONORES

L'onde ultrasonore est caractérisée par les mouvements périodiques des particules du milieu autour de leur position moyenne pouvant être représentée de manière pratique par une courbe sinusoïdale (Aldrich 2007). Elle est définie par un certain nombre de paramètres physiques (**Figure 29**) à savoir la fréquence, la pression acoustique, le nombre de cycles, la durée de l'impulsion et la fréquence de répétition de l'impulsion (qui fournit le rapport cyclique), qui sont tous importants pour prédire le comportement des MB et donc les effets biologiques (Deprez et al. 2021).

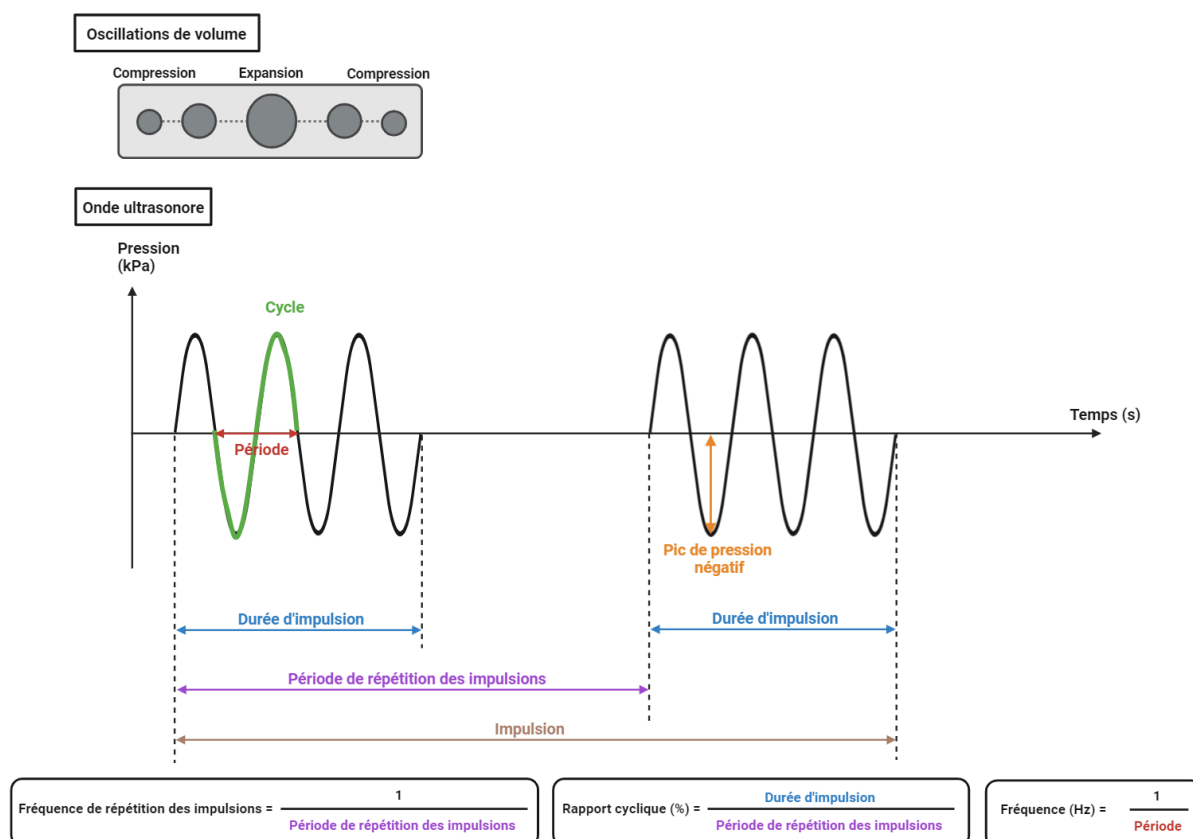


Figure 29 : Caractéristiques d'une onde ultrasonore (Deprez et al. 2021)

IV.5.1 Fréquence

La fréquence (exprimée en hertz, Hz) est le nombre d'oscillations (ou cycles) par seconde. Elle est inversement proportionnelle à la période correspondant à la durée d'une oscillation, c'est-à-dire le temps nécessaire à une onde d'effectuer un cycle complet (raréfaction et compression). Par conséquent, la période est d'autant plus courte que la fréquence est élevée (Powles et al. 2018; Quarato et al. 2023).

La fréquence détermine la profondeur de pénétration et influence la limite de la résolution spatiale de la sonde (c'est-à-dire la capacité à distinguer deux cibles distinctes mais proches) (Quarato et al. 2023). Plus la fréquence utilisée est élevée, plus la longueur d'onde et donc la profondeur de pénétration sont faibles en raison d'une atténuation acoustique accrue (Chowdhury et al. 2020), mais plus la résolution de l'image est élevée (Bouakaz et Michel Escoffre 2024; Grogan et Mount 2024). Une fréquence plus élevée permet aux tissus d'absorber plus facilement l'énergie, améliorant la netteté des images échographiques (Murthi, Ferguson, et Sisley 2010; Quarato et al. 2023). Un signal à basse fréquence avec une longueur d'onde plus grande interagit avec moins de molécules dans le tissu. Il en résulte une moins bonne résolution mais une plus grande profondeur de pénétration dans les tissus (Murthi, Ferguson, et Sisley 2010). Les fréquences utilisées en échographie clinique vont de 1 MHz à 20 MHz, en fonction de la sonde utilisée et de l'application souhaitée. Les sondes à haute fréquence (5 - 20 MHz) sont utilisées pour les structures superficielles (par exemple, la visualisation des vaisseaux périphériques) et les sondes à basse fréquence (2 - 5 MHz) pour l'imagerie des structures plus profondes (par exemple, les organes abdominaux et pelviens) (Chowdhury et al. 2020; Powles et al. 2018) (Quarato et al. 2023).

Contrairement aux ultrasons diagnostiques, les applications thérapeutiques notamment la délivrance de médicaments utilisent généralement une gamme de basses fréquences variant de 0,1 à 2,25 MHz (Lammertink et al. 2015).

En effet, dans le cas de la sono-perméabilisation, lorsque le milieu de propagation le permet (pas d'os à traverser), le choix de la fréquence de la sonde repose sur la fréquence de résonance de la MB et sur le choix de la zone à cibler (l'utilisation de haute fréquence permet une délivrance plus précise des US) (Chowdhury et al. 2020; Deprez et al. 2021). La fréquence de résonance diminue à mesure que la taille des MB augmente (Ammari et al. 2018). Elle dépend également de leur composition (gaz, coque) et du milieu environnant (Chowdhury et al. 2020). Dans la plupart des études rapportées, la fréquence de 1 MHz a été utilisée pour réaliser l'administration de médicaments à l'aide de MB (Lammertink et al. 2015). Cette fréquence de 1 MHz est choisie de manière à stimuler efficacement des agents ultrasonores homologués en clinique (Chowdhury et al. 2020; Lin et al. 2017).

Dans ce contexte, lorsque la fréquence des US est sélectionnée sur la taille des MB, un seuil faible de pression acoustique peut induire des oscillations de grande amplitude et déclencher la cavitation. Dans le cas contraire, des pressions plus élevées peuvent être nécessaires pour induire des effets de cavitation. Ce dernier point pourrait expliquer la grande variété de pressions acoustiques qui ont été rapportées dans les études de sono-perméabilisation (Deprez et al. 2021).

IV.5.2 Exposition ultrasonore : pression acoustique, intensité acoustique et indice mécanique

L'exposition ultrasonore peut être exprimée à travers différentes grandeurs qui dépendent de la sonde utilisée : amplitude de pression acoustique négative maximale (appelée pression de raréfaction maximale, en Pa), l'intensité acoustique (W/cm^2) ou l'indice mécanique (Chowdhury et al. 2020; Hoskins, Martin, et Thrush 2010; Lammertink et al. 2015; Murthi, Ferguson, et Sisley 2010; Peruzzi et al. 2018).

IV.5.2.1 Pression de raréfaction

L'amplitude détermine la force d'une onde et est le plus couramment décrit par la pression de raréfaction qui correspond au pic de pression négative par rapport à la pression de référence (ambiante ou de repos) qui se produit pendant l'onde (European Committee for Ultrasound Radiation Safety — The Watchdogs 1997; Hoskins, Martin, et Thrush 2010; Nyborg 2001).

À une fréquence donnée, l'amplitude de la pression de raréfaction joue un rôle dans l'apparition et la nature de l'activité de cavitation (Chhabra et Thakur 2022; Delalande et al. 2012) en présence de MB injectées ou encore de noyaux de bulles endogènes tels que de petites poussières et des poches gazeuses existants déjà dans les tissus (Chowdhury et al. 2020; Hoskins, Martin, et Thrush 2010).

La fréquence joue également un rôle dans la pression à appliquer. Une fréquence élevée nécessite des amplitudes de pression plus importantes pour induire la cavitation (Chowdhury et al. 2020; Lafond 2016), et inversement.

IV.5.2.2 Intensité acoustique

La force de l'onde peut être représentée par l'intensité faisant référence à la puissance délivrée par un unité de surface (W/cm^2) (Murthi, Ferguson, et Sisley 2010). Elle détermine l'énergie transportée par le faisceau et transmise aux particules du milieu. Elle est donc liée à la quantité de chaleur générée dans le tissu, selon l'absorption de celui-ci (Aldrich 2007). La production de chaleur dans la zone focale de la sonde est généralement insignifiante en imagerie US diagnostique, mais elle devient importante dans les applications thérapeutiques (Focused Ultrasound Foundation | State of the Field 2023). Les effets thermiques générés par de fortes intensités peuvent entraîner des dommages tissulaires irréversibles allant jusqu'à l'ablation du tissu. Lors de la délivrance de médicaments, l'intensité acoustique est comprise entre 0,3 et 3 W/cm^2 afin de limiter l'augmentation de la température des tissus à moins de 1°C (Batra et al. 2020 ; Chowdhury et al. 2020 ; Peruzzi et al. 2018). La plage d'intensité doit être choisie de façon à minimiser les dommages potentiels aux tissus normaux tout en maximisant l'administration de médicaments, généralement inférieure à celle des HIFU (Kuntner et Stout 2014). En présence de MB, de faibles intensités entraînent une cavitation stable des MB tandis que les hautes intensités conduisent à une cavitation inertielle. En utilisant des US de basse intensité, l'absorption endocytotique peut être stimulée tandis que des impulsions ultrasonores courtes mais intenses peuvent favoriser la formation de pores et l'absorption cytoplasmique directe de médicaments (Lentacker et al. 2014).

L'intensité moyenne spatiale des impulsions d'un transducteur est la plus fréquemment mesurée et fournie par les constructeurs (Constantinesco 2007). L'intensité moyenne temporelle est généralement utilisée pour déterminer les effets thermiques pouvant être minimisés en réduisant le rapport cyclique lorsque de fortes intensités ultrasonores sont employées (Kuntner et Stout 2014).

IV.5.2.3 Indice mécanique

L'indice mécanique (IM) est défini comme le rapport entre la pression négative (ou la pression de raréfaction maximale) exprimée en MPa et la racine carrée de la fréquence centrale du faisceau ultrasonore exprimée en MHz. Contrairement à l'intensité des US, directement corrélée aux effets thermiques, l'IM est lié aux effets mécaniques provoqués par la cavitation (Chowdhury et al. 2020). L'IM constitue ainsi un indicateur de la probabilité de cavitation inertielle basé sur le modèle théorique, le seuil de Apfel et Holland (Humphrey 2007; Quarato et al. 2023), permettant d'identifier le seuil de pression acoustique afin de prévenir les lésions tissulaires (Hoskins, Martin, et Thrush 2010). Pour les applications cliniques et notamment en imagerie diagnostique, l'IM maximal est fixé à 1,9 (Chowdhury et al. 2020 ; Peruzzi et al. 2018), approuvé et adopté par la FDA, l'AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine) et la NEMA (National Electrical Manufacturers Association) (Humphrey 2007).

L'IM utilisé pour la délivrance de médicaments par sono-perméabilisation varie généralement de 0,2 à 1,9 dont la valeur de 0,7 a été fixée par la BMUS (British Medical Ultrasound Society) comme seuil de cavitation inertielle en cas d'utilisation d'un agent de contraste ultrasonore gazeux (Chowdhury et al. 2020 ; Hoskins, Martin, et Thrush 2010; Quarato et al. 2023). Néanmoins, il a été montré que l'exposition des tissus tumoraux à un niveau supérieur mais proche du seuil de cavitation inertielle ne signifiait pas nécessairement des effets secondaires significatifs (Lammertink et al. 2015).

IV.5.3 Rapport cyclique

Les transducteurs ultrasonores fonctionnent sous deux régimes : en onde continue ou pulsée (sous la forme d'impulsions brèves et intermittentes) (Aldrich 2007). En imagerie, le mode pulsé implique que la sonde fonctionne alternativement comme émetteur et récepteur et permet d'éviter l'élévation de température et donc la surchauffe des tissus qui se produit lors d'une exposition continue en dispersant l'énergie ultrasonore (Peruzzi et al. 2018). Dans ce cas, plusieurs paramètres sont définis (durée de l'impulsion, période de répétition des impulsions, fréquence de répétition des impulsions, rapport cyclique).

Le rapport cyclique est défini comme la fraction de temps pendant laquelle l'onde US est appliquée par rapport au temps total de sa période (exprimé en pourcentage) (Bouakaz et Michel Escoffre 2024; Chowdhury et al. 2020 ; Deprez et al. 2021). Cela revient à multiplier la durée ou longueur de l'impulsion à la fréquence de répétition des impulsions (de Dreuille et al. 2004), la fréquence de répétition des impulsions est l'inverse de la période de répétition soit la durée de l'impulsion et de l'intervalle (Constantinesco 2007).

Lors de l'application d'une pression élevée, les impulsions courtes ont tendance à favoriser un comportement linéaire des MB. Les longs intervalles entre les impulsions permettent aux MB de revenir à leur état d'équilibre limitant les oscillations non linéaires et délivrant moins d'énergie acoustique. En revanche, avec un rapport cyclique plus long, la pression acoustique peut atteindre un niveau stable et l'énergie plus élevée délivrée peut provoquer des oscillations non linéaires des MB (Lin et al. 2017), induisant par exemple la diminution du processus de réparation des pores de la membrane et du taux de survie des cellules (Chowdhury et al. 2020).

Ce rapport cyclique peut varier de 0,25 à 50 % dans les différentes études d'administration de médicaments dans les tumeurs (Chowdhury et al. 2020).

IV.5.4 Durée d'exposition

Le temps d'exposition totale correspond à la durée pendant laquelle le tissu ciblé est soumis aux US. Pour une sono-perméabilisation optimale, la durée d'exposition doit être suffisamment longue pour garantir une administration complète des médicaments tout en minimisant les effets secondaires et les risques potentiels associés à la destruction des MB et dépend du choix des paramètres vus précédemment (Bouakaz et Michel Escoffre 2024; Chowdhury et al. 2020). Des temps d'exposition entre 10s et 30 minutes sont généralement utilisés lors de la délivrance de médicaments à l'aide de MB (Chowdhury et al. 2020) avec une durée recommandée de 1 à 5 minutes pour éviter les lésions tissulaires (Deprez et al. 2021). Ce temps correspond également à la durée de vie des MB dans le sang.

Le lien et l'interaction entre tous ces paramètres sont cruciaux et soulignent la nécessité d'une approche et ajustement globale pour atteindre à la fois l'efficacité et la sécurité dans les applications thérapeutiques (Bouakaz et Michel Escoffre 2024).

IV.6 ESSAIS CLINIQUES

Au cours des vingt dernières années, un grand nombre d'études *in vitro* et précliniques ont été menées. Une recherche dans PubMed a été effectuée en utilisant les mots-clés « therapeutic ultrasound », « preclinical » et « clinical », révélant du nombre croissant de publications, témoignant de l'intérêt de la communauté scientifique pour les ultrasons thérapeutiques (**Figure 30**).

Une sélection des travaux les plus pertinents dans le cadre de cette thèse a été effectuée et sera présentée dans les chapitres suivants. Tous ces essais ont conduit progressivement à la mise en place de plusieurs essais cliniques. Il paraît néanmoins important dans ce chapitre introductif de présenter les essais cliniques mis en place depuis 10 ans sur la technique des ultrasons en conjonction avec les microbulles (USMB) démontrant le potentiel de cette méthode adjuvante pour différentes applications thérapeutiques (**Figure 31**) et ouvrant la voie vers l'espoir d'un traitement clinique standardisé.

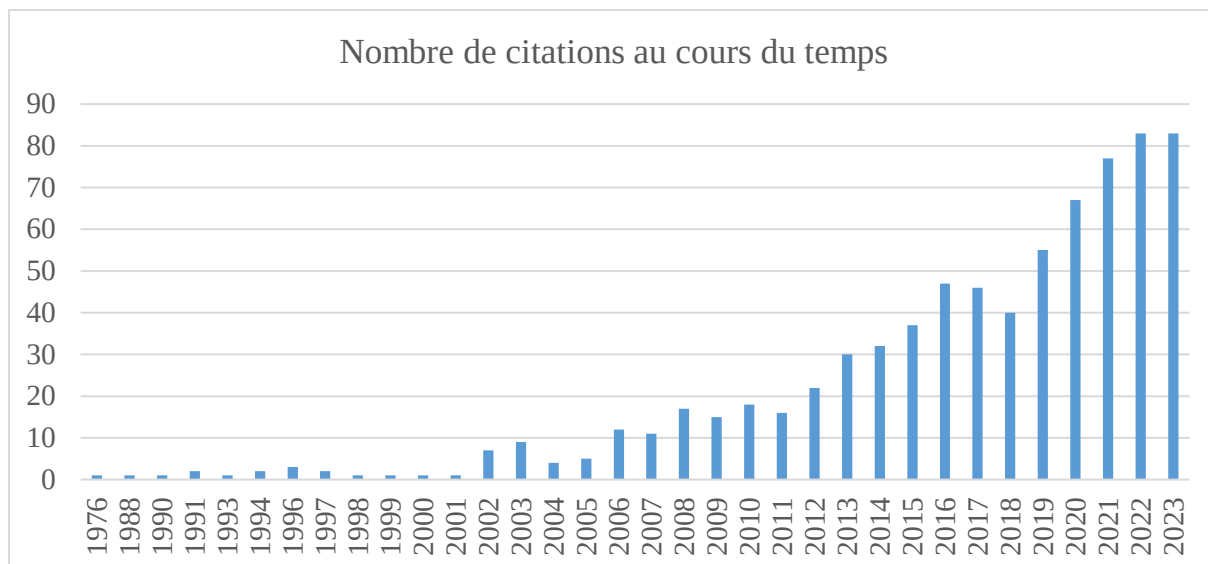


Figure 30 : Expansion des Publications sur les Ultrasons Thérapeutiques : Analyse des Études In Vitro et Précliniques

Nombre de sites de recherche travaillant sur la thématique au stade clinique

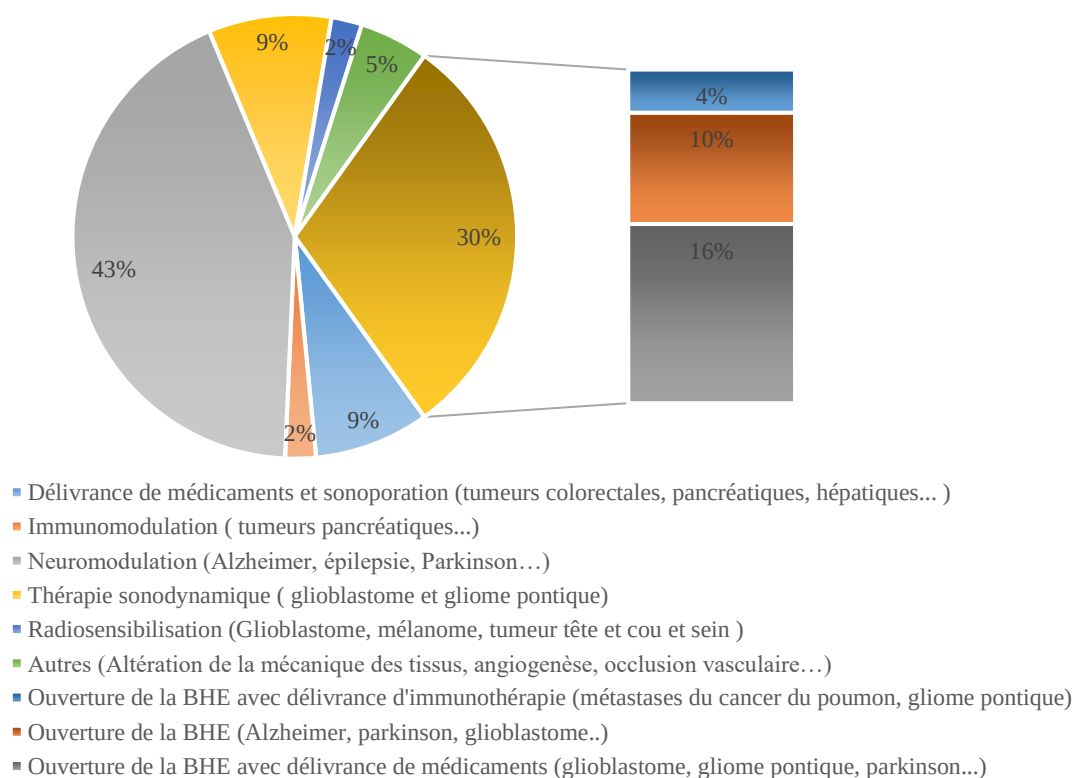


Figure 31 : Proportion des sites de recherche selon la thématique des effets biologiques non thermiques des ultrasons thérapeutiques au stade clinique (White et al. 2024)

Depuis ces dernières années, la tolérance, l'efficacité, la faisabilité et la sécurité de la thérapie par US sont des thématiques majoritairement étudiées dans de nombreuses applications allant de l'oncologie aux maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives. Les essais cliniques font alors appel à des MB approuvés cliniquement (par exemple, SonoVue®, Definity®, Sonazoid®, , Optison®) et à des scanners US et aux sondes disponibles sur le marché ou modifiées pour l'application désirée (Lin et al. 2017).

Tableau 9 : Liste représentative mais non exhaustive des essais cliniques sur les applications basées sur les effets non thermiques des ultrasons thérapeutiques au cours des 10 dernières années

Etude	Année	Numéro NCT	Type de pathologie	Type de traitement	MB	Scanners/ Sondes US
Phase 1 Terminé	2012 – 2015	NCT01674556	Cancer du pancréas	Chimiothérapie	SonoVue®	Non renseigné
Phase 2 Terminé	2020 - 2022	NCT04146441 (Lafond et al. 2022)	Adénocarcinome canalaire pancréatique inopérable	Chimiothérapie	SonoVue®	Non renseigné
Phase 1 et 2 Recrutement	2021	NCT04821284 (Posey et al. 2023)	Adénocarcinome canalaire pancréatique localement avancé ou métastatique	Chimiothérapie	Sonazoid®	Non renseigné
Phase 1 et 2 Statut inconnu	2014	NCT02233205 (Y. Wang et al. 2018)	Tumeurs malignes des métastases hépatiques des tumeurs gastro-intestinales et du carcinome pancréatique	Chimiothérapie	SonoVue®	Non renseigné
Phase 1 et 2 Terminé	2018 - 2022	NCT03477019	Carcinome colorectal et du sein avec métastases hépatiques	Chimiothérapie	SonoVue®	Échographe et sonde approuvés cliniquement
SONCHIMIO Phase 2 Terminé	2019 - 2022	NCT03458975	Métastases hépatiques de cancer colorectal	Chimiothérapie	SonoVue®	Echographe clinique
Phase 2 En cours	2017	NCT03199274 (Eisenbrey et al. 2021)	Cancer du foie	Radioembolisation	Perflutren Protein-Type A Microspheres	Non renseigné
Phase	2022	NCT06158217	Cancer du sein	Hemoperfus	SonoVue®	Non

Etude	Année	Numéro NCT	Type de pathologie	Type de traitement	MB	Scanners/ Sondes US
observat ionnelle En recrutem ent			invasive	ion		renseigné
Phase1 Termine	2020 - 2023	NCT04431674	Cancer du sein localement avancé et au niveau de la paroi	Radiothérapi e externe	Definity®	Non renseigné
Phase 2 En attente de recrutem ent	2024	NCT06185972	Cancer du sein localement avancé et au niveau de la paroi	Radiothérapi e externe	Definity®	Sonalleve Focused Ultrasound Dev
Phase 3 En recrutem ent	2022	NCT05317858	Métastases cérébrales du cancer du poumon non à petites cellules	Immunothér apie	Definity®	Exablate Model 4000 Type 2.0/2.1
Phase 1 En recrutem ent	2020	NCT04431648	Cancer tête et cou	Radiothérapi e externe	Definity®	Sonalleve Focused Ultrasound Device
Phase 1 et 2 Terminé	2014 - 2018	NCT02253212 (Idbaih et al. 2019)	Glioblastome	Chimiothéra pie	SonoVue®	SonoCloud
Phase 1 et 2 Terminé	2019 - 2022	NCT03744026 (Carpentier et al. 2024)	Glioblastome	Chimiothéra pie	Agents de contraste	SonoCloud -9
Phases 1 et 2 Recrute ment	2020	NCT04528680 (Sonabend et al. 2023)	Glioblastome	Chimiothéra pie	Definity®	SonoCloud -9
Phase 3 En attente	2024	NCT06496971	Glioblastome	Chimiothéra pie	SonoVue®	NaviFUS System

Etude	Année	Numéro NCT	Type de pathologie	Type de traitement	MB	Scanners/ Sondes US
de recrutement						
Phase 1 et 2 En attente de recrutement	2024	NCT06329570	Glioblastome	Chimiothérapie	Lumason®	NaviFUS System
Phase 2 Terminé	2020 – 2023	NCT04446416 (K.-C. Wei 2023)	Glioblastome	Chimiothérapie	SonoVue®	NaviFUS System
Phase 1 et 2 En cours	2020	NCT04440358	Glioblastome	Carboplatin Monothérapie	MB ou perflutren	Exablate Neuro Model 4000 Type 2 system
Phase 1 et 2 En recrutement	2023	NCT05630209	Gliome diffus	Chimiothérapie	Definity®	Exablate Model 4000 Type 2.0/2.1
BOREAL1 Phase 1 et 2 Terminé	2017 - 2020	NCT03119961 (Epelbaum et al. 2022)	Alzheimer	Evaluation TEP-IRM	SonoVue®	SONOCLOUD Dispositif implantable
Phase I En cours	2020	NCT04118764 (Y. Meng et al. 2023)	Alzheimer	Evaluation TEP-IRM	Definity®	Transducteur d'ultrasons focalisés à élément unique guidé par la neuronavigation
Phase 2 Terminé	2012-2015	NCT01678495	AVC ischémique aigu	Traitement thrombolytique	SonoVue®	Non renseigné

Etude	Année	Numéro NCT	Type de pathologie	Type de traitement	MB	Scanners/ Sondes US
Phase observationnelle Terminé	2014 - 2020	NCT02410330	Maladie coronarienne aiguë	Sonothrombolyse	Definity®	Non renseigné
Phase 1 Terminé	2018 - 2023	NCT02170103	Infarctus du Myocarde	Récupération microvasculaire	Definity® Optison™	Non renseigné

Le plus grand nombre d'essais combinant US focalisés (FUS) et MB (**Tableau 9**) porte sur l'ouverture temporaire de la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour le traitement du glioblastome (récurent ou nouvellement diagnostiqué) ou de gliome de haut grade via une thérapie médicamenteuse majoritairement chimiothérapique (NCT06496971, NCT06329570, NCT04446416, NCT05762419, NCT05630209) mais également pour le traitement des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (NCT03608553) ou d'Alzheimer (NCT03119961, NCT04118764).

Lors de la mise en place de la plupart des études cliniques des dispositifs médicaux thérapeutiques innovants utilisant les FUS ont vu le jour dans le but de permettre la délivrance des agents thérapeutiques à travers cette BHE dont le rôle est de contrôler les échanges dans le cerveau empêchant le passage des médicaments, ce qui explique l'échec thérapeutique pour les maladies cérébrales. Initialement développé pour l'ablation thermique dans le cerveau, le dispositif ExAblate Neuro 4000 (InSightec) est un système utilisant des FUS guidés par résonance magnétique (MRgFUS) destiné au ciblage de noyaux spécifiques du cerveau (thalamus, sous thalamus, pallidum) (Hughes, Khan, et Alkins 2023; Jameel et al. 2021; Tw s. d.). Ce dispositif a été approuvé en 2016 par la FDA pour traiter notamment les tremblements chez des patients atteints de la maladie de Parkinson âgés d'au moins 22 ans suite aux résultats de l'étude UNSOM (Tw s. d.). La version *ExAblate Neuro 4000 system type 2.0* dispose d'une sonde à 220 kHz utilisée pour l'ouverture de la BHE chez l'Homme. Le dispositif NaviFUS (NaviFUS) est un système qui se repose sur la neuronavigation pour guider les FUS de faible intensité à travers le crâne jusqu'aux régions prédéterminées du système nerveux central, sans intervention chirurgicale et en temps réel. Il a reçu récemment l'approbation de la FDA pour une étude pilote de faisabilité pour ouvrir la BHE chez les patients atteints de glioblastome récurrent qui seront traités par chimiothérapie à la suite des résultats d'un premier essai clinique (NCT 03626896) (K.-T. Chen et al. 2020). Delsona Therapeutics est une récente compagnie américaine proposant un dispositif FUS neuronavigué issu de l'université de Columbia, actuellement testé dans un premier essai clinique des patients atteints de gliome médian diffus (Parekh et al. 2023). Enfin le SonoCloud-1® et le SonoCloud-9® (CarThera) sont deux dispositifs implantables au niveau d'une fenêtre de la boîte crânienne conçus pour ouvrir la BHE à l'aide

d'ultrasons pulsés de faible intensité, avant ou après injection d'agents chimiothérapeutiques indiqués pour un glioblastome récurrent (Carpentier et al. 2024).

En outre, l'exploration de la délivrance d'agents chimiothérapeutiques par USMB s'étend à d'autres types de cancers que le glioblastome.

L'une des premières études cliniques de sono-perméabilisation à l'aide d'une sonde à ultrasons disponible en clinique a été réalisée en 2013 chez des patients atteints d'adénocarcinome canalaire pancréatique à l'hôpital universitaire de Haukeland, en Norvège (Dimcevski et al. 2016). Cet essai visait à évaluer la tolérance et le potentiel thérapeutique des USMB sur l'administration de la gemcitabine afin d'améliorer la qualité de vie des patients et de prolonger la survie globale de ces patients. Les données ont montré une diminution de la taille tumorale caractérisées selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) qui sont un ensemble de règles standardisées se basant principalement sur la mesure de la taille des lésions tumorales pour évaluer l'efficacité des traitements anticancéreux. De plus, aucun effet indésirable grave n'a été observé par rapport au traitement à la gemcitabine seule. (Castle, Kotopoulis, et Forsberg 2020 ; Kotopoulis et al. 2013, 2014). Ces résultats encourageants ont permis de rendre possible la perspective de développer des sondes endoscopiques à double fréquence pour des fins de sono-perméabilisation et donc de thérapie guidée par imagerie (Karzova et al. 2021 ; Wharton et al. 2007).

Récemment, une étude de faisabilité (Lee et al. 2023) a été publiée dans le but d'investiguer la sécurité et l'efficacité du traitement combinant les FUS et chimiothérapie (nab-paclitaxel plus gemcitabine) pour les patients atteints d'un cancer du pancréas non résécable. Les résultats ont montré une diminution de la taille de la tumeur, une modification partielle de la réponse tumorale et une augmentation de la survie. Aucun effet indésirable du dispositif ou toxicité limitant la dose n'est apparu chez aucun des participants pour les paramètres utilisés qui le seront pour d'autres études ultérieures.

Des études similaires sur l'administration de chimiothérapie standard et chimiothérapie néoadjuvante à l'aide d'USMB sont en cours respectivement chez des patients atteints de métastases hépatiques du cancer colorectal et du cancer du sein primaire précoce (NCT03458975 et NCT03385200).

Une étude de preuve de concept portant sur le traitement des métastases hépatiques non résécables (NCT03458975) a été mise en place à l'hôpital de Tours et ayant pour objectif de démontrer la faisabilité d'une sonde d'imagerie et thérapeutique développée avec un protocole thérapeutique avec des patients éligibles aux anticorps monoclonaux en combinaison avec la chimiothérapie. Une sonde ultrasonore 1,5-D dédiée a été développée et interconnectée à une plateforme d'imagerie Aixplorer modifiée (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) (Escoffre et al. 2022). Aucun résultat sur ce projet n'a été communiqué à ce jour.

L'étude de l'effet de la sono-perméabilisation dans le cancer du sein humain HER2-négatif (NCT03385200, Université RWTH d'Aix-la-Chapelle, Allemagne) compare la régression tumorale entre deux groupes de patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante sans et avec USMB (B. Zhou et al. 2022).

Seuls quelques essais ont publié leurs résultats montrant d'ores et déjà que l'administration de chimiothérapies approuvées cliniquement est faisable et compatible avec les procédures cliniques.

Bien que la majorité des études de délivrance par sono-perméabilisation combine la chimiothérapie et les USMB, des essais sont également menés sur des patients atteints de cancer du poumon à petites cellules ((NCT05317858) et de cancer de la prostate traités avec des immunothérapies (Sharma et al. 2023).

Les propriétés uniques de l'USMB permettent un large éventail d'applications dans le cadre clinique avec des thérapies anticancéreuses standardisées telles que la radiothérapie externe, radioembolisation ou les thérapies cardiovasculaires telles que la sonothrombolyse (Sharma, Leong, et Czarnota 2022). La sonothrombolyse a été l'une des premières applications thérapeutiques à base d'USMB dont les essais ont été pour les accidents vasculaires cérébraux ischémiques aigus ou sont actuellement en cours dans le traitement de l'infarctus du myocarde aigu. Les US et les MB se sont révélés être une alternative thérapeutique viable qui favorise la dissolution des caillots sanguins calcifiés (A. N. Thomas et Stride 2020).

L'association de l'effet des rayonnements ionisants avec les USMB a été évaluée chez des patients atteints de tumeurs de la tête et du cou (NCT04431648) par radiothérapie externe, de tumeurs de la paroi thoracique et de tumeurs localement avancées tel que carcinome hépatocellulaire par radioembolisation transartérielle (NCT04431648). Aucune altération de la fonction hépatique n'a été observée avec l'ajout de traitements USMB aux protocoles d'irradiation existants afin d'améliorer l'effet curatif. Une plus grande réponse tumorale a été observée, suggérant que l'USMB est un radiosensibilisateur potentiel (Sharma et al. 2023).

L'état de l'art des essais cliniques actuels sur l'impact des USMB ont montré des résultats bien plus qu'encourageants en termes de sécurité, de faisabilité et d'efficacité dans le cadre d'applications thérapeutiques dont les protocoles nécessitent d'être toutefois optimisés pour des études à plus long terme. En raison de ces avancées, l'utilisation des USMB à d'autres stratégies est envisagée pouvant s'étendre au-delà des traitements conventionnels, en particulier la RIV qui constitue à elle seule une innovation thérapeutique en plein essor.

V. OBJECTIFS DE THESE

Compte tenu des limites inhérentes aux approches thérapeutiques conventionnelles (par exemple les effets secondaires indésirables, toxicité non spécifique, nature hétérogène et complexe de l'environnement tumoral dont le réseau vasculaire), les USMB représentent une approche prometteuse pour surmonter les difficultés associées à la RIV en augmentant localement l'accumulation du radiopharmaceutique au sein de la tumeur afin de diminuer sa concentration dans la circulation. À ce jour, aucune étude combinant la RIV et les USMB dans le contexte de la lutte contre le cancer de la prostate n'a encore été évaluée et en particulier avec le [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

L'enjeu de la thèse est d'améliorer la délivrance du radiomédicament par sono-perméabilisation pour le traitement par RIV des tumeurs prostatiques, en maintenant la concentration de médicaments à une dose thérapeutique pour une efficacité et ciblage optimale afin de réduire la dose injectée et la toxicité liée à la RIV

Le travail de ma thèse se divise en trois grands axes : (i) Développement méthodologique *in vitro* de validation des séquences ultrasonores ; (ii) Etude de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution d'un traceur à usage diagnostique dans un modèle préclinique murin du cancer de la prostate ; (iii) Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la sono-perméabilisation combinée avec le traceur thérapeutique.

(i) Développement méthodologique : L'objectif de ce premier axe est de développer et valider *in vitro* les séquences US. Les paramètres tels que la fréquence, l'amplitude, le rapport cyclique ou encore la durée d'exposition seront ajustés afin d'obtenir la meilleure efficacité thérapeutique. La méthode sera validée sur des cellules humaines cancéreuses (LNCaP).

(ii) Etude de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution et la pharmacocinétique d'un radiopharmaceutique à usage diagnostique dans un modèle préclinique du cancer de la prostate : Il s'agira de développer dans un premier temps un modèle de prostate sous cutané et de caractériser la vascularisation par échographie de contraste corrélée avec une analyse en immunohistologie de la densité vasculaire. La pharmacocinétique et la biodistribution seront ainsi réalisées en imagerie TEP. Le deuxième axe du projet de thèse permettra de valider, suite à l'évaluation de la biodistribution du traceur, l'intérêt thérapeutique que pourront apporter les ultrasons associés aux microbulles (augmentation de la dose dans les tissus tumoraux et diminution dans les tissus sains).

(iii) Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la sono-perméabilisation combinée avec du ^{177}Lu Dotatate : L'objectif de la troisième partie est ainsi de comparer l'effet de la diminution de la posologie au niveau des tissus tumoraux et des tissus sains du ^{177}Lu Dotatate dans le modèle préclinique du cancer de la prostate, notamment en évaluant la présence de dommages au niveau de ces tissus.

Le développement de cette stratégie innovante permettra de répondre aux questions cruciales de la diminution de la radiotoxicité sur les organes sains pour aller vers une médecine du futur personnalisée et moins délétère pour une meilleure prise en charge du patient.

CHAPITRE 2 : EVALUATION *IN VITRO* DE LA DELIVRANCE DE MOLECULES THERAPEUTIQUES PAR ULTRASONNS DANS LE CANCER DE LA PROSTATE

I. INTRODUCTION.....	115
II. CHALLENGES ET ETUDES <i>IN VITRO</i> ET PRECLINIQUES.....	115
II.1 PARAMETRES ULTRASONORES.....	115
II.2 SYSTEME ULTRASONORE.....	122
II.2.1 Montage.....	122
II.2.2 Calibration du transducteur et caractérisation du champ acoustique.....	122
III. ETUDE DE L'EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE D'UN MODELE CELLULAIRE EPITHELIALE EN MONOCOUCHE.....	124
III.1 MATERIEL ET METHODES.....	125
III.1.1 Système de culture (modèle inserts).....	125
III.1.1.1 Filtre.....	126
III.1.1.2 Taille de la porosité.....	126
III.1.2 Modél cellulaire.....	129
III.1.2.1 Culture cellulaire.....	131
III.1.3 Etude TEER.....	131
III.1.4 Etude de la perméabilité.....	133
III.1.4.1 Radiopharmaceutique à base de PSMA.....	133
III.1.4.1.1 Radiosynthèse.....	133
III.1.4.2 Coefficient de perméabilité.....	136
III.1.5 Analyse statistique.....	137
III.2 RESULTATS.....	138
III.2.1 Effet de la sono-perméabilisation dans un modèle <i>in vitro</i> en monocouche.....	138
III.2.1.1 Etude TEER.....	138
III.2.1.1.1 Génération et caractérisation fonctionnelle du modèle.....	138
III.2.1.1.2 Effet sur la résistance et la perméabilité de la monocouche cellulaire.....	138
III.2.1.2 Coefficient de perméabilité.....	141
III.2.1.2.1 Sélection de notre molécule.....	141
III.2.1.2.2 Effet de l'USMB sur la perméabilité moléculaire à travers une barrière épithéliale.....	143
III.3 DISCUSSION.....	144
IV. ETUDE DE L'EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE D'UN MODELE DE TUMEUR	

PROSTATIQUE EN SUSPENSION	148
IV.1 MATERIEL ET METHODES	148
IV.1.1 Dispositif d'étude	148
IV.1.2 Modèle cellulaire tumorale prostatique	149
IV.1.3 Evaluation de l'efficacité de la sono-perméabilisation	151
IV.1.3.1 Etude en cytométrie en flux	152
IV.1.3.2 Etude de viabilité cellulaire	153
IV.1.3.3 Analyse statistique	155
IV.2 RESULTATS	155
IV.2.1 Effet de la sono-perméabilisation dans un modèle in vitro en suspension	155
IV.2.1.1 Analyse de la perméabilité cellulaire à part d'un cytométrie en flux	155
IV.2.1.2 Effet des USMB sur la viabilité cellulaire	162
IV.3 DISCUSSION	164
V. CONCLUSION.....	167

I. INTRODUCTION

L'application de la sono-perméabilisation dans le cadre du cancer de la prostate et son transfert vers la RIV nécessite une évaluation minutieuse en termes d'efficacité thérapeutique et de sécurité avec les risques et effets secondaires potentiels pour le patient. Et cela commence par le développement et l'optimisation de protocoles des paramètres ultrasonores dont l'évaluation débutera par le suivi des effets biologiques sur la cellule avant de déterminer l'effet sur un milieu plus complexe comportant la barrière endothéliale et la tumeur. La première approche au niveau cellulaire est réalisée via une étude *in vitro* avant de passer à des études *in vivo* représentant un milieu plus complexe. L'étude *in vitro* qui fait l'objet de ce chapitre permet plus précisément de comprendre les interactions entre le comportement des microbulles induites par l'exposition aux ultrasons et les cellules, ce qui est une condition essentielle en vue d'une application préclinique et clinique prévisible contrôlée et efficace.

Dans ce contexte, plusieurs notions clés seront abordées : les défis associés aux études *in vitro* et précliniques, en particulier les paramètres ultrasonores ; le système ultrasonore, incluant le montage et la calibration du transducteur et l'étude de l'effet des USMB sur la perméabilité d'un modèle cellulaire épithélial en monocouche, qui englobera les matériaux et méthodes, l'évaluation de la résistance électrique transépithéliale (TEER), ainsi que l'étude de la perméabilité. Enfin, une attention particulière sera portée à l'étude de l'effet des USMB sur la perméabilité d'un modèle de tumeur prostatique en suspension, avec un détail sur les matériaux et méthodes, le modèle cellulaire étudié, ainsi que l'analyse de la sono-perméabilisation par cytométrie en flux (CMF).

II. CHALLENGES ET ETUDES *IN VITRO* ET PRECLINIQUES

II.1 PARAMETRES ULTRASONORES

Dans le processus de développement de la sono-perméabilisation comme stratégie thérapeutique, le premier défi est la sélection des paramètres ultrasonores optimaux qui sont une composante principale influençant de manière significative les interactions entre les MB et les cellules, ainsi que les mécanismes d'administration des médicaments pour obtenir la réponse thérapeutique souhaitée.

La plupart des études *in vitro* et précliniques de sono-perméabilisation actuelles est associée à la thérapie génique (Y. S. Li et al. 2009b), la délivrance de médicaments chimio-thérapeutiques (Kotopoulis et al. 2014) dont les propriétés physiques et chimiques sont différentes de celles de la RIV par la structure chimique de la molécule ou plateforme vectrice de la thérapie.

Un état de l'art a été réalisé, en se limitant et en prenant en compte d'une part exclusivement des études *in vitro* et *in vivo* dont la thérapie associée pouvait se rapprocher au mieux des caractéristiques de la RIV, et d'autres part des études portant sur des modèles *in vitro* de lignées cellulaires cancéreuses

prostatiques et des modèles précliniques de tumeurs prostatiques en combinaison avec des microbulles SonoVue® (Bracco) disponibles en clinique en France. Les paramètres ultrasonores de ces études sont résumés dans les **Tableau 10** et

Tableau 11.

Tableau 10 : : Résumé des paramètres ultrasonores et de leurs effets thérapeutiques dans les études in vitro et in vivo, axées sur la sono-perméabilisation combinée à des thérapies proches de la RIV. Les critères d'éligibilité ont consisté à sélectionner des recherches portant sur cette approche thérapeutique, en s'appuyant principalement sur PubMed

Référence Année	Thérapie associée	Lignées cellulaires /modèle prostatiques	Microbulles	Paramètres Ultrasonores	Résultats/Effets
(van Wamel et al. 2004)	Radionucléide ([¹¹¹ In]In-DOTA-Tyr3-oc-treotate)	Lignée cellulaire de tumeur pancréatique de rat CA20948 (<i>In vitro</i>)	Référence non précisée (Ratio de 10 bulles pour 1 cellule)	1 MHz ; 0,42 MPa ; 0,42 IM 0,013% rapport cyclique ; temps d'impulsion de 10 µs ; 60 minutes d'exposition	Internalisation du radionucléide 160 % plus élevée pour les cellules tumorales traitées conjointement avec des ultrasons et des microbulles de contraste des cellules non traitées
(Lammer-tink et al. 2016)	Chimiothérapie (cisplatine) et radiothérapie externe	Cellules de carcinome squameux du pharynx humain (FaDu) (<i>In vitro</i>)	SonoVue 700 µL (7% v/v)	1,5 MHz Rapport cyclique de 10% 1 kHz de fréquence de répétition impulsion de 100 µs 845 kPa 0,7 (IM) 5 secondes d'exposition	Absorption du cisplatine a été significativement augmentée (2,7 plus élevé) par l'USMB, ce qui a entraîné des niveaux accrus de dommages à l'ADN et une efficacité accrue du cisplatine en combinaison avec la radiothérapie in vitro.
(E. Thomas et al. 2019)	Chimio-radiothérapie	Cellules humaines de cancer du sein à forte (MDA-MB-468) et faible (MCF7) expression d'EGFR (<i>In vitro</i>)	SonoVue	1,1 MHz 2 MPa 3,000 cycles 45 secondes d'exposition	Spécificité et cytotoxicité de l' ¹¹¹ In-EGF-LP-Dox pour les cellules cancéreuses surexprimant l'EGFR. Extravasation des liposomes augmentée dans

Référence Année	Thérapie associée	Lignées cellulaires /modèle prostatiques	Microbulles	Paramètres Ultrasonores	Résultats/Effets
		Fantômes de vaisseaux sanguins (<i>In vitro</i>)			un modèle de fantôme de gel in vitro
		Souris femelles nude (MDA-MB-468 xéno-greffes) (<i>In vivo</i>)		1 MHz 2 MPa 3,000 cycles 3,3 Hz 2 minutes d'exposition	Augmentation de l'absorption tumorale de 66 % malgré la faible vascularisation des xéno-greffes MDA-MB-468
(Owen et al. 2020)	Thérapie ciblée par radionucléide ([¹¹¹ In]In-HEGF))	Cellules humaines de cancer du sein à forte (MDA-MB-468) et faible (MCF7) expression d'EGFR (<i>In vitro</i>)	SonoVue	1,0 MHz 1 MPa (pic de pression de raréfaction (moyenne spatiale)) Longueur d'impulsion de 3 ms, période de répétition des impulsions de 10 ms Durée d'exposition totale de 20 s	Cytotoxicité spécifique des cellules surexprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), avec une réduction de plus de 99 % de la survie des colonies par rapport aux témoins.
		Souris femelles nude athymique et SCID (xéno-greffes MDA-MB-468 et MCF7) (<i>In vivo</i>)	SonoVue	1MHz 1 MPa Rapport cyclique de 30 % Période de répétition des impulsions de 10 ms 5 minutes d'exposition	Augmentation par 2 de l'absorption tumorale de [¹¹¹ In]In-HEGF)
(Schultz et al. 2021)	Chimiothérapie (Gemcitabine et paclitaxel)	Souris NOD-scid IL2Rgnull males et athymique femelles (xéno-greffes sous-utanée de cellules MIA PaCa-2)	Definity®, SonoVue®, Optison™ Sonazoid™ (1.2–3.0 × 10 ⁸ bulles/ml	2 MHz 60 et 200 mW/cm ² 550–650 et 165–195 kPa Impulsion de 20 μs	Diminution du volume tumoral et augmentation des caractéristiques de la vascularisation.

Référence Année	Thérapie associée	Lignées cellulaires /modèle prostatiques	Microbulles	Paramètres Ultrasonores	Résultats/Effets
		(In vivo)			Sonazoid était l'agent de contraste le plus efficace pour diminuer le volume tumoral et augmenter la vascularisation.

Tableau 11 : Résumé des paramètres ultrasonores et de leurs effets thérapeutiques dans les études in vitro et in vivo, axées sur la sono-perméabilisation appliquées à des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques et des modèles précliniques de tumeurs prostatiques Les critères d'éligibilité ont consisté à sélectionner des recherches portant sur cette approche thérapeutique, en s'appuyant principalement sur PubMed

Référence Année	Thérapie associée	Lignées cellulaires /modèle prostatiques	Microbulles	Paramètres Ultrasonores	Résultats/Effets
(WANG et al. 2013)	Chimiothérapie (Mitoxantrone)	DU145 (In vitro)	SonoVue (100 µL)	21 kHz 0.113 W/cm ² 70% rapport cyclique 2 minutes d'exposition	Pas de modification de la viabilité des cellules à court ou à long terme Renforcement des effets thérapeutiques avec une augmentation de la perméabilisation cellulaire pour les cellules exposées aux ultrasons avec injection des microbulles
(Y. H. Li et al. 2013)	Thérapie génique plasmide avec d promoteur chimérique HTERT/CMV pour induction apoptose)	22RV1 RWPE-1 (In vitro)	SonoVue (50 µL)	1 MHz 0.8 W/cm ² 20% rapport cyclique	Effet significatif des liposomes sur la transfection des gènes dans les cellules 22RV1, alors que l'UTMD seul n'a joué qu'un faible rôle dans l'augmentation de l'efficacité de la transfection des gènes.
		Souris Nude femelles Balb/c (xéno-greffes) (In vivo)	SonoVue (25 µL)	1 minute (temps exposition)	

<i>Référence Année</i>	<i>Thérapie associée</i>	<i>Lignées cel- lulaires /mo- dèle prosta- tiques</i>	<i>Micro- bulles</i>	<i>Paramètres Ultrasonores</i>	<i>Résultats/Effets</i>
(WANG et al. 2016)	Thérapie gé- nique (Gène p53)	PC3 (<i>In vitro</i>)	SonoVue (200 µL)	21 kHz 4,6 mW/cm ² Rapport cy- clique de 20% 5 minutes d ex- position	L'augmentation de l'efficacité de la transfec-tion et la réduc- tion des effets secondaires ont été difficiles à obtenir.
(Fagerland et al. 2020)	Chimiothéra- pie (Cabazitaxel)	Souris C57BL6 avec la mutation TRAMP (tu- meurs de prostate peu différenciées) (<i>In vivo</i>)	Sonovue (50 µL)	1,1 MHz 0,55 MPa IM 0,5 10 000 cycles 3 minutes	L'augmentation de l'efficacité de la transfection et la réduc- tion des effets secondaires ont été difficiles à obtenir
(Snipstad, Mørch, et al. 2021)	Chimiothéra- pie (Cabazitaxel)	Souris fe- melles nues balb/c (Xénogreffes de cellules PC3)	SonoVue (50µL)	1 MHz 10 ms de lon- gueur d'impul- sion (10,000 cycles) 0.5 MPa (0,5 IM) 0.25 Hz de fré- quence de répé- tition 0,25% rapport cyclique 15 minutes de temps d'expo- sition	Augmentation de l'absorption des nanoparticules directement après un traitement aux ultra- sons qui a duré plusieurs se- maines (augmentation de 2,3 × - 15,8 ×).
(Z. Meng et al. 2021)	Délivrance de nanoparti- cules à topo- logie de sur- face mimant celle des virus MVSN- IR825	Souris BALB/c (or- thotopique de cellules PC3) (<i>In vivo</i>)	SonoVue (50µL)	500 kHz Fréquence de repetition (0,001 kHz) 50 % rapport cyclique 500 ms (largeur de l'impulsion)	Efficacité moyenne de déli- vrance des nanoparticules dans le cancer de la prostate à 6,84% de la dose injectée
(Xia et al. 2021)	Chimiothéra- pie (Nab-pacli- taxel)	RM1 (<i>In vitro</i>)	SonoVue (50µL)	3 MHz 0,6 IM 2000 Hz (fré- quence de répé- tition)	Efficacité de la chimiothérapie attribuée à l'augmentation de la perméabilité cellulaire in- duite par cavitation

<i>Référence Année</i>	<i>Thérapie associée</i>	<i>Lignées cel- lulaires /mo- dèle prosta- tiques</i>	<i>Micro- bulles</i>	<i>Paramètres Ultrasonores</i>	<i>Résultats/Effets</i>
		Souris C57BL/6 (modèle or- thotopique)		Longueur de l'impulsion (26 cycles) 3 minutes d'ex- position	Inhibition significative de la croissance tumorale et prolongation de la survie des souris traités par chimiothérapie (nab- paclitaxel) combiné avec les USMB par rapport au groupe chimiothérapie seul.
(W. Zhang et al. 2022)	Thérapie gé- nique (pas- mide avec le gène de la protéine fluo- rescente verte pEGFP)	PC3 (<i>In vitro</i>)	SonoVue (200µL)	80 kHz 50 % rapport cyclique 150 mW/cm ² 5 minutes d'ex- position	Amélioration significative de l'efficacité de la transfection des gènes. Dans l'étude <i>in vitro</i> , les ultra- sons combinés aux microbulles ont entraîné la lyse des cellules et l'interruption de la continuité de la membrane cellulaire, et leur efficacité moyenne de transfection était de 9,9 %
		Souris nude (xénogreffes PC3) (<i>In vivo</i>)	SonoVue (250µL)	80 kHz 50 % rapport cyclique 3 W/cm ² 10 minutes d'exposition	

Ainsi, il est force de constater qu'il n'existe pas de consensus à proprement dit sur les paramètres ultrasonores, ce qui indique que chaque application nécessite sa propre séquence pour optimiser son efficacité. Toutefois, ces paramètres sont majoritairement limités à la fréquence, pression ou intensité, au rapport cyclique, durée d'exposition, volume de MB injecté.

Dans la plupart de ces études (Fan, Chen, et Deng 2014; Roovers et al. 2019 ; Telichko et al. 2021; Yoon, Yoon, et Lee 2015), la fréquence centrale des US de 1 MHz est choisie car elle se situe dans la plage des fréquences de résonance de la majorité des formulations de MB standard cliniques ($\pm 3 \mu\text{m}$ de taille) (Lu et al. 2022), ce qui garantit que les oscillations des MB sont maximales pendant le traitement USMB, bien que l'effet de cavitation peut être induit à partir des US de basse fréquence de 20 kHz (W. Zhang et al. 2022). De plus, le rapport cyclique suivi de la pression constitue les paramètres impactant significativement le comportement des MB.

En outre, trois régimes ultrasonores (Fan, Chen, et Deng 2014; Postema et al. 2004 ; Roovers et al. 2019) ont été étudiés à travers trois conditions ultrasonores (Figure 32) dont la nomenclature sera la suivante (**Tableau 12**) :

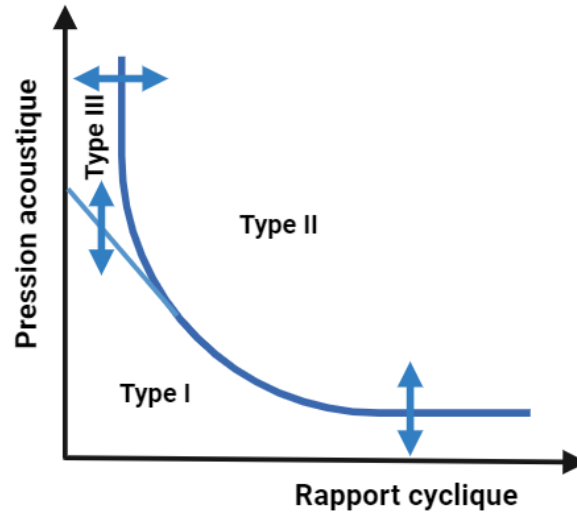


Figure 32 : Interaction des paramètres ultrasonores (pression acoustique et durée d'impulsion) dans la détermination des comportements des microbulles. La transition des comportements des bulles d'un type à un autre dépend des paramètres ultrasonores (Fan, Chen, et Deng 2014)

Tableau 12 : Choix des conditions ultrasonores réalisées avec microbulles

Conditions	Fréquence	Pression	Rapport cyclique
US1MB	1 MHz	200 kPa	50%
US2MB		500 kPa	30%
US3MB		800 kPa	10%

- US1MB : Le comportement de type I des MB correspond à une cavitation stable et à une agrégation des MB avec peu ou pas de destruction des bulles lorsque de longues durées d'impulsions ultrasonores à faibles pressions acoustiques sont utilisées ;
- US2MB : Le comportement de type II est caractérisé par une croissance et une coalescence significative des MB ainsi que par de grands mouvements de translation des bulles coalescentes. La coalescence est définie comme la fusion de deux ou plusieurs MB en collision ou en expansion sous l'effet des forces acoustiques. Ce phénomène est observé pour des impulsions à durée et pressions intermédiaires. Bien que ce régime se produit majoritairement en conditions de cavitation stable sans destruction brutale et immédiate des MB coalescentes ou fusionnées, il existe une transition vers la cavitation inertielle où la coalescence peut être considérée ;
- US3MB : Le comportement de type III est associé à la cavitation inertielle, caractérisée par des effondrements violents, la fragmentation des bulles provoquée par des courtes impulsions ultrasonores associées à de fortes pressions acoustique

II.2 SYSTEME ULTRASONORE

II.2.1 Montage

Les expériences ultrasonores pour les axes *in vitro* et *in vivo* ont été menées à l'aide d'un transducteur piézocomposite de puissance à élément unique non focalisé (plan de la surface active) de 16 mm de diamètre, avec une fréquence centrale de 1 MHz (Imasonic). Cet appareil est caractérisé pour une distance de champ proche (environ 30 mm, correspondant à la profondeur de focalisation naturelle de ce transducteur), une pression maximale de 1000 kPa (correspondant à une puissance acoustique d'environ 3 W/cm² à la surface du transducteur), une largeur de faisceau de 0,61D (D étant 16mm, l'ouverture de la sonde), la puissance acoustique au point focal calculée est de 16,19 W.

Une calibration a été réalisée, à l'aide d'un hydrophone et sera présenté dans la section suivante. Il est adapté électriquement à une impédance de 50 Ω , le signal électrique est généré par un générateur de fonctions (33210A, Keysight) connecté à un amplificateur RF de puissance (amplificateur RF de puissance 40 dB) puis transmis au transducteur.

II.2.2 Calibration du transducteur et caractérisation du champ acoustique

La caractérisation des champs acoustiques est nécessaire afin d'explorer et de valider expérimentalement les propriétés du faisceau acoustique pour un traitement ultrasonique précis.

Pour évaluer les performances du transducteur, des mesures des champs acoustiques ont été effectuées dans un réservoir d'eau fabriqué sur mesure et rempli d'eau déionisée et dégazée afin de minimiser la formation de bulles d'air et les échanges de gaz et éviter toute interférence avec les ondes ultrasonores.

Le transducteur a été placé sous le niveau de l'eau, à une position fixe, dans une structure étanche à travers une fenêtre ouverte sur le côté du réservoir d'eau, où la surface de la sonde était en contact avec l'eau.

A la sortie du transducteur, le signal sinusoïdal pulsé de 1 MHz, généré avec une tension variable (en volts) est mesuré par un hydrophone à capsule (HGL200 Onda) calibré .

Cet hydrophone, inséré dans un support en résine imprimé au laboratoire, a été monté sur une platine de balayage motorisée à trois axes (X, Y, Z) dont le déplacement était contrôlé par un logiciel (précision de 10 μ m, Image Guided Therapy) afin d'enregistrer la pression acoustique générée par le transducteur en différents points, le long des axes de balayage.

Le transducteur et l'hydrophone ont été positionnés et alignés selon leurs axes centraux respectifs et séparés initialement par une distance de 3 cm correspondant à la distance focale naturelle du transducteur. L'hydrophone a été déplacé sur une distance totale de 2 cm, le long de deux axes (Y et Z) pour déterminer précisément la zone focale de la sonde où la pression est la plus importante. Vingt

positions ont ainsi été enregistrées à 1 cm de part et d'autre de la région focale de la sonde avec un pas de 0,5 mm dans les deux directions Y et Z.

Les données traitées ont permis de déterminer la distribution spatiale de la pression acoustique et la distance du champ acoustique proche du transducteur. Les signaux acquis de l'hydrophone ont été observés sur un oscilloscope numérique (MSO série Tektronix) et envoyés à l'ordinateur pour l'analyse et le traitement des données avec le logiciel Matlab (Matlab Release 2020b, The MathWorks, Natick, MA).

Cette calibration a ainsi permis d'établir la corrélation entre la tension d'entrée appliquée au transducteur et la pression acoustique générée par celui-ci. Cette courbe a été réalisée en faisant varier les valeurs de tensions de 10 à 200 mVpp avec un pas de 10 mVpp. Les profils du faisceau sont illustrés sur la **Figure 33**.

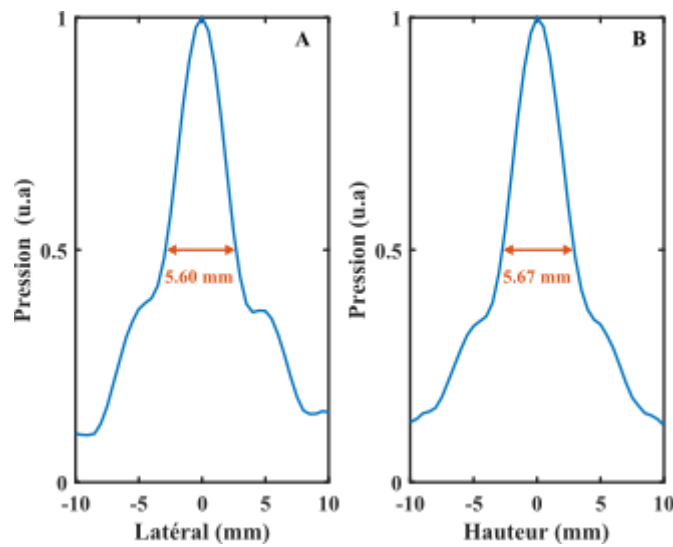


Figure 33: Profil du faisceau thérapeutique mesuré a) Scan latéral ; b) Scan en élévation

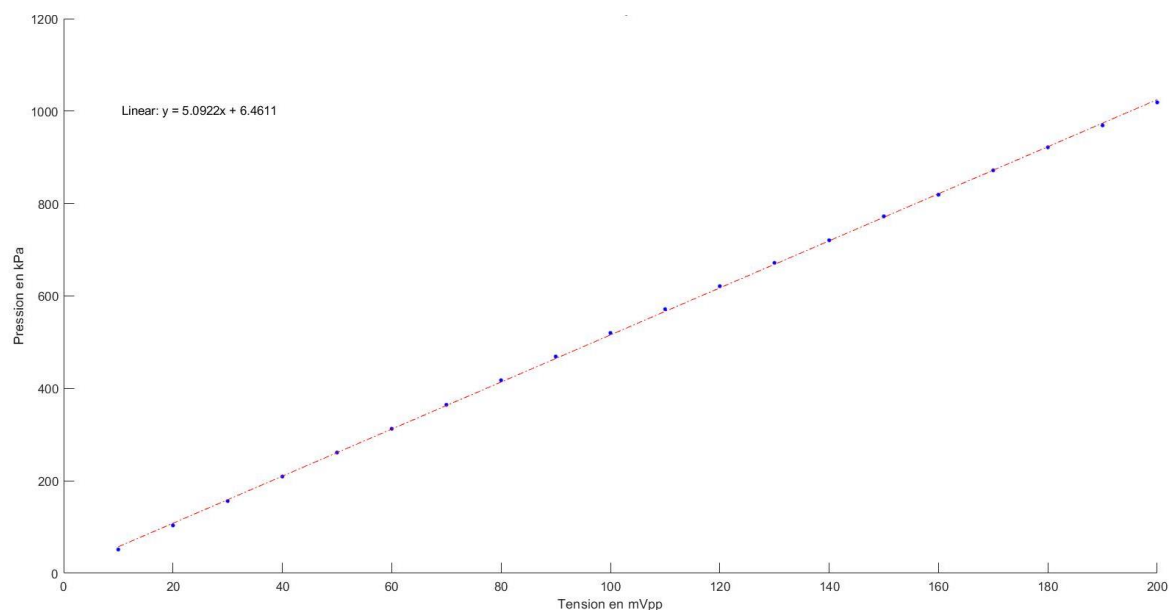


Figure 34 : Courbe de calibration montrant le pic de pression négative dans l'eau en fonction de la tension appliquée pour l'excitation de notre transducteur. Chaque mesure d'amplitude de pression acoustique, issue de 20 moyennages, a été réalisée avec un espacement de 0,5 mm dans les deux directions du plan étudié

Ainsi, la pression de raréfaction maximale appliquée pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo* sera déterminée en fonction de la tension appliquée (**Figure 34**).

III. ETUDE DE L'EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE D'UN MODELE CELLULAIRE EPITHELIALE EN MONOCOUCHE

Les barrières biologiques jouent un rôle essentiel dans la distribution des médicaments au sein de l'organisme, notamment en régulant le transport de l'eau et des substances dissoutes vers les tissus tumoraux. Ce transport s'effectue principalement par deux mécanismes : le transport paracellulaire où les molécules passent entre deux cellules adjacentes à travers des jonctions intercellulaires, et le transport transcellulaire, où les molécules pénètrent les bicouches lipidiques de la membrane plasmique par simple diffusion passive à travers des canaux ioniques ou par des mécanismes plus complexes, tels que la transcytose ou le transport médié par des récepteurs tels que les transporteurs d'anions/cations.

L'évaluation de la perméabilité est cruciale, car elle détermine dans quelle mesure un médicament peut franchir ces barrières pour atteindre ses cibles thérapeutiques. Une perméabilité insuffisante peut compromettre l'efficacité du traitement. Ainsi, comprendre et quantifier la perméabilité est essentiel pour anticiper le comportement du médicament *in vivo*.

Dans ce contexte, l'utilisation des USMB se révèle être une technique prometteuse permettant aux molécules thérapeutiques de traverser les barrières épithéliales. Parmi les effets induits par USMB

précédemment mentionnés, on retrouve une augmentation de la perméabilité paracellulaire résultant de la réorganisation des jonctions intercellulaires ; un renforcement de la perméation moléculaire à travers les membranes cellulaires et une accumulation intracellulaire, résultant de la formation de pores ou d'une endocytose améliorée.

Dans le cadre de cette étude, l'impact des USMB sur la perméabilité sera évaluée à travers un modèle expérimental largement utilisé dans les études de transport et de perméabilité des médicaments, celui des Transwells. Nous nous focaliserons sur les deux méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer l'intégrité de la barrière. La première est basée sur la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER), méthode non invasive et relativement facile à réaliser. Enfin l'efficacité du transport médiée USMB sera étudiée en utilisant un ligand le PSMA. Cette molécule préclinique développée au sein de notre laboratoire est particulièrement pertinente car elle s'inscrit dans un contexte d'optimisation par USMB de la délivrance de radiopharmaceutiques ciblant spécifiquement le PSMA.

III.1 MATERIEL ET METHODES

III.1.1 Système de culture (modèle inserts)

Le système Transwell (**Figure 35**) est un système statique 2D de culture perméable dans lequel une monocouche confluente de cellules avec des jonctions serrées peut être établie sur une membrane microporeuse montée sur un insert cylindrique, placé dans un puits d'une plaque multi-puits (Bol 2014; Puscas 2019). Ce dispositif permet de former et mimer une barrière avec deux compartiments distincts : le compartiment apical dans l'insert et le compartiment basolatéral correspondant au puit sous-jacent qui accueille l'insert. Ce dispositif favorise ainsi la différenciation des cellules épithéliales en culture en milieu liquide mais également la polarisation des cellules, ce qui rend ce système approprié pour l'étude de la perméabilité et le transport des substances à travers une couche cellulaire, ainsi que la modélisation des barrières biologiques telles que l'épithélium intestinal ou la BHE (Bol 2014; Scott, Neeley, et Granchelli s. d.) Scott, Neeley, et Granchelli 2013).

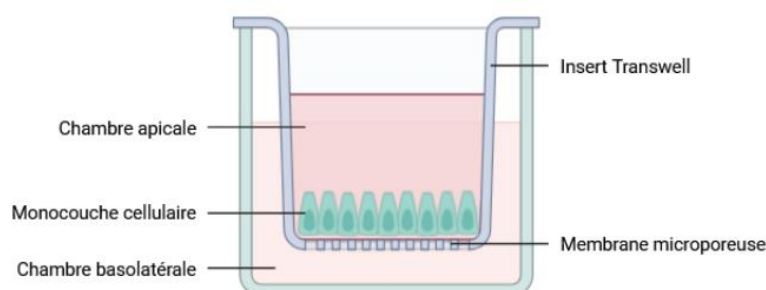


Figure 35 : Schéma d'un insert de Transwell. Ce dispositif se compose d'une chambre apicale et d'une chambre basolatérale, séparées par une membrane microporeuse, permettant d'étudier la migration et la perméabilité d'une monocouche cellulaire.

Avec autant d'applications différentes pour les inserts, il existe plusieurs types de matériaux couramment utilisés (polycarbonate (PC), polyéthylène téréphtalate (PET) et polytétrafluoroéthylène (PTFE)) et diverses tailles de pores pour les membranes poreuses.

III.1.1.1 Filtre

Trois caractéristiques sont prioritaires lors du choix du matériau du filtre ou membrane de l'insert (**Tableau 13**) : le potentiel d'attachement cellulaire, la qualité d'imagerie par fluorescence et l'adéquation aux tests de barrière cellulaire (Scott, Neeley, et Granchelli 2013).

Pour notre étude, le choix s'est porté sur les membranes en PC présentant d'une part les meilleures propriétés d'attachement cellulaire favorisant l'adhésion des cellules et d'autre part une densité élevée de pores pour permettre plus d'échanges à travers la membrane. Les membranes en PC offrent également un avantage pour les tests de barrière en maintenant des valeurs de TEER (résistance électrique transépithéliale) constantes sur une plus longue période (Scott, Neeley, et Granchelli 2013). Ce test sera décrit plus en détails dans la suite du chapitre.

Ainsi, les inserts PC sont particulièrement adaptés aux études de transport et aux applications nécessitant une croissance cellulaire optimale. En revanche, les membranes en PET avec une densité de pores généralement plus faible offrent une meilleure qualité d'image pour les examens microscopiques. Les membranes en PTFE, également très transparentes et présentant un faible fond de fluorescence, sont bien adaptées aux études microscopiques et immunofluorescentes mais doivent être recouvertes de protéines de matrice extracellulaire avant l'ensemencement pour un attachement cellulaire adéquat, en raison de la faible adhérence naturelle des cellules au PTFE (Scott, Neeley, et Granchelli 2013).

Tableau 13 : Caractéristiques des membranes Transwell (Inserts de culture cellulaire - Thermo Fisher Scientific)

Caractéristiques	Polyester (PET)	Polycarbonate (PC)	Polytétrafluoroéthylène (PTFE)
Propriétés optiques	Clair	Translucide	Clair (si humide)
Visibilité cellulaire	Bonne	Faible	Contours cellulaires
Traitement culture cellulaire	Oui	Oui	Non
Épaisseur de la membrane	10 µm	10 µm	50 µm
Revêtement matrice/ECM	Oui	Oui	Oui
Traitement collagène	Non	Non	Oui
Taille de pores disponible	0,4 ; 3,0 ; 8,0	0,4 ; 3,0 ; 5,0 ; 8,0 ; 12,0	0,4 ; 3,0

III.1.1.2 Taille de la porosité

Les pores de la membrane de l'insert permettent le passage sélectif des molécules entre les chambres apicales et basolatérales simulant ainsi le transport transépithélial. Le choix de la taille des pores du filtre utilisé est un point fondamental (**Tableau 14**) Des pores de petites tailles de 0,4 µm de diamètre

sont couramment utilisés pour évaluer la vitesse de diffusion des petites molécules dans les études de transport de médicaments et de perméabilité. Les membranes à pores plus larges de 3,0 μm ou plus sont généralement utiles pour les études de migration cellulaire, d'invasion tumorale, de chimiotaxie et de motilité (Inserts de culture cellulaire - Thermo Fisher Scientific s. d.).

Tableau 14 : Applications courantes des supports perméables ainsi que les tailles de pores recommandées (Inserts de culture cellulaire - Thermo Fisher Scientific)

Applications	Tailles de pores recommandées (μm)
Etudes de transport et perméabilité - Macromolécules, ions, eau, solutés de faible poids moléculaire, hormones, facteurs de croissance, etc.	0,4 ; 3,0
Polarité cellulaire - Distribution polarisée des canaux ioniques, enzymes, protéines de transport, récepteurs, lipides - Tri et ciblage - Développement et maintien de la polarité - Synthèse et assemblage des jonctions serrées	0,4 ; 3,0
Endocytose - Renouvellement des protéines - Recyclage des membranes - Interactions récepteur-ligand pour les facteurs de croissance, hormones, anticorps, virus, toxines	0,4 ; 3,0
Transport des médicaments - Localisation des récepteurs et polarité des réponses aux médicaments - Effets des médicaments sur la perméabilité vasculaire - Transport des médicaments à travers les barrières épithéliales (cellules Caco-2) et endothéliales - Transport des médicaments à travers les cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux	0,4 ; 3,0

L'installation expérimentale est schématisée dans la **Figure 36**. L'impulsion ultrasonore a été générée par un générateur de fonctions arbitraires (33210A, Keysight) connecté à un amplificateur de puissance de dB, puis transmis au transducteur préalablement calibré. Ce dernier a été placé verticalement au fond d'un bain de sonication spécifiquement développé sur mesure en impression 3D sur les dimensions du transducteur, compatible avec les inserts de transwell et inspiré des travaux publiés par Rousou et al. L'insert de transwell a été immergé dans le bain rempli de PBS à 37 °C avec la membrane poreuse en PC recouverte de cellules orientées vers le bas à une distance axiale fixe de 30 mm de la surface du transducteur, distance correspondant à la distance focale naturelle de la sonde.

Cette configuration de puits et de sonde immergés dans un bain offre l'avantage d'une absence d'interface liquide-air, promettant une homogénéité et une précision du traitement par ultrasons (Hensel, Mienkina, et Schmitz 2011).

La perméabilité à travers cette monocouche cellulaire cultivée sur des membranes d'inserts a été étudiée dans le sens apical vers basolatéral, afin d'évaluer les mécanismes de diffusion et de transport actif au sein du modèle cellulaire. Le système de transducteur était préalablement stérilisé avec de l'éthanol à 70 % en veillant à ne pas appliquer d'éthanol sur la face avant de la sonde pour éviter tout dommage. Les expériences ont ensuite été réalisées sous une hotte à flux laminaire.

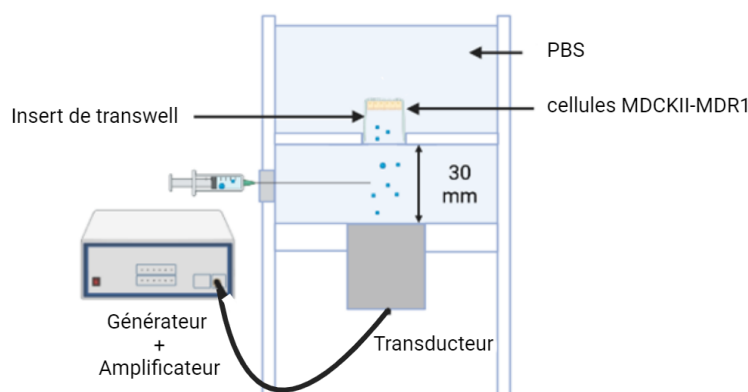


Figure 36: Schéma d'illustration du bain de sonication

Les inserts de transwell ont été répartis aléatoirement dans les différents groupes traités avec et sans US accompagnés ou non avec des MB, présentés dans le **Tableau 15** ci-dessous. Après l'immersion de ces dernières dans le bain de sonication, 50 μ L de MB SonoVue™ ont été injectés en direction des cellules à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de calibre 19G (gauges). Avant utilisation, les SonoVue ont été reconstituées dans une solution saline à 0,9 %, résultant en une suspension de MB de 2×10^9 MB/mL. Les US ont été appliqués pendant 30 secondes selon les différentes conditions ultrasonores, mentionnées précédemment. Les échantillons contrôles ont servi de témoins sans ajout de MB ni exposition aux US (Rousou et al. 2022).

Tableau 15 : Conditions ultrasonores de l'étude in vitro en couche monocellulaire

Conditions	Microbulles	Fréquence	Pression de raréfaction	Rapport cyclique	Temps d'exposition
Contrôle	Non	1 MHz	Pas d'exposition ultrasonore		30 secondes
MB	Oui				
US1	Non		200 kPa	50%	
US1MB	Oui		200 kPa	50%	
US2	Non		500 kPa	30%	
US2MB	Oui		500 kPa	30%	
US3	Non		800 kPa	10%	
US3MB	Oui		800 kPa	10%	

III.1.2 Modél cellulaire

La lignée cellulaire MDCK (Madin-Darby canine kidney) est une lignée épithéliale adhérente issue du tissu rénal d'un cocker femelle adulte (Dukes, Whitley, et Chalmers 2011; Irvine et al. 1999), largement utilisée comme modèle *in vitro* monocouche pour étudier la croissance, le métabolisme cellulaire ainsi que les mécanismes de transport et la perméabilité membranaire ((Dukes, Whitley, et Chalmers 2011), **Tableau 16**). Ces cellules se caractérisent par une polarité apico-basolatérale claire, des jonctions serrées bien définies lorsqu'elles sont cultivées sur des membranes semi-perméables, une période de croissance rapide. Elles sont adaptées à des techniques de microscopie telle que l'imagerie confocale et se polarisent en culture cellulaire 2D et 3D (Dukes, Whitley, et Chalmers 2011; Irvine et al. 1999).

La lignée cellulaire parentale MDCK est hétérogène et composée de populations de cellules ayant différentes propriétés résistives et de transport. Cette hétérogénéité permet d'expliquer les différentes caractéristiques des nombreux sous-clones de la lignée dont deux sous-types de cellules MDCK ont été dérivés et isolés à partir des cellules MDCK parentales à faible passage et passage plus élevé, respectivement désignés comme cellules MDCK de type I et type II (Fan, Chen, et Deng 2014).

Bien que ces deux souches présentent des jonctions adhérentes et des desmosomes, les cellules MDCK I montrent une coloration plus intense pour l'E-cadhérine et les cellules MDCK II montrent une coloration basale plus forte des desmosomes. De plus, les MDCK de type I possèdent ces jonctions communicantes contrairement aux MDCK de type II. En plus des différences au niveau des jonctions, ces souches diffèrent en taille, les cellules MDCK II étant plus grandes et plus hautes comparées aux cellules de type I, plus petites et plus aplaties. Elles sont caractérisées également par des différences distinctes dans les protéines de leur membrane apicale, l'activité Na-K-ATPase, l'expression de la phosphatase alcaline et la composition en glycosphingolipides (Fan, Chen, et Deng 2014; Nehls et al. 2019).

De plus, les cellules MDCK I présentent des valeurs de TEER élevées ($> 4000 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Ceci indique que la lignée cellulaire exprime des jonctions "serrées". Cette mesure reflète la perméabilité d'une monocouche cellulaire en évaluant la résistance électrique entre les chambres apicale et basolatérale. Quant aux cellules MDCK II, elles affichent des valeurs de TEER plus faibles ($< 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$), indiquant que les jonctions sont plus "perméables". Ces différences proviennent de variations dans l'expression des complexes jonctionnels au sein des cellules. Bien que les deux souches expriment les protéines de jonction serrée claudine-1, claudine-4, occludine et ZO-1, les cellules de type II expriment également la protéine de jonction serrée formant des pores, claudine-2, expliquant une valeur plus faible de TEER (Dukes, Whitley, et Chalmers 2011).

Dans notre étude de perméabilité, les cellules MDCK-II, qui sont la souche MDCK la plus couramment utilisée, ont été choisies pour représenter la barrière biologique (Fan, Chen, et Deng 2014), et plus précisément les MDCK II – MDR1. Bien que les MDCK I offrent un modèle pour des études sur des barrières serrées, ces cellules peuvent rendre plus difficile l'observation des effets de la sono-perméabilisation. Ainsi, les MDCK II sont mieux adaptées pour étudier les augmentations de perméabilité induite

par sono-perméabilisation et comprendre comment cette méthode peut encore améliorer la perméabilité, même lorsque la barrière est déjà perméable et accessible.

De plus, ces dernières sont des cellules transfectées avec le gène humain MDR1 (gène de résistance multiple) (Fan, Chen, et Deng 2014) ayant la capacité de former des jonctions plus serrées après différenciation. Elles sont utilisées pour étudier l'efflux par la P-glycoprotéine (P-gp), une caractéristique importante dans le contexte de l'étude de la résistance médicamenteuse et de la perméabilité. Elles constituent un modèle de perméabilité de la BHE (Gumbleton et Audus 2001) afin de prédire et classer les composés susceptibles de traverser la BHE en se basant sur les coefficients de perméabilité apparents ($A \rightarrow B$) (Jin et al. 2014).

La lignée cellulaire MDCK II montre des taux de prolifération élevés en conditions sous-confluentes, sa croissance est limitée à la confluence par inhibition de contact et le développement peut se poursuivre pendant plusieurs jours après avoir atteint la confluence, période au cours de laquelle les contacts entre les cellules sont renforcés et des structures supercellulaires comme des dômes ou des tubules se forment (Nehls et al. 2019).

Tableau 16 : Les principales souches MDCK utilisées pour l'étude de la polarité cellulaire épithéliale (Dukes, Whitley, et Chalmers 2011).

Souche	Détails	Fournisseur*
MDCK (NBL-2)	Ligne cellulaire parentale MDCK dont sont dérivées les lignées de type I et II. C'est une population hétérogène de cellules épithéliales qui forme une monocouche polarisée. Cette hétérogénéité permet qu'une manipulation puisse sélectionner une sous-population, ce qui pourrait compliquer l'analyse des expériences.	ATCC, ECACC, JCRB
MDCK I	Dérivées d'une lignée cellulaire parentale à faible passage (NBL-2). Les cellules de type I présentent des valeurs de TEER élevées ($> 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$), sont négatives pour la claudine-2 des jonctions serrées, et sont connues pour afficher une adénylate cyclase sensible à l'adrénaline, à la vasopressine et à la prostaglandine E, contrairement aux cellules de type II. Elles possèdent des jonctions gap. Le rapport de l'ECACC indique qu'elles peuvent afficher un phénotype épithélial instable.	ECACC (non fourni par ATCC et JCRB)
MDCK II	Isolées d'une lignée cellulaire parentale à passage élevé (NBL-2), les cellules de type II présentent des valeurs de TEER basses ($\sim 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$) et sont positives pour la claudine-2. Elles sont plus grandes et plus hautes que les cellules MDCK de type I et manquent de jonctions gap, sauf si elles sont modifiées. Les cellules MDCK II sont les souches MDCK les plus couramment utilisées et nous les recommandons pour la plupart des études. À ne pas confondre avec la souche MDCK.2 vendue par l'ATCC.	ECACC (non fourni par ATCC et JCRB)

* Correct au mois de septembre 2011. D'autres fournisseurs de lignées cellulaires sont disponibles, cependant seuls l'ATCC, l'ECACC et le JCRB ont été pris en compte ici.

III.1.2.1 Culture cellulaire

Les cellules MDCK-II, ont été cultivées dans des flacons de culture standard avec DMEM contenant GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific), supplémenté avec 10 % (v/v) de FBS et 1 % (v/v) d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Sigma-Aldrich) et maintenues dans un incubateur humidifié à 5 % de CO₂ à 37°C. Le milieu de culture était changé tous les 3 à 4 jours. La sous-culture était effectuée 2 à 3 fois par semaine avec des ratios de dilution entre 1:3 et 1:6 dans des flacons de culture standard. Pendant la sous-culture, les cellules étaient passées à 80-90 % de confluence. Le milieu de culture était retiré et les cellules étaient rincées avec du PBS (phosphate buffered saline) avant d'être incubées avec une solution de trypsine/EDTA (0,025 % de trypsine et 0,01 % d'EDTA dans PBS) à 37°C dans 5 % de CO₂ pendant 10 minutes pour permettre la dissociation des cellules adhérentes. Un milieu de culture contenant tous les suppléments était ajouté pour inactiver la trypsine/EDTA. Les cellules en suspension étaient centrifugées dans un tube conique à 1000 tr/min pendant 5 minutes, et le culot de cellules était resuspendu dans du milieu frais pour obtenir une densité de semis de 1-3 x 10⁴ cellules/cm² dans des flacons frais. La densité cellulaire était déterminée en comptant le nombre total de cellules à l'aide de lames de comptage (Fast-Read 102®, Dutscher)

Pour les études de perméabilité des monocouches cellulaires, les cellules MDCK-II étaient cultivées jusqu'à confluence, trypsinisées et ensemencées dans la chambre supérieure des inserts filtrants transwell (24 puits, pore de 0,4 µm, membrane en polycarbonate, Thermo Scientific Nunc™) à une densité de 50 000 cellules/puits, suspendues dans 0,5 mL de milieu de culture DMEM avec 1 mL du même milieu dans la chambre inférieure, volumes finaux recommandés par le fabricant. Les cellules étaient ensuite placées dans un incubateur humidifié à 5 % de CO₂ à 37°C.

Le milieu de culture était remplacé la veille du traitement ultrasonore. Avant toutes les expériences, les cellules MDCK II dans les inserts transwell étaient lavées avec une solution de PBS puis les membranes de transwell ont été équilibrées pendant 10 minutes avec du milieu de culture à température ambiante.

III.1.3 Etude TEER

L'une des méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer l'intégrité d'une monocouche de cellules MDCK-II sur des supports de membrane transwell est la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) à travers le monocouche cellulaire, comme l'a démontré pour la première fois Cereijido et al. en 1978.

Une barrière cellulaire possède un caractère capacitif et résistif (Linz et al. 2020). Elle développe ainsi une résistance d'autant plus forte que la perméabilité aux ions est faible (Bol 2014; Linz et al. 2020; Scott, Neeley, et Granchelli s. d.). Le calcul de la TEER repose sur la mesure de la résistance électrique, indiquant le niveau de résistance au flux d'ions entre les deux compartiments (Bol 2014). Cette méthode non invasive permet de quantifier l'intégrité et la perméabilité de la couche cellulaire, offrant un indicateur fiable de la fonctionnalité des jonctions serrées entre les cellules adjacentes (Linz et al. 2020).

Ainsi, en mesurant la résistance électrique endothéliale transépithéliale, le degré d'imperméabilité (spécifique au tissu) et la dynamique du réseau de jonctions serrées qui en résulte, peut être suivie en temps réel. Elle est mesurée à l'aide d'un voltmètre de résistance (système Millicell-ERS, Millipore Corp) équipé d'une double paire d'électrodes Ag/AgCl disposées de chaque côté de l'épithélium, l'une étant placée dans la chambre apicale immergée dans le milieu de culture au-dessus de la surface de la monocouche cellulaire, et l'autre dans la chambre basolatérale touchant le fond de la plaque, auxquelles est appliquée une tension (U). Le courant mesuré (I) est ainsi converti en résistance (R) selon la loi d'Ohm ($R=U/I$). C'est donc une mesure physique de la résistance au passage des ions entre les cellules épithéliales cultivées en monocouche, elle est exprimée selon la formule suivante :

$$TEER(\Omega.cm^2) = (R_E - R_M) \times S$$

- R_E : résistance mesurée à travers l'épithélium
- R_M : résistance de la membrane de l'insert en absence de cellules
- S : surface de l'épithélium

La résistance de la couche cellulaire est donc obtenue en soustrayant la résistance d'un échantillon sans cellules de celle d'un échantillon avec cellules, en prenant en considération la surface de l'insert (Linz et al. 2020) (Puscas 2019).

Avant de commencer la procédure de mesure de la TEER, le voltmètre a été calibré conformément aux instructions du fabricant, affichant la valeur de 1000 Ohms (Bednarek 2022). La sonde (embouts d'électrode STX-2) a ensuite été stérilisée en immergeant l'électrode en forme de baguettes dans de l'éthanol à 70 % pendant 15 minutes avant de la placer sous la hotte puis plongée pendant 15 minutes dans un milieu frais de culture MDCK II pour éliminer l'excès d'éthanol et équilibrer les deux électrodes, afin de limiter la différence de potentiel.

Les mesures de TEER ont été effectuées à plusieurs intervalles de temps pour évaluer l'évolution de l'intégrité de la barrière cellulaire au cours du temps, avant et après l'exposition aux ultrasons. L'évaluation a commencé par une première mesure 30 minutes avant l'exposition, suivie de mesures successives à 10 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures, ainsi qu'à 24 et 48 heures après application ultrasonore. Pour chaque insert, trois mesures ont été réalisées afin de garantir la précision des résultats. De plus, chaque expérience a été répétée quatre fois de manière indépendante avec le même numéro de passage cellulaire, afin de minimiser la variabilité liée aux différences de passage, qui pourrait influencer le TEER.

Pour les mesures entre chaque échantillon de chaque condition (**Tableau 15**), l'électrode a été nettoyée avec de l'éthanol, ensuite du PBS puis milieu de culture. Lors de la mesure de la TEER, la plaque de puits comportant les inserts de transwell a été placée dans un bain marie à 37°C afin de minimiser toute variabilité de température.

Une TEER faible reflète des jonctions intercellulaires lâches et est associée à une diffusion paracellulaire passive élevée. C'est une méthode rapide pour l'évaluation de l'intégrité du modèle qui dépend

néanmoins de plusieurs paramètres tels que la nature du milieu nutritif, la densité cellulaire, le positionnement des électrodes et la température, expliquant une variabilité inter-laboratoire observée dans la littérature (Bednarek 2022; Bol s. d.; Felix et al. 2021; Linz et al. 2020; Srinivasan et al. 2015). Une simple valeur TEER doit ainsi être accompagnée par les conditions de l'expérience qui ont mené à cette valeur (Puscas 2019).

III.1.4 Etude de la perméabilité

III.1.4.1 Radiopharmaceutique à base de PSMA

L'étude perméabilité repose généralement sur l'utilisation de composés fluorescents (par exemple, le luciférase jaune) ou des composés marqués avec un fluorophore comme biomarqueurs pour le transport paracellulaire et transcellulaire.

Dans le cadre de notre recherche portant sur la RIV, l'impact des USMB a été étudiée sur la perméabilité d'un radiopharmaceutique ciblant le PSMA. Cette sonde d'imagerie bimodale est basée sur l'isotope radioactif fluor-18 (^{18}F) et un fluorophore proche infrarouge, la cyanine 7 (Cy7) caractérisée par une longueur d'excitation de 766 nm et d'émission à 788 nm. La molécule froide (^{19}F)F-Cy7-PSMA, est similaire à la précédente mais marquée avec l'isotope stable fluor-19 (^{19}F), qui ne possède pas de propriétés radioactives.

La référence froide sera utilisée dans les études *in vitro* tandis que la référence chaude fera l'objet d'une étude préclinique en collaboration avec Dr Simon Specklin de l'équipe de Développements de Radiopharmaceutiques et d'Agents d'Imagerie de Biomaps, réalisant toute la radiosynthèse de ce radiomarqueur.

En intégrant à la fois des propriétés de TEP et de fluorescence, la dualité de cette sonde permet non seulement une imagerie de haute résolution pour visualiser les processus biologiques à l'échelle cellulaire, mais aussi une évaluation quantitative de la distribution du radiopharmaceutique. En combinant ces deux techniques, la sonde offre une approche complémentaire pour étudier l'impact des USMB sur la perméabilité, tout en conservant la propriété de ciblage du PSMA dans le contexte de la RIV.

III.1.4.1.1 Radiosynthèse

La radiosynthèse du radiopharmaceutique ^{18}F F-Cy7-PSMA (**Figure 37**) a été réalisée par l'équipe radiochimie dont la méthode est retranscrite ci-dessous.

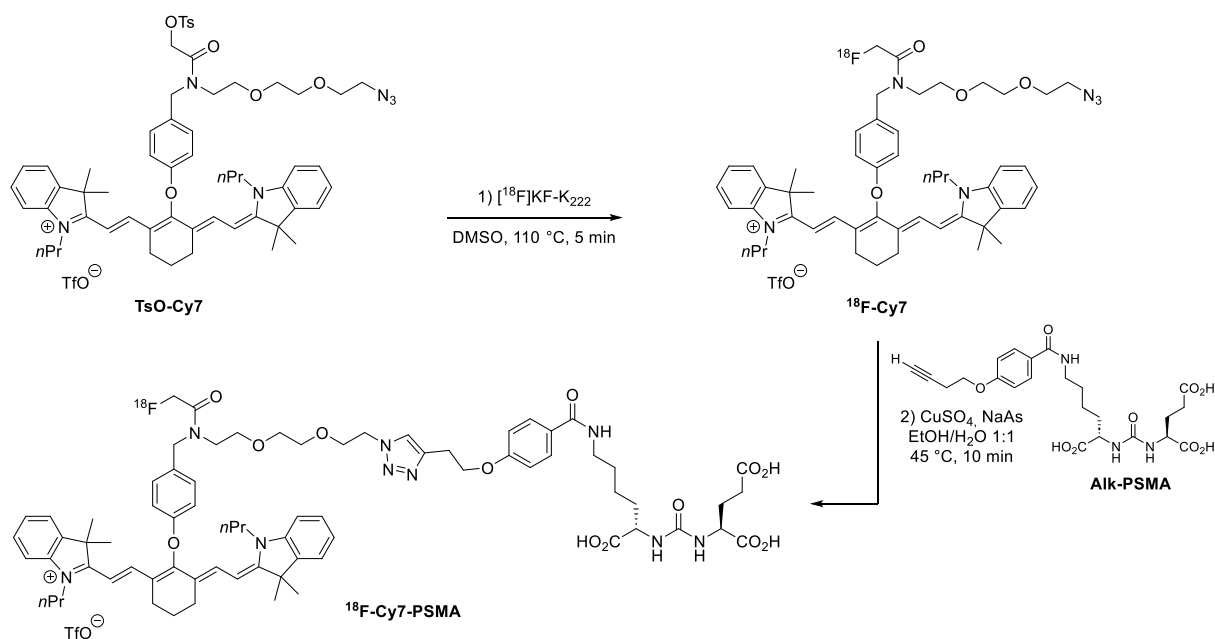


Figure 37 : Radiosynthèse de $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$

L'ion $[^{18}\text{F}]\text{fluorure}$ aqueux non additionné de porteur a été produit par la réaction nucléaire $[^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}]$ par irradiation d'une cible d'eau $[^{18}\text{O}]$ de 2 ml (cyclotron IBA Cyclone-18/9) et a été transféré dans la cellule chaude appropriée. Après la fin de l'irradiation, la solution aqueuse contenant les anions $[^{18}\text{F}]\text{fluorure}$ a été automatiquement transférée dans un synthétiseur Trasis AIO équipé d'une cassette appropriée (**Figure 38**). L'eau irradiée a ensuite été aspirée à travers une cartouche d'échange d'anions (Sep-Pak® Accell Plus QMA Plus Light cartridge, Waters) pour fixer les anions $[^{18}\text{F}]\text{fluorure}$ et éliminer l'eau enrichie qui a été collectée séparément. Les anions $[^{18}\text{F}]\text{fluorure}$ ont été récupérés de la résine par élution avec une solution de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K}_{222}$ (2,5 mg de K_2CO_3 dans 75 μL d'eau et 8 mg de Kryptofix® 222 dans 425 μL d'acétonitrile). Le complexe $[^{18}\text{F}]\text{KF-K}_{222}$ a ensuite été préparé par évaporation de la solution en la chauffant de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous vide et sous un courant de N_2 . Une solution de précurseur **TsO-Cy7** (5-6 mg) dans du DMSO (650 μL) a été ajoutée au complexe $[^{18}\text{F}]\text{KF-K}_{222}$ séché et le mélange résultant a été chauffé à $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 minutes. Après refroidissement, le mélange brut a été dilué avec de l'eau et purifié par HPLC semi-préparative (colonne Zorbax C18, Agilent) en utilisant un gradient du mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA, 5 mL/min, $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 65:35 à 75:25 sur 30 min). La purification a été contrôlée à la fois par UV (280 nm) et par détection de la radioactivité, et le $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7}$ a été recueilli à un temps de rétention de 27-30 min. L'éluat est dilué dans l'eau et transféré sur une cartouche échangeuse de cations (PS-H+, Macherey-Nagel). La cartouche a ensuite été éluée avec 2 mL d'un mélange éthanol/ NaOTf 0,1M 9:1 pour récupérer l'intermédiaire $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7}$ dans un second réacteur. L'**Alk-PSMA** (5 mg, 0,5 mL d'éthanol), le CuSO_4 (2,5 mg, 0,5 mL d'eau) et l'ascorbate de sodium (5 mg, 0,5 mL d'eau) ont ensuite été ajoutés et le mélange résultant a été chauffé à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min. Le mélange brut a été dilué dans l'eau et soumis à une seconde purification par HPLC semi-préparative (colonne Zorbax C18, Agilent, $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 67:33, 0,1% TFA). Le $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ a été recueilli à un temps de rétention de 11-12 min. Pour la formulation finale, 20 mL d'eau a été ajoutée à la fraction collectée et ce mélange a été transféré à travers une cartouche C18 (Sep-Pak® C18 Plus Short

135

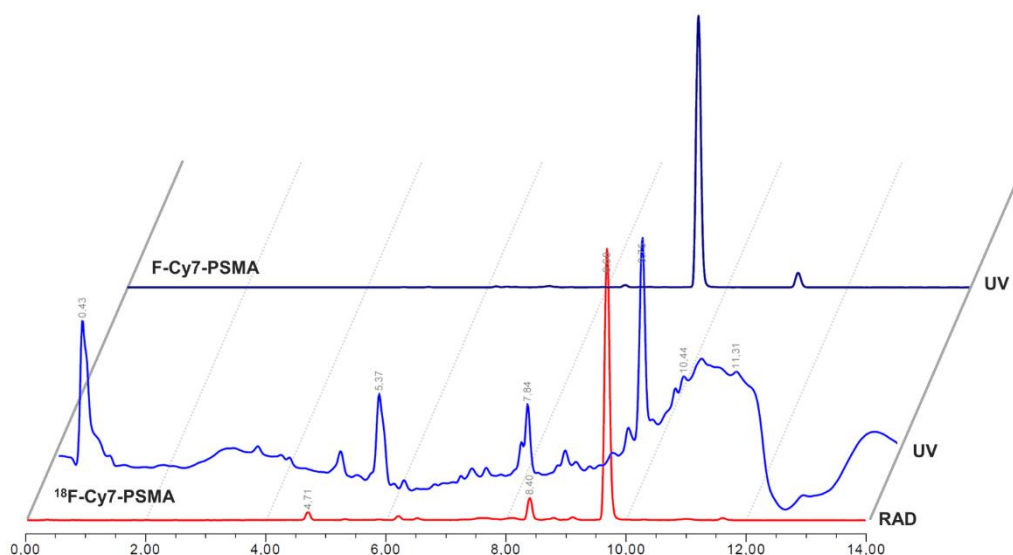


Figure 39 : Chromatogramme HPLC de $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$

III.1.4.2 Coefficient de perméabilité

La perturbation transitoire dans la barrière peut être évaluée par une autre méthode complémentaire à celle de l'essai TEER, en calculant le coefficient de perméabilité apparente (P_{app}). Ce coefficient repose sur la loi de Fick et permet de mesurer la capacité et plus précisément la vitesse d'une molécule à traverser une monocouche cellulaire sur une membrane poreuse. En fonction de sa nature, le transport peut être transcellulaire ou paracellulaire (Bol 2014).

Ainsi l'intensité du transport du composé étudié à travers la couche épithéliale exprimée par le coefficient P_{app} est calculée comme suit :

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

- $\frac{dQ}{dt}$: flux linéaire du marqueur du compartiment donneur vers le compartiment receveur ;
- A : surface de la membrane ;
- C_0 : concentration initiale du médicament/du composé déposée dans le compartiment donneur.

L'étude de la perméabilité des barrières épithéliales s'effectue en déposant le composé à étudier dans le compartiment apical puis en quantifiant après incubation la concentration de ce dernier en fonction du temps dans le compartiment basolatéral (Bol 2014).

Ainsi, une solution de la sonde bimodale marquée par fluorescence a été diluée dans un tampon de transfert HBSS (Hanks'Balanced Salt Solution, Ca^{2+} , Mg^{2+} , +10 mM HEPES, pH7) pour obtenir une concentration finale de 10 μM . Un volume de 0,5 ml de cette solution a été déposé dans la chambre apicale et 1 ml uniquement du tampon de transfert a été ajouté dans la chambre basolatérale. Les

différents puits ont ensuite été placés à l'incubateur (37°C, 5 % CO₂). Après exposition aux différentes conditions ultrasonores présentées précédemment dans le **Tableau 15**, 400 µl de milieu basolatéral de chaque insert a été prélevé à intervalles de temps réguliers (30, 60, 90, 120 min post- exposition ultrasonore) et transféré dans une plaque de 96 puits. Le volume d'échantillon prélevé a été remplacé par du HBSS frais. Pendant l'expérience, les cellules ont été maintenues à 37 °C et agitées à 170 tours par minute. Dans les expériences où des composés fluorescents étaient utilisés, les échantillons ont été protégés de la lumière en tout temps.

L'absorbance des échantillons a été lue dans la plaque par un lecteur de plaque (Clario-Star, BMG Labtech) à 742/15nm d'excitation et 788/20nm d'émission afin de déterminer la concentration du composé transféré. Un contrôle sans composé ainsi qu'une solution de notre sonde bimodale ont été réalisés.

Une fois la mesure effectuée de la quantité de notre composé dQ , calculée par la différence de concentration du composé entre deux points de temps dans le compartiment récepteur et le calcul de l'intervalle de temps entre les échantillons, le taux de perméabilité a pu être obtenu pour finalement appliquer l'équation du coefficient de perméabilité, en prenant en compte la surface de la membrane et la concentration initiale du composé.

Les données de perméabilité (**Tableau 17**) recueillies de la littérature scientifique sont très diverses, selon le type de composé, sa taille, sa lipophilie, cellule utilisée et les conditions expérimentales. Les molécules lipophiles traversent plus facilement les barrières biologiques en raison de leur affinité avec les membranes cellulaires lipidiques. En revanche, les molécules hydrophiles ont plus de difficulté à traverser ces barrières, surtout si elles sont de grande taille, car elles nécessitent des mécanismes de transport spécifiques. Ainsi, plus une molécule est grosse et hydrophile, plus il est difficile pour elle de pénétrer la cellule. (Jin et al. 2014).

Tableau 17 : Test de perméabilité des composés dans les cellules et MDCK-MDR1 : Classification selon les valeurs de Papp A–B (Jin et al. 2014).

Type de Perméabilité	Plage des valeurs de Papp A-B (cm/s)
Faible	$< 2 \times 10^{-6}$ cm/s
Moyenne	2×10^{-6} à 20×10^{-6} cm/s
Elevée	$> 20 \times 10^{-6}$ cm/s

III.1.5 Analyse statistique

Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v9.1.2, GraphPad Software). Le test de Shapiro Wilk a été utilisé pour évaluer la normalité des données de chaque échantillon, et un Q-Q plot a automatiquement été tracé.

Le suivi du TEER dans le temps entre les différents groupes a été comparée et le pourcentage de perméabilité décrivant le passage de notre molécule froide ont été comparé entre les différents groupes à

l'aide d'un test ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Dunnett pour identifier les résultats significatifs. Sauf spécifié autrement, les résultats sont présentés sous la forme : valeur moyenne $\pm$ écart-type de la moyenne. Le niveau de significativité statistique des p-valeurs renvoyées par les tests est indiqué sur les graphiques par des astérisques : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

III.2 RESULTATS

III.2.1 Effet de la sono-perméabilisation dans un modèle *in vitro* en monocouche

III.2.1.1 Etude TEER

III.2.1.1.1 Génération et caractérisation fonctionnelle du modèle

Pour évaluer l'effet de la sono-perméabilisation sur la fonction de barrière de notre modèle généré par monoculture des cellules épithéliales MDCK II-MDR1, des mesures de résistance reflétant l'intégrité et formation de jonctions serrées ont été déterminées.

Les lignées cellulaires ont été cultivées sur des inserts de culture pendant 3 jours avec des valeurs de TEER entre 100 et 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, appropriées pour l'étude. Le jour des expériences de sono-perméabilisation, soit 3 jours post-ensemencement, le milieu de culture a été remplacé, et les monocouches cellulaires ont été incubées pendant 30 minutes afin de s'équilibrer et rétablir la valeur TEER de base.

III.2.1.1.2 Effet sur la résistance et la perméabilité de la monocouche cellulaire

Notre modèle a été exposé aux MB seules, aux différentes conditions US seules, et aux différentes combinaisons des deux pour évaluer leur impact sur la TEER dont la valeur a été suivie et mesurée avant application des US (seuls ou en combinaison avec des MB) et après, à différents intervalles de temps : 10 minutes, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h et 48h post-sono-perméabilisation. Lors des différentes expériences réalisées indépendamment, une variabilité dans les valeurs de TEER de base avant application ultrasonore a été constatée. Ainsi pour évaluer cet effet à chaque intervalle de mesure, les mesures des inserts avant US de chaque groupe d'étude ont été utilisées comme leurs valeurs de TEER de référence. Les résultats des mesures de TEER pour chaque condition d'étude comparés au contrôle sont illustrés dans la

Figure 40.

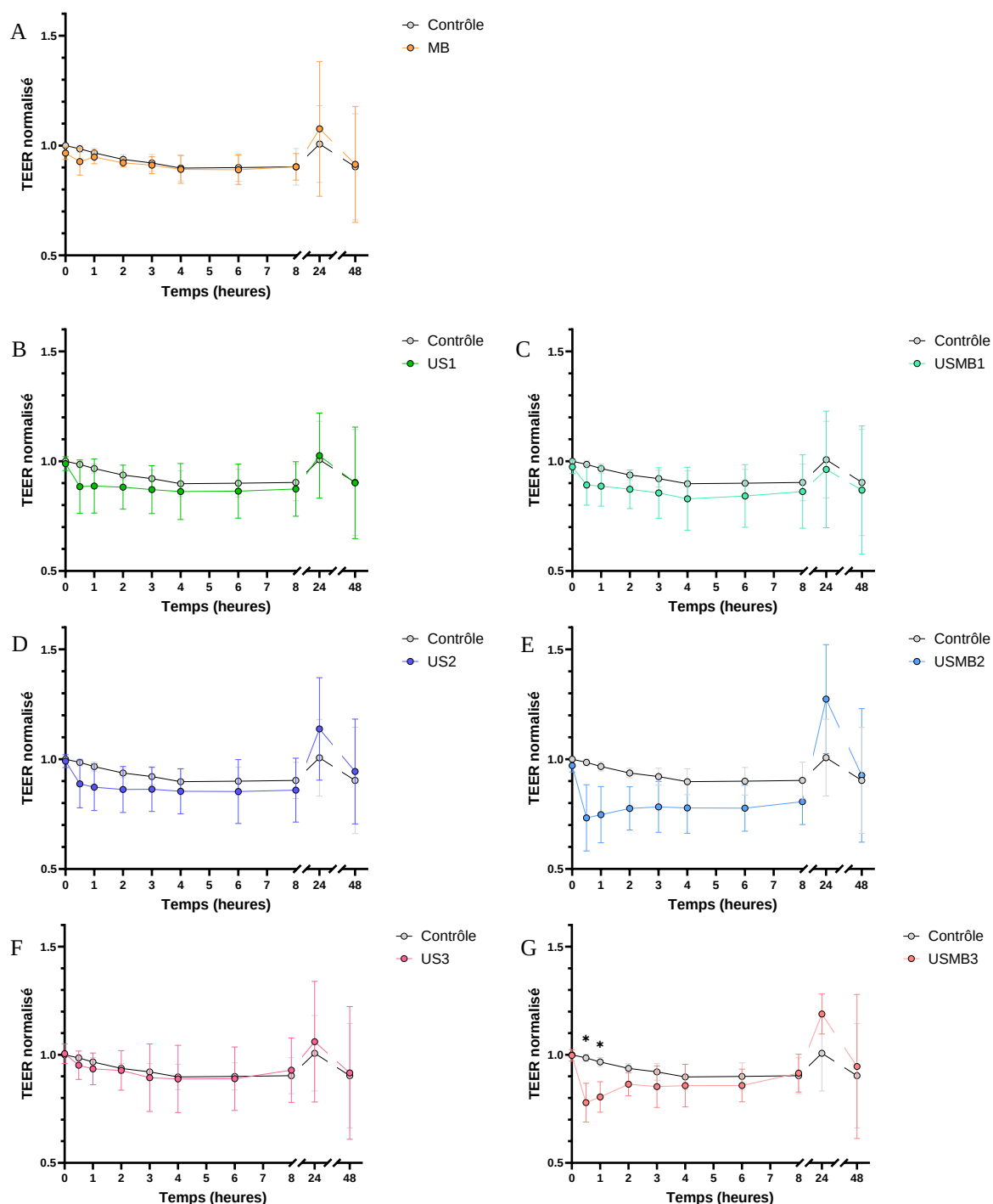


Figure 40 : Évaluation temporelle du TEER normalisée de MDCK II-MDR1 : comparaison entre le groupe contrôle et les groupes expérimentaux A) MB ; B) US1 ; C) US1MB ; D) US2 ; E) US2MB ; F) US3 ; G) US3MB. Les cellules MDCK II-MDR1 ont été maintenues dans un bain marie de 37°C pour une densité d'ensemencement de 50000 cellules/puit. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=4). Méthode d'analyse : test ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Dunnett pour les résultats significatifs (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Le groupe non traité aux US montre que les valeurs de TEER diminuent légèrement au cours des quatre premières heures de suivi ($0,90 \pm 0,08$ à 4h post-exposition), puis atteignent un plateau stable ($0,90 \pm 0,06$ à 6h post-exposition), maintenant cet équilibre jusqu'à la dernière mesure effectuée à 8 heures post-exposition ($0,90 \pm 0,08$) le jour de l'expérience. Après une période de récupération de 24 heures après changement de milieu, une augmentation de la résistance est observée ($1,01 \pm 0,18$), se rapprochant de la valeur de référence correspondant à la première mesure de l'expérience. Toutefois, à 48 heures post-exposition, cette valeur ($0,90 \pm 0,24$) diminue et devient inférieure à la valeur de référence initiale.

Lors de la comparaison entre les groupes, illustrée par la

Figure 40A., aucune différence significative entre le groupe contrôle et celui traité uniquement avec des MB n'a été constaté indiquant que les MB seules n'ont pas d'effet sur la perméabilité/résistance de la monocouche MDCK II-MDR1. Il en est de même pour les traitements uniquement avec sonication ne modifiant pas de manière significative la TEER, comme illustré dans les

Figure 40B,

Figure 40D et

Figure 40F . En revanche, à partir des 30 minutes post-sono-perméabilisation, bien que non statistiquement significatif, les cellules traitées avec les conditions US1 ($0,88 \pm 0,12$) et US2 seules ($0,89 \pm 0,11$) ont révélé une diminution des valeurs de TEER comparé au groupe contrôle ($0,99 \pm 0,02$). Cette diminution a continué tout au long des 8 heures de suivi post-sono-perméabilisation. Par la suite, les valeurs de TEER ont convergé vers le niveau de base de celles du groupe contrôle, bien qu'elles soient restées plus élevées pour le groupe US2 ($1,14 \pm 0,23$) par rapport au groupe contrôle ($1,01 \pm 0,18$) à 24h post-sono-perméabilisation.

Comme représentés sur les

Figure 40

Figure 40E et

Figure 40G, la combinaison des US et MB et précisément les conditions US2MB et US3MB ont diminué fortement les valeurs de TEER par rapport à celles du groupe contrôle sur la première heure de suivi après sonication ($0,75 \pm 0,13$ et $0,81 \pm 0,07$ contre $0,97 \pm 0,02$), entraînant ainsi une perte de l'intégrité de la couche cellulaire. Cette diminution du TEER et donc de la perméabilité est statistiquement significative pour le groupe US3MB ($p < 0,05$) contrairement au groupe US2MB qui présente néanmoins une plus forte diminution.

Ces valeurs ont progressivement augmenté avec le temps pour tous les groupes expérimentaux atteignant une valeur équivalente à celle du groupe témoin à 8 heures post-sonication. Cela semble indiquer que le traitement était bien toléré et que l'impact de la sono-perméabilisation sur l'intégrité cellulaire est réversible. Après 24h post-traitement, une augmentation de la résistance dans les groupes US2MB et US3MB par rapport au groupe contrôle, est observée, reflétant ainsi une couche cellulaire plus serrée.

Suite à une nouvelle période d'incubation de 24 heures, les valeurs de TEER ont retrouvé et atteint les valeurs des groupes de contrôle.

En revanche, comme indiquée dans la

Figure 40C, malgré l'ajout des MB aux cellules traitées à la condition US1, aucune différence significative n'a été détectée entre ces deux groupes dont les valeurs de résistances ne se distinguent pas significativement non plus du groupe témoin.

En somme, la diminution du TEER au fil du temps observée dans toutes les conditions expérimentales, entre 0 et 8 heures post-traitement, bien que non significative, peut s'expliquer par la perturbation des monocouches cellulaires par le changement de milieu avant les mesures initiales. La diminution accrue de la résistance montrant un impact sur la perméabilité de la barrière a été déclenchée immédiatement suite aux stimuli des US combinés au MB pour certaines conditions c'est-à-dire US2MB et US3MB. Les groupes exposés au MB seules et aux US seuls ne montrent de différence significative sur la valeur TEER et donc sur l'intégrité cellulaire de notre modèle, bien que les groupes traités uniquement à US1 et US2 semblent indiquer une tendance qui s'oriente vers une diminution de la résistance.

L'augmentation du TEER observée pour tous les groupes d'étude et notamment pour le contrôle à 24h post-traitement est probablement due à la croissance des cellules avec l'apport des nutriments par l'ajout du milieu de culture au début de l'expérience. La monocouche de cellules épithéliales présentait ainsi des jonctions plus serrées et formées. Néanmoins les augmentations de la résistance constatées pour les groupes US2MB et US3MB semblent être additionnelles à celles générées par le développement cellulaire comme on peut l'observer dans le groupe contrôle.

III.2.1.2 Coefficient de perméabilité

La perméabilité est maintenue par une barrière biologique intacte via les jonctions entre cellules permettant le passage sélectif de molécules protégeant ainsi les tissus sous-jacents. Les molécules traceuses marquées par fluorescence sont couramment utilisées dans les études de perméabilité *in vitro* comme biomarqueurs pour le transport paracellulaire et transcellulaire.

Le coefficient de perméabilité d'une molécule traceuse fluorescente a été mesuré pour estimer l'impact sur le flux moléculaire à travers les monocouches cellulaires en raison des différents traitements ultrasonores.

III.2.1.2.1 Sélection de notre molécule

Le but de cette étude étant d'évaluer l'impact des USMB sur la perméabilité membranaire en tenant compte d'une application potentielle en RIV, une molécule ciblant le PSMA marquée avec un fluorophore proche de l'infrarouge a donc été sélectionnée. Ses propriétés physico-chimiques sont résumées dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 : Propriétés physico-chimiques de [¹⁹F]F-Cy7-PSMA

Composé	Type de composé	Masse molaire (g/mol)	Propriété
[¹⁹ F]F-Cy7-PSMA	Polaire	1440,62	fluorescente

La molécule [¹⁹F]F-Cy7-PSMA est considérée comme polaire en raison de sa structure chimique, qui inclut des groupes fonctionnels favorisant l'interaction avec l'eau. En particulier, la cyanine 7 est souvent conçue pour être soluble dans des milieux aqueux grâce à la présence de groupes polaires tels que des hydroxyles ou des amines. De plus, l'Alk-PSMA, un ligand du PSMA, contribue également à ces caractéristiques polaires. Cette polarité est cruciale pour les applications d'imagerie, car elle permet à la molécule de se dissoudre facilement dans l'eau, améliorant ainsi sa biodisponibilité et facilitant son élimination dans le système digestif. Au contraire, les molécules lipophiles, qui sont généralement hydrophobes, se dissolvent mieux dans des solvants organiques et peuvent être plus difficiles à excréter. Ainsi, la composition chimique de [¹⁹F]F-Cy7-PSMA lui confère principalement des propriétés hydrophiliques, adaptées à ses usages biomédicaux.

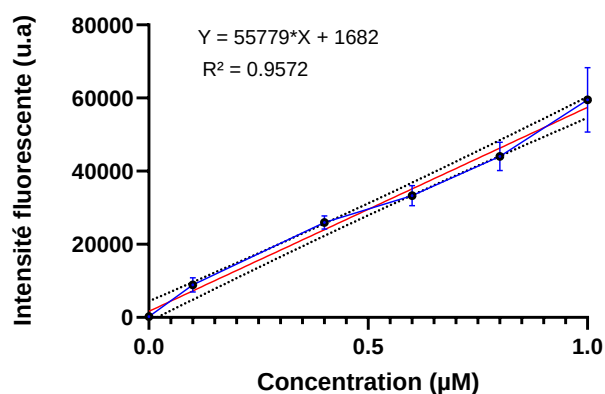


Figure 41 : Courbes de calibration de la molécule froide marquée à la cyanine 7. L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de 55779 ± 2230 , un intercept de 1682 ± 1341 et $R^2 = 0,9572$.

Une quantification de la molécule froide marquée à la cyanine 7 et précisément une courbe de calibration a été réalisée pour une gamme de concentration de 0 à 1 µM à l'aide d'un lecteur de plaque réglé à une longueur d'onde d'excitation de 742/15nm et d'émission de 788/20nm (**Figure 41**).

III.2.1.2.2 Effet de l'USMB sur la perméabilité moléculaire à travers une barrière épithéliale

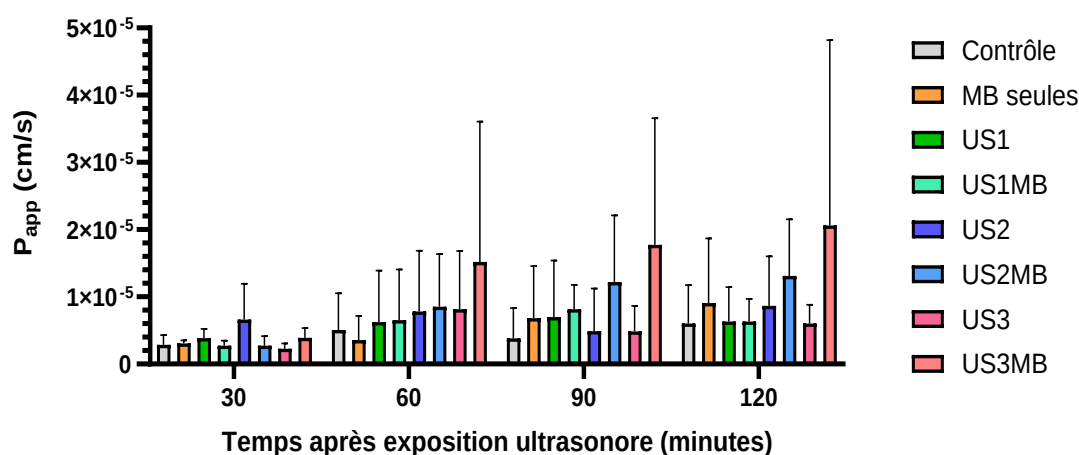


Figure 42 : Coefficient de perméabilité apparente moyenne de la molécule froide [¹⁹F]F-Cy7-PSMA à travers une barrière épithéliale MDCKII-MDR1, mesuré sous différentes conditions ultrasonores : sans microbulles et traitement ultrasonore (USMB), avec microbulles uniquement (MB), et avec traitements ultrasonores sans (US1, US2, US3) ou avec microbulles (US1MB, US2MB, US3MB) à divers intervalles (30, 60, 90 et 120 minutes) après l'exposition. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n=3$) et ont été analysées par un test ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Dunnett pour les résultats significatifs (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

De la même manière que dans l'étude de la TEER, les cellules MDCKII-MDR1 ont été cultivées sur des inserts Transwell pendant 3 jours avant le jour de l'expérimentation. La perméabilité apicale-basolatérale mesurée a été représentée en termes de valeurs de coefficient de perméabilité apparente (P_{app}) puis comparée entre les différents groupes d'étude. La concentration utilisée dans le compartiment donneur était de 10 μ M. Le coefficient de perméabilité reste un paramètre important pour prédire la diffusion passive d'un médicament. Les résultats sont présentés dans la **Figure 42**, comme valeurs moyennes de triplicata provenant de 3 expériences indépendantes.

Les valeurs de P_{app} de notre traceur dans le groupe non traité présentaient une faible augmentation au cours du temps, suggérant que la monocouche de cellules MDCKII-MDR1 avait maintenu son intégrité pendant l'expérience. En d'autres termes, son transport à travers la monocouche de cellules semblerait se limiter à la voie transcellulaire. Ces valeurs de P_{app} comprises entre $2,87$ et $6,02 \times 10^{-6}$ cm/s concordent avec les données dans la littérature et montrent que la barrière est moyennement perméable à notre traceur (**Tableau 17**). Une valeur plus élevée signifie une meilleure capacité à traverser les membranes biologiques, indiquant ainsi une solubilité accrue dans les milieux biologiques.

Premièrement, aucune différence statistiquement significative entre les P_{app} des différentes conditions expérimentales pour les différents intervalles de temps après traitement ultrasonore n'a été constatée. En effet, 30 minutes après traitement, aucun des groupes n'a présenté de changement significatif par rapport au groupe témoin (P_{app} : $2,87 \pm 1,45 \times 10^{-6}$ cm/s). Comme illustrée dans la **Figure 42**, une augmentation générale des valeurs a été notée 60 minutes post-traitement qui semblent tendre vers un

équilibre malgré quelques variations demeurant non significatives. Néanmoins, cette légère hausse se poursuit jusqu'à 120 minutes après le traitement à l'exception des groupes US2 et US3.

En revanche, il convient de souligner qu'il existe des tendances qui émergent et méritent une attention particulière. A 30 minutes post-exposition, les groupes traités uniquement avec des MB ou exposés uniquement aux paramètres ultrasonores ont montré un schéma similaire à celui du groupe témoin (P_{app} : $2,87 \pm 1,45 \times 10^{-6}$ cm/s) dans leurs coefficients de perméabilité apparente à l'exception du groupe US2 (P_{app} : $6,60 \pm 5,35 \times 10^{-6}$ cm/s). Pour exemple, les groupes US1 et US1MB présentaient respectivement une valeur P_{app} de $3,84 \pm 1,38 \times 10^{-6}$ cm/s et de $2,71 \pm 7,76 \times 10^{-6}$ cm/s.

Pour les intervalles de temps à 60, 90 et 120 minutes, les groupes traitées avec des US en concomitance avec l'injection des MB ont montré des coefficients de perméabilité apparentes supérieurs bien que statistiquement non significatifs par rapport au groupe témoin et les groupes soumis aux US sans MB, à l'exception du groupe traité avec des impulsions longues et faibles (US1MB). Pour exemple, à 90 minutes post-exposition, les groupes US2 et US2MB présentaient respectivement une valeur P_{app} de $4,92 \pm 6,33 \times 10^{-6}$ cm/s et de $12,18 \pm 9,93 \times 10^{-6}$ cm/s.

Ainsi, l'ajout des MB au traitement des cellules avec de faibles pressions et longues impulsions n'a pas eu d'effet sur la perméabilité apparente.

En outre, en l'absence d'US, la perméabilité du marqueur avec une monocouche cellulaire est plus faible. Toutefois les données de coefficient de perméabilité de ce composé de faible poids moléculaire ($>2 \times 10^{-6}$ cm cm·s⁻¹) suggèrent une perméabilité moyenne (**Tableau 17**) même en l'absence de traitement par US. La perméabilité apparente pour le transport du traceur était augmentée dans les cellules soumises à la combinaison des MB avec certaines conditions ultrasonores avec une différence plus marquée pour le groupe US3MB que le groupe US2MB. Les résultats bien que statistiquement non significatifs indiquent que l'USMB semble faciliter la perméabilité la molécule.

III.3 DISCUSSION

La sono-perméabilisation reposant sur l'injection i.v. des MB en concomitance avec les US est explorée et connue pour faciliter le passage des médicaments à travers les barrières biologiques en perturbant transitoirement les jonctions serrées entre les cellules, permettant une ouverture temporaire de ces dernières. Toutefois, les conditions optimales pour maximiser l'efficacité de la délivrance restent incertains en raison de la variabilité des paramètres ultrasonores utilisés dans les études, ce qui souligne la nécessité de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ce phénomène.

Cependant comme l'a souligné (Rousou et al. 2022) dans son article, il existe un faible nombre d'études qui a exploré l'utilisation des USMB sur des modèles *in vitro* pour la perméabilité des jonctions cellulaires. Par exemple, (Conway et al. 2024) ont développé un modèle de co-culture en transwell de la BHE comprenant des cellules endothéliales bEnd.3 et des astrocytes C8-D1. Ce modèle a permis de mesurer la perméabilité de la barrière via la résistance électrique transendothéliale et le flux de dextran

ainsi qu'observer le flux de calcium en temps réel. L'application d'ultrasons (1MHz, 250 kPa, durée d'impulsion de 10 μ s, intervalle d'impulsion de 10 ms et durée de traitement de 20 s) avec des microbulles lipidiques a révélé une augmentation de la perméabilité de la BHE, induite par la formation de pores (perméabilité transcellulaire) et des lacunes inter-endothéliales (perméabilité paracellulaire) réversibles avec un rôle clé de l'influx de calcium.

Dans l'étude de Hark et al, un modèle de co-culture basé sur des cellules endothéliales hCMEC/D3 et des péricytes hPC-PL a été établi pour étudier l'impact de la sono-perméabilisation sur la délivrance d'un vecteur polymérique, le pHPMA, et du médicament antiviral ribavirine, dans des conditions standards et inflammatoires, en utilisant des MB non ciblées et ciblées recouvertes de peptides RGD. L'application des USMB (fréquence de 0,933 MHz, 10 cycles par impulsion, une fréquence de répétition d'impulsion de 2 kHz et une pression de raréfaction de 200 kPa pendant 3 secondes) a entraîné une réduction significative des valeurs de TEER, facilitant la délivrance de pHPMA fluorescent (Atto488-pHPMA). Les MB recouvertes de RGD ont permis une meilleure liaison et perméabilisation de l'endothélium enflammé, améliorant ainsi la délivrance d'Atto488-pHPMA et de ribavirine.

Rousou et al. ont démontré que l'association ultrasons (0,7 MPa) et MB SonoVue améliore la perméabilité paracellulaire des grandes molécules hydrophiles à travers un modèle de barrière cellulaire épithéliale (sur des cellules MDCK II), tout en n'ayant aucun effet sur les petites molécules. De plus, l'accumulation intracellulaire de ces molécules a également augmenté. Des expériences de perméabilité avec des cellules endothéliales (HUVEC) ont mis en évidence que ces dernières présentaient une perméabilité naturellement plus élevée, ce qui a conduit à une détérioration de la barrière après exposition à l'USMB, les rendant moins adaptées pour étudier l'effet de l'USMB sur le transport moléculaire.

Dans la continuité des recherches portant sur les modèles avec des inserts de Transwell, (L. Chen et al. 2022) ont développé une lignée cellulaire MDCK II exprimant la claudine-5 pour examiner l'effet de deux liants (mC5C2 et cCPEm) sur la perméabilité de la BHE en association avec les USMB (0,5 MPa, 1 MHz) en mesurant la résistance électrique transendothéliale et la perméabilité au dextran fluorescent de 40 kDa. Les résultats ont montré que les liants augmentaient l'ouverture de la barrière de manière dépendante du temps et de la concentration, tandis que les USMB provoquaient une ouverture rapide suivie d'une récupération au bout de 12 heures. La pré-incubation avec cCPEm avant l'application de FUS+MB a conduit à une ouverture de la barrière plus importante que les traitements effectués séparément avec un coefficient de perméabilité 3,5 fois plus important que le groupe contrôle.

Enfin (K. Kooiman et al. 2010) a mis en évidence que l'activation de l'agent de contraste BR14 par les US (210 kPa, indice mécanique de 0,21, 10 000 cycles sinusoïdaux, fréquence de répétition de 20 Hz, exposition totale de 2 minutes) a permis d'augmenter la perméabilité de la barrière endothéliale (HUVEC) sans provoquer de perte cellulaire ni de toxicité directe en réduisant les valeurs de TEER à 59,7 % des valeurs initiales.

À l'inverse, plusieurs études ont utilisé des dispositifs en monocouche cellulaire, permettant d'étudier la perméabilité cellulaire sans recourir à des inserts mais à des chambres stériles et fermées, telles que les Opticells et Clinicell. L'étude menée par (Beekers et al. 2022) s'est intéressée sur l'interaction des USMB

et les cellules endothéliales (HUVEC) et les mécanismes biologiques sous-jacents. Ainsi, l'augmentation locale de la perméabilité vasculaire a été observée montrant que l'ouverture des jonctions intercellulaires correspondait à une réponse biologique plutôt qu'une simple réaction mécanique suite à l'activation des microbulles ciblant $\alpha V\beta 3$ (protéine de surface cellulaire) par US (2 MHz, 100–400 kPa, 10 cycles). Les résultats ont révélé que ce phénomène était influencé par l'état des cellules elles-mêmes (comme leur intégrité) plutôt que par les oscillations des microbulles contrairement à la formation des pores. Les oscillations plus importantes des microbulles entraînent généralement la création de pores plus grands dans les cellules.

En résumé, ces études ont permis d'apporter des éléments clés sur l'impact des ultrasons et des microbulles sur la perméabilité cellulaire contribuant ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'ouverture des jonctions serrées. L'utilisation d'inserts de Transwell a permis d'analyser plus précisément la perméabilité des barrières cellulaires endothéliales et épithéliales, tandis que les chambres de culture stériles offrent une flexibilité d'observation en temps réel pour des études plus variées sur les cellules souvent en monocouche sans les contraintes des modèles avec inserts.

C'est dans cette optique que notre étude visait à investiguer l'effet de différents paramètres ultrasonores avec ou sans MB SonoVue sur les propriétés de la barrière biologique et notamment épithéliale. La fonctionnalité de cette couche cellulaire polarisée et donc le comportement de la barrière face à la sonoperméabilisation a été surveillée par deux paramètres : la mesure de résistance électrique transendothéliale et de la perméabilité d'une molécule. Ces méthodes permettent d'évaluer la confluence de la couche cellulaire ainsi que le transport ionique de la voie paracellulaire. En utilisant un ligand ciblant le PSMA comme réactif fluorescent, l'étude vise à améliorer le passage de substances thérapeutiques dans le cadre du cancer de la prostate et la RIV.

Ainsi un modèle *in vitro* en monocouche cellulaire a été établi en utilisant la lignée cellulaire MDCK II-MDR1, largement employé comme outil de perméabilité cellulaire en minimisant l'influence de certains paramètres tels que le passage cellulaire ou le maintien de la température. Notre modèle affichait des valeurs de TEER entre $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ et $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ après 3 jours d'ensemencement, validant une barrière fonctionnelle avec des jonctions intercellulaires bien établies, requise pour les études de perméabilité. Cette plage de valeurs est conforme aux données de la littérature et les directives de la FDA exigeant un seuil TEER d'au moins $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Pour ce modèle, la molécule froide $[^{19}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ a montré une forte perméabilité affichant des coefficients de perméabilité variant de $2,87$ à $6,02 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. Ces résultats correspondent aux valeurs attendues pour les petites molécules hydrophiles, généralement supérieures à $0,1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, montrant la capacité du traceur à traverser facilement les espaces intercellulaires sans traitement USMB.

L'intégrité de la barrière affectant la perméabilité a été comparée sur la base de plusieurs expériences indépendantes. Les monocouches épithéliales, traitées uniquement par les SonoVue et uniquement avec les US, ne présentaient pas différence significative de TEER et de perméabilité de notre traceur avec le groupe contrôle.

Cependant la combinaison des US avec l'activation des SonoVue par des impulsions brèves et fortes (US3MB) et intermédiaires (US2MB) ont montré des Papp supérieurs, bien que non significatifs, par

rapport au groupe contrôle à partir de 60 minutes post-traitement. Elle a également entraîné une diminution immédiate du TEER suivi par une récupération dès la première heure post-sono-perméabilisation pouvant nécessiter jusqu'à 3h post-exposition pour le groupe US2MB, démontrant l'effet transitoire des USMB. Uniquement le groupe US3MB a réduit les valeurs de TEER à 16,7 % comparé au groupe contrôle de manière significative ($p < 0,05$). Une augmentation de la résistance 24 heures post-sono-perméabilisation a été observée dans tous les groupes d'études de manière plus flagrante pour les groupes US2MB et US3MB, pouvant s'expliquer par la croissance des cellules et le développement des jonctions intercellulaires. Elle est suivie d'une diminution de TEER pour tous les groupes, pouvant s'expliquer par la dégradation du développement cellulaire.

Ainsi les résultats du TEER et du passage du traceur fluorescent ont pu mettre en évidence l'augmentation de la perméabilité de la barrière biologique, suggérant une ouverture temporaire et réversible dans la barrière pour des propriétés acoustiques spécifiques en présence de microbulles. Cela souligne l'importance du phénomène des oscillations des microbulles dans la perméabilité membranaire. Malgré une efficacité globale peu élevée, les tendances de perméabilité ont été observées pour des pressions de 500 kPa et 800 kPa respectivement associées à des rapports cycliques de 30% et 10% en combinaison avec des microbulles. Cela suggère que l'USMB pourrait être une stratégie prometteuse pour améliorer la délivrance de RP.

Néanmoins, ce modèle *in vitro* en monocouche cellulaire reste un modèle simplifié fournissant une perspective des interactions cellulaires avec les MB en réponse aux stimuli ultrasonores. Cette étude constitue un point de départ pour des futures études fondamentales sur la capacité de différentes combinaisons d'US et de MB à optimiser la délivrance avant de passer à un stade préclinique.

Il est important de souligner certains points limitants. La formation de la monocouche peut présenter des variations d'homogénéité à travers l'insert contribuant ainsi aux variations observées. De plus, des facteurs tels que la position des électrodes, la température, la formulation du milieu peuvent également influencer les résultats et renforcer les variations.

Par ailleurs, des études complémentaires sont nécessaires pour approfondir notre compréhension des mécanismes sous-jacents des USMB sur la perméabilité. Cela inclut des évaluations de la viabilité cellulaire et des analyses microscopiques visant à quantifier l'accumulation intracellulaire du RP par sonoporation, ainsi qu'à confirmer la délivrance extravasculaire en observant la morphologie et l'intégrité des jonctions serrées. En effet, le complexe ligand-PSMA est internalisé dans la cellule et transporté dans les endosomes qui fusionnent ensuite avec les lysosomes. Après fusion, le PSMA est soit dégradé soit recyclé et retransporté à la membrane plasmique, influençant ainsi la disponibilité du récepteur à la surface cellulaire. Comprendre ces processus est crucial pour évaluer l'apport des USMB au niveau des transporteur et améliorer l'efficacité des traitements basés sur des ligands ciblant le PSMA.

IV. ETUDE DE L'EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE D'UN MODELE DE TUMEUR PROSTATIQUE EN SUSPENSION

L'efficacité thérapeutique est fortement dépendante de la quantité de médicaments délivrée aux cellules cibles dont l'absorption peut se produire par endocytose et exocytose, ou via des transporteurs membranaires pour certaines substances. L'application des USMB peut favoriser cette délivrance intracellulaire en provoquant des disruptions de la membrane plasmique et en facilitant l'endocytose. Ainsi les molécules absorbées par disruption de la membrane se localisent dans le cytoplasme, tandis que celles entrées par endocytose se retrouvent encapsulées dans des vésicules membranaires.

Dans le contexte de la thérapie que représente la RIV ciblant le PSMA, cette étude se penchera sur l'effet des différentes conditions ultrasonores sur des cellules tumorales prostatiques isolées en suspension telles que les cellules LNCaP, qui sont couramment utilisées dans les études sur le cancer de la prostate. L'efficacité des USMB dépend non seulement du type cellulaire mais également la molécule à délivrer. Cette étude se concentrera sur deux molécules de faible poids moléculaire dont l'une a été précédemment utilisée dans le modèle *in vitro* en monocouche correspondant au RP bimodale ciblant le PSMA marquée à la fois par le fluorophore cyanine 7 et l'isotope radioactif fluor 18. L'autre molécule est l'iodure de propidium (IP) couramment employé comme marqueur de sono-perméabilisation. Des contrôles appropriés comprenant des cellules non traitées seront mis en place, afin de déterminer l'impact direct des USMB sur la perméabilité.

Cette approche nous permettra de recueillir des données sur l'effet des USMB sur la perméabilité des membranes cellulaires, ainsi que sur la capacité d'accumulation du radiopharmaceutique dans les cellules tumorales en suspension.

IV.1 MATERIEL ET METHODES

IV.1.1 Dispositif d'étude

Le système à ultrasons tel que décrit précédemment est schématisé dans la **Figure 43** ci-dessous. Le dispositif expérimental suit la même configuration que celle utilisée pour la caractérisation des champs acoustiques. Il comprend un générateur de forme d'onde arbitraire connecté à un amplificateur, qui transmet des ondes ultrasonores au transducteur non focalisé ($f_0 = 1$ MHz, Imasonic). Une cuvette transparente en polystyrène équipée de fenêtres acoustiques (Kartell SPA, 45 mm de hauteur, 10 mm de diamètre interne, 12 mm de diamètre externe) contenant la suspension cellulaire dont le centre a été positionné à 3 cm, distance de champ proche du transducteur, dans un réservoir d'eau milli-Q dégazée à 37°C, est soumise à une agitation douce à l'aide d'un agitateur magnétique afin d'homogénéiser la solution pendant l'expérience.

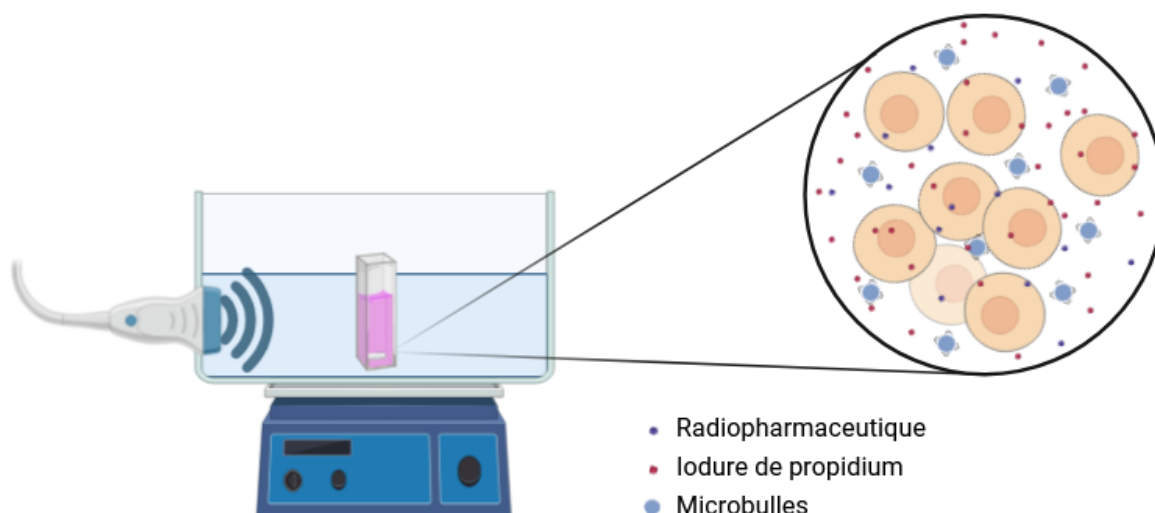


Figure 43 : Bain de sonication pour le modèle en suspension. Chaque cuvette transparente en plastique contenant la suspension cellulaire a été positionnée à 3 cm devant le transducteur et placée sous agitation douce avec un agitateur magnétique pour homogénéiser la solution.

IV.1.2 Modèle cellulaire tumorale prostatique

Depuis plusieurs décennies, les lignées cellulaires tumorales prostatiques les plus couramment utilisées pour la recherche sur le cancer de la prostate sont toutes dérivées de lésions métastatiques du cancer de la prostate : LNCaP du ganglion lymphatique, PC-3 de la vertèbre et DU145 du cerveau (Abate-Shen et de Almeida 2022; Moya et al. 2023; Naeem et al. s. d.).

Malgré son potentiel métastatique modéré, la lignée cellulaire DU-145 représente un cancer de la prostate à un stade avancé qui est indépendante des hormones et n'exprime pas le RA et la protéine du PSA. En effet, la plupart des tumeurs humaines de la prostate expriment le RA, ce qui fait du modèle DU-145 un modèle moins précis pour étudier la progression typique du cancer de la prostate dont la majorité des cancers de la prostate humains dépendent de l'action des androgènes pour leur croissance (Cunningham et You 2015; Naeem et al. s. d.; Sorvina et al. 2018).

La lignée PC3 est similaire aux cellules DU-145 puisqu'elle est insensible aux hormones et ne présente ni RA ni PSA au niveau de l'ARNm ou des protéines. Les taux de croissance des xénogreffes semblent similaires aux cellules DU-145 avec une latence d'environ une semaine et des temps de doublement de l'ordre de 4 à 5 jours (Cunningham et You 2015). Cependant, la lignée PC3 possède un potentiel métastatique supérieur à celui des cellules DU-145, qui est modéré, et celui des cellules LNCaP, qui est faible (Naeem et al. s. d.). Ainsi, la lignée PC3 est largement utilisée dans la recherche sur le cancer de la prostate résistant aux androgènes.

Enfin parmi cette triade, seules les cellules LNCaP sont sensibles aux androgènes avec une expression de l'ARNm et la protéine des récepteurs aux androgènes de l'antigène spécifique de la prostate, donnant

la capacité unique aux cellules LNCaP de modéliser la progression du cancer de la prostate (Abate-Shen et de Almeida 2022). Cette lignée conserve les caractéristiques cytologiques des tumeurs de la prostate ainsi que sa fonction de différenciation précoce, représentant des traits caractéristiques du cancer de la prostate dépendant des androgènes à un stade précoce. Elle présente une croissance *in vitro* lente avec un temps de doublement variant entre 60 et 72 heures, en fonction de la concentration de sérum. Les xénogreffes affichent un taux de réussite modeste de 50 %, avec un temps de doublement tumoral de 86 heures lorsqu'elles sont associées à une formulation de Matrigel™ (Moya et al. 2023)

En plus de ces lignées bien établies, la lignée 22Rv1 mérite également d'être mentionnée. Dérivée de la xénogreffe CWR22R obtenue d'un patient avec des métastases osseuses, cette lignée est indépendante des androgènes mais demeure sensible à ces hormones avec un temps de doublement de 35 à 40 heures. La lignée 22RV1 constitue un modèle pertinent pour le cancer de la prostate RA-positif illustrant des croissances dépendantes et indépendantes des récepteurs aux androgènes et permet d'explorer les variants d'épissage de ces RA liés à la résistance hormonale (Abate-Shen et de Almeida 2022; Moya et al. 2023).

Par ailleurs, les lignées cellulaires hautement métastatiques (PC3) et faiblement métastatiques (LNCaP) présentent des potentiels métastatiques plus élevés *in vivo* après culture sur des substrats imitant la rigidité de leur microenvironnement d'origine. Dans cette étude, nous avons réalisé une caractérisation quantitative des lignées cellulaires représentant la progression du cancer de la prostate : PC3 (hautement agressive), DU145 (modérément métastatique), LNCaP (faiblement métastatique) et 22Rv1 (tumorigène mais non métastatique). Les classifications de potentiel métastatique sont bien établies dans la littérature sur le cancer de la prostate, s'appuyant principalement sur la capacité de chaque lignée à métastaser *in vivo*, bien que l'invasivité soit également évaluée par des tests de migration et d'invasion *in vitro*.

Ainsi, la lignée cellulaire LNCaP exprimant le PSMA à la surface membranaire de la lignée cellulaire humaine s'est avérée être un modèle capable de reproduire une large gamme de stades de progression du cancer de la prostate, y compris la transition de la dépendance aux androgènes à la résistance à la castration, les métastases osseuses, la sensibilité aux médicaments, et même l'acquisition de caractéristiques de la NEPC (neuroendocrine prostate cancer) (Abate-Shen et de Almeida 2022). L'intégration de la lignée 22Rv1 à notre recherche permet d'approfondir notre compréhension des mécanismes de progression tumorale et de réponse aux traitements.

Pour les expériences en suspension cellulaire, les cellules LNCaP et 22RV1, ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 complété avec 10 % de FBS et 1 % d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) dans des conditions standardisées d'incubation à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Les cellules ont été sous-cultivées selon les protocoles standards de l'ATCC, avec une densité de semis comprise entre 1×10^4 et 2×10^5 cellules/cm².

IV.1.3 Evaluation de l'efficacité de la sono-perméabilisation

Le protocole de sono-perméabilisation pour le modèle en suspension repose sur celui déjà mis en place au sein du laboratoire (Fix 2019).

Les cellules LNCaP et 22RV1 ont été cultivées jusqu'à confluence, récoltées à l'aide de trypsine-EDTA à 0,25% et comptées sur des cellules de numération en plastique (Fast-Read 102®) en utilisant du bleu trypan comme révélateur, puis diluées pour obtenir une concentration de 5×10^5 cellules dans 1,5 mL de milieu de culture DMEM enrichi de GlutaMax complété par 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antimycotique et antibiotique. Cette suspension cellulaire maintenue dans un bain-marie à 37°C a ensuite été transférée dans une cuvette, préalablement stérilisée et maintenue sous lumière ultraviolette pendant 15 minutes avant expérience. Des cuvettes témoins contenant uniquement du milieu ont également été utilisées.

L'efficacité de la sono-perméabilisation a été évaluée en ajoutant 100 μ L d'iodure de propidium et 3×10^6 MB à chaque échantillon juste avant l'application des US, ce qui donne un ratio de 6 MB par cellule, considéré optimal pour éviter les agrégats tout en assurant le contact avec chaque cellule (Snipstad, Hanstad, et al. 2021). L'échantillon est exposé aux différentes conditions ultrasonores pendant 30 secondes, chaque condition étant répétée trois fois. Pendant l'exposition, la suspension cellulaire a été homogénéisée à l'aide d'un agitateur magnétique. Lorsque les US ne sont pas appliqués, l'échantillon est agité pendant 30 secondes dans les mêmes conditions que les échantillons traités par US.

Les conditions testées incluent des cellules non traitées, des cellules non traitées mais uniquement sous agitation, celles exposées uniquement aux MB (SonoVue), celles exposées uniquement aux US (US1, US2, US3), et celles traitées par une combinaison des deux (**Tableau 19**).

Immédiatement après traitement ultrasonore, chaque échantillon est incubé pendant 30 min à 37°C puis soumis à une centrifugation de 5 minutes à 200 G. Le surnageant est ensuite éliminé, et les cellules sont diluées dans 1,5 mL de PBS (Gibco-Invitrogen) avant d'être transférées dans un tube pour analyse par cytométrie en flux (Attune NxT, Invitrogen).

Tableau 19 : Conditions ultrasonores pour l'étude dans un modèle en suspension

Conditions	Microbulles	Fréquence	Pression de raréfaction	Rapport cyclique	Temps exposition
Contrôle	Non	Pas d'exposition ultrasonore			30 secondes
Agitation uniquement	Non				
MB	Oui				

US1	Non	1 MHz	200 kPa	50%
US1MB	Oui		200 kPa	50%
US2	Non		500 kPa	30%
US2MB	Oui		500 kPa	30%
US3	Non		800 kPa	10%
US3MB	Oui		800 kPa	10%

IV.1.3.1.1 Etude en cytométrie en flux

L'efficacité de la sono-perméabilisation à travers la génération des pores transitoires à la surface des cellules peut être évaluée par CMF. C'est une méthode d'analyse qualitative et quantitative qui permet de caractériser et compter des cellules mises en suspension dans un milieu et ce, à grande vitesse (plusieurs milliers d'événements par seconde). Ces cellules en suspension sont acheminées jusqu'à une source d'excitation lumineuse le plus souvent une source laser dont les longueurs d'ondes les plus utilisés dans les cytomètres de flux traditionnels sont de 488 nm (bleu), 405 nm (violet), 532 nm (vert), 552 nm (vert), 561 nm (vert-jaune), 640 nm (rouge) et 355 nm (ultraviolet). Les cellules excitées vont émettre en retour des signaux optiques correspondant à différents paramètres cellulaires tels que la diffusion de la lumière FSC, SSC et la fluorescence FL1, FL2, FL3 (McKinnon 2018; Zafrani et Monneret 2017) :

- Le paramètre FSC (forward scatter) correspond à la diffusion frontale de la lumière, dans la direction du rayonnement lumineux. L'intensité de ce paramètre renseigne sur la taille des cellules pour un type cellulaire donné ;
- Le paramètre SSC (side scatter) correspond à la diffusion latérale de la lumière, à un angle de 90°. Ce paramètre renseigne sur la granularité cellulaire, la structure interne et l'état des membranes.

L'utilisation de molécules fluorescentes, permet de quantifier le pourcentage de cellules sonoporées présentant une absorption du marqueur fluorescent, signe de perméabilisation. L'iodure de propidium est marqueur de viabilité cellulaire utilisé comme marqueur de perméabilité membranaire. C'est un colorant cationique, agent intercalant de l'ADN, ne traversant que les membranes cytoplasmiques endommagées. Il permet donc de mettre en évidence les cellules mortes et d'évaluer la viabilité des cellules par l'exclusion de l'IP ce qui permet de déterminer si la membrane cellulaire est intacte (McKinnon 2018; Zafrani et Monneret 2017).

Pour notre étude, l'évaluation de l'absorption de l'IP a été réalisée à l'aide avec un laser FL2 de longueur d'onde d'excitation de 574 nm. En outre, une cellule marquée par l'IP excitée par le laser va émettre de la fluorescence à une longueur d'onde de 617 nm. Ce signal optique va être détecté, amplifié et collecté par un système optique de filtre et de photomultiplicateurs avant d'être converti en signaux électriques.

Les tensions des détecteurs du cytomètre en flux utilisées tout au long des expériences de sono-perméabilisation sont les suivantes : la diffusion avant (FSC) varie entre 90V et 140V , la diffusion latérale (SSC) est maintenue à 310 V et le laser de 574 nm est constamment sur 330 V.

A partir des paramètres FSC, SSC, FL2, une sélection initiale des populations cellulaires d'intérêt (étape de « gating ») est effectuée pour distinguer les cellules tumorales. Les débris, les événements coïncidents représentant des amas de cellules ont ensuite été exclus et le pourcentage de cellules positives à l'iodure de propidium est mesuré. Les résultats d'absorption dans les cellules traitées sont ensuite normalisés par rapport aux valeurs de la condition témoin (sans US et sans MB) comme référence pour garantir une meilleure comparaison des tests effectués indépendamment. Ainsi, le niveau de perméabilisation des membranes cellulaires est défini comme un facteur d'augmentation par rapport au contrôle. Pour chaque histogramme, au moins 10 000 événements ont été pris en compte, et une fenêtre de détection a été définie de manière arbitraire pour mesurer l'intensité de fluorescence.

IV.1.3.2 Etude de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide d'un test colorimétrique basée sur la réduction du composé tétrazolium MTS par des cellules viables grâce à l'activité déshydrogénase de leurs mitochondries, produisant un produit de formazan coloré, soluble dans le milieu de culture cellulaire (Riss et al. 2016).

Plus précisément, le métabolisme des cellules génère du NADH (hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide) qui peut transférer son électron à un intermédiaire comme le phenazine ethyl sulfate (PES), qui aura la capacité de réduire le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolium (MTS) en formazan. La molécule colorée de formazan est directement soluble dans le milieu de culture et détectable par une mesure d'absorbance par spectrophotométrie à 490-500 nm. Ainsi, la quantité de formazan produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Le schéma de réactions est présenté dans **la Figure 44** (Riss et al. 2016).

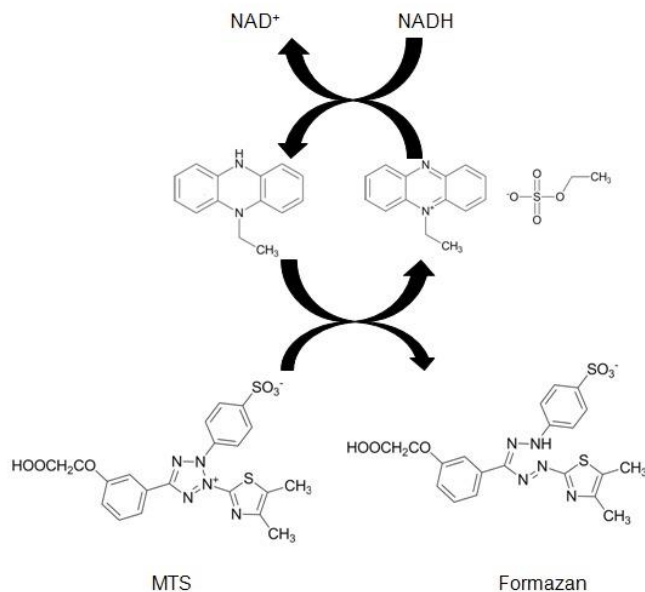


Figure 44: Principe du test MTS pour évaluer l'activité cellulaire. Le réactif intermédiaire (PES) transfère l'électron du NADH du cytoplasme dans le milieu de culture pour réduire le MTS en une molécule de formazan soluble (Riss et al. 2016)

Le test MTS est adapté pour évaluer la prolifération cellulaire et les facteurs de croissance, et analyser les composés cytotoxiques comme les médicaments anticancéreux, sans étapes intermédiaires nécessaires, sans lavage ni étape de solubilisation supplémentaires. Bien que le test ne soit pas quantitatif, un traitement est considéré comme toxique si la viabilité des cellules est inférieure à 80 %, conformément à la norme ISO 10993-5:2009.

L'évaluation de la cytotoxicité après sono-perméabilisation s'est appuyée sur le même protocole ultrasonore que celui décrit précédemment avec les mêmes conditions expérimentales, répétées 3 fois, mais sans ajout de marqueur.

Immédiatement après les 30 secondes de traitement ultrasonore, trois aliquots de chaque échantillon ont été déposés dans une plaque de 96 puits (Greiner Bio-One, fond plat) à une densité de 10 000 cellules par puits, puis ensuite été incubés à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 24h. Ce volume des aliquotes a été calculé pour obtenir environ 80 % de confluence dans les puits après 24 heures d'incubation (30 µL, soit environ 10 000 cellules diluées dans du DMEM supplémenté pour atteindre un volume total de 100 µL).

Après la période d'incubation, 20 µl de réactif MTS (CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent, Promega), manipulé à l'abri de la lumière, ont été ajoutés dans chaque puits selon les instructions du fabricant. Suite à une ré-incubation de 2 h à 37 °C en 5 % de CO₂, l'absorbance de chaque puits a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques (CLARIOstar Plus, BMG Labtech) pour évaluer l'absorbance à 490 nm. La condition témoin (sans MB ni US) a été fixée à 100 % de viabilité, et les valeurs d'absorbance des cellules traitées ont été normalisées par rapport à celles du témoin afin d'évaluer la toxicité du traitement.

IV.1.3.3 Analyse statistique

Les données acquises sur le cytomètre ont été analysées avec le logiciel FlowJo (v10.7). Divers paramètres statistiques, comme le nombre d'évènements ont été dérivés des populations cellulaires définies. Un test statistique ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Dunnett a été réalisé pour évaluer les effets des ultrasons et des microbulles sur le niveau d'absorption d'IP par les cellules. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v9.1.2, GraphPad Software). Le test de Shapiro Wilk a été utilisé pour évaluer la normalité des données de chaque échantillon, et un Q-Q plot a automatiquement été tracé. Sauf spécifié autrement, les résultats sont présentés sous la forme : valeur moyenne $\pm$ écart-type de la moyenne. Le niveau de significativité statistique des p-valeurs renvoyées par les tests est indiqué sur les graphiques par des astérisques : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

IV.2 RESULTATS

IV.2.1 Effet de la sono-perméabilisation dans un modèle *in vitro* en suspension

IV.2.1.1 Analyse de la perméabilité cellulaire à part d'un cytométrie en flux

La délivrance de médicaments *in vitro* médiée par US et MB repose sur la perméabilisation de la membrane cellulaire. Pour explorer l'effet des MB en association avec les US sur la perméabilité des cellules cancéreuses prostatiques, ces dernières ont été insonifiées sous agitation, selon les mêmes paramètres acoustiques investigués précédemment (3 réplicats par condition). Les conditions incluaient les US seules (US1, US2 et US3) et avec les MB (US1MB, US2MB et US3MB), en présence de l'iodure de propidium. Ce colorant imperméable à la membrane cellulaire émet une fluorescence rouge lorsqu'il s'intercale dans l'ADN simple ou double brin et se lie aux acides nucléiques. Ces expériences ont également été menées sur : un groupe de cellules contrôles avec une exposition simulée en l'absence de MB et d'agitation (cellules seules) ; un groupe de cellules uniquement sous agitation (cellules agitées) ; un groupe de cellules sous agitation et en présence de MB (cellules MB).

La fraction de cellules sonoporées a été évaluée par l'internalisation cellulaire de l'IP en mesurant l'intensité de fluorescence à l'aide d'un cytomètre en flux.

Lors de l'analyse cytométrique de l'impact cellulaire, deux populations distinctes se dessinent en se basant sur la sélection FSC vs SSC : les débris cellulaires dans le quadrant inférieur gauche, Q4 et les cellules viables dans le quadrant inférieur droit, Q3 (**Figure 45A**).

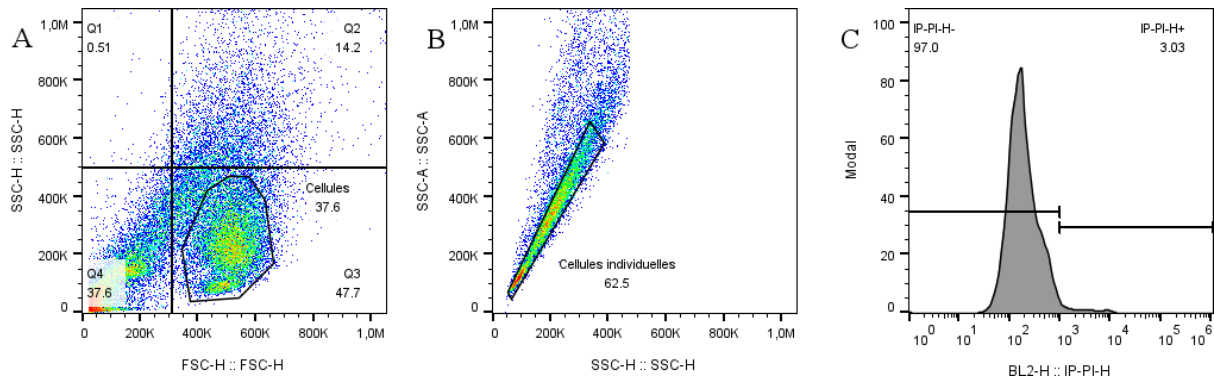
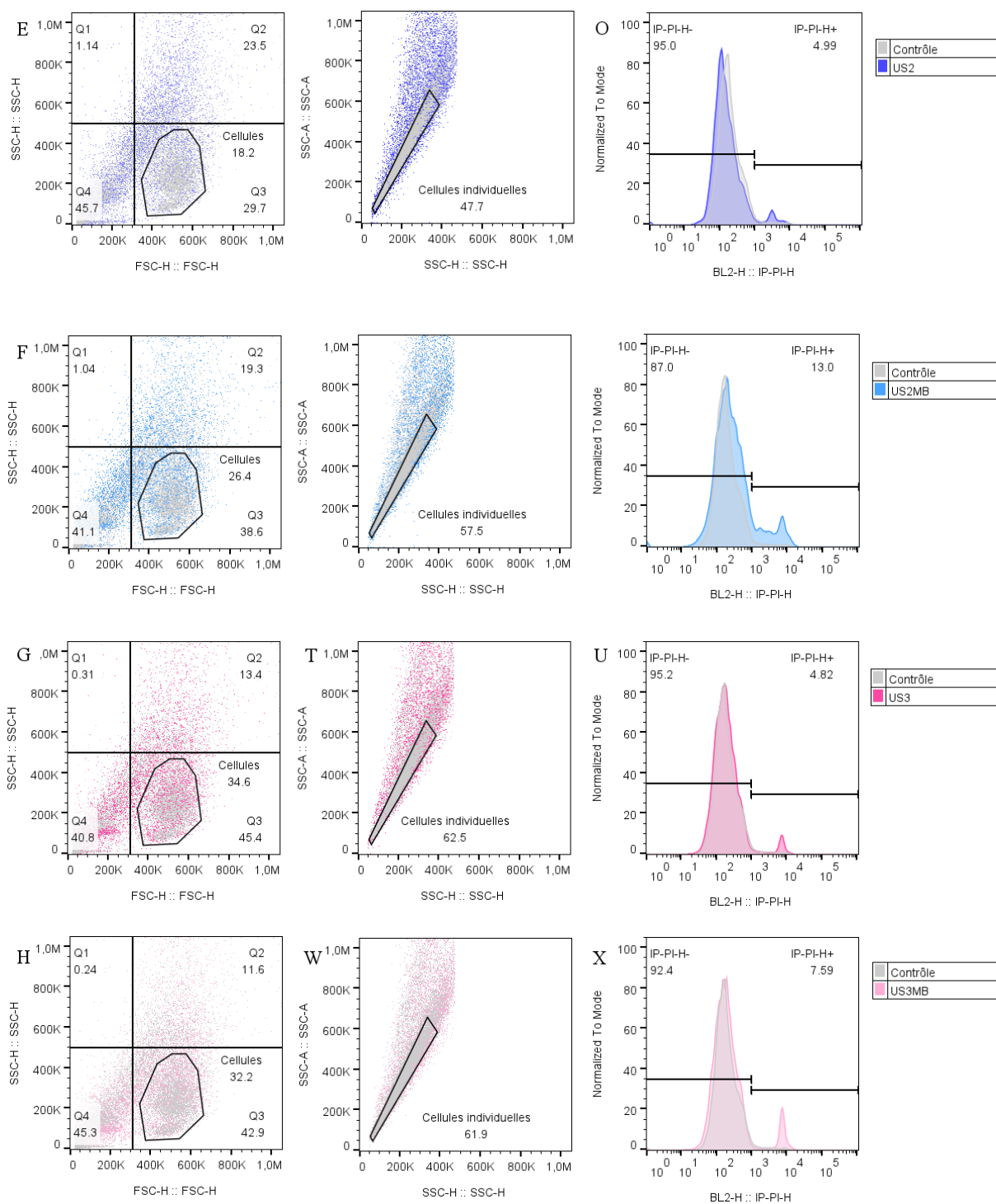


Figure 45 : Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules humaines de LNCaP cultivées in vitro incubées avec de l'iodure de propidium. (A) Graphique représentatif de la hauteur de diffusion avant (FSC-H) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H) afin d'identifier les cellules d'intérêt en fonction de leur taille et de leur granularité. Les cellules tumorales LNCaP (quadrant inférieur droit Q3) ont été distinguées des débris cellulaires (quadrant inférieur gauche Q4). (B) Graphique représentatif de la surface de diffusion latérale (SSC-A) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H). Les événements coïncidents ont été exclus de la population cellulaire. (C) Histogramme représentant le profil de coloration à l'IP avec une estimation du pourcentage de cellules sonoporées avec le pic d'intensité à droite. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'évènements de la population parentale est indiqué.

A partir de la sélection de la sous-population « cellules individuelles » de la population des « cellules » viables afin d'exclure les événements coïncidents, **Figure 45**, un histogramme représentant le profil d'absorption de l'IP de ces cellules a été obtenu, mettant en évidence un premier pic de fluorescence révélant les cellules non sonoporées et un deuxième signal d'intensité permettant d'estimer le pourcentage de cellules sonoporées.

L'efficacité de la sono-perméabilisation, définie comme le pourcentage de cellules positives à l'IP, a été quantifiée pour chaque groupe expérimentale et comparée au groupe témoin (**Figure 46**).



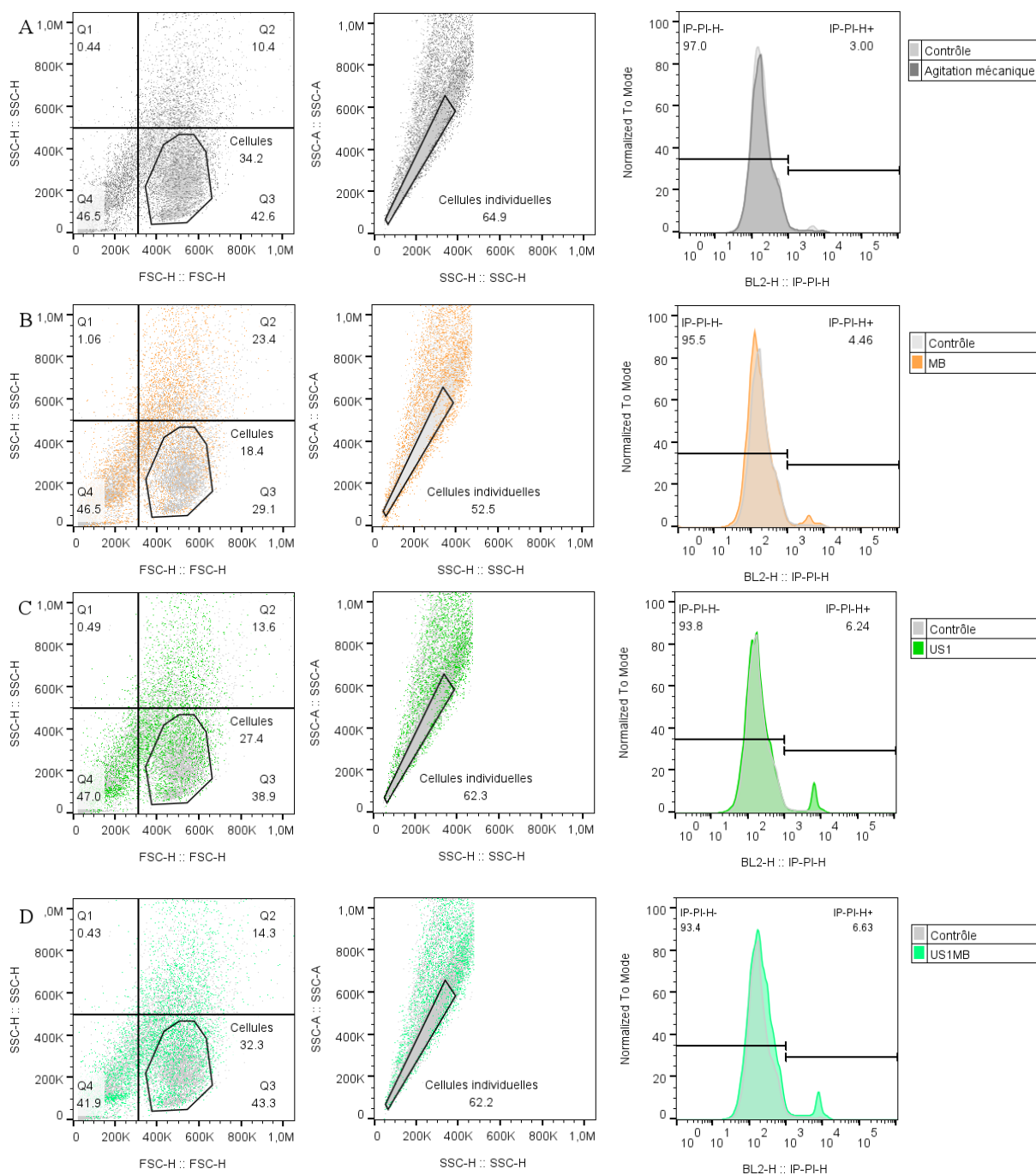


Figure 46 : Graphiques représentatifs des expériences de CMF sur les cellules humaines de LNCaP cultivées *in vitro* incubées avec de l'iodure de propidium pour les différentes conditions expérimentales. La colonne de gauche présente le graphique SSC-H en fonction de FSC-H, la colonne centrale affiche le graphique SSC-A en fonction de SSC-H, et la colonne de droite montre les histogrammes du profil d'absorption de l'IP des cellules tumorales. Les données du groupe témoin (cellules seules) ont été comparées et superposées avec ceux de chaque condition expérimentale (A) cellules non traitées mais uniquement sous agitation ; (B) cellules exposées uniquement aux MB (SonoVue) ; Cellules exposées (C) sans MB et (D) avec MB aux paramètres US1 ; Cellules exposées (E) sans MB et (F) avec MB aux paramètres US2 ; Cellules exposées (G) sans MB et (H) avec MB aux paramètres US3

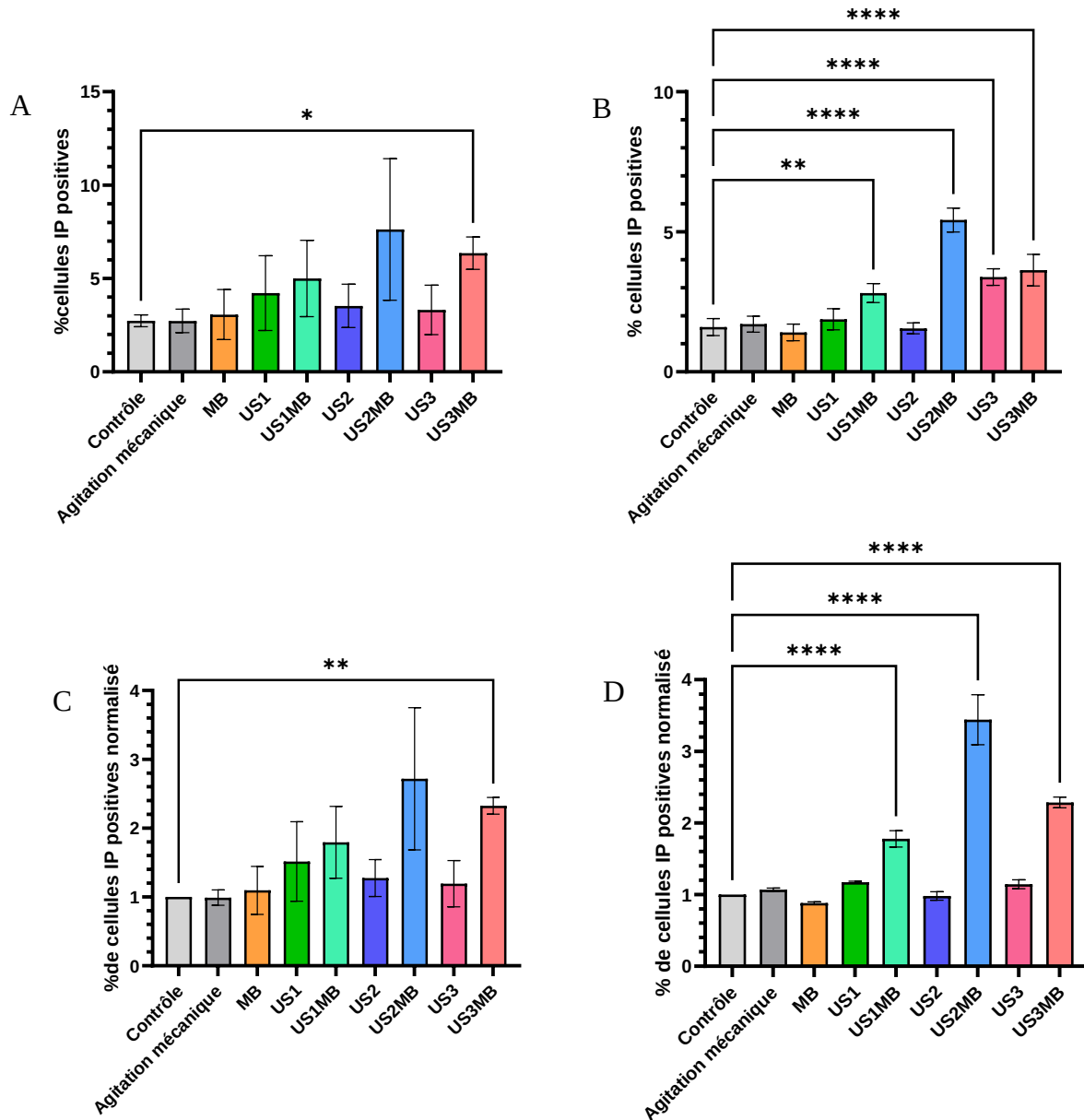


Figure 47 : Pourcentages de cellules IP positives respectivement pour les deux lignées cellulaires. (A) LNCaP et (B) 22RV après exposition par US médiée par des MB. Toutes données ont été normalisées par rapport au groupe témoin (cellules seules) respectivement pour les lignées cellulaires (C) LNCaP et (D) 22RV1. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n=3$) et ont été analysées par ANOVA à un facteur (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; * : $p \leq 0,001$; **** : $p \leq 0,0001$).**

Comme illustré dans la **Figure 47A**, les résultats pour la lignée LNCaP révèlent certaines tendances notables parmi les différents groupes. En l'absence d'US, les niveaux de perméabilisation de l'IP ont été les suivants pour le groupe contrôle ($2,73 \pm 0,32$ %), le groupe soumis uniquement à une agitation mécanique ($2,73 \pm 0,63$ %) et le groupe MB ($3,07 \pm 1,34$ %). Aucune différence significative a été constatée entre les trois conditions.

Ces résultats montrent d'une part que la simple incubation de l'IP avec les cellules qu'elle soit réalisée sans traitement, sous agitation mécanique ou en présence de microbulles, a entraîné une faible

internalisation de l'IP, et d'autre part que l'agitation ou les MB seules n'ont pas eu d'effet sur le niveau de perméabilisation. Par ailleurs, ce niveau de perméabilisation a faiblement augmenté, bien que de manière non significative, pour les cellules LNCaP traitées aux US par rapport au groupe contrôle, en particulier dans le groupe US1, qui présente un rapport cyclique de 50 % et une pression de raréfaction de 200 kPa ($4,22 \pm 2,00$ %).

En général, l'exposition des cellules aux US et aux MB a induit une augmentation du niveau d'efficacité de sono-perméabilisation par rapport au groupe témoin et aux groupes soumis aux mêmes paramètres en absence de MB ($4,22 \pm 2,00$ % avec US1, $3,54 \pm 1,16$ % avec US2, $3,32 \pm 1,32$ % avec US3 contre $5,01 \pm 2,04$ % avec US1MB, $7,62 \pm 3,79$ % avec US2MB, $6,36 \pm 0,86$ % avec US3MB). Ces cellules semblent montrer des degrés d'efficacité différents, le groupe US2MB ayant le taux de sono-perméabilisation le plus élevé, suivi des groupes US3MB et US1MB. Toutefois, seule la différence observée pour le groupe US3MB est statistiquement significative ($p \leq 0,05$). Bien que ces valeurs restent relativement faible, il est important de noter que les tests in vitro ont été réalisés avec des microbulles SonoVue, dont la stabilité et l'efficacité sont limitées, notamment dans les modèles en suspension utilisés dans cette étude.

Après normalisation de ces données par rapport au groupe contrôle, comme présenté dans la **Figure 47C**, les tendances précédemment observées demeurent identiques. Seul le groupe exposé aux paramètres US3MB (rapport cyclique de 10% et pression à 800 kPa) se distingue avec un ratio de perméabilisation membranaire statistiquement et significativement supérieur ($2,32 \pm 0,12$; $p \leq 0,01$) au groupe contrôle.

Contrairement aux cellules LNCaP, les cellules 22RV1 ont montré globalement un plus faible pourcentage de cellules sonoporées comme l'illustre la **Figure 47B** avec une valeur moyenne de $1,60 \pm 0,30$ % pour le groupe témoin. Le niveau de perméabilisation des cellules 22RV1 à l'IP exposées uniquement aux MB ($1,41 \pm 0,30$ %) ou à l'agitation ($1,70 \pm 0,29$ %) n'est statistiquement pas différent de la condition contrôle, ce qui indique qu'il n'y a pas d'impact significatif de ces traitements. De plus, l'exposition des cellules uniquement aux US n'a révélé aucune différence significative du niveau de perméabilisation à l'IP par rapport aux cellules témoin ($1,87 \pm 0,38$ % avec US1 ; $1,55 \pm 0,19$ % avec US2) à l'exception du groupe US3 qui affiche une valeur de $3,38 \pm 0,30$ % ($p \leq 0,01$). Les paramètres utilisés avec le groupe US3 semblent avoir un effet positif sur la perméabilisation des cellules 22RV1.

Une augmentation significative du niveau d'internalisation de l'IP a été observée pour tous les groupes soumis aux USMB. De manière similaire aux cellules LNCaP, la **Figure 47B** révèle que les cellules 22RV1 traitées avec US2MB ($5,42 \pm 0,43$ % ; $p \leq 0,0001$) ont montré un pourcentage de cellules positives à la fluorescence statistiquement plus important par rapport aux cellules de contrôle, suivi des groupes US3MB ($3,63 \pm 0,56$ % ; $p \leq 0,0001$) et US1MB ($2,82 \pm 0,34$ % ; $p \leq 0,0001$). En outre, la condition US2MB s'avère plus efficace que la condition US3MB pour induire la perméabilisation membranaire par rapport aux autres conditions.

Ces résultats ont également été normalisés par rapport au groupe contrôle (**Figure 47D**). Ainsi seules les différentes combinaisons USMB ont entraîné une augmentation statistiquement significative du niveau d'absorption de l'IP et donc de l'efficacité de sono-perméabilisation, particulièrement notable

pour le groupe US2MB ($3,44 \pm 0,35$; $p \leq 0,0001$) suivi de US3MB ($2,29 \pm 0,07$; $p \leq 0,0001$) et enfin US1MB ($1,78 \pm 0,11$; $p \leq 0,0001$).

Dans le cadre de notre étude *in vitro*, l'effet de la sono-perméabilisation via un traceur spécifique marquée à la cyanine 7 ciblant le PSMA a été étudié par analyse cytométrique (**Figure 48** et **Figure 49**). Bien qu'il ne soit pas analogue, ce traceur présente des caractéristiques proches de celles du médicament utilisé dans la RIV. L'objectif est d'explorer et évaluer si la sono-perméabilisation pourrait être transposée à ce type de thérapie ciblant le PSMA.

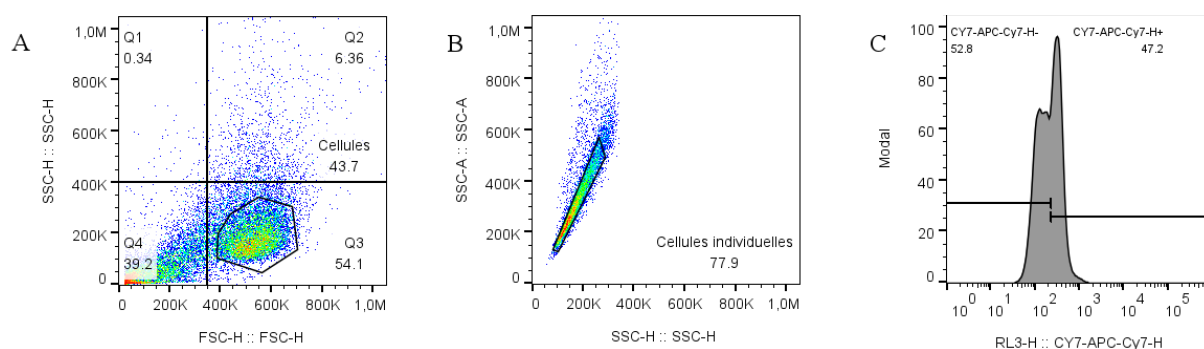


Figure 48 : Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules humaines de LNCaP cultivées *in vitro* incubées avec un ligand ciblant le PSMA marqué à la cyanine 7 (A) Graphique représentatif de la hauteur de diffusion avant (FSC-H) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H) afin d'identifier les cellules d'intérêt en fonction de leur taille et de leur granularité. Les cellules tumorales LNCaP (quadrant inférieur droit Q3) ont été distinguées des débris cellulaires (quadrant inférieur gauche Q4). (B) Graphique représentatif de la surface de diffusion latérale (SSC-A) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H). Les événements coïncidents ont été exclus de la population cellulaire. (C) Histogramme représentant le profil de coloration à l'IP avec une estimation du pourcentage de cellules sonoporées avec le pic d'intensité à droite. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'événements de la population parentale est indiqué

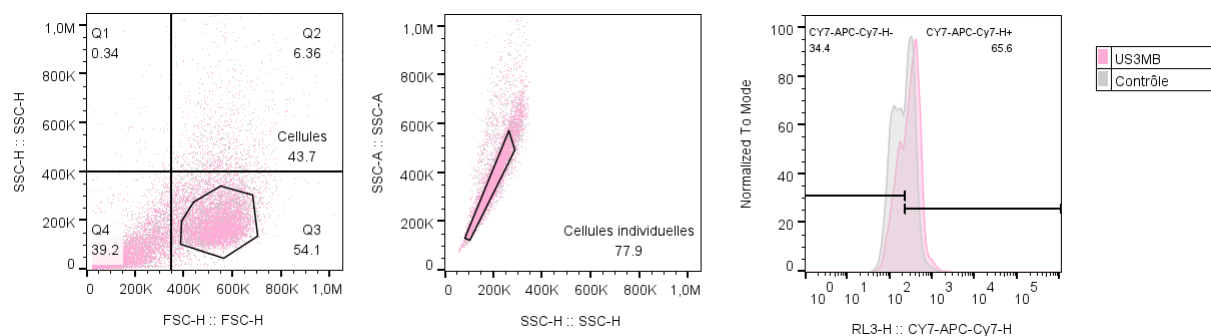


Figure 49 : Superposition des analyses de CMF (graphique de diffusion FSC et SSC, histogramme avec profil de fluorescence de traceur ciblant le PSMA marqué à la cyanine 7) pour les cellules LNCaP des groupes témoin (cellules seules) et US3MB.

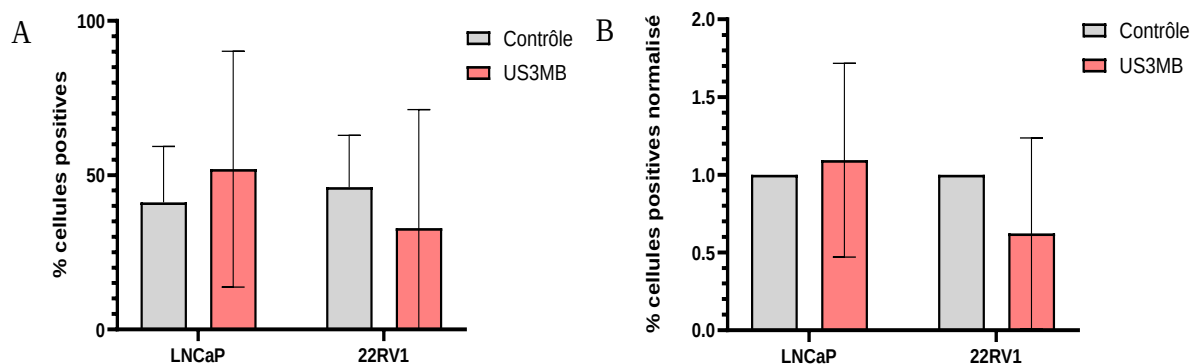


Figure 50 : (A) Pourcentage de cellules positives au traceur ciblant le PSMA marqué à la cyanine 7 pour la lignée LNCaP après exposition par ultrasons médiée par des microbulles. (B) Toutes les données ont été normalisées par rapport au groupe témoin. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3).

L'exploration de l'efficacité de la sono-perméabilisation a été réalisée en utilisant le paramètre US3MB, paramètre commun ayant démontré l'impact le plus significatif sur l'absorption de l'IP dans les deux lignées, LNCaP et 22RV1. Comme le montre la **Figure 50A.** et **Figure 50B.**, le traitement des cellules LNCaP avec la condition US3MB a entraîné une légère augmentation non significative du nombre de cellules positives au traceur ($51,96 \pm 38,20$ %) par rapport au groupe contrôle ($41,16 \pm 18,16$ %). En revanche, pour les cellules 22RV1, une diminution ($32,82 \pm 38,40$ %) a été observée par rapport à leur contrôle ($46,08 \pm 16,81$ %). Ces résultats mettent en évidence des différences d'absorption du traceur entre les lignées cellulaires LNCaP et 22RV1. Les LNCaP, exprimant fortement le PSMA, montrent une meilleure absorption du traceur grâce à l'effet positif de la sono-perméabilisation, qui améliore leur perméabilité membranaire. En revanche, les 22RV1, avec une expression modérée de PSMA, présentent une absorption réduite, possiblement en raison de leur morphologie hétérogène et de mécanismes de résistance qui diminuent leur sensibilité aux ultrasons. La sono-perméabilisation pour cette condition peut avoir des effets différents tel que la perturbation membranaire selon le type cellulaire.

IV.2.1.2 Effet des USMB sur la viabilité cellulaire

Afin d'étudier l'effet du traitement par sono-perméabilisation sur la viabilité cellulaire, les cellules ont été soumises au même protocole de sono-perméabilisation que celui appliqué précédemment. La cytotoxicité de chaque condition a été évaluée par un test MTS réalisé 24h après les traitements pour les deux lignée cellulaires LNCaP et 22RV1.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans la viabilité des cellules 22RV1 entre les sous-groupes de traitement (**Figure 51B**) contrairement pour les cellules LNCaP, où de fortes diminutions ont été observées (**Figure 51A**).

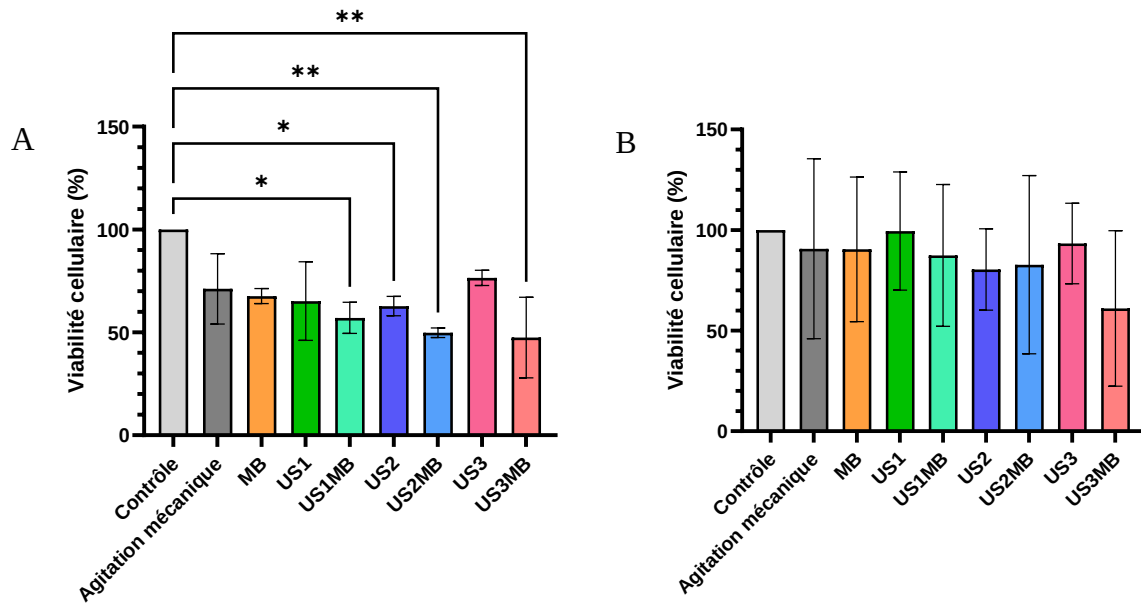


Figure 51 : Viabilité cellulaire mesurée à l'aide d'un test MTS 24h heures après les différents traitements avec ou sans ultrasons assistés ou non par microbulles SonoVue pour (A) la lignée LNCaP et (B) la lignée 22RV1. Chaque bar représente la moyenne de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreur indiquent l'écart type. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n=3$) et ont été analysées par ANOVA à un facteur suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey (* : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,01$).

En effet, la viabilité cellulaire des cellules 22RV1 était supérieure à 80 % dans tous les sous-groupes de traitement à l'exception de la condition US3MB ($61,00 \pm 38,66$ %), indiquant que ces sous-groupes ne sont pas considérés comme toxiques. Cependant, bien qu'aucun effet nocif significatif n'ait été observé sur la survie des cellules, la viabilité a diminué dans tous les groupes, y compris ceux soumis uniquement à l'agitation mécanique ($90,63 \pm 44,73$ %). Cela soulève des questions sur l'impact global de l'agitation sur la viabilité cellulaire, suggérant qu'elle pourrait avoir un effet, même en l'absence d'ultrasons et de microbulles. Toutefois l'exposition ultrasonore en présence de microbulles a entraîné une plus faible viabilité cellulaire ($87,36 \pm 35,24$ % pour US1MB, $82,76 \pm 44,29$ % pour US1MB et $61,00 \pm 38,66$ % pour US3MB).

Contrairement aux cellules 22RV1, la faible viabilité des cellules LNCaP inférieure à 80% comme l'indique la **Figure 51A**, montre que tous les groupes expérimentaux ont exercé un effet cytotoxique sur ces cellules, suggérant ainsi une sensibilité et une vulnérabilité accrues des LNCaP par rapport aux 22RV1. Nos données indiquent que l'agitation ont eu un effet non significatif néanmoins pertinent sur le nombre de cellules viables ($71,16 \pm 17,10$ %), soulignant l'influence de la force mécanique de l'agitation. L'exposition des cellules aux MB n'a pas modifié la viabilité cellulaire ($67,63 \pm 3,67$ %) par rapport à la condition avec agitation mécanique. De plus, pour les groupes traités aux US, la viabilité cellulaire observée était très similaire à celle de l'agitation mécanique ($65,18 \pm 19,11$ % pour US1 et $76,53 \pm 3,74$ % pour US3). En revanche, le groupe US2 a induit une diminution significative ($62,76 \pm 4,74$ %, $p < 0,05$) par rapport au groupe témoin, indiquant que ces paramètres US à elles-seules (500 kPa, 30 % de rapport cyclique) influencent la viabilité des LNCaP.

Toutes les cellules exposées à différents traitements de sono-perméabilisation avec des MB SonoVue ont montré une diminution statistiquement significative de la viabilité cellulaire. Le pourcentage de cellules viables était plus faible pour le groupe US3MB ($47,51 \pm 19,58 \%$, $p < 0,01$) suivi de près par US2MB ($49,82 \pm 2,29 \%$, $p < 0,01$) et enfin par US1MB ($57,18 \pm 7,62 \%$, $p < 0,05$).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent clairement que les microbulles SonoVue en combinaison avec les ultrasons ont induit une mortalité cellulaire significativement plus élevée par rapport au groupe contrôle pour deux conditions ultrasonores : US2MB pour une pressions négative de pression élevée (500 kPa) et impulsion modérée (rapport cyclique de 30 %) et US3MB pour une forte pressions négative de pression (800 kPa) et courte impulsion (rapport cyclique de 10 %). Cette interaction pourrait favoriser des effets de cavitation et de perturbation membranaire, qui sont des processus cruciaux dans la sono-perméabilisation.

IV.3 DISCUSSION

L'efficacité de la sono-perméabilisation par USMB repose d'une part sur l'induction d'une absorption accrue des molécules thérapeutiques, facilitée par des mécanismes comme la cavitation, qui augmente temporairement la perméabilité de la membrane cellulaire, et d'autre part par la préservation de l'intégrité cellulaire. De plus, le mécanisme de délivrance par sono-perméabilisation est influencé par la taille des molécules à transférer. En outre, la perméabilisation de la membrane cellulaire et la viabilité des cellules sont étroitement liées aux paramètres ultrasonores soulignant la nécessité d'optimiser les conditions de traitement afin d'exploiter pleinement le potentiel thérapeutique des USMB notamment dans le traitement du cancer de la prostate.

Actuellement, de nombreuses recherches sur les effets de la cavitation portent sur la perméabilité des membranes et l'administration de traitements. Cependant, peu d'études se focalisent spécifiquement sur la sono-perméabilisation combinée à des stratégies thérapeutiques dans le contexte du cancer de la prostate comme décrit précédemment dans le **Tableau 11** du chapitre 2.

Parmi les recherches pouvant être citées, (Y. H. Li et al. 2013) étudié l'application des USMB dans une approche de thérapie génique pour traiter le cancer de la prostate résistant aux hormones en utilisant un promoteur chimérique HTERT/CMV pour induire l'apoptose des cellules 22RV1 via l'expression de HSP70-ShRNA. Les cellules de carcinome prostatique 22RV1 en suspension ont été transfectées avec un plasmide contenant de l'HSP70-ShRNA en utilisant des ultrasons (1 MHz, puissance $0,8 \text{ W/cm}^2$, rapport cyclique 20%, durée d'exposition de 1 minute) associée à des MB SonoVue pour faciliter la perméabilité membranaire. Les résultats ont révélé un taux de transfection de 23,05 % et un pourcentage d'apoptose de 20,02 % dans le groupe exposé aux USMB, contre des taux significativement inférieurs dans les groupes témoins, soulignant ainsi l'efficacité des USMB. Dans l'étude de (WANG et al. 2013), l'utilisation des US à faible fréquence et énergie en concomitance avec des MB SonoVue a été investiguée pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie dans le cancer de la prostate, en particulier en utilisant le mitoxantrone HCl (MIT) sur des cellules DU145 en suspension. Les résultats indiquent que,

bien que les USMB (21 kHz, puissance 0,113 W/cm², rapport cyclique de 70 %, durée d'exposition de 1 minute) n'affectent pas la viabilité cellulaire à court ou long terme, elles améliorent de manière significative l'absorption intracellulaire de MIT, augmentant ainsi les effets thérapeutiques. Environ 31,26 % des cellules traitées par USMB étaient perméabilisées, contre seulement 9,74 % dans le groupe témoin. Ces résultats suggèrent que les USMB peuvent optimiser la délivrance des médicaments tout en minimisant les effets secondaires.

Ces études axées sur l'activation des MB SonoVue par ultrasons dans un modèle cellulaire prostatique en suspension mettent en évidence la possibilité d'améliorer la délivrance de médicaments dans le cas d'une thérapie génique où la survie cellulaire est souhaitée ou bien dans le cadre d'une chimiothérapie assistée par sono-perméabilisation, où l'objectif principal est de provoquer la mort cellulaire. Certaines études (Karshafian et al. 2009) ont démontré que la sono-perméabilisation et la cavitation peuvent avoir des effets anti-prolifératifs sur les cellules cancéreuses. Bien que l'augmentation de la perméabilité, provoquée par des déformations ou des dommages à la membrane, puisse être temporaire, elle peut impacter la viabilité cellulaire.

Dans le cadre de notre étude, l'effet de différents paramètres ultrasonores avec ou sans MB SonoVue a été investigué en utilisant deux lignées cellulaires de cancer de la prostate, LNCaP et 22RV1. L'efficacité de la sono-perméabilisation a été étudiée en évaluant l'absorption d'iodure de propidium, un marqueur souvent utilisé dans les études de sonoporation (Van Wamel et al., 2006, Zhou et al., 2009) mais également d'une molécule spécifique qui cible le PSMA, tout en explorant son impact potentiel sur la viabilité cellulaire.

Bien que les résultats obtenus mettent en évidence des différences significatives dans l'efficacité de la sono-perméabilisation entre les lignées cellulaires LNCaP et 22RV1, les tendances observées semblent conformes aux attentes. En effet, l'étude de (Fan, Chen, et Deng 2014) a classé 3 régimes d'oscillation des MB selon l'intensité ultrasonore appliquée. Le type 1 se caractérise par un régime de cavitation stable des MB, favorisant une haute viabilité cellulaire, mais sans induire de sono-perméabilisation et est atteint avec une pression négative de pression (PnP) faible et des impulsions longues. Le type 2, en revanche, entraîne la coalescence des microbulles et la mort cellulaire, étant réalisé avec une PnP élevée et des impulsions longues. Enfin, le type 3 se rapporte à un régime de cavitation inertielle, permettant la sono-perméabilisation des cellules tout en préservant une haute viabilité cellulaire, obtenu par de courtes impulsions à forte PnP. Ces trois comportements sont respectivement représentés dans notre étude par les conditions US1MB, US2MB et US3MB.

Les traitements sans ultrasons ont montré des niveaux de perméabilisation de l'iodure de propidium qui étaient faibles et comparables à ceux du groupe contrôle, avec 2,73 % pour les cellules LNCaP et 1,60 % pour les cellules 22RV1. L'application d'ultrasons seuls n'a entraîné qu'une légère amélioration de la perméabilisation, principalement dans le cas de la condition US1 pour la lignée LNCaP. En revanche, la combinaison des ultrasons et des microbulles a significativement augmenté l'absorption de l'IP, soulignant ainsi l'importance des microbulles pour une délivrance efficace. Les cellules LNCaP traitées avec les paramètres US1MB ont montré le plus faible pourcentage d'absorption, à 5,01 %, tandis que celles soumises à US2MB ont atteint le pourcentage le plus élevé de 7,62 %. Mais seules celles avec

US3MB, à 6,36 %, ont présenté une différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle ($p \leq 0,05$). Pour la lignée 22RV1, tous les groupes combinant ultrasons et microbulles ont également montré une augmentation significative de l'absorption de l'iodure de propidium, avec US2MB atteignant 5,42 % ($p \leq 0,0001$), suivi de US3MB à 3,63 % ($p \leq 0,0001$) et US1MB à 2,82 % ($p \leq 0,0001$). Ainsi, la condition US2MB a été identifiée comme la plus efficace pour induire la perméabilisation membranaire des cellules 22RV1. Ces résultats mettent en évidence une réponse moins efficace à la sono-perméabilisation pour les cellules 22RV1 par rapport aux cellules LNCaP, qui ont montré un meilleur taux de perméabilisation.

Néanmoins, ces valeurs restent faibles. Les études dans la littérature indiquent que l'efficacité des microbulles SonoVue pour la sono-perméabilisation peut être variable. Bien que certaines recherches rapportent des résultats prometteurs, d'autres soulignent que l'efficacité peut être faible, avec ce type de MB, en particulier dans certaines lignées cellulaires ou conditions expérimentales.

A l'inverse de l'IP, l'absorption du traceur spécifique ciblant le PSMA a montré des résultats contrastés. Les différences entre les cellules LNCaP et 22RV1 peuvent être attribuées à leur expression distincte du PSMA et à la manière dont elles réagissent au ciblage du traceur marqué à la cyanine 7. Les cellules LNCaP, qui expriment fortement le PSMA, ont montré une légère augmentation du nombre de cellules positives au traceur après traitement aux ultrasons, suggérant que la sono-perméabilisation a permis une meilleure internalisation du traceur. En revanche, les cellules 22RV1 avec une expression modérée du PSMA, ont révélé une diminution du nombre de cellules positives au traceur, ce qui pourrait expliquer leur moindre efficacité d'absorption, car moins de récepteurs disponibles signifie une réduction de l'interaction avec le traceur. La condition US2MB a été identifiée comme la plus efficace pour induire la perméabilisation membranaire

La sono-perméabilisation agit de manière distincte sur ces lignées cellulaires en raison de mécanismes sous-jacents variés, notamment par le biais d'un stress biomécanique pouvant induire des altérations de la membrane ou des réponses cellulaires actives et régulées. Ce stress pourrait provoquer une stimulation de l'endocytose, qui facilite l'absorption du traceur. Ainsi, les différences observées entre les deux lignées peuvent être attribuées à des variations dans l'efficacité des mécanismes d'absorption et d'endocytose en réponse aux stimuli par les USMB.

De plus, les caractéristiques morphologiques des cellules influencent également cette dynamique : les LNCaP, ayant une morphologie plus adhérente, facilitent l'interaction avec le traceur, alors que les 22RV1, plus hétérogènes, peuvent avoir une absorption moins efficace. Enfin, la résistance potentielle des 22RV1 aux effets des ultrasons, due à leur agressivité et à leur comportement moins adhérent, pourrait contribuer à cette différence de résultats.

Concernant la viabilité cellulaire, les cellules 22RV1 ont maintenu un taux supérieur à 80 % dans la plupart des traitements sauf dans la condition US3MB, où elle chute à 61 %. En revanche, les cellules LNCaP affichent une viabilité inférieure à 80 % dans tous les groupes, indiquant leur sensibilité accrue aux traitements, en particulier ceux associés USMB, qui ont provoqué une mortalité cellulaire signifi-

cativement plus élevée. L'utilisation de microbulles SonoVue en combinaison avec les ultrasons a particulièrement augmenté la mortalité cellulaire, notamment dans les groupes US3MB (47,51 %, $p < 0,01$) et US2MB (49,82 %, $p < 0,01$). Ces résultats suggèrent que l'association USMB induit des effets de cavitation et de perturbation membranaire entraînant une plus grande perméabilisation des cellules mais aussi un niveau plus élevé de cytotoxicité.

En conclusion, la combinaison d'ultrasons et de microbulles montre un potentiel prometteur pour améliorer l'efficacité de l'absorption de l'IP normalement imperméable à la membrane cellulaire dans un modèle de suspension cellulaire *in vitro*. Les impulsions modérées et courtes, associées à des pressions négatives élevées, se sont révélées particulièrement efficaces pour la perméabilisation bien qu'elles entraînent une réduction de la viabilité cellulaire. Cela suggère que l'augmentation de la délivrance de molécules facilitée par USMB est directement liée aux dommages causés à la membrane cellulaire.

Cette étude met également en lumière l'importance d'optimiser les conditions de sono-perméabilisation, mettant en évidence des différences significatives de réponse entre les lignées cellulaires LNCaP et 22RV1, liées au ciblage spécifique du PSMA. Ces résultats, en tenant compte du ciblage spécifique du PSMA, pourraient avoir des implications cruciales pour le développement de thérapies ciblées et de traitements utilisant les ultrasons dans le cadre de la RIV.

V. CONCLUSION

Les effets biologiques de la sono-perméabilisation médiée par l'application d'ultrasons conjointement à l'injection i.v. de microbulles dans le cadre des thérapies ciblées restent encore peu explorés. Cette étude *in vitro* met en avant l'efficacité prometteuse de la sono-perméabilisation pour faciliter le passage de molécules *thérapeutiques* à travers les barrières biologiques dans le cadre du cancer de la prostate. Les résultats obtenus à partir de deux modèles distincts — un modèle en monocouche cellulaire représentant la barrière épithéliale et un modèle cellulaire prostatique en suspension — illustrent que la combinaison de paramètres ultrasonores et de microbulles influence significativement la perméabilité cellulaire. Ainsi les impulsions ultrasonores brèves à forte pression de raréfaction se sont révélées être les plus efficaces pour induire une augmentation significative la perméabilité membranaire. Ces paramètres ont ainsi favorisé d'une part l'ouverture temporaire des jonctions serrées du modèle épithélial et la délivrance d'IP dans les cellules prostatiques en suspension, ce qui a été confirmé respectivement par les variations de la résistance électrique transépithéliale et de perméabilité ainsi que l'augmentation de l'absorption de l'IP. Ces changements mettent en lumière la capacité des USMB à moduler la fonction de la barrière et perméabilité cellulaire.

Cependant, bien que les résultats soient encourageants, il est crucial d'atteindre un équilibre entre l'augmentation de la perméabilité et la préservation de la viabilité cellulaire. Une diminution significative de la viabilité cellulaire en particulier pour les cellules LNCaP, indique que des dommages à la membrane

cellulaire peuvent survenir et persister. Cela met en exergue la nécessité d'optimiser les protocoles de traitement pour maximiser l'efficacité tout en minimisant les effets cytotoxiques.

En effet, les différences notables entre les lignées cellulaires LNCaP et 22RV1 soulignent l'importance d'adapter les conditions de traitement en fonction des caractéristiques spécifiques de chaque lignée, en tenant compte de leur expression du PSMA et de leurs réponses aux stimuli ultrasonores. Par exemple, les cellules LNCaP, qui expriment fortement le PSMA, montrent une meilleure internalisation des traceurs ciblés, tandis que les cellules 22RV1, avec une expression modérée, démontrent une moindre efficacité d'absorption.

Cependant, il demeure essentiel de comprendre les mécanismes sous-jacents pour lesquelles cette exposition a eu des effets hétérogènes sur l'efficacité de sono-perméabilisation. Des études supplémentaires sont nécessaires notamment sur les différences biophysiques entre ces deux lignées cellulaires en examinant par exemple les tailles de pores créés par la sonoporation, qui influencent la récupération cellulaire et l'absorption des médicaments. L'exploration des voies de délivrance intracellulaire et l'analyse des dynamiques des récepteurs pourraient constituer également des pistes de recherche.

En somme, cette étude constitue une base solide pour des recherches futures visant à optimiser les conditions de sono-perméabilisation et à évaluer les effets biologiques à des stades précliniques. L'accent mis sur le ciblage spécifique du PSMA et les variations entre les lignées cellulaires met en évidence l'importance d'une approche personnalisée dans le développement de traitements pour le cancer de la prostate, augmentant ainsi l'efficacité des thérapies tout en réduisant les risques associés.

Un suivi en temps réel de l'activité des microbulles durant le traitement pourrait également s'avérer utile pour prédire et contrôler le processus de sono-perméabilisation. En résumé, cette étude ouvre la voie à de futures investigations visant à mieux comprendre les effets biologiques, ce qui pourrait faire de la sono-perméabilisation un outil précieux pour le développement de thérapies ciblées dans le cadre de la RIV.

CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'IMPACT DE LA SONO-PERMEABILISATION SUR LA DISTRIBUTION D'UN TRACEUR A USAGE DIAGNOSTIQUE DANS UN MODELE PRECLINIQUE MURIN DU CANCER DE LA PROSTATE

I. INTRODUCTION	171
I. MISE EN PLACE D'UN MODELE PRECLINIQUE MURIN	172
I.1 REGLEMENTATION RELATIVE A L'EXPERIMENTATION ANIMALE	174
I.2 HEBERGEMENT DES SOURIS	174
I.3 SUIVI ET SURVEILLANCE DES SOURIS	174
I.4 ANESTHESIE DES SOURIS.....	175
II. ETUDE D'IMAGERIE BIMODALE TEP/OPTIQUE DE LA DISTRIBUTION D'UNE NOUVELLE SONDE PSMA.....	175
II.1 MATERIEL ET METHODES	176
II.1.1 <i>Modèle de tumeur xénogreffe</i>	176
II.1.2 <i>Imagerie TEP</i>	176
II.1.2.1 Evaluation de la pharmacocinétique dérivée de l'image (Dose traceuse).....	176
II.1.2.2 Evaluation de la sélectivité par test dit de blocking	177
II.1.3 <i>Imagerie optique par fluorescence</i>	178
II.2 RESULTATS	178
II.2.1 <i>Mise en place d'un modèle préclinique murin</i>	178
II.2.1.1 Evolution de la croissance tumorale <i>in vivo</i> : modèles de xénogreffe sous-cutanée	178
II.2.2 <i>Etude de la biodistribution d'un radiotraceur à usage diagnostique</i>	180
II.2.2.1 Imagerie TEP et biodistribution dérivée de l'image dans un modèle murin humanisé	180
II.2.2.2 Corrélation de la distribution déterminée par imagerie optique et par imagerie TEP	184
II.2.2.1 Evaluation de la sélectivité par test de blocking.....	186
II.3 DISCUSSION	192
III. ETUDE DE LA DELIVRANCE D'UN RADIOPHARMACEUTIQUE PAR ULTRASONS DANS UNE TUMEUR DE LA PROSTATE	194
III.1 MATERIEL ET METHODES	195
III.1.1 <i>Modèle murin</i>	195
III.1.2 <i>Configuration expérimentale ultrasonore</i>	196

III.1.3	Caractérisation de l'ouverture de la barrière endothéliale suite à la sono-perméabilisation	197
III.1.4	Imagerie TEP	198
III.1.5	Biodistribution ex vivo et compteur γ	198
III.1.6	Etude en cytométrie de flux	198
III.1.7	Echographie de contraste.....	199
III.1.8	Immuno-histofluorescence.....	201
III.2	RESULTATS	201
III.2.1	Effet de la sono-perméabilisation sur l'accumulation in vivo du médicament radiopharmaceutique dans les tumeurs	201
III.2.2	Evaluation de l'effet de la sono-perméabilisation sur la perfusion sanguine tumorale	206
III.2.3	Evaluation ex vivo de l'impact de la sono-perméabilisation.....	209
III.2.3.1	Evaluation ex vivo de l'impact de la thérapie ultrasonore sur la délivrance de médicament dans la tumeur	209
III.2.3.1	Evaluation de l'impact de la thérapie ultrasonore sur l'internalisation cellulaire médicament	212
III.3	DISCUSSIONS	216
IV.	ETUDE EN COURS SUR L'EVALUATION DE L'EFFET THERAPEUTIQUE SYNERGIQUE DU [177Lu]Lu-PSMA-617 COMBINE AUX USMB.....	220
IV.1	CONTEXTE	220
IV.2	MATERIEL ET METHODES	221
IV.2.1	Synthèse du radiopharmaceutique	221
IV.2.1.1	HPLC analytique.....	221
IV.2.1.2	Marquage de PSMA-617.....	221
IV.2.1.3	Stabilité in vitro de [177Lu]-PSMA.....	223
IV.2.2	Modèle murin	223
IV.2.3	Configuration expérimentale ultrason	223
IV.2.4	Protocole de traitement et conditions expérimentales.....	224
IV.2.4.1	Evaluation de la croissance tumorale	225
IV.2.4.2	Étude de survie chez la souris avec [177Lu]Lu-PSMA-617	225
IV.2.4.3	Biodistribution	225
V.	CONCLUSION.....	226

I. INTRODUCTION

Bien qu'une efficacité préliminaire *in vitro* a été démontrée, la translation vers des applications cliniques nécessite une prise en compte des défis inhérents aux environnements biologiques *in vivo*. En effet, les expériences *in vitro*, bien que contrôlées, ne peuvent pas reproduire fidèlement la complexité des tissus vivants et refléter des interactions des USMB à l'échelle des organes et des systèmes telles qu'elles se déroulent dans l'environnement naturel d'une tumeur *in vivo*. Cette lacune peut poser un risque lors de la transition clinique et compromettre l'atteinte des résultats attendus.

Le confinement vasculaire constitue un obstacle majeur à la délivrance efficace de médicaments. Les microbulles, souvent trop volumineuses pour traverser les ouvertures des parois endothéliales, voient leur oscillation et leur amplitude d'action atténuées par la structure vasculaire. La viscosité du sang et les variations de flux dans les différents types de vaisseaux compliquent davantage cette dynamique, rendant l'interaction entre microbulles et cellules moins prévisible. L'accumulation localisée des microbulles et leur exposition variable aux ultrasons ajoutent une couche de complexité qui influence leur capacité à induire des effets biologiques.

Parallèlement, les propriétés tissulaires des patients, telles que l'atténuation des ondes ultrasonores et la réponse des cellules endothéliales, varient considérablement. Ces différences peuvent altérer l'énergie transmise aux microbulles, modifiant ainsi leur comportement et leur efficacité. L'absence de membranes rigides en *in vivo* modifie également les réponses acoustiques des microbulles, engendrant des phénomènes tels que la formation de microjets lors de l'effondrement des bulles, potentiellement capables de perforer les cellules (Roovers et al. 2019).

Dans cette optique, il est crucial de développer des modèles plus complexes qui intègrent ces éléments variés afin de mieux simuler le comportement des microbulles et d'optimiser les stratégies de délivrance de médicaments. En effet, le système endothélial associé au microenvironnement tumoral joue un rôle clé dans les réponses au stress environnemental y compris celles aux thérapies (Garcia, Schmidt, et Hajal 2024). Par exemple, l'organisation des cellules immunitaires, telles que les macrophages et les lymphocytes T, peut moduler la réponse aux traitements et influencer le métabolisme tumoral. Ces cellules, souvent présentes en forte densité dans le microenvironnement tumoral, peuvent également sécréter des cytokines qui modifient la perméabilité vasculaire, affectant ainsi la biodistribution des agents thérapeutiques.

Certaines populations immunitaires, comme les macrophages M2, sont connues pour favoriser un environnement pro-tumoral en sécrétant des facteurs de croissance et des cytokines qui peuvent promouvoir l'angiogenèse et inhiber la réponse immunitaire antitumorale. Ces interactions peuvent non seulement altérer la réponse des tumeurs aux thérapies, mais également influencer le métabolisme tumoral, rendant certaines tumeurs plus résistantes aux traitements (De Palma et Lewis 2013).

De plus, le pH plus acide fréquemment observé dans les tumeurs, en raison d'un métabolisme altéré, joue un rôle crucial dans le passage et la diffusion des médicaments. Ce milieu acide peut influencer la solubilité et l'absorption des molécules thérapeutiques, affectant ainsi leur efficacité. Par exemple, des

médicaments dont l'absorption est dépendante du pH peuvent voir leur efficacité réduite dans cet environnement acide. En outre, des études montrent que les environnements tumoraux acides peuvent favoriser l'infiltration de certaines cellules immunitaires, modifiant ainsi le paysage immunitaire local et la réponse à la thérapie (Worsley, Veale, et Mayne 2022).

Dans ce contexte, les modèles précliniques murins pour le cancer de la prostate demeurent des outils essentiels pour améliorer notre compréhension du développement et de la progression de cette maladie, sur lesquels le potentiel thérapeutique de la sono-perméabilisation a été démontré dans plusieurs études. En intégrant des éléments tels que la perfusion sanguine, l'hétérogénéité tumorale, le métabolisme tumoral et la réponse immunitaire, l'évaluation *in vivo* permet non seulement d'améliorer notre compréhension de la biodistribution des traceurs à usage diagnostique ou thérapeutique dans les organes, mais elle ouvre également la voie à des protocoles de traitement plus adaptés et à des stratégies personnalisées pour optimiser l'efficacité des thérapies ciblées.

Ainsi ce chapitre se concentre sur l'évaluation de l'efficacité de la sono-perméabilisation pour améliorer la distribution d'un traceur à usage diagnostique, spécifiquement une sonde PSMA, dans un modèle préclinique murin de cancer de la prostate. Dans un premier temps, la mise en place d'un modèle préclinique murin sera décrite, incluant les considérations réglementaires relatives à l'expérimentation animale. Ensuite, une étude se concentrera sur l'imagerie bimodale TEP/optique, un outil prometteur pour évaluer la distribution d'une nouvelle sonde ciblant le PSMA. La dernière section traitera de la délivrance d'un radiopharmaceutique par USMB et détaillera la configuration expérimentale, la procédure de sono-perméabilisation et les techniques d'imagerie utilisées pour analyser l'impact sur l'accumulation du médicament dans les tumeurs. Les résultats mettent en évidence l'amélioration de la délivrance grâce à la sono-perméabilisation, en prenant également en compte son impact sur la perfusion sanguine tumorale. Ce chapitre met en avant le potentiel de la sono-perméabilisation pour optimiser la délivrance thérapeutique et améliorer les techniques d'imagerie diagnostique dans le cancer de la prostate.

I. MISE EN PLACE D'UN MODELE PRECLINIQUE MURIN

À l'heure actuelle, les modèles murins précliniques du cancer de la prostate demeurent des outils essentiels pour approfondir notre compréhension du développement, de la progression et du schéma métastatique de cette maladie. Parmi ces modèles (Thomsen et Busk 2023), les xénogreffes de cellules humaines sont les plus répandus, consistant en l'implantation de cellules tumorales dans des souris immunodéficientes. Comme mentionné précédemment, les lignées cellulaires fréquemment utilisées incluent PC3, DU145, LNCaP et 22RV1, chacune offrant la possibilité d'explorer différentes caractéristiques de la néoplasie prostatique. Ces cellules sont généralement inoculées par voie sous-cutanée, une méthode simple qui facilite la croissance tumorale et l'évaluation des résultats. Cependant, les tumeurs sous-cutanées peuvent différer des tumeurs orthotopiques en raison de leur moins bonne perfusion et de leur plus grande hypoxie, ce qui peut affecter les résultats des études. Bien que les

modèles orthotopiques soient plus fidèles à la maladie clinique, notre choix s'est tourné vers les modèles sous-cutanées souvent préférés pour les premières phases des essais de nouveaux traitements en raison de leur facilité d'utilisation et de la possibilité de surveiller la croissance tumorale de manière moins intrusive.

Pour favoriser la prise et la croissance des xénogreffes d'origine humaine tout en évitant leur rejet immunitaire, les modèles murins s'appuient sur des hôtes immunodéficients, parmi lesquels les souris nude, SCID, NOD-SCID, NOG/NSG ou RAG sont les plus couramment utilisées (J. Chen et al. 2022).

Les souris nude athymiques sont les premiers modèles de souris immunodéficientes. Elles présentent une mutation du gène FOXP1, ce qui perturbe le développement normal du thymus et entraîne une déficience en lymphocytes T matures et une immunité cellulaire réduite. Les souches couramment utilisées incluent BALB/c-nu, Swiss-nu, NC-nu, et NIH-nu. Cependant, en conservant composants du système immunitaire inné (neutrophiles, cellules dendritiques, cellules NK (Natural Killer)) et des cellules B, ces souris ne peuvent pas accepter complètement les greffes de cellules immunitaires humaines, limitant leur utilité comme modèles humanisés.

Les souris à immunodéficiência combinée sévère (SCID) résultent d'une mutation qui affecte la protéine kinase dépendante de l'ADN, essentielle à la synthèse des récepteurs des lymphocytes T et B. Dépourvues de lymphocytes B et T fonctionnels, les souris SCID tolèrent plus facilement les greffes comparativement à la lignée Nude. Néanmoins, les cellules Natural Killer (NK) et les macrophages fonctionnent normalement un phénomène de "fuite" chez des souris qui développent spontanément une réactivité immunitaire partielle et montrent une récupération des lymphocytes.

Les souris NOD-SCID combinent les caractéristiques des souris SCID et celles ayant un fond génétique NOD (Non Obese Diabetic). Elles présentent une perte fonctionnelle des lymphocytes T et B ainsi que des cellules NK, résultant en une immunodéficiência plus marquée que les autres modèles. Bien que la reconstruction des cellules B humaines dans les souris nude et SCID soit faible, elles ont une durée de vie limitée et une prédisposition accrue aux lymphomes thymiques.

Les souris NSG et NOG sont une lignée dérivée des NOD-SCID mais diffèrent par leur mutation du récepteur IL-2. Les NSG ont une mutation complète qui bloque toute activité du récepteur. Elles offrent un environnement encore plus permissif pour la transplantation de cellules et de tissus humains, sans fuite de cellules ni lymphomes thymiques spontanés.

Enfin, les souris RAG (Recombination Activating Gene) présentent des mutations dans les gènes impliqués dans la recombinaison des récepteurs des lymphocytes T et B. Elles sont incapables de générer des cellules T et B fonctionnelles. Les modèles RAG sont utilisés pour étudier les interactions avec le système immunitaire dans un contexte où la réponse immunitaire n'interfère pas.

Dans le cadre de l'établissement des modèles *in vivo* pour évaluer la stratégie de sono-perméabilisation, divers modèles précliniques de xénogreffe sous cutanée de cancer de la prostate ont été évalués comme montré dans le **Tableau 20** pour sélectionner le modèle le plus représentatif de la pathologie humaine (Rea et al. 2016) :

Tableau 20 : Modèles précliniques sous cutanées testées *in vivo*

Fournisseur	Souches	Age	Lignée cellulaire	Implantation
ENVIGO	FOXN1NU Mâles	6 semaines	LNCaP	5x10 ⁶ cellules/100µL (dilution 1:1 PBS/Matrigel)/ flanc
Charles River	Rj:ATHYM-Foxn1nu/nu Mâles	6 semaines	LNCaP	2,5x10 ⁶ cellules/100µL (dilution 1:1 PBS/Matrigel)/ flanc
Charles River	CB-17/Icr-Prkdc scid/Rj Mâles	6 semaines	LNCaP	2,5x10 ⁶ cellules/100µL (dilution 1:1 PBS/Matrigel)/ flanc
Janvier	Nude NMRI Mâles	12 semaines	LNCaP	5x10 ⁶ cellules/100µL (dilution 1:1 PBS/Matrigel)/ flanc
Janvier	Nude NMRI Mâles	12 semaines	22RV1	5x10 ⁶ cellules/100µL (dilution 1:1 PBS/Matrigel)/ flanc

I.1 REGLEMENTATION RELATIVE A L'EXPERIMENTATION ANIMALE

Tous les soins aux animaux et les procédures ont été réalisés conformément aux recommandations ARRIVE (« Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments ») (Percie du Sert et al., 2020), aux politiques et directives du Comité National de Réflexion Éthique sur l'Expérimentation Animale (CNREEA). Les études précliniques ont été menées sur la plateforme d'imagerie du CEA au service de l'Hôpital Frédéric Joliot.

I.2 HEBERGEMENT DES SOURIS

Les souris ont été logées dans une animalerie sécurisée de niveau de sécurité biologique 2 (A2). La température de la pièce était maintenue à 22°C avec un taux d'humidité contrôlé à 40 %, et un cycle de 12 heures de lumière suivi de 12 heures d'obscurité était appliqué. Les animaux ont été logés dans des cages ventilées individuellement, dotées de couvercles filtrants, avec 4 à 5 souris par cage. Elles avaient un accès libre à des cubes nutritionnels standards et à de l'eau.

I.3 SUIVI ET SURVEILLANCE DES SOURIS

Les souris ont été régulièrement observées et pesées 2 à 3 fois par semaine. Afin de minimiser leur souffrance, des seuils ont été définis pour l'interruption immédiate des expérimentations. Ces seuils

incluaient, par exemple, une perte de poids supérieure à 20 % par rapport au poids initial ou au poids le plus élevé de l'animal étudié, des signes de dyspnée, une diminution significative de l'activité ou une taille de tumeur sous-cutanée dépassant 1,5 cm dans son diamètre maximal. Les souris montrant des signes de faiblesse significative ou de souffrance étaient euthanasiées sous anesthésie.

I.4 ANESTHESIE DES SOURIS

Pour les procédures expérimentales nécessitant une anesthésie (comme l'injection sous-cutanée de cellules tumorales), les souris étaient anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Baxter) dans un mélange Air/O₂ (50/50 %) à un débit d'environ 1,5 L/min. La concentration utilisée était de 3 % pour l'induction et de 1,5 à 2 % pour le maintien de l'anesthésie. Un module d'anesthésie compact (Minerve) relié à un concentrateur d'oxygène médical JAY-5A OXY.LIFE (Longfian Scitech Co.) était utilisé. Pendant l'anesthésie et la période de réveil, les souris étaient placées sur des tapis chauffants.

II. ETUDE D'IMAGERIE BIMODALE TEP/OPTIQUE DE LA DISTRIBUTION D'UNE NOUVELLE SONDE PSMA

La recherche sur les méthodes d'imagerie avancées joue un rôle crucial dans l'optimisation des thérapies ciblées pour le cancer, notamment le cancer de la prostate. Avant d'explorer l'impact de la sonoperméabilisation sur la distribution d'un radiopharmaceutique à visée thérapeutique, la première phase de l'étude a été la sélection d'une sonde appropriée ciblant le PSMA. Cette phase préliminaire est essentielle pour garantir la précision et l'efficacité des traitements, tout en offrant une meilleure compréhension de la dynamique de distribution des agents thérapeutiques dans les tissus tumoraux.

Bien que cette approche permette d'évaluer la distribution du PSMA dans la complexité du microenvironnement tumoral au sein de notre modèle murin, un paramètre clé dans l'évaluation de l'impact des USMB, il est primordial de prendre en compte les différences d'expression de ce biomarqueur entre les tissus murins et humains. Chez l'Homme, le PSMA est surexprimé à la surface cellulaire de la plupart des cancers de la prostate primaires et métastatiques, ainsi que dans la néovasculature des tumeurs solides. Il présente des niveaux d'expression remarquablement élevés dans les cellules cancéreuses, mais une faible expression dans les tissus sains, à l'exception des reins, des glandes salivaires et des glandes lacrymales.

Bien que le PSMA humain et son homologue murin partagent une similarité de séquence allant de 86 % à 91 % et possèdent une activité enzymatique identique, des schémas d'expression diffèrent considérablement. L'expression du PSMA est fortement corrélée à l'expression du gène FOLH1, pouvant servir d'indicateur potentiel de pronostic dans le cancer. Des études ont montré une faible expression ou même une absence d'expression de FOLH1 (Folh1) dans la prostate des souris, tandis qu'elle peut varier de modérée à élevée dans d'autres contextes. Les souris présentent généralement des

niveaux d'expression du PSMA plus faibles que ceux des humains notamment dans les glandes salivaires, ce qui pourrait restreindre les études visant à prévenir la toxicité liée à la thérapie ciblée. Ces disparités peuvent également compromettre l'efficacité des radioligands ciblant le PSMA humain lorsqu'ils sont utilisés dans des modèles murins et compliquer l'interprétation des résultats des études précliniques. De ce fait, bien que des volumes d'intérêt (VOI) similaires soient définis chez le patient, les observations réalisées chez la souris peuvent être difficiles à transposer en raison de cette homologie partielle ((Simons et al. 2019).

Cette première étape vise à d'investiguer la biodistribution et la capacité à cibler les cellules tumorales prostatiques de la sonde bimodale basée sur un fluorophore proche infrarouge, la cyanine 7 et un radionucléide choisi pour sa demi-vie relativement courte, le ^{18}F , dans un modèle tumoral via imagerie TEP et optique.

Cette étude permettra d'ouvrir la voie à l'évaluation de l'effet des ultrasons en conjonction avec les MB sur un radioligand destiné à des applications diagnostiques. De plus la modalité fluorescente de cette sonde proche de l'infrarouge nous permettrait une certaine flexibilité dans la validation des paramètres ultrasonores nous évitant l'utilisation permanente de la sonde radiomarquée plus complexe à mettre en place en termes de production.

II.1 MATERIEL ET METHODES

II.1.1 Modèle de tumeur xénogreffe

Des souris immunodéficientes (Nude NMRI, Janvier, 12 semaines, 20–25 g) ont été utilisées pour le modèle sous-cutané. Testées négatives au test mycoplasme, les cellules LNCaP ($2,5 \times 10^6$) ont été suspendues dans un mélange 1:1 de milieu de culture RPMI 1640 et de Matrigel (100 μL) et injectées en sous-cutanée sur le flanc gauche pour établir des modèles de souris xénogreffées de tumeurs (< 2 mm de volume tumoral) après environ 8 semaines post-implantation.

L'implantation a été réalisée sous anesthésie par inhalation d'isoflurane dans l'oxygène (3-4% pour l'induction et 1-3% pour le maintien, débit de 2 L/min), sur tapis chauffant à 37°C pendant toute la procédure. La croissance tumorale a été surveillée chaque semaine et mesurée avec un pied à coulisse selon la formule longueur $\times$ largeur $\times$ hauteur $\times$ 0,5 (J. P. Miller et al. 2016).

II.1.2 Imagerie TEP

II.1.2.1 Evaluation de la pharmacocinétique dérivée de l'image (Dose traceuse)

Les souris ont été pesées, anesthésiées par inhalation d'isoflurane dans de l'oxygène puis placées en position ventrale dans l'imageur (Inveon, microPET, Siemens Healthcare, Knoxville, TN, USA) tout en étant maintenues à température à l'aide d'une lampe chauffante. Les animaux ont été injectés (bolus) via un cathéter placé dans la veine latérale de la queue et ont reçu $0,1363 \pm 0,0096$ nmol ($9,62 \pm 0,53$

MBq ; $152,5 \pm 10,7$ μ Ci) de la sonde bimodale suivi d'une acquisition dynamique TEP de 90 minutes associée à la fin de l'acquisition à un examen tomодensitométrie pour obtenir des informations anatomiques et enfin d'une acquisition fluorescente 2h post-injection (p.i.).

L'injection i.v. a été réalisée une fois les animaux positionnés dans l'imageur, quelques secondes (~ 20 s) après le lancement de l'acquisition TEP. Immédiatement après l'injection du traceur, le cathéter a été rincé avec de la solution saline (0,9 % NaCl) afin de minimiser la radioactivité résiduelle dans celui-ci.

Les données TEP ont été reconstruites en images à l'aide du logiciel Inveon Acquisition Workspace (v2.1, Siemens) en utilisant la méthode OP-OSEM (2 itérations OSEM3D) suivie de l'algorithme OS-MAP (18 itérations MAP avec 16 sous-ensembles par itération). Les images TEP avaient une matrice de 256 x 256 pixels et 159 coupes, avec une taille de voxel de 0,38 mm x 0,38 mm x 0,80 mm. Des corrections ont été appliquées pour normaliser les données TEP et compenser les variations de réponse du détecteur, ainsi que pour les phénomènes de temps mort, de diffusion, d'atténuation des photons et de décroissance radioactive. Les acquisitions dynamiques ont été organisées en 24 images. Les images TDM ont été reconstruites avec l'algorithme Feldkamp, résultant en une matrice de 496 x 496 pixels et 630 coupes, avec des voxels cubiques de 0,21 mm³.

Les images ont été analysées à l'aide du logiciel PMOD (v3.9). Les images ont d'abord été rognées autour du corps entier de l'animal puis rééchantillonnées par interpolation trilineaire pour harmoniser la taille des voxels avec celle de l'image TDM. Des VOI ont été tracés dans les organes principaux et les tumeurs, en utilisant l'image TDM comme référence, pour quantifier l'accumulation du composé dans les organes d'intérêt chez chaque animal. Des VOI sphériques ont ainsi été définis pour le cœur, le foie, la rate et les reins, tandis que le corps entier et les tumeurs sous-cutanées ont été délimités semi-automatiquement, puis ajustés manuellement. Pour les acquisitions dynamiques, une image moyenne a été produite à partir des 24 images, et les VOI ont été appliqués à cette image. La concentration d'activité moyenne du composé dans l'organe d'intérêt a été corrigée en prenant en compte la décroissance radioactive (utilisant la demi-vie du radionucléide) et en normalisant par rapport à l'activité totale administrée, permettant d'obtenir le pourcentage d'activité injectée par unité de volume de tissu (% ID/cm³).

II.1.2.2 Evaluation de la sélectivité par test dit de blocking

Des expériences « blocking » d'imagerie TEP-CT ont été réalisées pour évaluer la spécificité du radioligand pour la cible souhaitée et ainsi confirmer que son accumulation dans les xénogreffes humaines de LNCaP (PSMA+) est bien spécifique au PSMA. Ainsi un groupe supplémentaire de souris de la même souche porteuses de xénogreffes LNCaP a été injecté avec un excès molaire (70x) de la référence froide de la sonde bimodale non radiomarquée et diluée dans du NaCl comme agent de blocage, puis imagé sous caméra TEP dynamique de 60 minutes.

Tout comme les expériences d'imagerie en dose traceuse, la quantification de la concentration d'activité dans la tumeur xénogreffée a été réalisée en positionnant des VOI au niveau de la tumeur et des organes listés précédemment.

Si l'accumulation tumorale de notre sonde bimodale est spécifique au PSMA, l'excès de la référence froide non radiomarquée devrait saturer les sites de liaison PSMA dans la tumeur LNCaP PSMA+, entraînant ainsi une réduction de l'accumulation du radioligand, qui ne pourrait plus se fixer aux récepteurs au PSMA.

II.1.3 Imagerie optique par fluorescence

Une imagerie par fluorescence a été réalisée 2h post-injection de la sonde bimodale, à l'aide d'un système d'imagerie Vilber Fusion Fx. Ce système est généralement utilisé pour la capture d'images de gels, membranes et plaques en fluorescence, chimioluminescence. Il est équipé de caméras CCD avec un objectif V.070 et de plusieurs sources d'excitation et filtres (émission, excitation, dichroïque) pour détecter une large gamme de signaux fluorescents ou lumineux, soit 7 canaux de domaines IR, NIR, RVB et UV et 10 filtres à bande étroite disponibles de 440 à 850nm.

Les animaux ont été imagés dorsalement et ventralement ainsi que sur les côtés droit et gauche avec une longueur d'excitation fixée à 740 nm et celle d'émission à 780 nm avec un temps d'exposition de 30 s. Les images acquises ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J (v1.53i) pour le recadrage, l'inversion de couleur noir/blanc, et l'ajustement du contraste global.

Ainsi l'intensité fluorescente moyenne et donc l'accumulation tumorale de la sonde bimodale marquée à la cyanine 7 a été quantifiée en traçant des régions d'intérêt (ROI) autour de la tumeur qui a été délimitée en champ clair. Parallèlement, une ROI de même taille a été délimitée et définie comme le fond. Le signal de notre ROI a été corrigé en soustrayant le signal de fond.

II.2 RESULTATS

II.2.1 Mise en place d'un modèle préclinique murin

II.2.1.1 Evolution de la croissance tumorale *in vivo* : modèles de xénogreffe sous-cutanée

Pour valider notre modèle *in vivo* murin, la croissance tumorale a été évaluée dans cinq modèles de souris inoculées en sous-cutanée avec des xénogreffes de cellules LNCaP pour 4 souches de lignées différentes et des cellules 22RV1 pour une souche, illustrée dans la **Figure 52**.

Les modèles Rj:ATHYM-Foxn1nu/nu(LNCaP) et CB-17/Icr-Prkdc scid/Rj(LNCaP) présentaient de faibles signes de génération tumorale primaire 7 jours après implantation néanmoins significative pour la souche Rj:ATHYM-Foxn1nu/nu ($p < 0,0001$) par rapport aux autres groupes avec respectivement un volume tumoral moyen de $156,10 \pm 18,68 \text{ mm}^3$ et de $81,77 \pm 21,04 \text{ mm}^3$. Cependant ces deux modèles ont montré par la suite peu d'augmentation subséquente malgré un taux de prise tumorale de 100% ($n=6/6$) respectivement à 28 et 31 jours post-implantation. Les animaux du groupe FOXN1NU (LNCaP)

n'ont montré aucune génération tumorale jusqu'à 4 semaines après implantation et ensuite à un rythme significativement lent avec un volume tumorale moyen inférieur à 100 mm³ à la fin de l'étude (74,13 ± 104,83 mm³). Notamment, le taux de prise tumorale pour ce groupe était faible, se limitant à n=2/6, soit 33% de prise tumorale.

Le modèle Nude/NMRI a montré un temps de latence de 2 semaines avant l'apparition d'une prise tumorale. À 28 jours, le taux de prise tumorale pour ce modèle était de n=6/7, soit 85%. Par la suite, les tumeurs ont rapidement atteint un volume moyen de 964,06 ± 323,71 mm³ pour la lignée 22RV1 et 1702,90 ± 581,98 mm³ pour la lignée LNCaP, 39 jours après implantation. L'analyse de la croissance tumorale a révélé une différence significative ($p < 0,0001$) de ce modèle par rapport aux autres groupes. Bien que non significative, une différence de volume est observée entre la lignée 22RV1 et LNCaP pour la même souche de souris, avec un volume tumoral supérieur pour les cellules LNCaP.

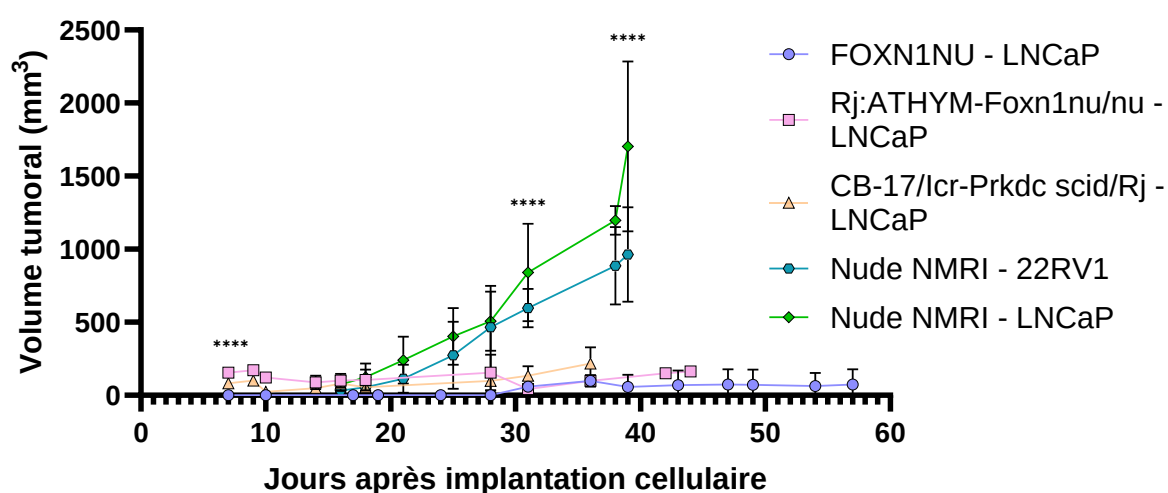


Figure 52 : Evolution de la croissance tumorale in vivo : comparaison des modèles de xénogreffe sous-cutanée de tumeurs prostatiques. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de comparaisons multiples de Tukey (**** $p < 0,0001$).

Compte tenu des résultats concernant la vitesse de croissance, le volume et la prise tumorale, ainsi que des différences significatives observées, le modèle Nude/NMRI se distingue comme étant le plus adapté pour mener des études *in vivo* et sera désormais privilégié dans nos travaux.

Il est intéressant de relever que le choix de notre modèle-sous cutanée ne concorde pas à ce qui était attendu, étant donné que le modèle SCID est souvent considéré comme un meilleur modèle que le modèle Nude pour une prise de xénogreffe et une croissance tumorale. Cependant, les résultats observés dans la littérature varient considérablement d'une étude à l'autre, avec des différences notables entre les modèles et les taux de croissance tumorale. Par exemple, dans certaines études, les modèles SCID portant des xénogreffes LNCaP montrent une croissance tumorale variable atteignant un volume moyen de 82,9 ± 64,7 mm³ après 40 jours post-implantation (Soeda et al. 2019) ou des tumeurs pouvant atteindre un diamètre de 4 à 8 mm après 3 à 5 semaines ((Robu et al. 2018). En revanche, les études sur les souris Nude LNCaP, ont rapportées un taux de prise tumorale plus modéré avec seulement 58,3 %

des animaux avec les premières tumeurs palpables entre 30 et 33 jours après (Liu et al. 2021) et dans certains cas, une prise tumorale plus élevée, avec 68 % des souris montrant une croissance tumorale visible après 6 semaines, et 88 % développant des tumeurs d'au moins 100 mm³ en volume après 3 mois (Lim et al. 1993). Il existe une variabilité de réponses tumorales en fonction des différents modèles murins, des lignées cellulaires utilisées et des conditions expérimentales.

II.2.2 Etude de la biodistribution d'un radiotracer à usage diagnostique

II.2.2.1 Imagerie TEP et biodistribution dérivée de l'image dans un modèle murin humanisé

Lors de cette étude, une sonde dédiée à l'imagerie a été produite, consistant en un ligand du PSMA doublement conjugué au marqueur radioactif et au marqueur fluorescent soit le [¹⁸F]F-Cy7-PSMA.

Afin d'évaluer les performances de ce radiotracer [¹⁸F]F-Cy7-PSMA en tant qu'agent d'imagerie, des études d'imagerie TEP et de biodistribution *in vivo* ont été réalisées sur un modèle de souris nude mâles implantées avec une xénogreffes sous-cutanée gauche de tumeurs prostatiques LNCaP (PSMA +).

L'imagerie TEP dynamique de 60 minutes après injection de $0,1363 \pm 0,0096$ nmol ($9,62 \pm 0,53$ MBq ; $152,5 \pm 10,7$ µCi) de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA a révélé une accumulation continue de ce dernier dans la tumeur, mais aussi au niveau des organes d'élimination que sont le foie, les reins et y compris dans le tractus intestinal (**Figure 53**), confirmant une élimination rapide dans le foie et les reins.

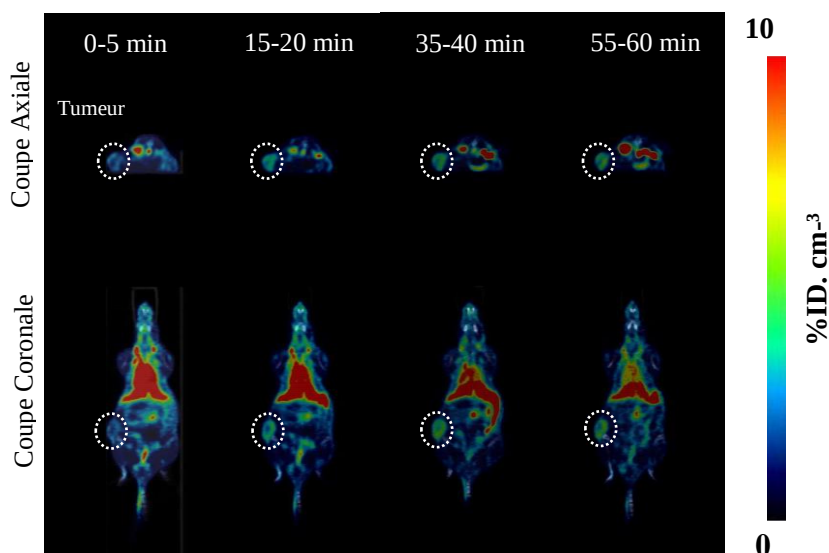


Figure 53 : Images TEP/TDM dynamiques représentatives (coupes axiale et coronale) moyennées de 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes post-injection du traceur [¹⁸F]F-Cy7-PSMA chez des souris mâles (n=3) porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), entourées par les cercles blancs en pointillés).

A partir de ces images TEP, une analyse des VOI de différents organes a été utilisée pour quantifier la biodistribution du radiotraceur. Comme illustré dans les **Figure 53** et **Figure 54**, dès l'injection du radiotraceur, la diffusion rapide est observée dans les organes exprimant le PSMA notamment les glandes salivaires et lacrymales, y compris la tumeur LNCaP sous-cutanée et les reins ainsi que d'autres organes tels que le foie ou la rate, comme en témoigne l'activité radioactive moyenne calculée sur une fenêtre d'images de 5 minutes à différents temps suivant l'injection du traceur. Ainsi l'accumulation initiale sur l'intervalle de 0-5 minutes post-injection, classée par ordre croissant était la suivante : $12,38 \pm 4,79$ %ID.cm⁻³ pour le foie ; $9,34 \pm 2,93$ %ID.cm⁻³ pour le thymus ; $8,78 \pm 3,17$ %ID.cm⁻³ et $9,37 \pm 3,21$ %ID.cm⁻³ respectivement pour les reins gauche et droite ; $5,51 \pm 1,73$ %ID.cm⁻³ pour la glande salivaire gauche ; $5,44 \pm 1,78$ %ID.cm⁻³ pour la rate ; $4,10 \pm 1,23$ %ID.cm⁻³ pour la glande lacrymale gauche ; $1,70 \pm 0,72$ %ID.cm⁻³ pour la tumeur.

Cependant le traceur est rapidement éliminé dans la vessie et l'intestin avec une activité initiale qui diminue progressivement dans le thymus ($6,10 \pm 0,40$ %ID.cm⁻³), dans la glande salivaire ($4,26 \pm 0,9$ %ID.cm⁻³), lacrymale ($3,18 \pm 0,21$ %ID.cm⁻³) et de manière significative dans le compartiment sanguin ($9,21 \pm 0,79$ %ID.cm⁻³, $p < 0,05$) dès l'intervalle 15-20 minutes post-injection. En revanche, cette réduction commence à partir de l'intervalle 30-35 minutes post-injection pour le foie ($11,69 \pm 0,40$ %ID.cm⁻³) et la rate ($5,36 \pm 0,11$ %ID.cm⁻³). Parallèlement à cette diminution, une augmentation significative et continue de l'activité radioactive est observée dans les reins gauche ($14,94 \pm 0,45$ %ID.cm⁻³, $p < 0,001$) et droit ($16,17 \pm 0,68$ %ID.cm⁻³, $p < 0,001$) à partir de l'intervalle 15-20 minutes post-injection ainsi que dans la vessie ($5,86 \pm 0,339$ %ID.cm⁻³, $p < 0,05$) et l'intestin ($21,32 \pm 0,29$ %ID.cm⁻³, $p < 0,0001$), montrant la plus forte absorption tissulaire dès l'intervalle 35-40 minutes post-injection.

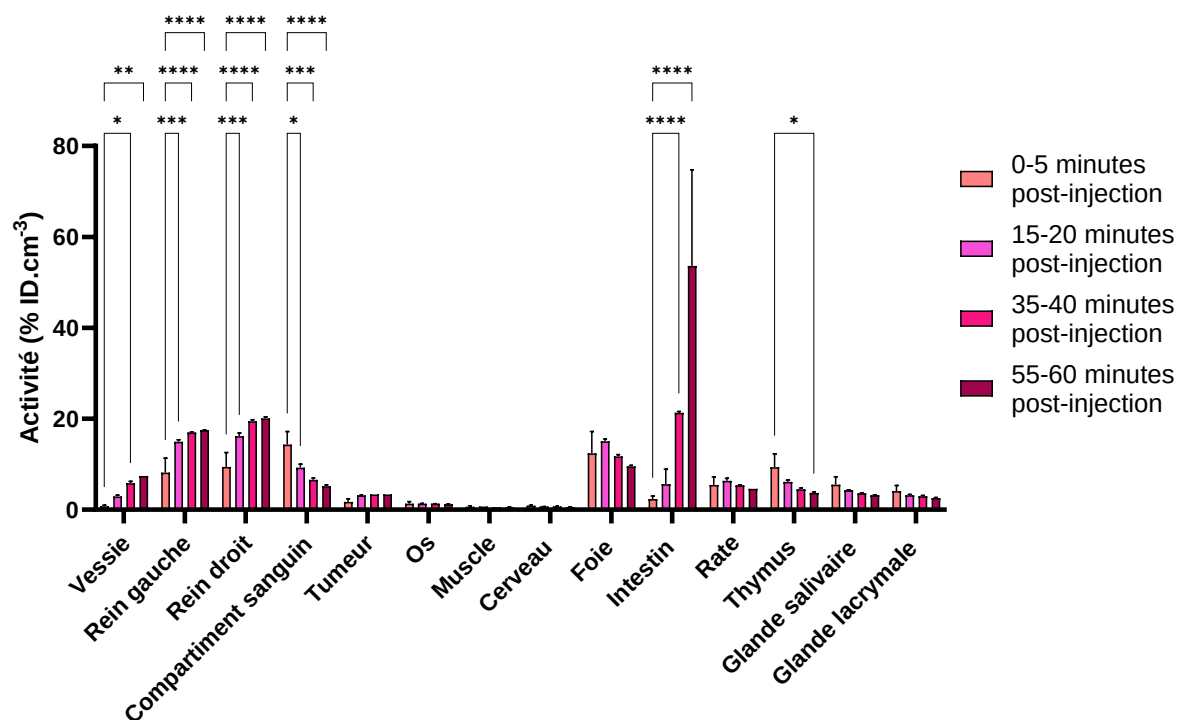


Figure 54 : Quantification in vivo de la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA dans plusieurs organes. Les données ont été obtenues à partir de l'analyse des VOI des organes sur la moyenne des frames TEP 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes après l'injection chez les souris porteuses de xénogreffes LNCaP. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Dunnett (* : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001, **** : p < 0,0001).

Chez les souris implantées avec les xénogreffes humaines LNCaP, l'accumulation du radioligand [¹⁸F]F-Cy7-PSMA dans les autres tissus que la tumeur était relativement élevée, à l'exception de l'os ($1,30 \pm 0,24$ %ID.cm⁻³), du muscle ($0,63 \pm 0,13$ %ID.cm⁻³) et du cerveau ($0,73 \pm 0,14$ %ID.cm⁻³), présentant une faible radioactivité avec un niveau stable à travers les différents intervalles de temps.

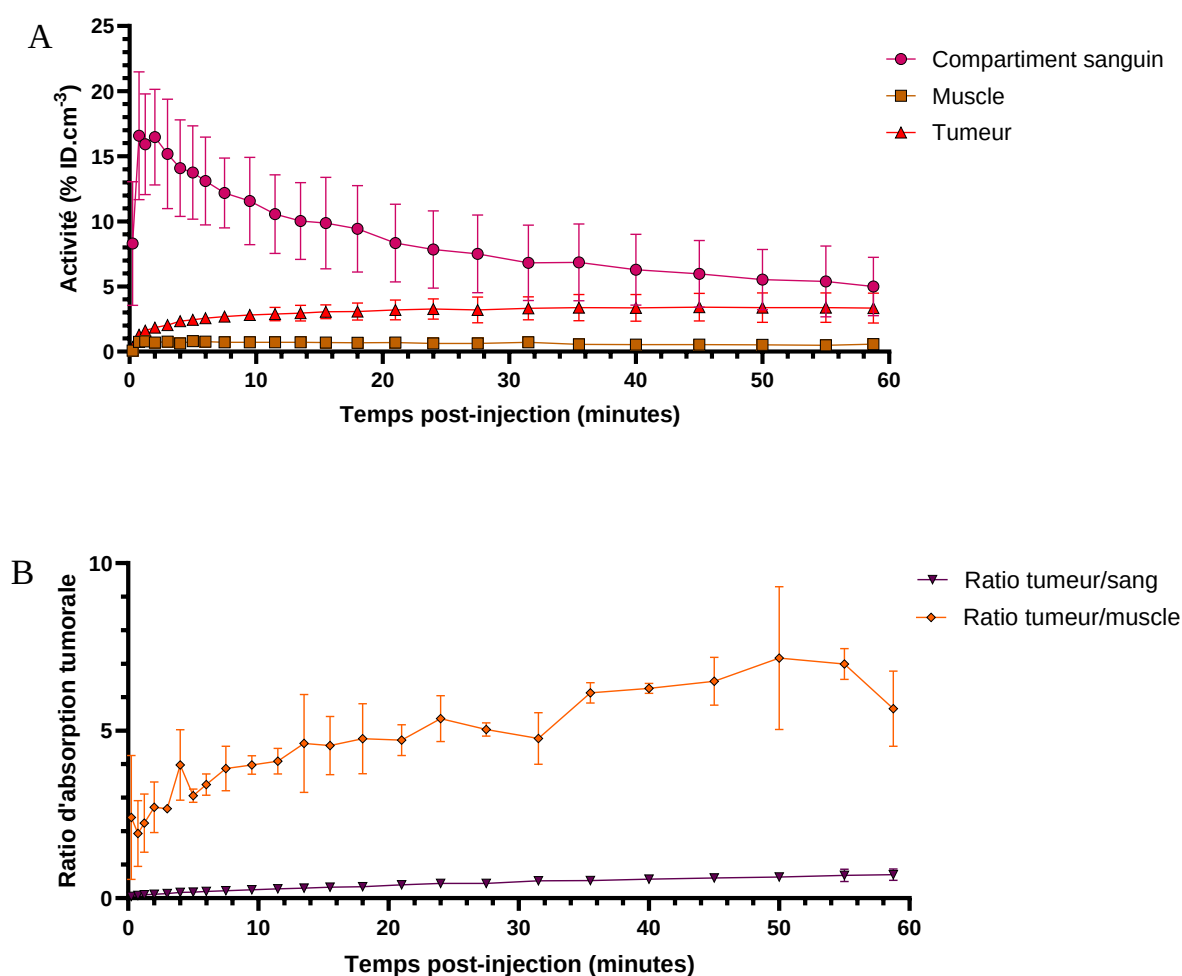


Figure 55 : Quantification *in vivo* de (A) la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ au sein de la tumeur, du muscle et du compartiment sanguin et (B) le ratio d'absorption tumorale par rapport au compartiment sanguin et au muscle au cours du temps chez les souris (n=3) porteuses de xénogreffes LNCaP. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3).

Sur la **Figure 55A**, la biodistribution *in vivo* a montré une accumulation tumorale rapide et continue, atteignant un plateau vers 30 minutes post-injection avec un maximum de $3,40 \pm 1,07$ %ID.cm⁻³ à 45 minutes après injection du traceur, mettant en évidence un schéma de rétention tumorale stable dans le temps jusqu'à la fin de l'imagerie TEP dynamique.

Cela contraste avec la distribution du traceur dans les autres tissus, où l'on observe une prise initiale rapide dans le compartiment sanguin, quantifié à partir d'une VOI du ventricule gauche. Le compartiment sanguin cardiaque a montré ainsi une accumulation élevée atteignant un pic maximal à 2 minutes post-injection ($16,47 \pm 3,67$ %ID.cm⁻³). Par la suite, l'activité a diminué de 50 % par rapport à cette valeur maximale dès 24 minutes post-injection ($7,85 \pm 2,97$ %ID. cm⁻³). Cette tendance s'est poursuivie, aboutissant progressivement à une radioactivité de $5,00 \pm 2,25$ %ID. cm⁻³ à 60 minutes après l'injection, ce qui suggère un processus d'élimination du traceur rapide dans le sang (**Figure 55A**).

L'accumulation musculaire du traceur suit le même schéma que celui du compartiment sanguin avec

des niveaux d'activité inférieurs et un maximum atteint à 5 minutes post-injection ($0,80 \pm 0,05$ %ID.cm³) mais présente une cinétique d'élimination plus lente et progressive.

La rétention prolongée de l'activité tumorale accompagnée par une élimination rapide du signal dans le compartiment sanguin ou progressive dans le muscle a contribué à une augmentation des ratios tumeurs/sang et tumeur/muscle au cours du temps atteignant respectivement $0,70 \pm 0,17$ et $5,66 \pm 1,12$ à 60 minutes post-injection, comme illustré dans la **Figure 55B**. Cependant, le ratio tumeur/sang demeure faible en raison des valeurs qui restent significatives pour le compartiment sanguin malgré l'élimination rapide du traceur dans le sang.

II.2.2.2 Corrélation de la distribution déterminée par imagerie optique et par imagerie TEP

Dans le but d'utiliser la sonde bimodale pour déterminer la pharmacocinétique via imagerie TEP, puis obtenir une distribution spatiale plus précise grâce à l'imagerie par fluorescence, l'objectif est de corréler la distribution du radiopharmaceutique au sein de la tumeur entre ces deux modalités d'imagerie.

Les résultats TEP corroborent avec les images de fluorescence correspondantes des souris de l'étude (**Figure 56**), révélant une fluorescence élevée dans le système intestinal à 1h post après l'injection, confirmant ainsi le mode d'élimination de la sonde observé dans l'étude d'imagerie TEP. De plus, la courbe de corrélation sur la **Figure 57** montre une corrélation positive significative ($R^2 = 0,9945$, $p < 0,05$), entre la concentration en activité tumorale mesurée par imagerie TEP et l'intensité fluorescente de la tumeur évaluée par imagerie optique pour chaque souris, suggérant que le schéma de distribution de la sonde et son activité tumorale peut être suivi de manière cohérente entre les deux techniques d'imagerie.

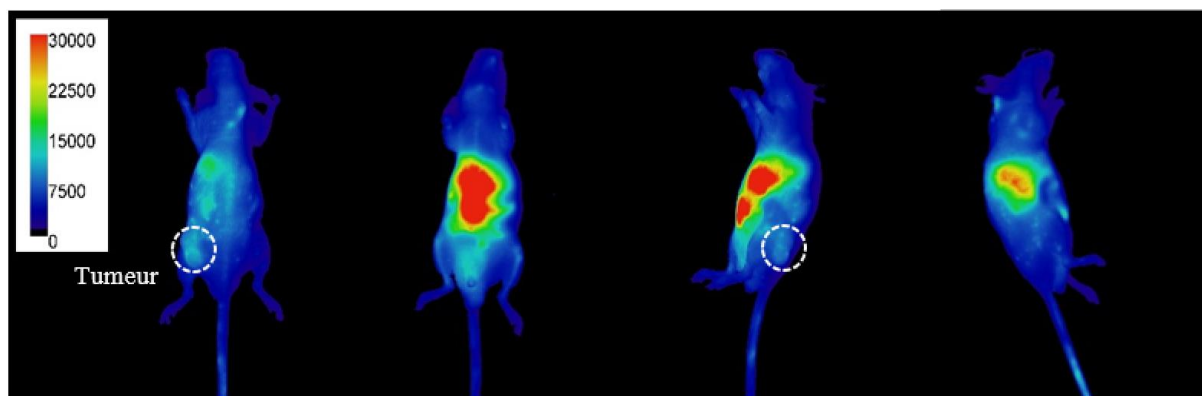


Figure 56 : Images optiques in vivo représentatives des chez des souris mâles (n=3) porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), entourées par cercles blancs en pointillés à 2h post-injection du traceur $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ ($n = 3$), $\lambda_{\text{exc}} = 740 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 780 \text{ nm}$.

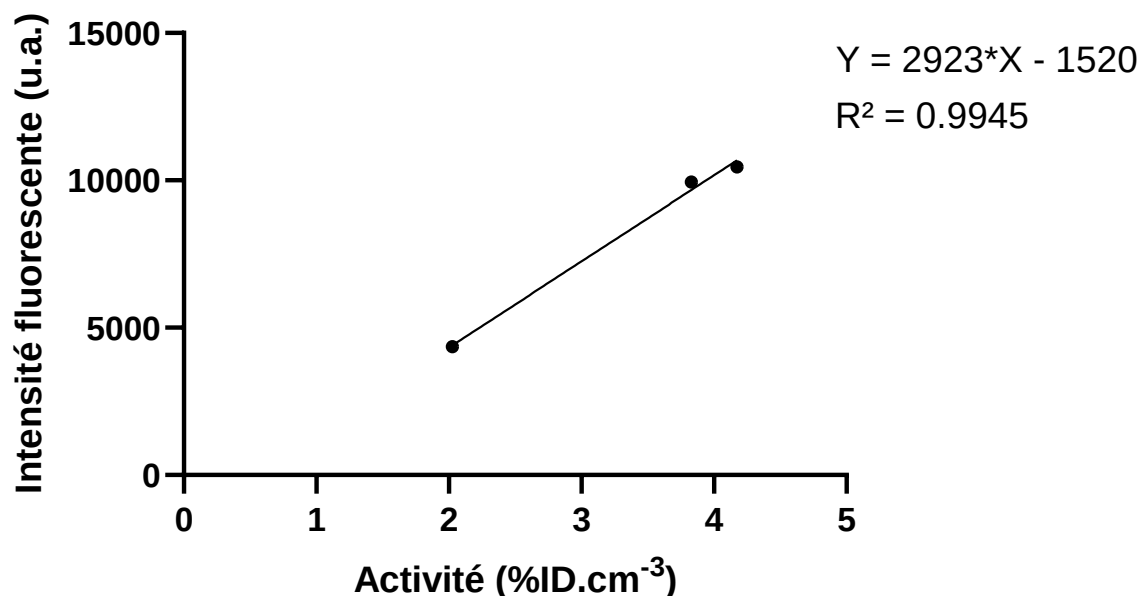


Figure 57 : Courbe de régression linéaire montrant une corrélation significative ($p < 0,05$) entre l'intensité fluorescente (unité arbitraire) et de la concentration en activité (%ID. cm⁻³) du traceur [¹⁸F]F-Cy7-PSMA au sein des tumeurs respectivement à 2h et 1h post-injection pour chaque souris mâle ($n=3$) porteuse de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+). L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $2923 \pm 217,8$, un intercept de $-1520 \pm 756,5$ et $R^2 = 0,9945$.

Sur la base de ces images optiques (**Figure 56**), le signal de fluorescence et les ratios tumeur/tissu normal (T/N) ont été calculés en traçant des régions d'intérêt autour des tumeurs et dans les tissus normaux (au niveau de la tête des souris), servant de référence de fond. La **Figure 58A** montre une intensité de fluorescence moyenne plus élevée (de manière non significative) pour la tumeur ($8253,76 \pm 3379,66$) que le tissu normal ($4961,08 \pm 1329,35$). Le ratio T/N moyen obtenu était de $1,85 \pm 0,60$ (**Figure 58B**).

Dans l'ensemble, une distribution d'élimination similaire de la sonde a été observée dans les différentes images obtenues avec les deux modalités d'imagerie. Néanmoins en raison de la forte intensité du signal hépatique, il peut être difficile de détecter les tumeurs (**Figure 56**).

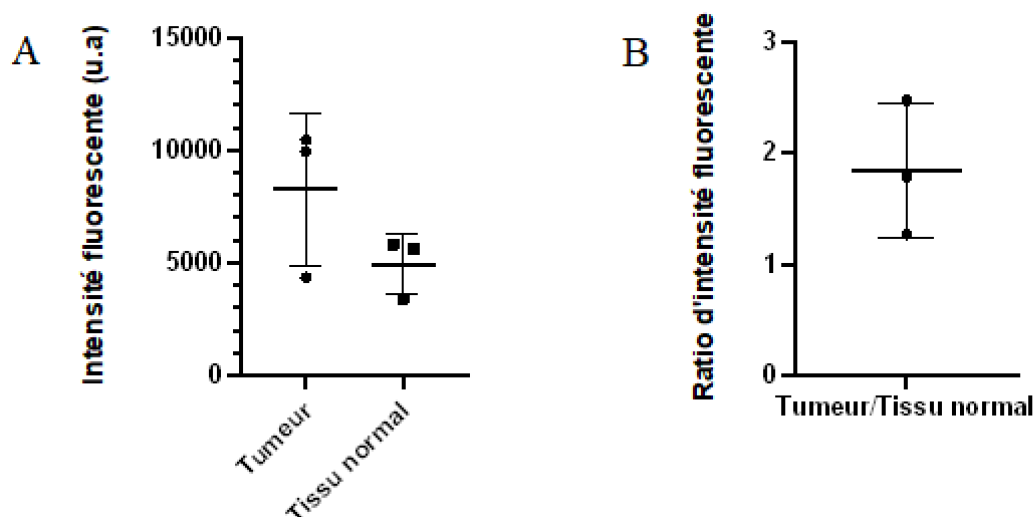


Figure 58 : Évaluations de (A) l'intensité fluorescente [^{18}F]F-Cy7-PSMA au sein de la tumeur et du tissu normal et (B) du ratio d'intensité fluorescente entre tumeur et tissu normal à 2h post-injection chez des souris mâles (porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP). Les résultats ont été exprimés en unité arbitraire présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type ($n = 3$)

II.2.2.1 Evaluation de la sélectivité par test de blocking

Afin de confirmer la spécificité du radioligand [^{18}F]F-Cy7-PSMA envers le PSMA, des expériences de blocking ont effectuées sur le même modèle préclinique de LNCaP. Les souris ont été injectées avec un excès molaire (70x) de ligand froid [^{18}F]F-Cy7-PSMA, en complément du radioligand [^{18}F]F-Cy7-PSMA à faible dose.

Les images TEP/CT dynamiques (**Figure 59**) ont démontré un blocking efficace de l'absorption tumorale au cours de l'acquisition avec un niveau d'activité à différents moments comparable au temps initial de 0-5 minutes post-injection. De plus, contrairement aux expérimentations sans blocage, la détection de certains organes exprimant le PSMA n'a pas pu être réalisée en raison du signal d'intensité insuffisante observé dans les images, ce qui a été le cas dans notre étude pour la rate, la glande lacrymale.

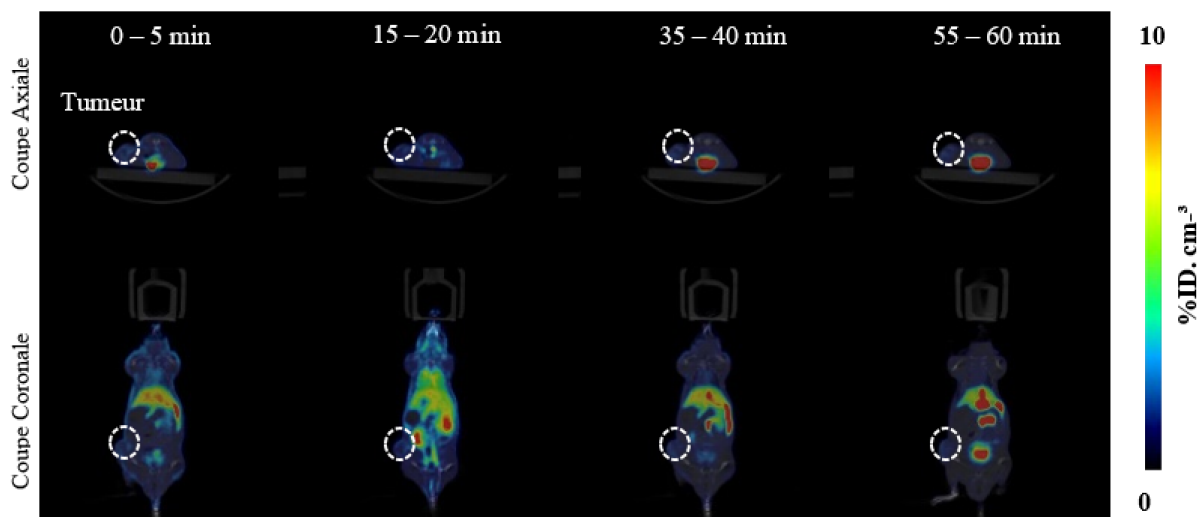


Figure 59 : Images TEP/TDM dynamiques représentatives (coupes axiale et coronale) moyennées de 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes post-injection d'une dose bloquante de ligand froid du traceur [¹⁸F]F-Cy7-PSMA chez des souris mâles (n=3) porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), entourées par les cercles blancs en pointillés.

Comme illustré dans la **Figure 60**, l'analyse des VOI des autres organes de ces données TEP a montré que l'accumulation du [¹⁸F]F-Cy7-PSMA était la plus importante dans les reins gauche ($39,52 \pm 27,19$ %ID. cm⁻³) et droit ($39,49 \pm 28,38$ %ID. cm⁻³) puis dans la vessie ($37,35 \pm 44,95$ %ID. cm⁻³) suivie du cœur ($8,92 \pm 4,03$ %ID. cm⁻³) et du foie ($6,83 \pm 2,93$ %ID. cm⁻³) pendant l'intervalle 0 à 5 minutes post-injection. Cette diminution est moins prononcée au cours de l'acquisition au niveau des différents organes à l'exception de l'intestin, avec une différence significative observée pour les reins gauche ($6,62 \pm 0,60$ %ID. cm⁻³) et droit ($6,29 \pm 0,38$ %ID. cm⁻³) durant l'intervalle de 55 à 60 minutes post-injection par rapport à la période initiale de 0 à 5 minutes. A l'inverse donc, une augmentation de l'absorption intestinale du traceur a été notée au cours de cette même période ($2,70 \pm 1,19$ %ID.cm³ à l'intervalle 0-5 minutes post-injection contre $15,27 \pm 2,01$ %ID.cm³ à 55-60 minutes post-injection).

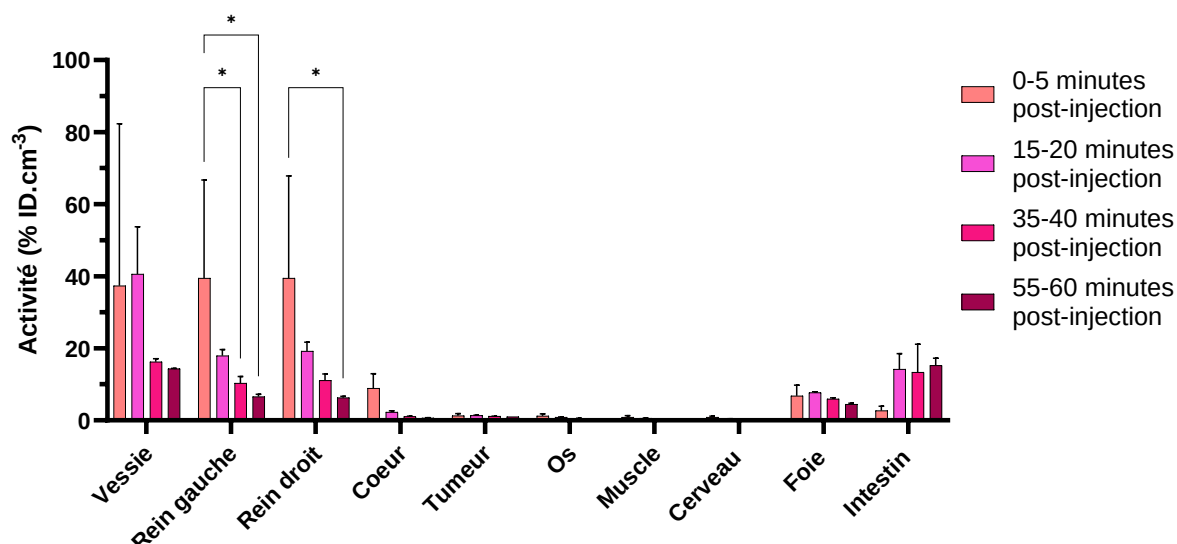
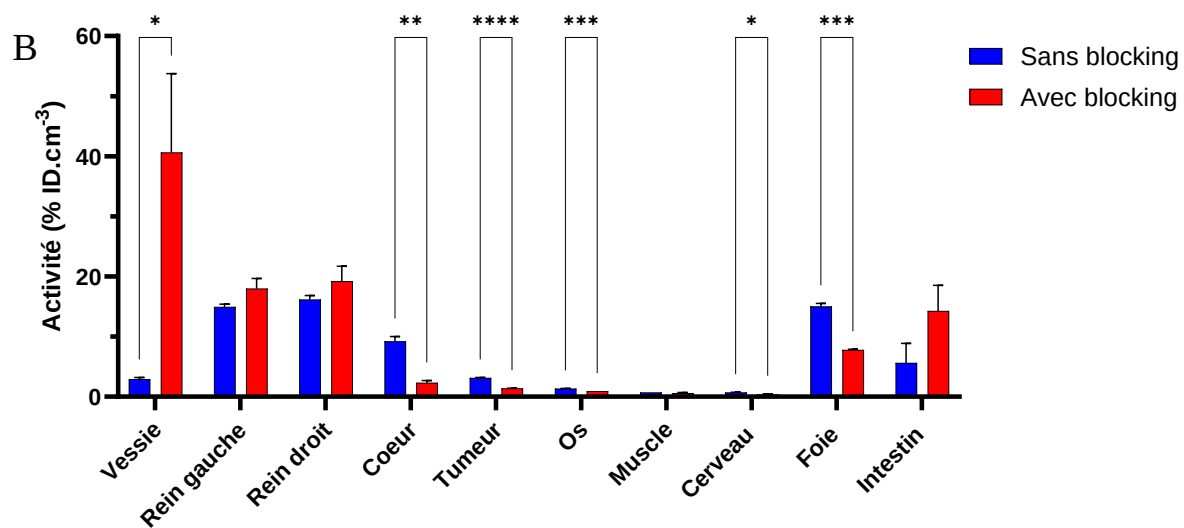
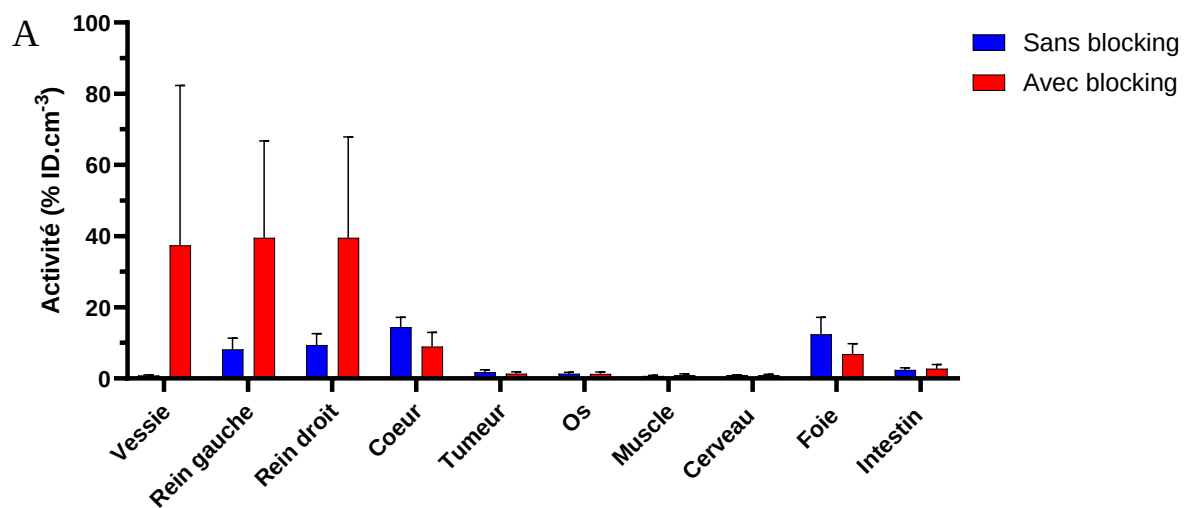


Figure 60 : Biodistribution in vivo de la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA avec dose bloquante de ligand froid dans plusieurs organes. Les données ont été obtenues à partir de l'analyse des ROIs des organes sur la moyenne des images TEP de 0 à 5 minutes, de 15 à 20 minutes, de 35 à 40 minutes et de 55 à 60 minutes chez les souris porteuses de xénogreffes LNCaP (PSMA+). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (n=3) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Dunnett. *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001, ****: p < 0,0001.

La **Figure 61A** montre une différence non significative de la distribution de [¹⁸F]F-Cy7-PSMA entre les groupes avec et sans condition de blocking à l'injection du traceur. Dans le groupe ayant reçu une dose bloquante de ligand froid non marqué, des valeurs d'activité (vu précédemment) plus élevées ont été mesurées dans la vessie et les reins tandis que des valeurs plus faibles ont été relevées dans le cœur et le foie par rapport au groupe ayant reçu uniquement la dose traceuse [¹⁸F]F-Cy7-PSMA.



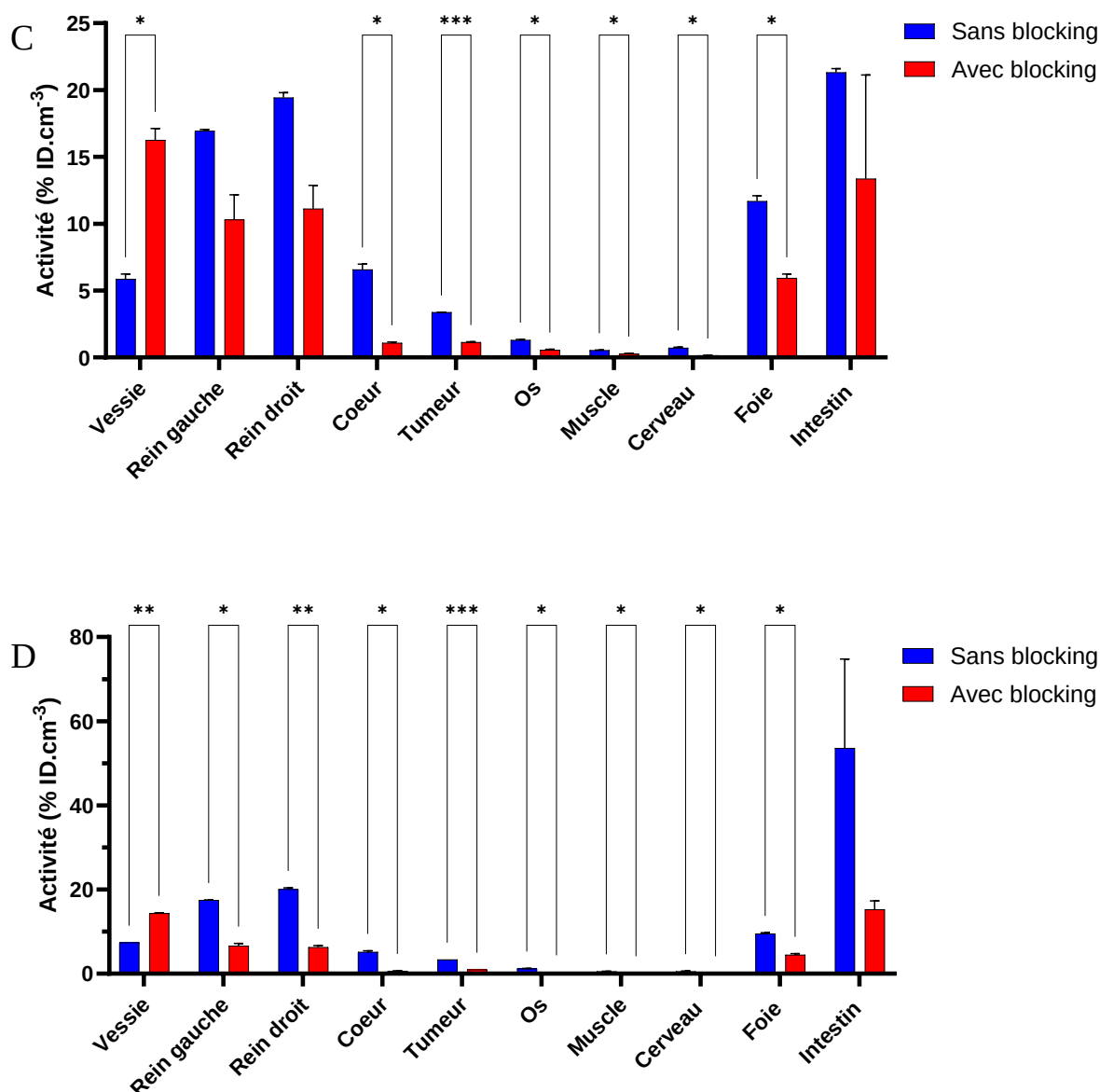


Figure 61 : Expériences de blocking avec les radioligands $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ dans les modèles précliniques LNCaP. Concentrations en activité (%ID.cm⁻³) des radioligands $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ avec ou sans injection d'une dose bloquante de ligand froid dans les organes sains et dans la tumeur sur la moyenne des images TEP de (A) 0 à 5 minutes, (B) de 15 à 20 minutes, (C) de 35 à 40 minutes et (D) de 55 à 60 minutes chez les souris porteuses de xénogreffes humaines LNCaP. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type ($n=3$ souris par expérience sans blocking et avec blocking) et ont été analysées par le test t de Student bilatéral non apparié (* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$).

Cette différence devient significative pour la vessie (**Figure 61B**), où l'excrétion urinaire et donc la cinétique d'élimination par la voie rénale étaient plus importantes dans le groupe avec blocking à partir de 15 à 20 minutes post-injection ($40,63 \pm 13,14$ %ID. cm⁻³ contre $2,88 \pm 0,33$ %ID. cm⁻³). Cependant, les niveaux d'activité dans les reins ne présentent pas de différences significatives au temps 15-20 minutes post-injection bien que le groupe n'ayant pas reçu la dose bloquante affiche des niveaux

supérieurs au temps 35-40 minutes post-injection ($16,25 \pm 0,87 \%ID. cm^{-3}$ contre $15,86 \pm 0,39 \%ID. cm^{-3}$, **Figure 61C**) avec une différence significative au temps 55-60 minutes ($17,49 \pm 0,02 \%ID. cm^{-3}$ contre $6,62 \pm 0,60 \%ID. cm^{-3}$, **Figure 61D**).

Les données de biodistribution *in vivo* révèlent également une accumulation statistiquement plus élevée de $[^{18}F]F-Cy7-PSMA$ à partir de l'intervalle 15 à 20 minutes p.i. dans le foie ($15,03 \pm 0,50 \%ID. cm^{-3}$ contre $7,75 \pm 0,15 \%ID. cm^{-3}$, $p < 0,01$), le cœur ($9,21 \pm 0,79 \%ID. cm^{-3}$ contre $2,32 \pm 0,36 \%ID. cm^{-3}$, $p < 0,001$), l'os ($1,35 \pm 0,02 \%ID. cm^{-3}$ contre $0,92 \pm 0,30 \%ID. cm^{-3}$, $p < 0,001$), le cerveau ($0,68 \pm 0,04 \%ID. cm^{-3}$ contre $0,38 \pm 0,09 \%ID. cm^{-3}$, $p < 0,0$) et la tumeur ($3,11 \pm 0,07 \%ID. cm^{-3}$ contre $1,39 \pm 0,05 \%ID. cm^{-3}$, $p < 0,0001$) chez les souris n'ayant pas reçu de dose bloquante. Cette accumulation notamment pour le foie se renforce davantage à 35-45 minutes après injection ($11,69 \pm 0,40 \%ID. cm^{-3}$ contre $5,93 \pm 0,30 \%ID. cm^{-3}$, $p < 0,05$).

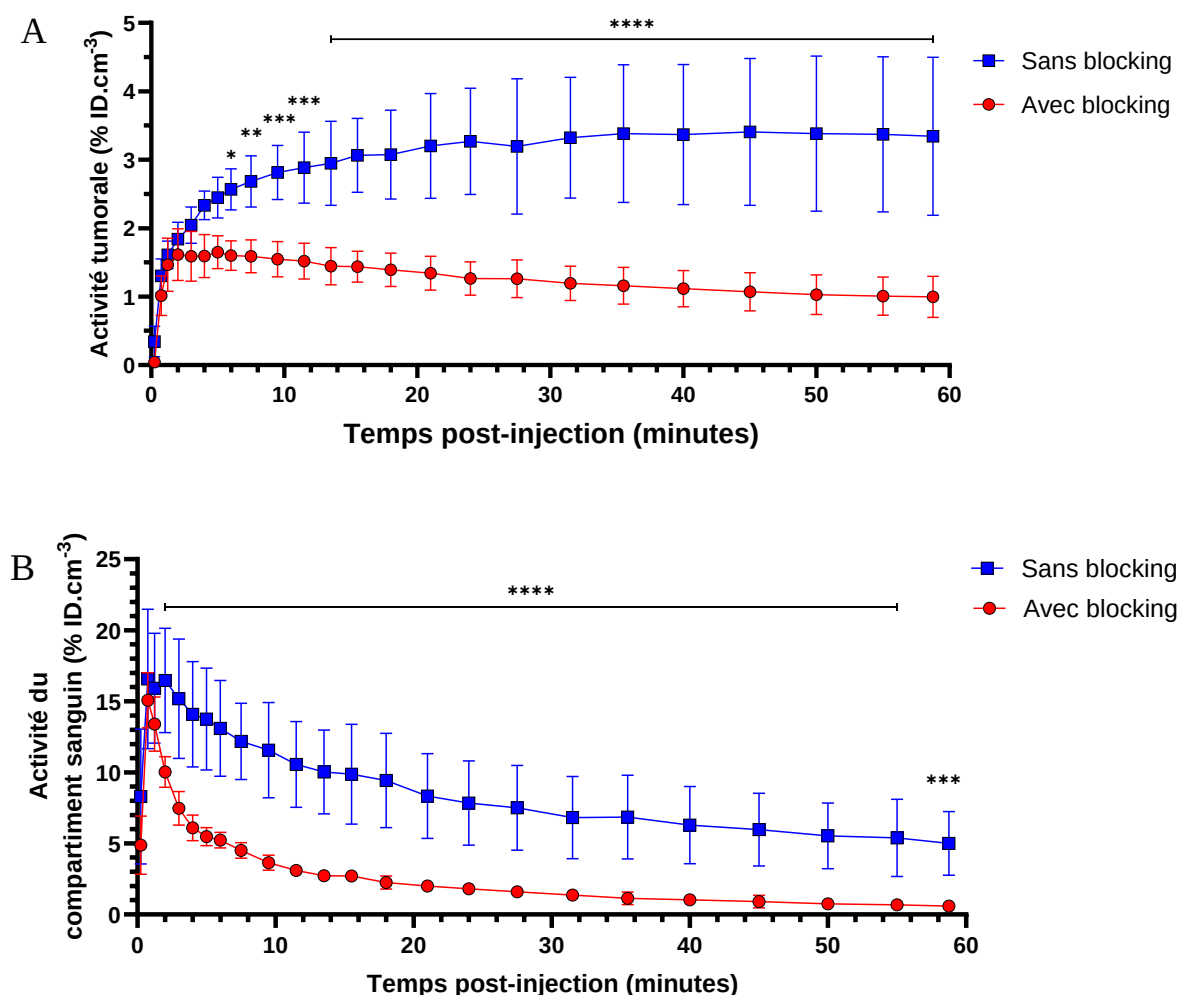


Figure 62 : Quantification *in vivo* de (A) la concentration en activité (%ID.cm⁻³) de $[^{18}F]F-Cy7-PSMA$ au sein de la tumeur et du (B) compartiment sanguin au cours du temps chez les souris (n=3) porteuses de xénogreffes LNCaP (PSMA+). Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n=3) et ont été analysées

par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Šidák (* : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$).

Une différence significative de l'absorption tumorale (**Figure 62A**) du radioligand [^{18}F]F-Cy7-PSMA a été observée dans les xénogreffes LNCaP chez les souris injectées avec un excès de ligand PSMA froid, comparativement à celles ayant reçu uniquement une dose traceuse de radioligand [^{18}F]F-Cy7-PSMA. Cette différence a été observée dès 6 minutes après l'injection ($2,57 \pm 0,30$ %ID. cm^{-3} en condition blocking contre $1,60 \pm 0,22$ %ID. cm^{-3} en condition non blocking, $p < 0,05$) atteignant un écart maximal entre les deux groupes à 55 minutes post-injection ($1,01 \pm 0,30$ %ID. cm^{-3} en condition de blocking $3,37 \pm 1,13$ %ID. cm^{-3} contre en condition de non blocking, $p < 0,0001$). Ces résultats suggèrent que le radioligand [^{18}F]F-Cy7-PSMA cible les xénogreffes humaines de LNCaP (PSMA+).

En revanche, malgré un profil similaire de l'activité du compartiment sanguin (**Figure 62B**) pour les deux groupes avec un pic maximal à 2 minutes après l'injection ($10,04 \pm 1,09$ %ID. cm^{-3} avec une dose bloquante et $16,47 \pm 3,37$ %ID. cm^{-3} sans dose bloquante, $p < 0,0001$), une différence significative a été observée avec une diminution rapide et plus prononcée chez les souris ayant reçu la dose bloquante. Ainsi, les valeurs de ce groupe tendent vers $0,6 \pm 0,30$ %ID. cm^{-3} tandis que celles du groupe avec uniquement la dose traceuse du ligand convergent vers $5 \pm 2,25$ %ID. cm^{-3} .

Cette étude a confirmé par imagerie TEP et expérience de blocking, une sélectivité prononcée pour l'absorption de [^{18}F]F-Cy7-PSMA ainsi qu'une accumulation continue dans les tumeurs LNCaP et les organes exprimant le PSMA. Concernant la biodistribution du radioligand dans les tissus sains exprimant le PSMA, celle-ci a été affectée par l'injection de ligand froid, suggérant un impact sur les sites de fixation. Ainsi l'activité dans les glandes salivaires, lacrymales a été bloquée avec l'ajout de l'excès molaire et l'activité a été réduit dans les reins et le foie. Les images TEP dynamiques ont révélé une cinétique d'élimination rapide par voie hépatobiliaire et rénale.

En revanche, un résultat inattendu a été observé avec l'activité du traceur dans le compartiment sanguin qui a augmenté chez les souris ayant reçu la dose bloquante.

II.3 DISCUSSION

Au cours de la dernière décennie, la recherche sur l'amélioration de la détection du cancer de la prostate a connu des progrès significatifs avec le développement de sondes d'imagerie multimodale. Plusieurs études précliniques ont ainsi exploré l'utilisation de traceur ciblant le PSMA combinant la sensibilité de l'imagerie TEP ainsi que sa capacité à réaliser une imagerie du corps entier et la haute résolution spatiale de l'imagerie optique en particulier la fluorescence proche infrarouge. C'est ainsi que les sondes telles que le [^{68}Ga]Ga-NOTA-PSMA-Cy5 (H. Zhou et al. 2022) , [^{68}Ga]Ga-PSMA-I&F (Schottelius et al. 2019) , [^{68}Ga]Ga-PSMA-IRDye800CW (M. Zhang et al. 2024), et [^{68}Ga]Ga-NYM016 (Fu et al. 2024) , ont vu le jour, montrant une forte affinité pour PSMA, une faible toxicité et une biodistribution favorable, ce qui permet de visualiser à la fois les tumeurs primaires et métastatiques avec une grande précision.

Dans le cadre de notre sujet, l'utilisation d'une sonde bimodale combinant imagerie TEP et optique peut s'avérer très pertinent pour explorer le potentiel de la sono-perméabilisation permettant d'évaluer en temps réel l'effet des USMB sur la pénétration du radioligand dans les tissus tumoraux. En effet, la possibilité d'alterner entre les imageries TEP et optique représente un atout considérable. En tirant profit de l'imagerie optique, l'avantage est de pouvoir réaliser des évaluations fréquentes et plus accessibles sans avoir recours aux équipements TEP coûteux afin de comparer l'efficacité de différentes configurations ultrasonores dans l'étape de validation et d'optimisation des paramètres ultrasonores.

Cependant, avant d'atteindre cet objectif, il est essentiel de réaliser une évaluation précise de la performance de la sonde au niveau préclinique, notamment en quantifiant leur distribution dans les tissus. Pour notre étude, une sonde doublement marquée, composée d'un ligand ciblant le PSMA (Alk-PSMA) conjugué à TsO-Cy7 composé du fluorophore cyanine et au radionucléide fluor-18 (^{18}F), incorporé sous forme d'anion [^{18}F]fluorure a donc été utilisée.

Un modèle de xénogreffe de cellules prostatiques tumorales sous-cutanée a été établi en évaluant la croissance tumorale dans différents modèles murins, inoculées avec des xénogreffes de cellules LNCaP et 22RV1 sur une période de 30 à 60 jours post-implantation. Parmi les modèles dont la réponse tumorale a été très hétérogène, les souris Nude/NMRI porteuses de tumeurs prostatiques humaines LNCaP ont été retenus comme le modèle le plus approprié pour nos études expérimentales en raison de leur croissance et prise tumorale plus rapide.

La biodistribution du radiotracer [^{18}F]F-Cy7-PSMA a été évaluée par imagerie TEP dynamique révélant une accumulation significative du traceur dans la tumeur atteignant un pic d'activité de 3,4 %ID.cm⁻³ à 45 minutes post-injection. Une élimination rapide a été observée dans la vessie, le foie et les reins, avec une excrétion prolongée dans le système intestinal. Ces résultats sont cohérents avec les caractéristiques de la sonde bimodale. L'élimination de la [^{18}F]F-Cy7-PSMA dans le système digestif est facilitée, car les composés polaires sont excrétés plus rapidement dans les reins ou le système biliaire par rapport aux composés lipophiles qui tendent à s'accumuler dans les tissus adipeux et nécessitent des métabolismes spécifiques pour être éliminés. Une diffusion rapide a également été constatée dans des organes exprimant le PSMA, notamment les glandes salivaires et lacrymales.

Les résultats d'imagerie optique et TEP ont montré une bonne corrélation entre les deux techniques d'imagerie pour la quantification de l'activité de la tumeur où l'intensité fluorescente était significativement plus élevée que dans les tissus normaux avec un ratio tumeur/tissu normal moyen de 1,85. Cependant, la forte signalisation dans le foie reste un défi pour une détection précise de la tumeur pour l'imagerie optique avec une meilleure visualisation de la tumeur en imagerie TEP.

Enfin l'expérience de blocking a confirmé la spécificité du radiotracer pour le PSMA, montrant que l'absorption tumorale était réduite en présence d'un excès de ligand froid, ce qui a inhibé l'activité dans certains organes exprimant le PSMA, notamment les glandes salivaires, lacrymales, et les reins. Cela suggère que le radiotracer [^{18}F]F-Cy7-PSMA cible spécifiquement les tumeurs prostatiques LNCaP et se distribue préférentiellement dans les tissus exprimant le PSMA. De plus, l'analyse de biodistribution a montré une élimination plus rapide du traceur dans les reins et la vessie avec une diminution de l'activité dans les organes tels que le cœur et le foie sous l'effet du blocking. L'injection d'un ligand

froid a ainsi modifié la biodistribution du traceur dans certains organes, mettant en évidence sa sélectivité.

Bien que l'utilisation du radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ soit prometteuse pour l'imagerie tumorale dans le traitement du cancer via une approche bimodale, certaines limites subsistent dans cette étude. Une analyse ex vivo de la biodistribution du traceur serait essentielle pour confirmer la corrélation entre les deux méthodes de quantification. De plus, les résultats en imagerie optique mettent en lumière les atouts et les limitations de l'utilisation combinée de l'imagerie TEP et optique pour la surveillance de la distribution tumorale et la distinction entre les tissus normaux et tumoraux, en particulier en présence de signaux de fond élevés provenant de l'élimination hépatique. Des optimisations sont donc nécessaires pour améliorer la détection des tumeurs, notamment en ajustant la stratégie d'administration du traceur.

Une limitation importante de cette étude est que les résultats obtenus ont montré également une biodistribution variant considérablement par rapport aux cinétiques d'élimination et de distribution des radiopharmaceutiques diagnostiques cliniques actuelles tel que le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$, ce qui constitue un obstacle pour la transposition des résultats de l'étude vers des applications cliniques.

La biodistribution du $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$ est caractérisée par une forte accumulation dans les tumeurs exprimant le PSMA et une excrétion rénale prédominante. Les concentrations dans des organes comme le foie et les intestins restent relativement faibles, ce qui permet une visualisation précise des tumeurs avec un faible bruit de fond dans les tissus sains. En revanche, le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$, bien qu'il possède un profil de biodistribution similaire dans les tumeurs, se distingue par l'ajout de la sonde fluorescente Cy7, impactant la distribution du traceur dans certains tissus. Ainsi le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ présente une biodistribution défavorable avec une accumulation élevée dans le foie et la rate pouvant s'expliquer par une élimination hépatobiliaire importante. Cette différence rend difficile la comparaison directe des résultats avec ceux obtenus chez l'Homme.

III. ETUDE DE LA DELIVRANCE D'UN RADIOPHARMACEUTIQUE PAR ULTRASONS DANS UNE TUMEUR DE LA PROSTATE

Dans le domaine de la théranostique, l'optimisation de la délivrance de médicaments au site tumoral constitue un défi crucial. Les radiopharmaceutiques ciblant le PSMA offrent un potentiel considérable pour la détection et le traitement du cancer de la prostate. Cependant leur efficacité thérapeutique repose en grande partie sur leur capacité à cibler efficacement la tumeur tout en minimisant les effets secondaires sur les tissus sains. Dans ce contexte, la sono-perméabilisation combinant l'utilisation d'ultrasons et de microbulles apparaît comme une approche innovante pour optimiser les thérapies ciblées et ainsi améliorer la délivrance des radiopharmaceutiques dans les cellules tumorales en augmentant transitoirement la perméabilité des barrière biologiques et des membranes cellulaires pour une meilleure pénétration des molécules ciblées au sein de la tumeur.

Lors de nos premières investigations utilisant une sonde bimodale préclinique, notamment le [^{18}F]F-Cy7-PSMA, les résultats de l'étude ont mis en évidence un facteur limitant compliquant l'interprétation des observations et rendant difficile la comparaison avec les données chez l'Homme. Une biodistribution défavorable avec une accumulation élevée du radiotraceur [^{18}F]F-Cy7-PSMA dans le foie liée à l'élimination hépatobiliaire accrue du traceur, a conduit à une réévaluation de l'utilisation de [^{18}F]F-Cy7-PSMA pour cette étude.

Face à cette problématique, notre décision a été de concentrer nos efforts sur un radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007 à usage diagnostique, utilisé au sein de notre laboratoire en routine clinique dans le cadre d'une Autorisation de Mise sur le Marché depuis janvier 2023. Ce traceur, dont la biodistribution a déjà été validée dans des contextes diagnostiques cliniques, offre une base plus fiable pour poursuivre nos recherches en thérapie ciblée permettant de minimiser les biais dus à une biodistribution imprévisible et ainsi optimiser la pertinence des résultats en vue de futures applications cliniques.

L'enjeu principal est de démontrer la faisabilité et l'efficacité de la sono-perméabilisation dans l'amélioration de la délivrance du radiotraceur [^{18}F]F-PSMA-1007 dans la tumeur dans un modèle murin de cancer de la prostate. Cette étude préclinique, qui fait le lien entre une application diagnostique vers une approche thérapeutique, représente un jalon important dans le développement de thérapies ciblées théranostiques avec l'ambition d'ouvrir de nouvelles voies de stratégies de traitement spécifiques pour le cancer de la prostate.

Les sections suivantes détailleront toutes les procédures expérimentales utilisées dans cette étude, allant du modèle murin à la mise en œuvre des techniques d'imagerie et de quantifications telles que l'imagerie TEP, la CMF ou l'immunohistochimie pour permettre une évaluation de la biodistribution du radiotraceur. Les résultats obtenus permettront de confirmer ou infirmer l'efficacité de la sono-perméabilisation dans l'amélioration de la délivrance du radiopharmaceutique et son ciblage tumoral.

III.1 MATERIEL ET METHODES

III.1.1 Modèle murin

La même souche de souris (Nude NMRI, Janvier, 12 semaines, 20–25 g) de l'étude de la biodistribution d'un radiotraceur à usage diagnostique a été utilisée en suivant la même procédure et mêmes conditions d'anesthésie pour l'implantation sous-cutanée au flanc gauche des cellules LNCaP, mais suspendues à une concentration de 5×10^6 toujours dans un mélange 1:1 de milieu de culture RPMI 1640 et de Matrigel (100 μL). Les tumeurs se sont développées pendant une période maximale de 40 jours après l'inoculation ou jusqu'à atteindre un diamètre de 10 mm.

Le suivi tumoral a également été réalisé deux fois par semaine avec un pied à coulisse selon la formule longueur $\times$ largeur $\times$ hauteur $\times$ 0,5 (J. P. Miller et al. 2016).

III.1.2 Configuration expérimentale ultrasonore

La configuration expérimentale pour cette étude *in vivo* est schématisée dans la **Figure 63**.

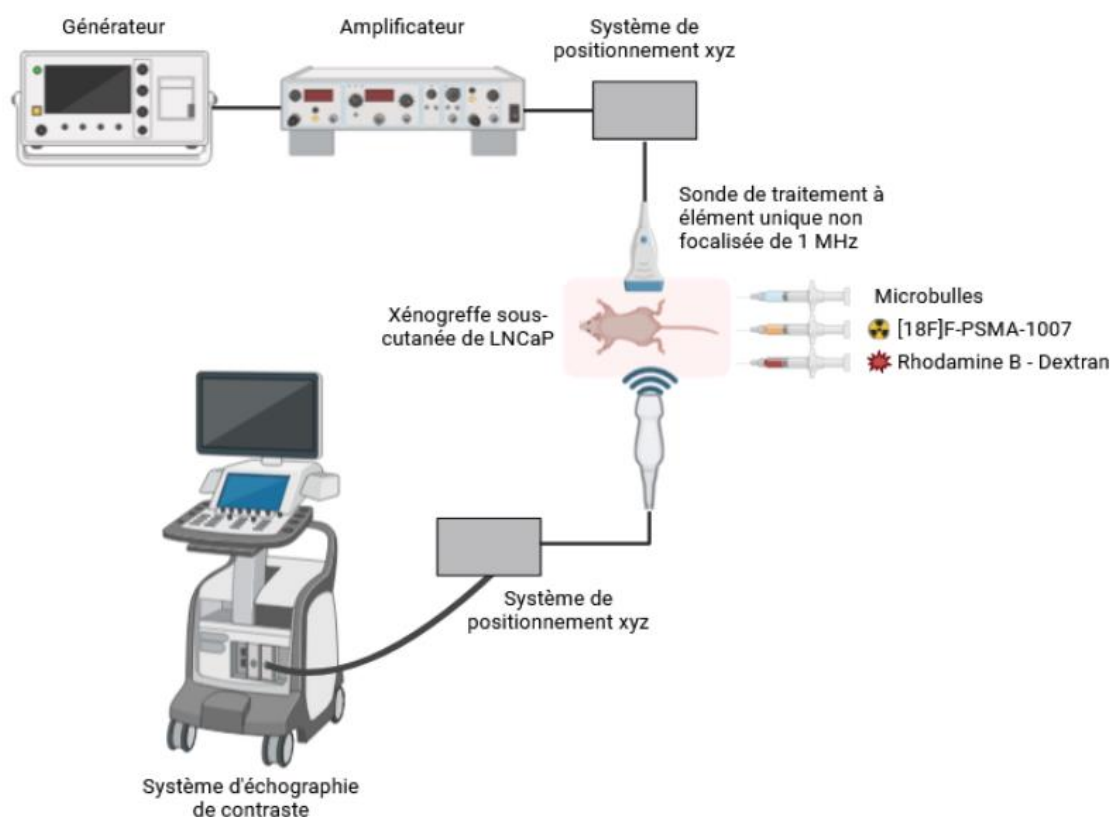


Figure 63 : Schéma de la configuration expérimentale ultrasonore

L'animal est placé en position ventrale sur un tapis chauffant à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pour maintenir sa température corporelle. Il est contenu à l'aide de ruban adhésif médical pour atténuer les artefacts de mouvement dus à la respiration et positionné sur un absorbeur acoustique afin d'atténuer les réflexions ultrasonores indésirables, lui-même positionné sur la station d'imagerie Vevo (VisualSonics).

Le système de sono-perméabilisation ultrasonore, identique à celui utilisé dans l'étude *in vitro*, a été employé comprenant le générateur, l'amplificateur et le transducteur. Ce dernier est placé dans une structure cylindrique en plastique en impression 3D remplie avec de l'eau milli-Q préalablement dégazée et dotée d'un film transparent pour fermer l'ouverture du support cylindrique. Ce film couplé à un gel à ultrasons pour favoriser la propagation de l'onde et mis en contact avec la région supérieure de la tumeur sous-cutanée de la souris. La distance entre le transducteur et la tumeur est d'environ 3 cm, distance focale du transducteur.

Ce support aux dimensions du transducteur est monté sur un système de potence (IGT Cube) à trois axes (X, Y, Z) pour assurer un alignement acoustique avec la localisation de la tumeur prostatique.

En parallèle, un échographe VEVO F2 (Visual Sonics, Fujifilm, Toronto, Canada) a été utilisé pour les expériences. La sonde ultrasonore à haute fréquence associée à l'échographe a été montée sur le dispositif 3 axes de la station d'imagerie Vevo (VisualSonics), sur mesure et compatible avec la sonde, permettant trois degrés de translation (x, y et z) et un degré de rotation.

III.1.3 Caractérisation de l'ouverture de la barrière endothéliale suite à la sono-perméabilisation

Les souris nude immunodéficientes mâles porteuses des tumeurs prostatiques sous-cutanées étaient anesthésiées avec 1,5 % d'isoflurane dans un mélange O₂/Air (50/50). Avant tout traitement ultrasonore, un gel échographique est préalablement centrifugé.

Pour évaluer les résultats suite au traitement par US, des souris immunodéficientes porteuses des tumeurs prostatiques sous-cutanées ont toutes reçu une injection de 50 µL de MB SonoVue puis ont été réparties aléatoirement en 4 groupes (n = 7 par groupe) : un groupe témoin sans US et 3 autres groupes (US1MB, US2MB et US3MB) avec les différents paramètres ultrasonores, présentés dans le **Tableau 21**.

Tableau 21 : Conditions ultrasonores des différents groupes expérimentaux

Groupes expérimentales			
Contrôle (n=7) 50 µL de SonoVue	USMB1 (n=7) 50 µL de SonoVue 50% rapport cyclique 200 kPa 1 minute d'exposition	USMB2 (n=7) 50 µL de SonoVue 30% rapport cyclique 500 kPa 1 minute d'exposition	USMB3 (n=7) 50 µL de SonoVue 10% rapport cyclique 800 kPa 1 minute d'exposition

Suite à l'exposition ultrasonore en concomitance avec les MB (**Figure 64**), tous les groupes ont reçu une injection i.v. du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 (5,1 ± 1,7 MBq, 100µL, ABX GMBH) afin d'évaluer l'impact des US avec les MB sur la biodistribution de ce traceur spécifique dans la tumeur, ce qui a été évalué par imagerie TEP/CT 2 heures post-injection. L'injection [¹⁸F]F-PSMA-1007 est immédiatement suivie d'une injection i.v. d'une solution de tetramethylrhodamine isothiocyanate-dextran (TRITC-dextran, Sigma-Aldrich, 100µL, 70 kDa, 5mg.mL⁻¹) afin d'évaluer l'impact de l'USMB sur l'extravasation de ce traceur non spécifique dans la tumeur. Une imagerie par échographie de contraste 15 minutes post sono-perméabilisation a été réalisée après injection de 70µl de MB VevoMarker (Bracco) pour évaluer la perfusion tumorale. Une immunofluorescence a été effectuée pour évaluer la distribution du dextran dans la tumeur ainsi que pour quantifier l'expression du PSMA et la densité vasculaire.

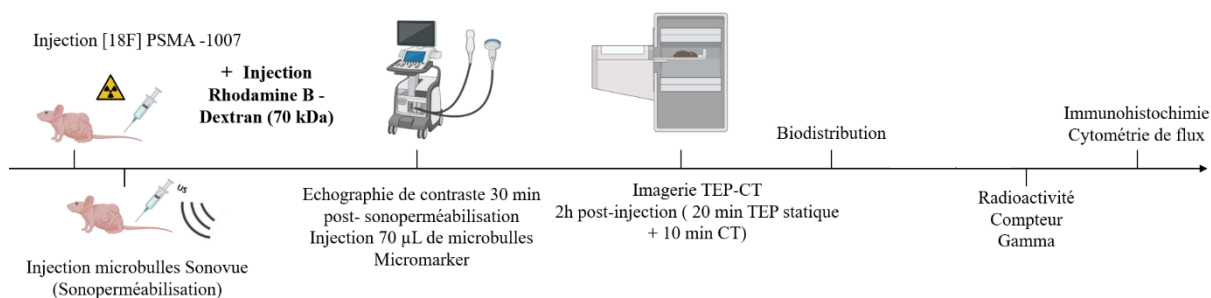


Figure 64 : Timeline du protocole de sono-perméabilisation

III.1.4 Imagerie TEP

L'acquisition des souris a été réalisée à l'aide d'un scanner Inveon® multimodale TEP/CT (Siemens) 2 heures après l'injection i.v. du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007.

Les images statiques TEP/CT sur une période de 20 minute suivie de 10 minutes de tomodesitométrie ont été reconstruites selon le même protocole mentionné auparavant, analysées à l'aide du logiciel PMOD (v3.9). Des volumes d'intérêt ont été tracés dans les organes (cœur, rein, vessie, foie, rate, intestin, os, muscle, cerveau, glandes salivaires, glandes lacrymales) et les tumeurs, en utilisant l'image TDM pour référence pour quantifier l'accumulation du RP chez chaque animal. La concentration d'activité moyenne du composé dans l'organe d'intérêt a été corrigée en prenant en compte la décroissance radioactive (utilisant la demi-vie du radionucléide) et en normalisant par rapport à l'activité totale administrée, permettant d'obtenir le pourcentage d'activité injectée par unité de volume de tissu (% ID/cm³).

III.1.5 Biodistribution ex vivo et compteur γ

A 3h post-injection, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale, le sang a été prélevé par ponction cardiaque. Les organes (cœur, rate, intestin, rein gauche, foie, muscle, os, glandes salivaires) ont été prélevés, pesés et comptés à l'aide d'un compteur γ automatique WIZARD2 de Perkin Elmer. Le pourcentage de captation du traceur, exprimé en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g), a été calculé comme l'activité liée au tissu par poids d'organe par dose injectée réelle, corrigée pour la désintégration jusqu'au début du comptage.

La tumeur prélevée a été coupée en deux, et une moitié a été immédiatement congelée dans de l'azote liquide pour des études d'immunohistochimie. L'autre moitié a été conservée dans du milieu de conservation pour réaliser le jour suivant l'étude en CMF.

III.1.6 Etude en cytométrie de flux

Les tumeurs prostatiques ont tout d'abord été dissociées par un scalpel puis par voie enzymatique à l'aide

du kit de dissociation des tumeurs humaines (Miltenyi Biotec) en suivant le protocole du fabricant. Après incubation avec le cocktail enzymatique dans le dissociateur automatique de tissus (GentleMACSTM Octo Dissociator with Heaters, Miltenyi), les échantillons ont été filtrés à travers un tamis de 70 μ M (MACS® SmartStrainers; Miltenyi Biotec), lavés dans un milieu de culture RPMI 1640 non complétement puis remis en suspension dans le milieu de culture. La suspension unicellulaire a été centrifugée à 200 G pendant 5 min avant d'être incubée avec le kit coloration des cellules mortes fixables Viability 405/520 (1 μ L/100 μ L PBS; Miltenyi Biotec) pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été lavés avec du CBS (1,5 de BSA dans 50 mL de PBS), centrifugés pendant 5 minutes à 200g puis incubés avec un anticorps anti-PSMA APC Vio 710 dans l'obscurité pendant 30 minutes (2 μ L/100 μ L CBS). Les suspensions cellulaires ont été lavées, centrifugées avant d'être analysées à l'aide d'un cytomètre en flux (Attune NxT, Invitrogen).

L'acquisition des données a été réalisée en utilisant 3 lasers : BL2, RL3 et VL2 et dont les paramètres de tension ont été les suivants : FCS (20V), SSC (300 V), BL2 (400 V), RL3 (330 V), et VL2 (190 V).

Lors de l'analyse par le logiciel FlowJo, les cellules mortes, les débris cellulaires, les doublets et les agrégats ont été exclus et les seuils de gating ont été définis.

III.1.7 Echographie de contraste

L'imagerie par échographie de contraste ou contrast-enhanced ultrasound (CEUS) a été réalisée à l'aide d'un transducteur linéaire d'une fréquence de 29 MHz de la plateforme d'imagerie ultrasonore haute fréquence Vevo F2. Une imagerie en mode B au préalable a été réalisée pour identifier l'anatomie de la tumeur avant l'administration en bolus des MB VevoMarker, activées selon les recommandations du fabricant.

Après identification et sélection de notre région d'intérêt, l'imagerie ultrasonore par contraste non linéaire (NLC) a été initiée simultanément avec l'injection des MB VevoMarker. Pour les expériences en mode de contraste, les paramètres d'acquisition ont donc été les suivants : puissance de transmission 10 %, fréquence 18 MHz, largeur de faisceau standard, gain de contraste de 0 dB, champ de vision de 16 mm par 18 mm, avec un taux d'acquisition de 10 images par seconde jusqu'à 6000 images.

Les données obtenues à partir de la cinétique d'arrivée des MB en NLC ont permis l'évaluation des paramètres de perfusion tumorale, illustrés dans la **Figure 65** et ont été analysées avec Vevo Lab Version 5.8.0 et VevoCQ (FUJIFILM VisualSonics).

A partir des images NLC, une ROI a été dessinée en traçant manuellement les contours de chaque tumeur dans l'image B-mode initiale via l'interface VEVO. Les intensités au sein de la ROI sont utilisées pour obtenir des courbes d'intensité temporelle (TIC) en suivant le modèle de perfusion en bolus. Les valeurs d'intensité au sein de la ROI à chaque point temporel sont tracées pour générer une TIC, l'intensité étant liée à la concentration de MB.

Les paramètres suivants ont ainsi été évalués : pic maximal (PE - la différence entre l'amplitude

maximale et l'intensité de base, qui est proportionnelle à la concentration de MB et indicatrice du volume sanguin relatif ; l'indice de perfusion (PI - l'aire sous la courbe divisée par le temps de transit moyen du flux) et le temps jusqu'au pic (TTP - le temps écoulé entre l'administration du contraste et l'amélioration maximale). Le PE, tout comme l'aire sous la courbe, sont des paramètres liés au volume sanguin, tandis que le TTP et le MTT sont liés au flux sanguin.

L'analyse statistique des données numériques obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel Graphpad. Un test ANOVA à un facteur a été utilisé, et les moyennes ont été comparées entre elles (test de Tukey). Les résultats avec des valeurs $p < 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs.

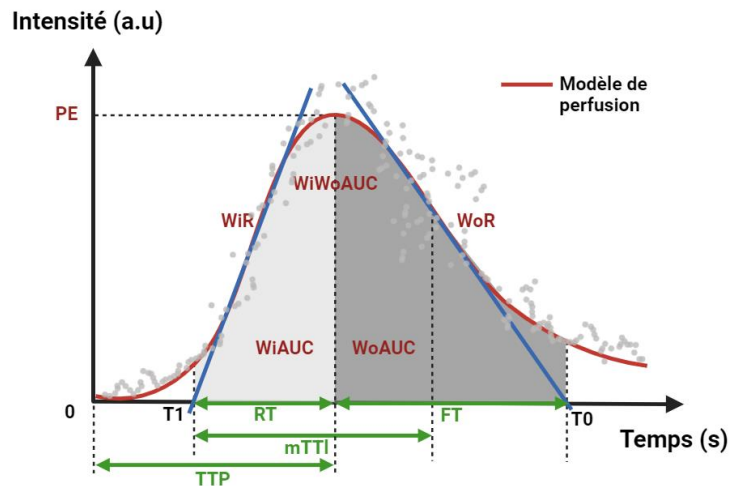


Figure 65 : Principaux paramètres de la courbe intensité-temps (El-Bandar et al. 2022). PI : Peak Intensity ou PE : Peak Enhancement = Rehaussement maximal du contraste ou pic d'intensité [u.a] ; WiAUC : Wash-in Area Under the Curve AUC = Aire sous la courbe durant le remplissage (phase de captation/remplissage du produit de contraste) [u.a] ; RT : Rise Time = Temps de montée du produit de contraste ; mTTl : mean Transit Time local = Temps de transit moyen local correspondant à l'intervalle de temps moyen nécessaire à un bolus de produit de contraste pour traverser le réseau vasculaire [s] ; TTP : Time To Peak = Temps au pic d'intensité correspondant au temps nécessaire au bolus pour arriver au pic de rehaussement maximal de contraste [s] ; WiR : Wash-in Rate = Taux de remplissage (pente maximale = pente de la tangente à la courbe au moment du remplissage, prise à mi-hauteur) [u.a] ; WiPI Wash-in Perfusion Index - Indice de perfusion en phase de remplissage (WiAUC / RT) [u.a] ; WoAUC Wash-out AUC - Aire sous la courbe en phase d'élimination du produit de contraste ; WiWoAUC Wash-in and Wash-out AUC - Aire sous la courbe en phases de remplissage et d'élimination [u.a] ; FT Fall Time - Temps de descente [s] ; WoR Wash-out Rate = Taux d'élimination (pente minimale = pente de la tangente à la courbe au moment de l'élimination, prise à mi-hauteur) [u.a] ; QOF Quality Of Fit between the echo-power signal and $f(t)$ = Qualité de la modélisation entre le signal d'intensité et $f(t)$ [%].

III.1.8 Immuno-histofluorescence

Une évaluation immunohistochimique de la densité des cellules endothéliales (CD31), de l'expression du PSMA et de l'extravasation du dextran injecté a été effectuée sur une série de coupes cryogéniques de 10µm réalisées à l'aide d'un cryostat, puis stockées et protégées de la lumière à -80 °C.

Les tissus ont été fixés avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans un tampon phosphate saline (PBS) pendant 15 minutes suivi d'un lavage au PBS avant de bloquer l'action du PFA avec une solution de NH₄Cl (50mM) dans du PBS pendant 5min. Un deuxième lavage au PBS a eu lieu, suivi d'une étape de perméabilisation au MeOH-AOH pendant 5 minutes, d'ajout de Triton pendant 5 minutes, d'un nouveau lavage au PBS et enfin d'une étape de saturation des sites non spécifiques avec une solution de BSA 5% ; Tween 80, pendant 1h00.

Les anticorps primaires dirigés contre le PSMA (anti-humain (lapin), dilution 1:500, Abcam) et contre le CD31 (anti-souris (rat), dilution 1:100, BD Biosciences™) ont ensuite été ajoutés aux lames et incubés toute la nuit à 4 °C.

Les anticorps anti-CD31 marquent les cellules endothéliales vasculaires et ont donc été largement utilisés pour visualiser les vaisseaux sanguins. Le CD31, récepteur d'adhésion cellulaire, localisé en forte densité à la surface des cellules endothéliales vasculaires est principalement utilisé pour démontrer la présence de cellules endothéliales, mesurer la densité des vaisseaux ou quantifier l'angiogenèse (néo-angiogenèse).

Après avoir été rincés trois fois à des intervalles de 5 minutes avec PBS, les anticorps secondaires de chèvre anti-lapin conjugués à Alexa Fluor 488 et de chèvre anti-rat conjugués à Alexa Fluor 647 (dilution 1 :1000) ont été incubés pendant 30 minutes. Les noyaux cellulaires ont été visualisés avec du DAPI (Thermo Fisher).

Les lames ont été scannées à un objectif x20, à l'aide d'un microscope AxiObserver Z1 (Zeiss, Allemagne) avec les différents pics d'émissions et filtres de détections adaptés aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission des anticorps. Au moins trois images par échantillon ont été acquises et traitées à l'aide du logiciel Zen Zeiss 3.7. Et le rapport des pixels des colorations correspondant au PSMA, dextran et CD31 à la surface totale des tumeurs a été évaluée pour chaque image.

III.2 RESULTATS

III.2.1 Effet de la sono-perméabilisation sur l'accumulation *in vivo* du médicament radiopharmaceutique dans les tumeurs

Afin de déterminer l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du RP [¹⁸F]F-PSMA-1007, 4 groupes de souris, portant des tumeurs LNCaP sous-cutanées, ont été évalués avec (i) un groupe avec injection du RP sans US (n=9), ensuite les groupes de traitement avec injection du RP associée à un traitement ultrasonore selon (ii) la condition US1 (n=9) , (iii) la condition US2 (n=8) et (iv) la condition

US3(n=8)). Tous les groupes ont été injectées en i.v. avec des MBs de SonoVue. Une imagerie statique PET/CT a été réalisée à 2h post-injection du RPD. A partir de ces images TEP, la quantification de la distribution du RP avec ou sans ultrasons a été réalisée en analysant les VOI dans les principaux organes.

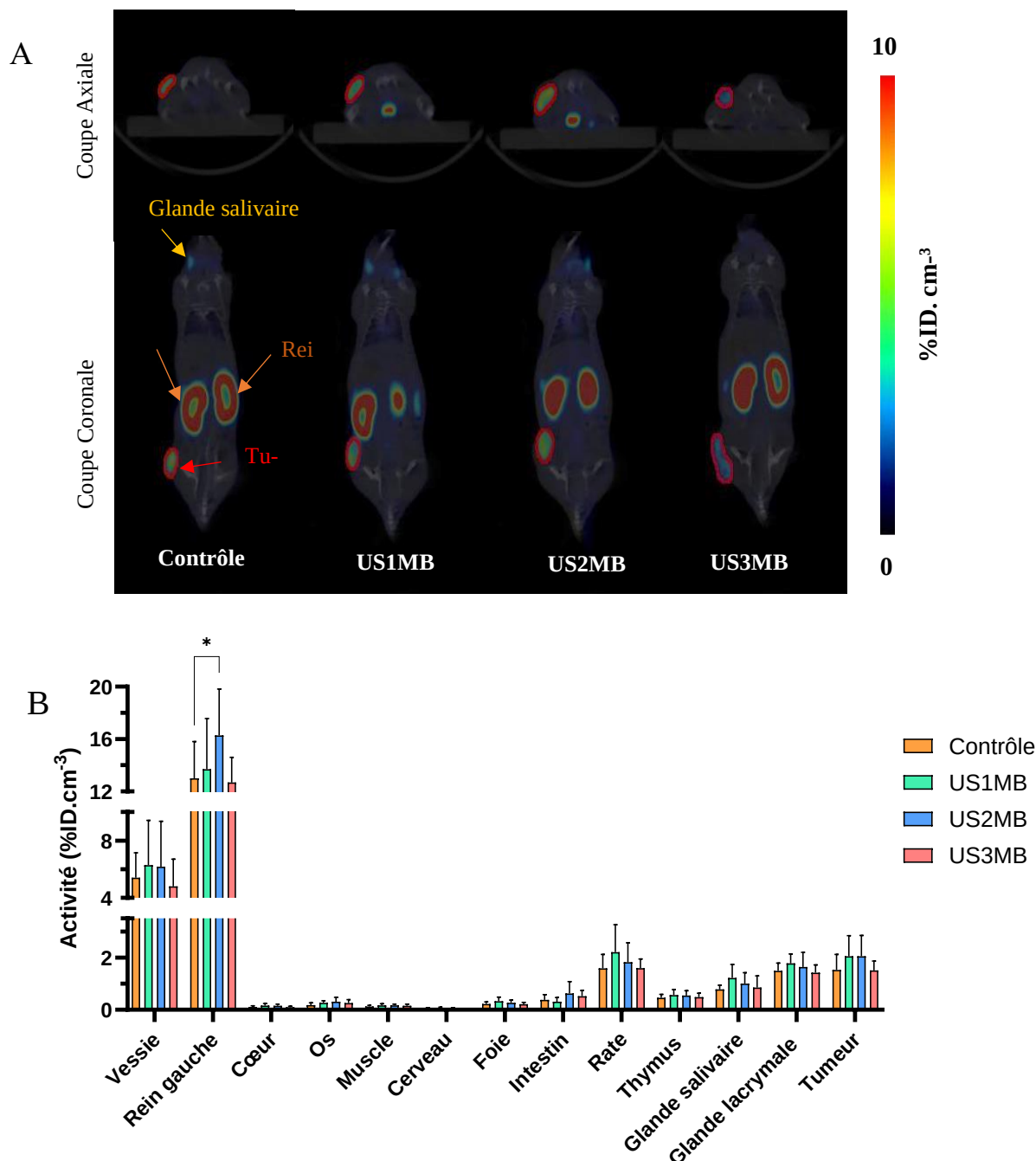


Figure 66 : (A) Images TEP (axiales en haut et coronales en bas) obtenues à partir de souris mâles porteuses de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+), sans USMB, avec la condition US1MB, la condition US2MB et la condition US3MB, 2 heures p.i. du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-. La flèche rouge montre la tumeur, les flèches oranges les reins et jaune, la glande salivaire. (B) Biodistribution in vivo du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 chez des souris portant les xénogreffes humaines sous-cutanées de LNCaP. Les concentrations en activité dans les organes sains et dans la tumeur (%ID.cm⁻³) ont été extraites des images TEP/TDM, obtenues à 2h post-

injection du radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n=8$) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Dunnett. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

Comme prévu, à 2h après injection, les images TEP/TDM illustrées dans la **Figure 66A.**, et la biodistribution *in vivo* ont révélé, pour tous les groupes, une forte activité du RP détectée dans les reins et dans la vessie, indiquant une excrétion urinaire élevée. Une captation modérée du traceur était également observée dans la tumeur et la rate présentant des niveaux d'accumulation relativement similaires, suivi par les glandes lacrymales et salivaires.

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans l'accumulation chez les souris non traitées par rapport aux souris traitées avec différentes conditions ultrasons/microbulles dans les organes sains (**Figure 66B**). Cependant, seul le groupe US2MB montre une augmentation significative ($p < 0,05$) dans le rein gauche ($16,271 \pm 3,55 \text{ \%ID.cm}^{-3}$), comparativement au groupe non traité aux ultrasons ($13,01 \pm 2,80 \text{ \%ID.cm}^{-3}$). Une tendance à une accumulation plus importante a également été constatée pour les groupes US1MB et US2MB dans des tissus exprimant le PSMA telles que les glandes salivaires ($0,78 \pm 0,16 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe contrôle ; $1,22 \pm 0,52 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US1MB ; $1,00 \pm 0,42 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US2MB) et lacrymales ($1,50 \pm 0,29 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe contrôle ; $1,78 \pm 0,36 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US1MB ; $1,64 \pm 0,56 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US2MB). L'excrétion urinaire du radiotraceur était plus élevée pour les groupes US1MB et US2MB ($5,41 \pm 1,73 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe contrôle ; $6,29 \pm 3,18 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US1MB ; $6,18 \pm 3,17 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US2MB). Une différence a été observée, notamment dans la rate ($1,59 \pm 0,53 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe contrôle ; $2,21 \pm 1,05 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US1MB ; $1,82 \pm 1,05 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US2MB) et dans la tumeur ($1,53 \pm 0,60 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe contrôle ; $2,05 \pm 0,79 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US1MB ; $2,05 \pm 0,80 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US2MB).

Pour l'absorption tumorale, une augmentation statistiquement non significative a été observée dans la tumeur (**Figure 67A**) pour tous les groupes par rapport au groupe témoin ($1,53 \pm 0,60 \text{ \%ID.cm}^{-3}$), à l'exception du groupe US3MB ($1,51 \pm 0,35 \text{ \%ID/cc}$) exposé à des impulsions plus courtes et à plus forte pression.

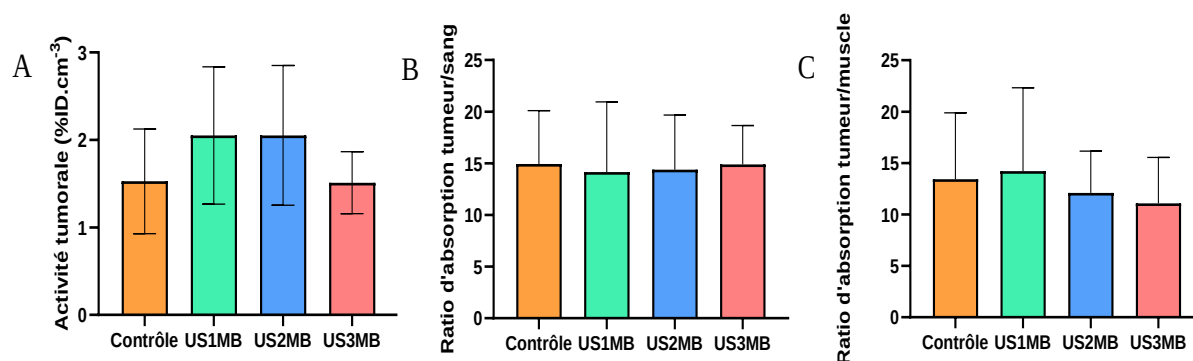


Figure 67 : Quantification in vivo de (A) la concentration en activité ($\text{\%ID.cm}^{-3}$) du radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007 au sein de la tumeur et du ratio d'absorption tumorale par rapport au (B) compartiment sanguin et (C) au muscle à 2h p.i. chez les souris porteuses de xénogreffes LNCaP (PSMA+) sans USMB, avec la condition US1MB, la condition US2MB et la condition US3MB. Les données sont présentées sous forme de

moyennes $\pm$ écart-type ($n=8$) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples montrant aucune différence significative.

Il a été remarqué que l'augmentation de la pression couplée à la diminution du rapport cyclique associée aux MBs a induit une augmentation de l'écart type de l'activité du RP dans la tumeur, suggérant une délivrance plus hétérogène du RP.

En revanche, comme illustré dans les **Figure 67B** et **Figure 67C**, l'analyse des rapports tumeur/sang (T/S) et tumeur/muscle (T/M) n'a montré aucune amélioration pour tous les groupes soumis à la sono-perméabilisation. Par ailleurs, la faible absorption présente dans le cœur ($0,11 \pm 0,04$ %ID.cm⁻³ pour le groupe contrôle ; $0,16 \pm 0,08$ %ID.cm⁻³ pour le groupe US1MB ; $0,15 \pm 0,07$ %ID.cm⁻³ pour le groupe US2MB ; $0,10 \pm 0,02$ %ID.cm⁻³ pour le groupe US3MB) et dans les muscles ($0,12 \pm 0,05$ %ID.cm⁻³ pour le groupe contrôle ; $0,17 \pm 0,07$ %ID.cm⁻³ pour le groupe US1MB ; $0,17 \pm 0,04$ %ID.cm⁻³ pour le groupe US2MB ; $0,15 \pm 0,07$ %ID.cm⁻³ pour le groupe US3MB) pourrait entraîner des fluctuations importantes amplifiant l'incertitude de ces résultats.

Nos observations TEP ont été confirmées par la biodistribution *ex vivo*, réalisée immédiatement après l'imagerie statique de 120 minutes. La biodistribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans différents tissus a été évaluée à l'aide d'un compteur à rayons gamma (**Figure 68**). Les valeurs d'accumulation de [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans les tissus, mesurées par biodistribution *ex vivo* (% ID/g), étaient fortement corrélées ($p < 0,000001$, Figure 69) aux valeurs d'accumulation obtenues à partir de l'analyse des images TEP/TDM, réalisées juste avant le sacrifice des souris (%ID.cm⁻³). Ce résultat confirme que la quantification de l'accumulation du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 *in vivo*, par analyse des images TEP/TDM, est précise et fiable.

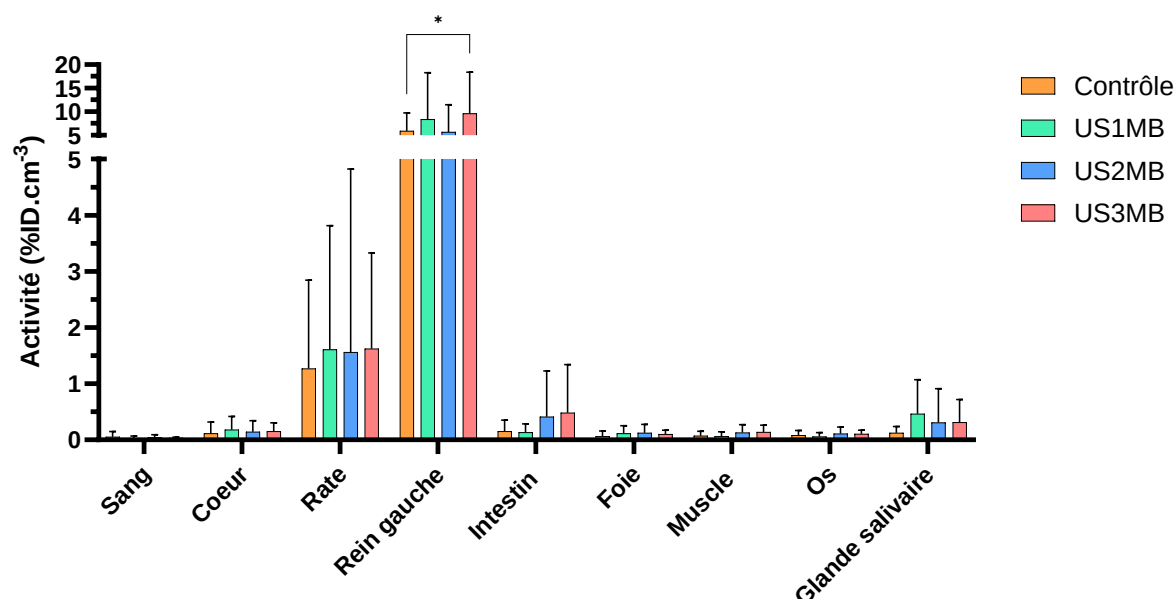


Figure 68 : Quantification de la concentration en activité (%ID.cm⁻³) du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans les tissus sains par biodistribution ex vivo, 3h p.i. dans les souris portant les xénogreffes humaines de LNCaP (PSMA +). Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type (n=8) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples de Dunnett. * : p < 0,05, ** : p < 0,01, * : p < 0,001, **** : p < 0,0001.**

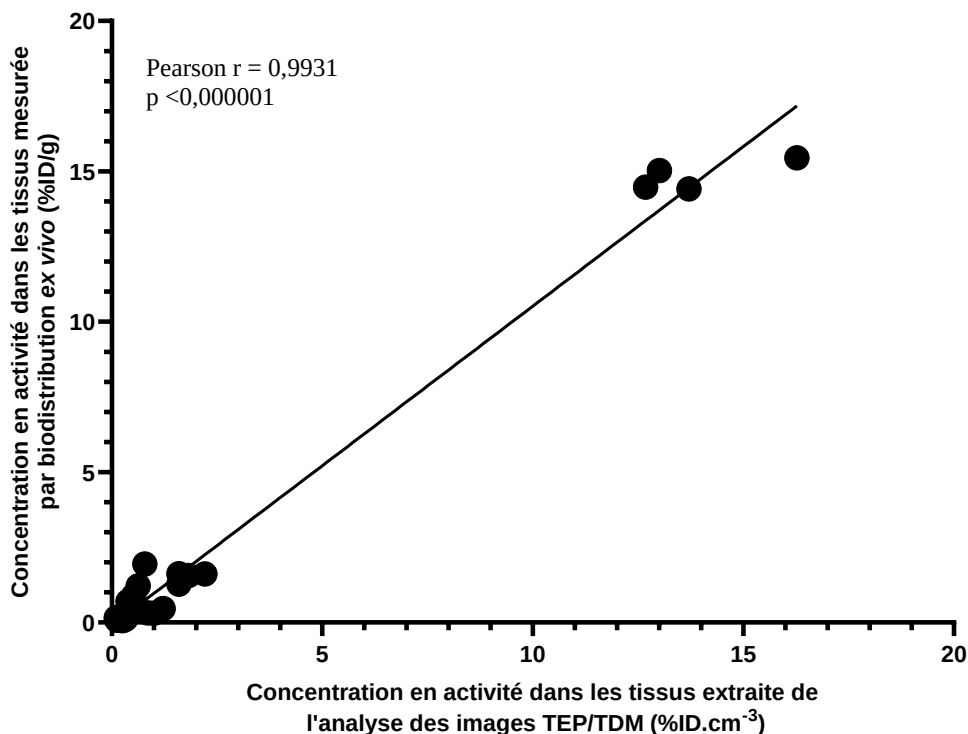


Figure 69 : Corrélation entre la quantification de l'accumulation du [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans les tissus par biodistribution ex vivo et par analyse des images TEP/TDM. La corrélation entre les valeurs d'activité mesurées par les 2 méthodes a été évaluée par le test de Pearson.

III.2.2 Evaluation de l'effet de la sono-perméabilisation sur la perfusion sanguine tumorale

Pour explorer l'effet de la sono-perméabilisation, l'échographie de contraste (CEUS) a été utilisée pour surveiller les variations de la perfusion tumorale des modèles murins de xénogreffes sous-cutanée de LNCaP ayant reçu le RP sur une période de 6000 frames. A cet effet, des MB Vevomarker (70 μ L) ont été administrées via une injection i.v. en bolus chez les souris, 15 minutes après avoir traité par sono-perméabilisation ou non.

Dans ce contexte, le contour de la tumeur a été défini en traçant des ROIs sur les images d'échographie en mode B (**Figure 70A**). Ces ROIs ont ensuite été appliqué sur les images de contraste non linéaires pour obtenir la dynamique de perfusion sous forme de courbe temps-intensité (**Figure 70B**), soit l'intensité du signal moyenne en fonction du temps. Le pic d'intensité (en dB) identifie le maximum de l'intensité du signal dans les ROIs après l'injection de l'agent de contraste et le temps au pic d'intensité (s) est le moment où le signal atteint son maximum.

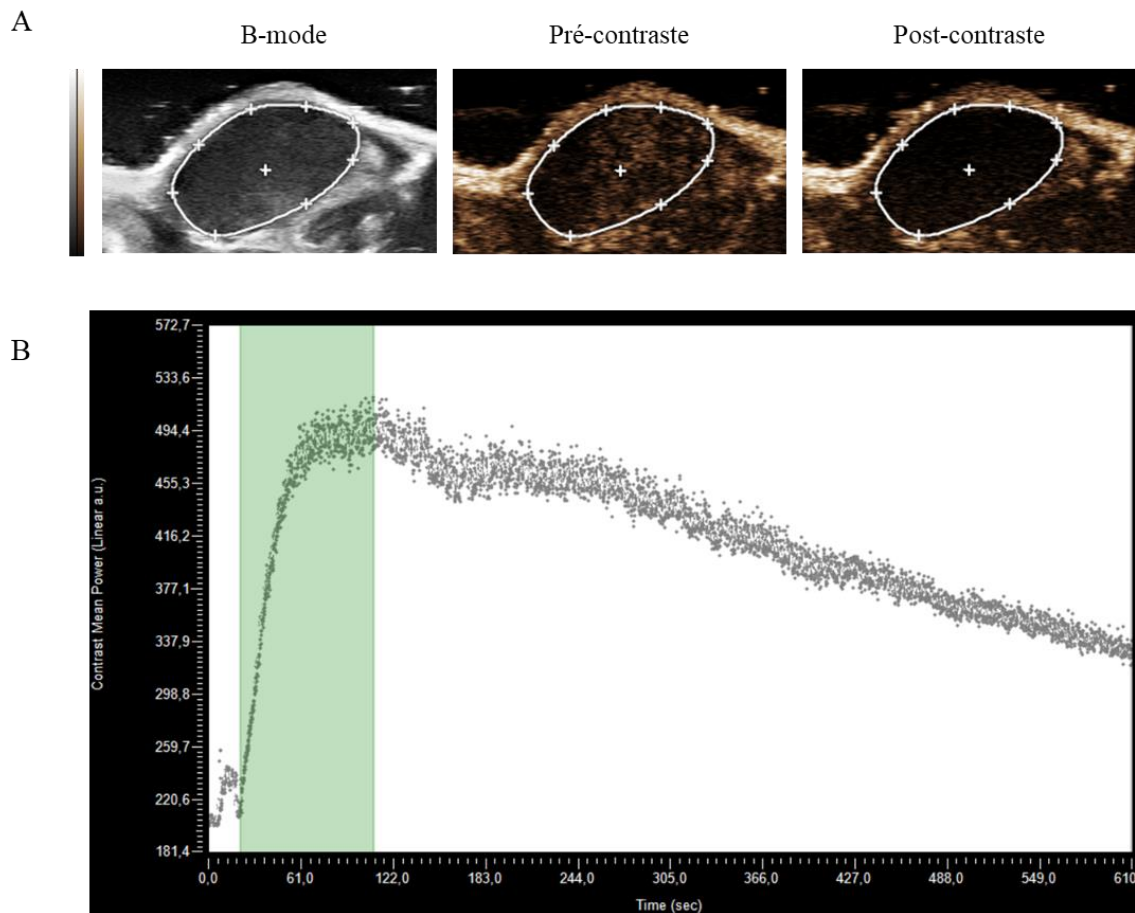


Figure 70 : A) Images représentatives d'échographie ultrasonore avec contraste (CE-US) des tumeurs sous-cutanées LNCaP chez des souris nues mâles. La tumeur (zone d'intérêt blanche, ROI) de la souris témoin non traitée est montrée. De gauche à droite : image en mode gris (échelle de gris) ; image en mode contraste avant l'injection de l'agent de contraste; image en mode contraste après injection au pic d'amélioration du contraste (après contraste) (B) Courbe représentative du temps et de l'intensité de la tumeur (zone d'intérêt blanche, ROI).

Au sein de la tumeur aucune différence statistiquement significative du pic d'intensité est observée entre les groupes. En effet, les résultats ont indiqué que les niveaux de pic d'intensité de la tumeur entière étaient similaires chez les souris traitées sous différentes conditions ultrasonores ($4,32 \pm 1,55 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US1MB ; $4,23 \pm 1,51 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US2MB ; $4,76 \pm 0,81 \text{ \%ID.cm}^{-3}$ pour le groupe US3MB) et les souris contrôle non traitées ($4,56 \pm 0,80 \text{ \%ID.cm}^{-3}$), suggérant que les traitements ultrasonores n'ont pas modifié la perfusion sanguine.

Pour cette étude, la relation entre la perfusion sanguine tumorale à travers une variable soit le pic d'intensité et l'absorption tumorale de $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$ a été explorée (**Figure 72**). Pour chaque groupe expérimental, une courbe de corrélation a été réalisée afin d'évaluer si des variations dans l'absorption tumorale étaient liées à des variations de l'intensité maximale du pic de contraste. La surface des ROIs a également été prise en compte dans cette analyse.

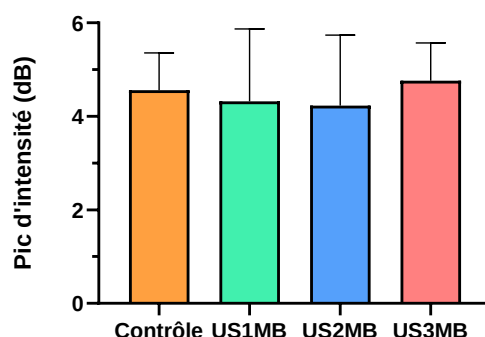


Figure 71 : Évaluation du pic d'intensité de contraste (mesurée en dB) dans la tumeur chez les souris contrôle non traitées et traitées aux conditions US1MB, US2MB et US3MB. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n=8$) et ont été analysées par ANOVA à deux facteurs suivis du test de comparaisons multiples montrant aucune différence significative.

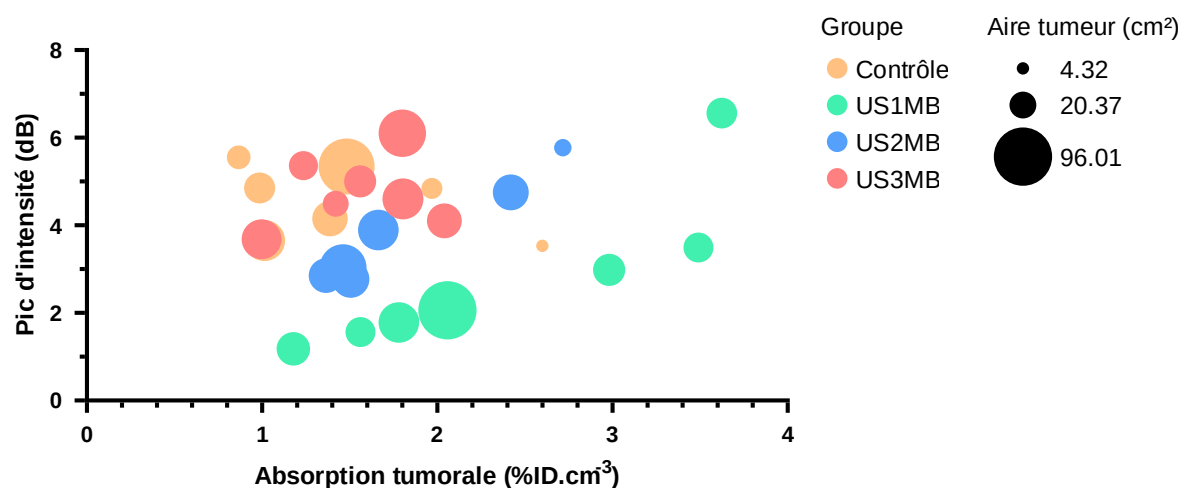


Figure 72 : Représentation du pic d'intensité de contraste (mesurée en dB) de la tumeur en fonction de l'absorption tumorale ($\text{\%ID.cm}^{-3}$) du radiopharmaceutique $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$ pour chaque souris du groupe contrôle non traitées et traitées aux conditions US1MB, US2MB et US3MB. L'aire de la ROI est prise en compte dans le graphe.

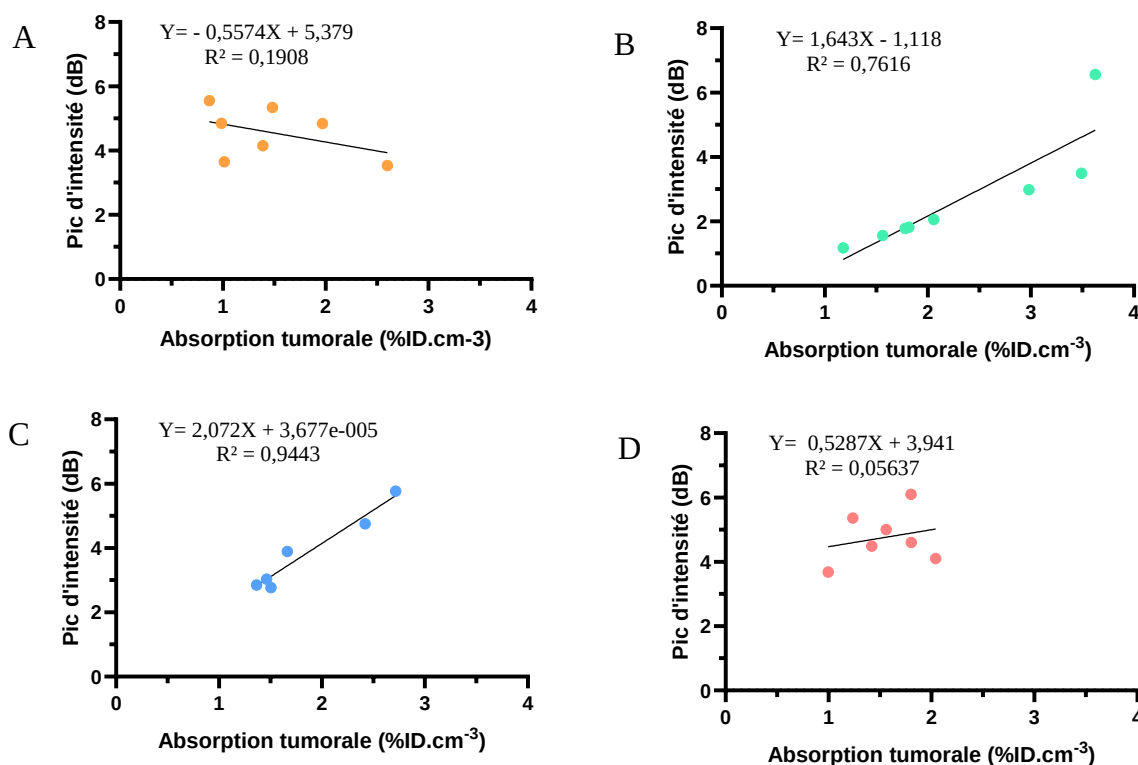


Figure 73 : Courbe de régression linéaire entre absorption tumorale du radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007 (%ID.cm $^{-3}$) et le pic d'intensité (dB) à 2h p.i. chez des souris mâles porteuse de tumeurs sous-cutanées LNCaP (PSMA+) pour (A) le groupe contrôle montrant une corrélation non significative. L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $-0,5574 \pm 0,5134$, une ordonnée à l'origine de $5,379 \pm 0,8117$ et $R^2 = 0,1908$ (B) le groupe US1MB montrant une corrélation significative ($p < 0,01$). L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $1,643 \pm 0,3752$, une ordonnée à l'origine de $-1,118 \pm 0,9260$ et $R^2 = 0,7616$ (C) US2MB montrant une corrélation significative ($p < 0,01$). L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $2,072 \pm 0,2516$, une ordonnée à l'origine de $3,677e-005 \pm 0,4846$ et $R^2 = 0,9443$ et (D) US3MB montrant une corrélation non significative. L'ajustement linéaire est caractérisé par une pente de $0,5287 \pm 0,9675$, une ordonnée à l'origine de $3,941 \pm 1,535$ et $R^2 = 0,05637$.

Comme illustrées dans les **Figure 73A** et **Figure 73D**, chez les souris contrôle et US3MB, aucune corrélation entre l'absorption tumorale du RP et le pic d'intensité n'a été observée, affichant respectivement des valeurs de coefficient de détermination R^2 de 0,1908 et 0,05637. En revanche, les souris soumises aux conditions US1MB et US2MB (**Figure 73B** et **Figure 73C**) ont présenté une corrélation significative ($p < 0,01$) entre l'absorption tumorale du RP et le pic d'intensité avec des coefficients de détermination élevées, plus marqué pour le groupe US2MB ($R^2 = 0,9443$) que le groupe US1MB ($R^2 = 0,7616$) par rapport au groupe contrôle. Cela indique que l'augmentation du pic d'intensité du contraste était fortement corrélée à l'accumulation tumorale du RP.

III.2.3 Evaluation ex vivo de l'impact de la sono-perméabilisation

III.2.3.1 Evaluation ex vivo de l'impact de la thérapie ultrasonore sur la délivrance de médicament dans la tumeur

Pour évaluer l'efficacité de la sonoporation, le TRITC-dextran (70 kDa, Sigma-aldrich) a été administré par voie i.v. aux mêmes groupes de souris porteuses de tumeurs LNCaP sous-cutanées, traitées ou non par USMB, après l'injection du radiopharmaceutique. Les tumeurs ont ainsi été prélevées à la fin de l'acquisition de l'imagerie TEP et la moitié de chaque échantillon été placé dans un milieu de conservation jusqu'au lendemain pour l'analyse cytométrique et l'analyse microscopique (Han et al. 2007).

L'impact des ultrasons thérapeutiques sur la barrière a été évaluée sur des coupes en immunofluorescence pour corrélérer la distribution du dextran fluorescent, de l'expression de la cible (PSMA) et de l'intégrité de la barrière avec le CD31. Cette évaluation quantitative a été effectuée sur des sections de tumeurs congelées incubées avec un anticorps primaire anti-PSMA, anti-CD31 (marqueur de cellules endothéliales) en quantifiant le pourcentage de pixels provenant des marquages et du TRITC-dextran.

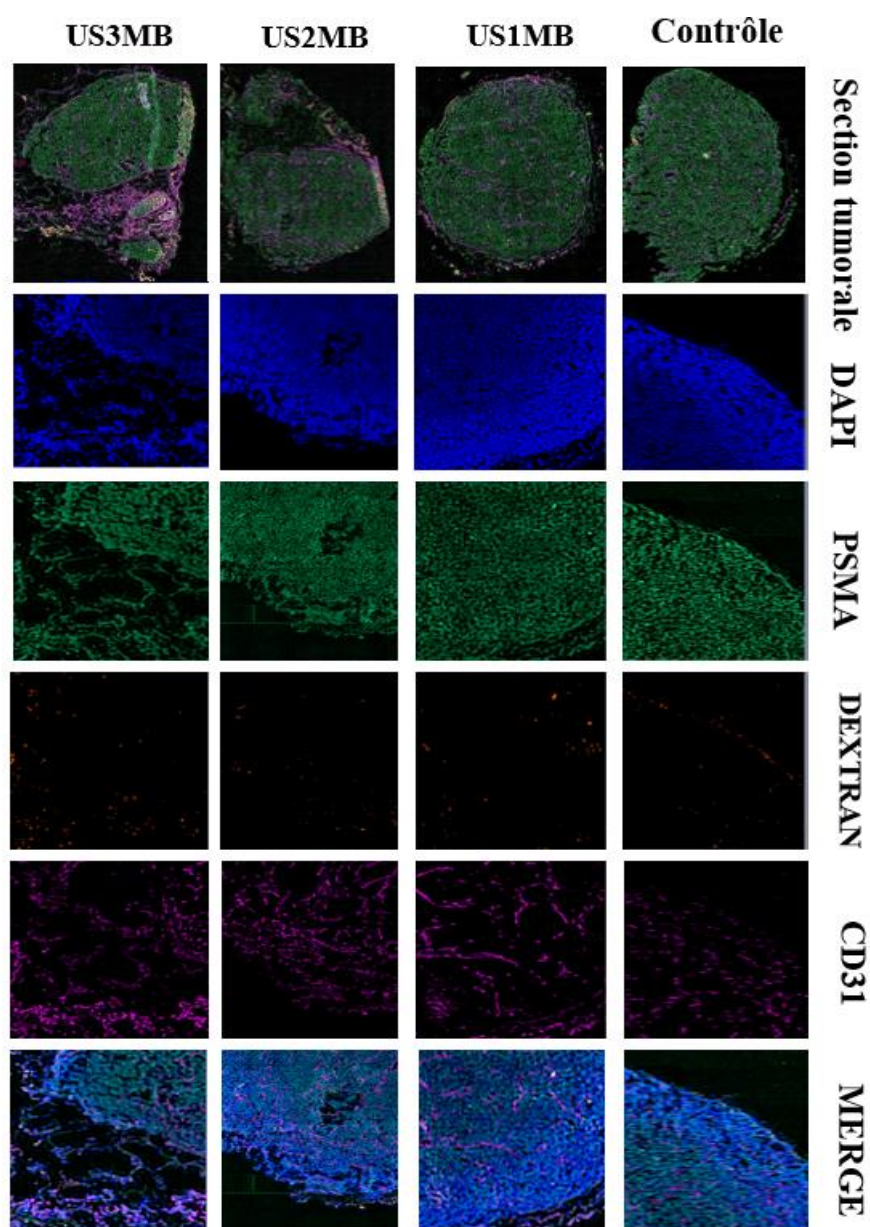


Figure 74 : Images représentatives (x20) de microscopie à fluorescence des coupes de tumeurs LNCaP des souris mâles porteuses de xénogreffes sous cutanées LNCaP colorées avec DAPI (noyaux, fluorescence bleue), anticorps anti-PSMA (fluorescence verte), TRITC-dextran (fluorescence rouge) et anticorps anti- CD31 (violet). Les images fusionnées sont montrées.

Comme illustrée par la **Figure 75A**, la quantification par immunofluorescence du PSMA via l'utilisation d'un anticorps anti-PSMA sur les sections de tumeur LNCaP a révélé aucune différence statistiquement significative au niveau de l'expression *in vivo* positive du PSMA entre les différents groupes expérimentaux, indiquant que la quantité ou la distribution du PSMA sur la surface des cellules tumorales n'a pas été impacté. Cela suggère que l'expression du PSMA en tant que cible est restée stable et n'a pas été influencée par les traitements USMB. La quantification de l'expression de PSMA sera également réalisée ultérieurement par CMF pour confirmer les observations microscopiques.

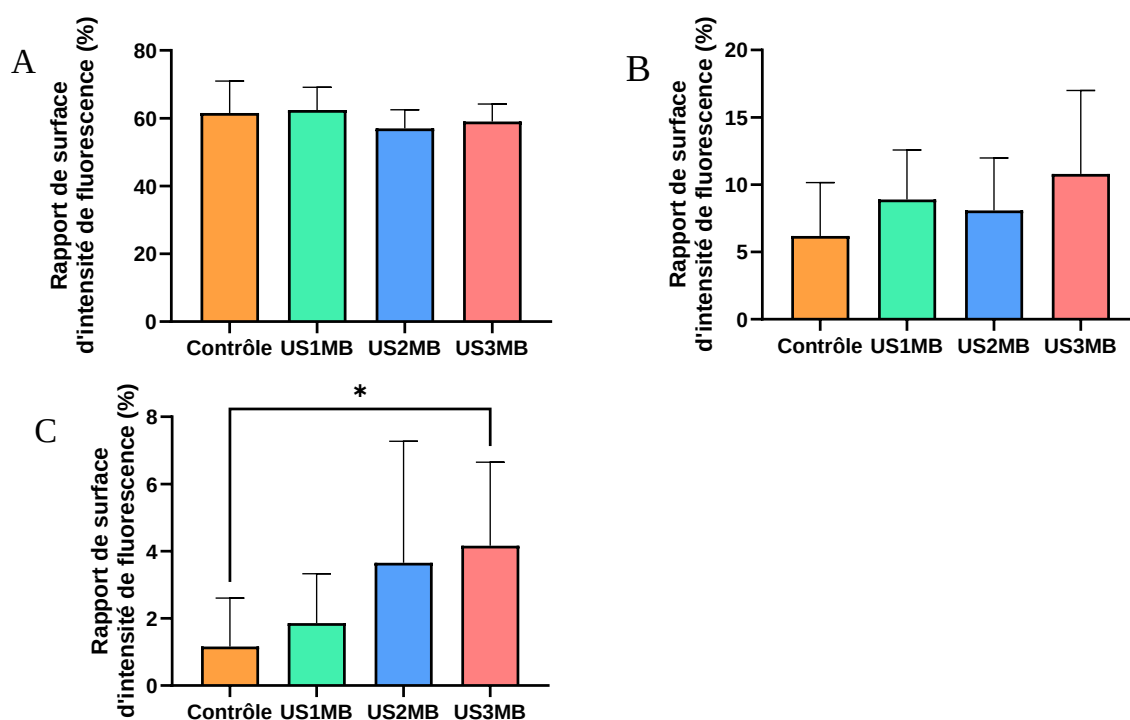


Figure 75 : Analyse quantitative du pourcentage de la surface totale de la tumeur LNCaP couverte par les pixels marqués (A) l'anticorps anti- PSMA (B) anticorps-anti CD31(C) le TRITC-dextran entre les différents groupes de souris mâles porteuses de xénogreffes sous-cutanées traitées sans et avec différentes conditions USMB .Toutes les données sont présentées sous forme de valeurs moyennes $\pm$ écart-type ($n=8$) et analysées par ANOVA à un facteur suivie d'un test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$).

Comme le montrent les images microscopiques de la Figure 74, l'étendue de couverture des cellules endothéliales, déterminée par le pourcentage de pixels CD31, était plus élevée dans les tumeurs traitées par sono-perméabilisation que celles observées dans les tumeurs contrôles ($6,20 \pm 3,96$ %). Cette augmentation, bien que non significative, était particulièrement marquée dans le groupe US3MB ($11,19 \pm 6,41$ %), suivie du groupe US1MB ($8,86 \pm 3,84$ %), puis du groupe US2MB ($8,05 \pm 4,18$ %) suggérant que la sono-perméabilisation perturbe les cellules endothéliales, augmentant ainsi l'étendue des vaisseaux tumoraux positifs pour CD31.

En parallèle, les images d'immunofluorescence ont révélé une accumulation évidente du TRITC-dextran dans les tissus tumoraux, soutenant l'effet de la sono-perméabilisation sur la perméabilité vasculaire. Une augmentation du signal fluorescent a été observée dans tous les groupes traités par USMB, avec une accumulation plus importante dans les tumeurs du groupe US3MB ($4,16 \pm 2,49$ %), suivies des groupes US2MB ($2,63 \pm 1,47$ %) et US1MB ($1,86 \pm 1,47$ %). L'accumulation du TRITC-dextran dans le groupe US3MB s'est avérée significative ($p < 0,05$), indiquant que la sono-perméabilisation pourrait être un moyen utile pour améliorer la perméabilité vasculaire et l'extravasation du TRITC-dextran au sein de la tumeur. Par ailleurs, la couverture des cellules endothéliales dans la tumeur (Figure 72B) a

été augmentée dans ce même groupe, semblant démontrer la capacité de la sono-perméabilisation à améliorer l'extravasation du dextran des tissus vaisseaux sanguins vers les tissus environnants notamment l'interstitium tumoral.

Les images DAPI (**Figure 74**) révèlent également une détérioration tissulaire importante dans le groupe US3MB, ce qui corrobore l'idée que cette condition induit une perturbation de la barrière vasculaire, facilitant ainsi le passage des molécules du vaisseau sanguin vers la tumeur et son interstitium.

III.2.3.1 Evaluation de l'impact de la thérapie ultrasonore sur l'internalisation cellulaire médicament

Après avoir initialement évalué l'efficacité de la sono-perméabilisation à l'échelle de la tumeur entière par analyse microscopique, l'accent est mis sur l'évaluation la délivrance intracellulaire à l'aide de la CMF.

Pour évaluer la viabilité cellulaire, un marqueur fluorescent de viabilité (Viability) a été utilisé. En effet, contrairement aux cellules cultivées *in vitro*, les suspensions cellulaires extraites des tumeurs solides contiennent une proportion importante de débris cellulaires et de cellules mortes, qui, en raison de leur forte auto-fluorescence, peuvent interagir de manière non spécifique avec les anticorps fluorescents et entraîner des faux positifs. En utilisant le marqueur de viabilité, les cellules mortes apparaissent avec une intensité de fluorescence plus élevée, permettant ainsi de les distinguer des cellules vivantes. La quantification de la fluorescence du dextran, associé à celle du PSMA, a ensuite été réalisée pour évaluer la délivrance intracellulaire et l'expression du PSMA.

La même stratégie de gating (sélection de populations), décrit précédemment pour les expériences de cytométrie sur les cellules cultivées *in vitro* a ensuite été employée, en ajoutant une étape de discrimination des cellules vivantes et mortes (**Figure 76**). En outre, après avoir exclu les débris cellulaires représentant la majorité des événements (≈ 80 % des événements totaux), les doublets ainsi que les cellules négatives pour la viabilité, les cellules viables LNCaP ont été sélectionnées, pour une analyse plus approfondie. La quantification du pourcentage de cellules TRITC dextran positives et de l'intensité de fluorescence médiane (MFI pour « median fluorescence intensity ») des cellules exprimant le PSMA a été réalisée entre les différents groupes (**Figure 77**)

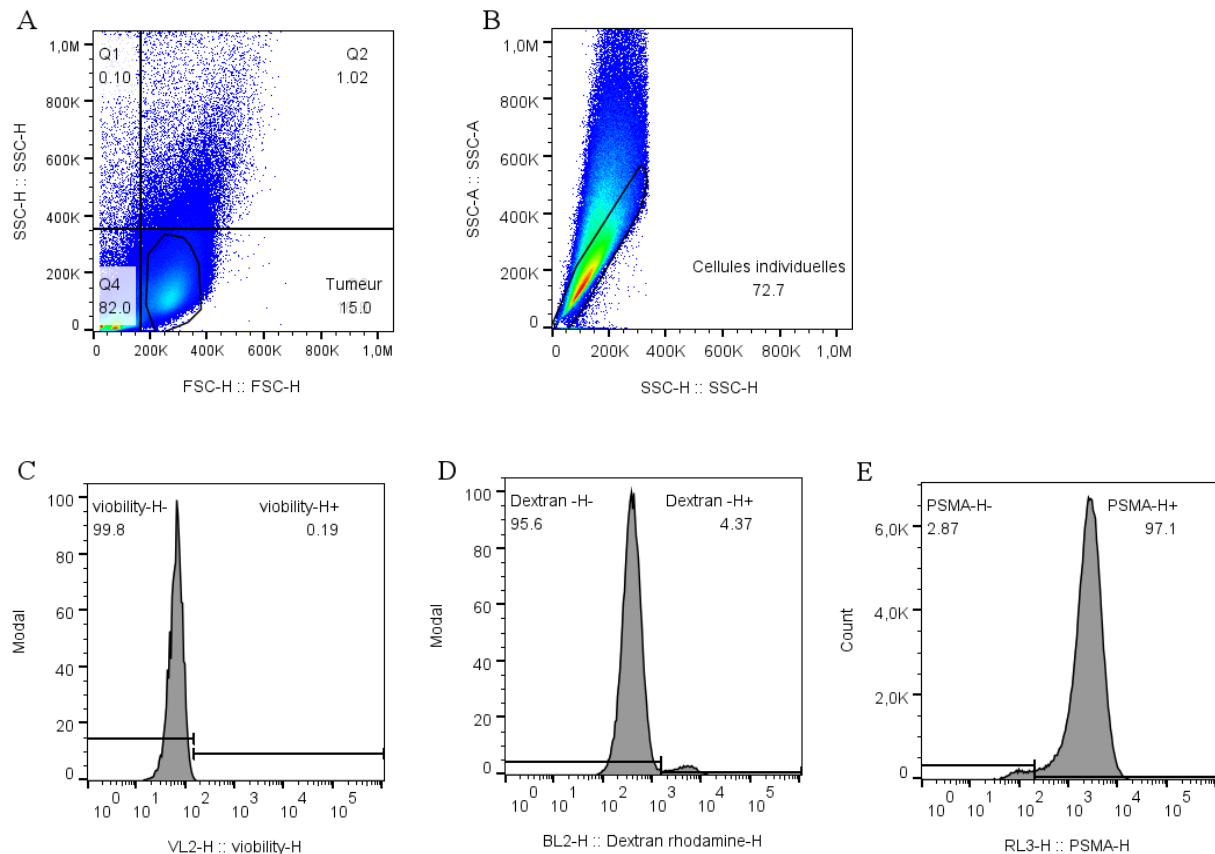
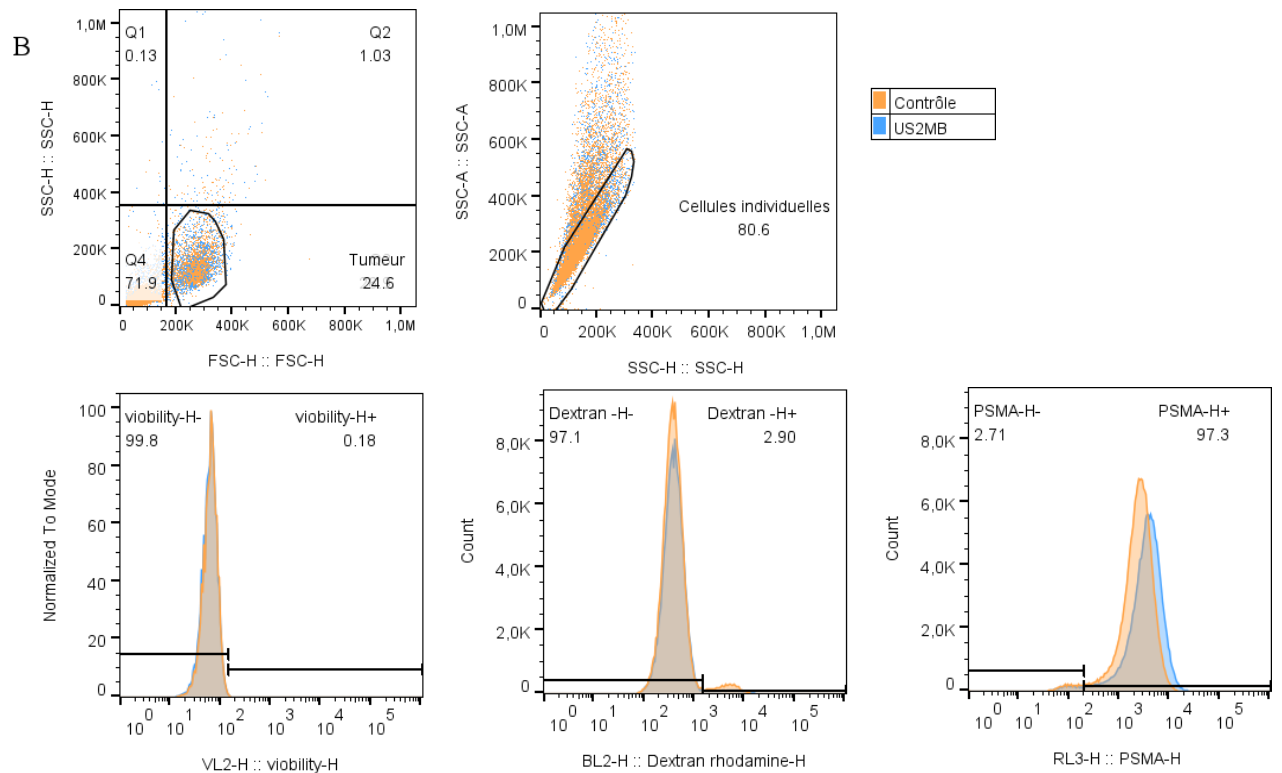
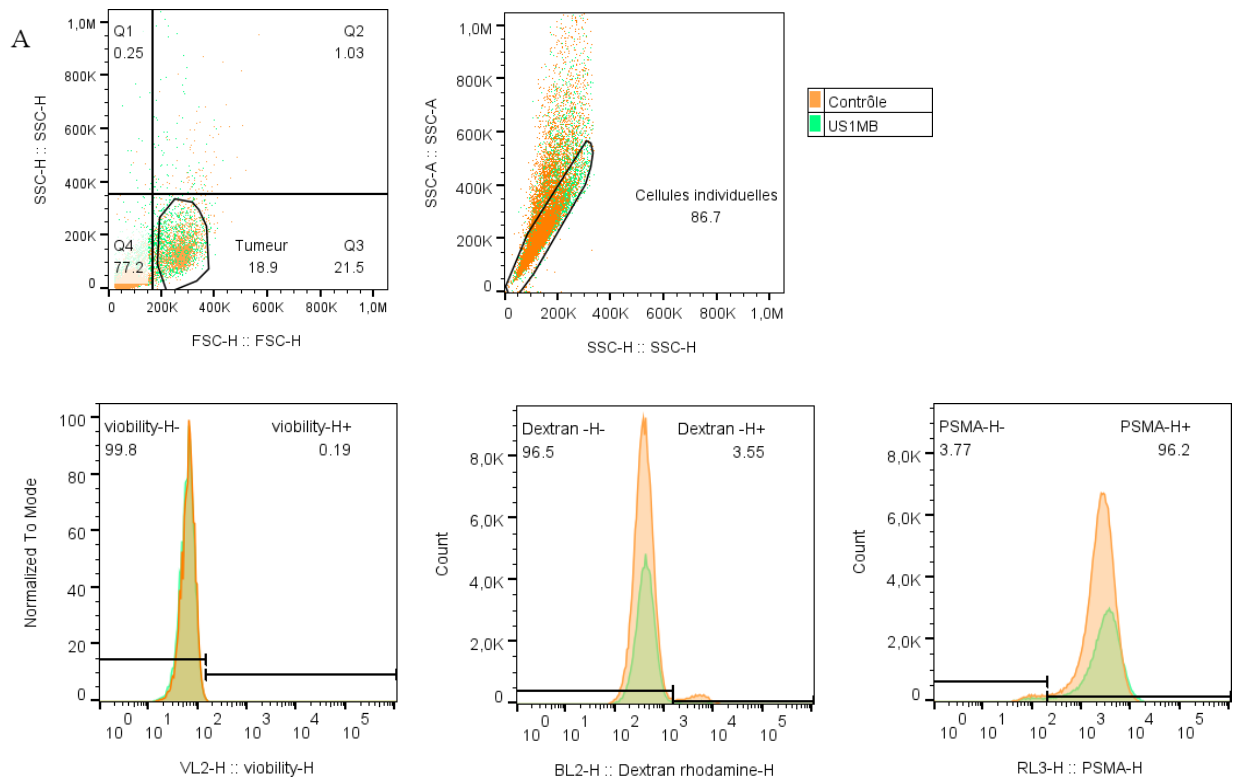


Figure 76 : Stratégie de « gating » appliquée aux expériences de cytométrie de flux sur les cellules issues de tumeurs de LNCaP (A) Graphique représentatif de la hauteur de diffusion avant (FSC-H) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H) afin d'identifier les cellules d'intérêt en fonction de leur taille et de leur granularité. Les cellules tumorales LNCaP (quadrant inférieur droit Q3) ont été distinguées des débris cellulaires (quadrant inférieur gauche Q4). (B) Graphique représentatif de la surface de diffusion latérale (SSC-A) et de la hauteur de diffusion latérale (SSC-H). Les événements coïncidents ont été exclus de la population cellulaire. (C) Les cellules mortes ont finalement été exclues sur l'histogramme Viability-H. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'évènements de la population parentale est indiqué. (D) Histogramme représentant le profil de coloration du dextran avec une estimation du pourcentage de cellules sonoporées avec le pic d'intensité à droite. (E) Histogramme représentant le profil de coloration du PSMA avec une estimation du pourcentage de cellules exprimant le PSMA avec le pic d'intensité à droite. Pour chaque nouvelle population définie, le pourcentage d'évènements de la population parentale est indiqué



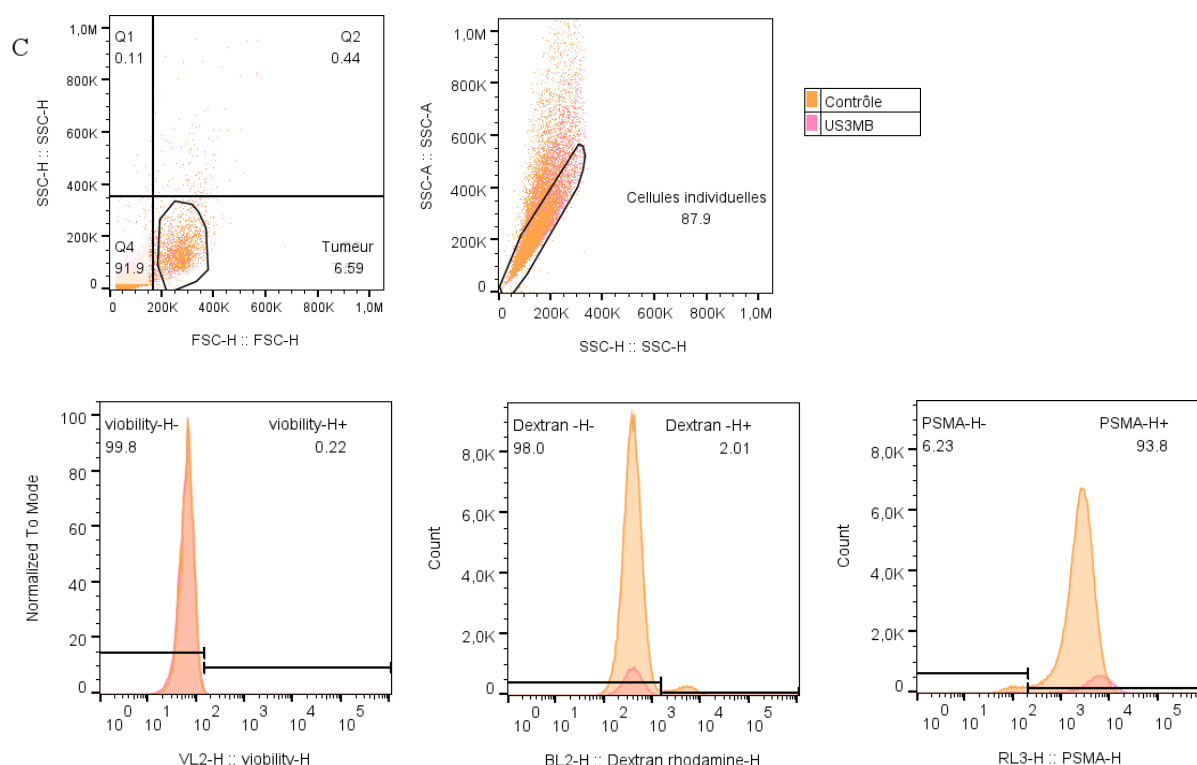


Figure 77 : Graphiques représentatifs des expériences de cytométrie en flux sur les cellules humaines de LNCaP cultivées in vitro incubées avec de l'iodure de propidium pour les différentes conditions expérimentales.

La colonne de gauche présente le graphique SSC-H en fonction de FSC-H, la colonne centrale affiche le graphique SSC-A en fonction de SSC-H, et la colonne de droite montre les histogrammes du profil d'absorption d'iodure de propidium (IP) des cellules tumorales. Les données du groupe contrôle ont été comparées et superposées avec ceux de chaque condition expérimentale (A) Exposition aux paramètres US1MB (B) Exposition aux paramètres US2MB (C) Exposition aux paramètres US2MB.

Comme le montre la **Figure 78A**, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le groupe contrôle et les groupes traités avec USMB, concernant la quantité de TRITC-dextran internalisé par les cellules tumorales. En effet, le pourcentage de cellules positives au dextran -ITC était similaire entre les échantillons contrôle ($1,78 \pm 2,05$ %), ceux traités avec US1MB ($1,83 \pm 1,35$ %) et ceux traités avec US2MB ($1,79 \pm 1,34$ %). En revanche, les échantillons traités avec US3MB ont montré une fréquence légèrement inférieure de cellules positives au TRITC-dextran ($1,48 \pm 1,32$ %), bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. Ces valeurs d'absorption intracellulaire demeurent néanmoins faibles dans tous les groupes, suggérant que la sono-perméabilisation n'a pas induit une délivrance intracellulaire substantielle de dextran dans les cellules tumorales.

Ces résultats semblent toutefois indiquer que les traitements US1MB et US2MB pourraient favoriser légèrement l'entrée du TRITC-dextran dans les cellules tumorales par rapport au groupe contrôle, bien que l'effet reste modeste. L'absence de différence significative entre ces groupes suggère que d'autres facteurs, tels que l'intégrité de la barrière vasculaire ou la distribution du traitement, peuvent influencer l'efficacité de la sono-perméabilisation.

De plus, les analyses de CMF ont permis de mesurer l'expression du PSMA dans les cellules tumorales LNCaP (**Figure 77B**). Les valeurs de MFI étaient de $4317,2 \pm 2166,15$ pour les cellules contrôle et de $4330,2 \pm 1793,66$ pour les cellules traitées avec US1MB. En revanche, les cellules traitées avec US2MB ($3554,6 \pm 282,55$) et US3MB ($3385,67 \pm 1773,72$) ont montré une intensité de fluorescence légèrement inférieure, ce qui pourrait indiquer une réduction de l'expression de PSMA ou une modification de la distribution du marqueur dans ces groupes. Cette différence, plus subtile dans l'expression du PSMA au niveau des cellules isolées, n'a pas pu être détectée par l'analyse microscopique au niveau tissulaire.

Cependant, les résultats de cytométrie ont également révélé une tendance à la diminution de l'absorption intracellulaire de TRITC-dextran dans les cellules des souris traitées avec US3MB, bien que cette diminution ne soit pas statistiquement significative. Cette observation pourrait suggérer un effet délétère sur l'intégrité cellulaire, tel qu'une dégradation cellulaire ou une redistribution du marqueur, en particulier en réponse aux traitements ultrasonores plus intenses. En effet, les dommages potentiels causés par l'exposition aux US3MB pourraient avoir compromis l'intégrité des membranes cellulaires, réduisant ainsi l'absorption intracellulaire du TRITC-dextran, malgré son extravasation dans l'interstitium tumoral constatée en imagerie immunofluorescence, qui pourrait favoriser son passage dans le tissu tumoral environnant.

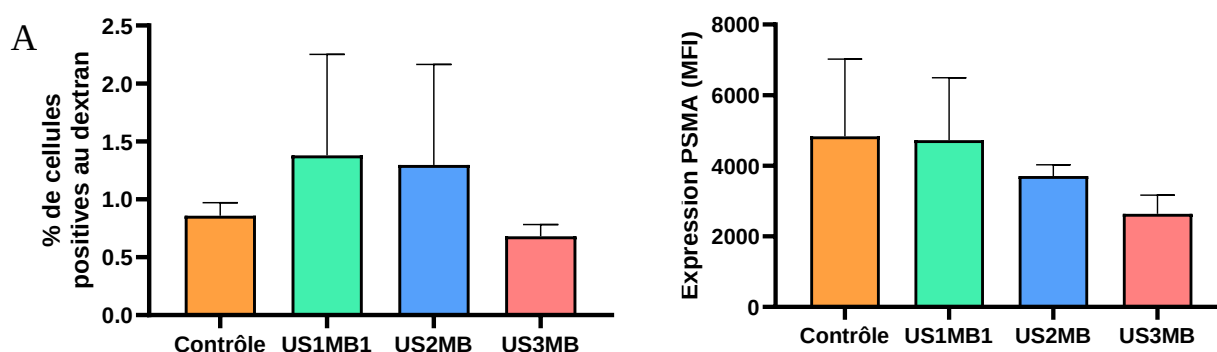


Figure 78 : (A) Quantification de l'internalisation cellulaire de TRITC-dextran et (B) niveau d'expression du PSMA des tumeurs LNCaP des souris porteuses des xénogreffes sous-cutanées LNCaP ayant été traité sans USMB (contrôle) et avec respectivement les conditions US1MB, US2MB et US3MB. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n=$) et ont été analysées par ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de

III.3 DISCUSSIONS

La RIV constitue un traitement prometteur pour les formes avancées et résistantes du cancer de la prostate, offrant une délivrance ciblée de rayonnement aux cellules tumorales tout en réduisant les effets secondaires. Cependant des défis subsistent, notamment en ce qui concerne la pénétration effective des agents thérapeutiques dans les tumeurs solides et leur diffusion homogène au sein du microenvironnement tumoral. La sono-perméabilisation est une technique complémentaire qui a suscité un intérêt croissant dans le domaine de l'administration de médicaments et du traitement des tumeurs.

La combinaison de la RIV et des USMB pourrait constituer une approche thérapeutique synergique en améliorant la distribution des agents thérapeutiques pour maximiser l'efficacité du traitement.

Bien qu'aucune étude à notre connaissance n'ait exploré l'association de ces deux techniques dans le cancer de la prostate, deux recherches pertinentes méritent d'être citées. La première étude de (van Wamel et al. 2006b) concerne l'utilisation de microbulles de contraste ultrasonore dans la thérapie au radionucléide des tumeurs. Cette recherche a montré que l'utilisation de microbulles de contraste et d'ultrasons permettait d'augmenter l'internalisation du radionucléide [^{111}In]In-DOTA-Tyr3-octreotate dans les cellules tumorales pancréatiques. En optimisant les réglages des ultrasons, comme le ratio des microbulles (10 bulles pour 1 cellule), le rapport cyclique (0,013 %) et l'indice mécanique (0,42) avec des durées de traitement de 30 à 60 minutes, cette étude a montré une augmentation de 160 % de l'internalisation du radionucléide par rapport aux cellules non traitées. Ces résultats suggèrent que le traitement adjuvant avec des microbulles de contraste et le radionucléide [^{111}In]In-DOTA-Tyr3-octreotate pourrait être une option thérapeutique viable, réduisant la dose nécessaire du radionucléide pour obtenir une efficacité antitumorale comparable.

Une deuxième étude exploratoire de (Owen et al. 2020) porte sur l'utilisation combinée de radiopharmaceutiques, de nanoparticules et d'ultrasons pour améliorer la délivrance ciblée dans les tumeurs surexprimant le facteur de croissance épidermique. Elle a montré que l'utilisation de microbulles pour libérer des radiopharmaceutiques encapsulés dans des liposomes améliore la distribution ciblée du médicament dans les tumeurs. L'exposition à des ultrasons augmentait significativement la concentration du radiopharmaceutique dans les tumeurs exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique, réduisant de plus de 99 % la survie clonogénique des cellules tumorales.

Dans ce contexte, l'effet des USMB sur la distribution et l'accumulation du radiopharmaceutique de diagnostic [^{18}F]F-PSMA-1007 en vue d'un schéma thérapeutique de RIV dans le cancer de la prostate a été exploré dans un modèle préclinique sous-cutané de souris immunodéficientes (Nude NMRI) porteuses de tumeurs humaines LNCaP (PSMA +) traitées avec quatre protocoles ultrasonores différents : sans USMB, avec US1MB, US2MB et US3MB.

Les résultats préliminaires ont montré que la sono-perméabilisation avec microbulles (USMB) n'a significativement pas impacté la biodistribution du radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007 dans les organes sains, avec une accumulation principalement observée dans les reins et la vessie (lié à l'excrétion urinaire) et modérément dans la rate (en raison de la filtration par les macrophages). La rate est un organe riche en macrophages et en cellules dendritiques. Ces cellules jouent un rôle central dans la filtration sanguine et éliminent tout organisme étranger. Toutefois, une différence significative a été observée dans l'accumulation au niveau du rein gauche dans le groupe US2MB ($p < 0,05$), suggérant que cette technique pourrait influencer la captation ou l'excrétion du radiotraceur dans cet organe. Concernant l'absorption tumorale, tous les groupes traités par USMB à l'exception du groupe US3MB ont montré une légère augmentation, mais aucune différence statistiquement significative n'a été notée. Cela suggère que cette technique pourrait favoriser, dans des conditions ultrasonores précises, la détection et la précision du ciblage tumoral à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Néanmoins, l'impact potentiel sur d'autres organes, tels que les glandes salivaires et la rate, nécessite des investigations

supplémentaires pour évaluer les risques et la sécurité globale du traitement.

Les analyses de la perfusion sanguine tumorale par échographie de contraste n'ont pas montré d'effet notable des traitements USMB sur la perfusion. Cependant, une corrélation significative ($p < 0,01$) a été observée entre l'intensité du pic de contraste et l'absorption du radiopharmaceutique dans les groupes traités avec US1MB et US2MB, suggérant que l'augmentation de l'intensité de contraste pourrait refléter une meilleure accumulation du radiotraceur dans la tumeur. Cela indique que la sono-perméabilisation pourrait améliorer la perméabilité tumorale, facilitant ainsi la distribution du radiopharmaceutique, un effet non observé dans le groupe contrôle sans traitement. En revanche, aucune corrélation n'a été constatée dans le groupe US3MB, ce qui pourrait s'expliquer par des effets indésirables des ultrasons, tels que la vasoconstriction ou des altérations de la microcirculation tumorale, perturbant la perfusion et ainsi l'absorption du radiotraceur.

L'impact de la sono-perméabilisation sur l'extravasation et l'internalisation du TRITC-dextran a été évalué *ex vivo*. Les résultats obtenus en microscopie à fluorescence suggèrent que la sono-perméabilisation modifie la structure des cellules endothéliales, entraînant une augmentation de la couverture des vaisseaux tumoraux positifs pour CD31. Il est important de souligner que CD31, également appelé PECAM-1, joue un rôle essentiel dans les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales, où il régule l'adhésion cellulaire et la perméabilité vasculaire. Bien que CD31 soit aussi exprimé sur d'autres types cellulaires, comme les plaquettes ou les monocytes, son expression au sein des jonctions intracellulaires endothéliales des vaisseaux sanguins reste majoritaire. Ainsi, une augmentation de l'expression de CD31 dans les vaisseaux tumoraux pourrait signaler une altération des jonctions endothéliales, exposant davantage CD31 à la surface des cellules endothéliales, facilitant ainsi sa détection, comme cela a été observé dans le groupe US3MB.

L'extravasation du TRITC-dextran dans les tissus tumoraux a été facilitée, avec une accumulation significativement marquée dans le groupe US3MB ($p < 0,05$), suivi du groupe US2MB et US1MB, suggérant une amélioration de la perméabilité vasculaire. Ces données suggèrent que la sono-perméabilisation pourrait être un moyen efficace pour améliorer l'accès des agents thérapeutiques aux tissus tumoraux en favorisant leur extravasation. Cependant, une exposition excessive aux ultrasons, comme celle utilisée dans le groupe US3MB, semble également induire une dégradation tissulaire importante, comme en témoigne l'observation des images DAPI au microscope. Cette détérioration pourrait expliquer la faible imprégnation du dextran au niveau intracellulaire observée en CMF, malgré son extravasation dans l'interstitium tumoral. En effet l'internalisation du TRITC-dextran dans les cellules tumorales a été faible et n'a pas révélé de différence significative entre les groupes traités et le groupe contrôle, bien que les groupes US1MB et US2MB aient montré une légère tendance à une amélioration par rapport au contrôle. Par ailleurs, l'expression du PSMA dans ces cellules a légèrement diminué dans les groupes traités par USMB, particulièrement dans le groupe US3MB, ce qui pourrait indiquer une altération de la distribution ou de la stabilité du marqueur.

Bien que l'extravasation du TRITC-dextran soit améliorée, elle ne se traduit pas nécessairement par une meilleure internalisation du dextran. Un point intéressant est que les tendances observées dans l'absorption tumorale du radiopharmaceutique et l'internalisation intracellulaire du dextran sont

similaires entre les différents groupes.

L'absence d'une accumulation significative du radiotraceur observée par imagerie TEP, malgré une augmentation de la perméabilité (indiquée par l'extravasation du TRITC-dextran vers l'interstitium tumoral), suggère que d'autres facteurs, comme une dégradation tissulaire, peuvent limiter l'efficacité de l'absorption du radiotraceur. Cela soulève la question de l'efficacité de la sono-perméabilisation pour optimiser l'absorption intracellulaire des agents thérapeutiques dans les thérapies ciblées.

Par ailleurs, plusieurs limites doivent être soulignées lors de cette étude. L'absence d'analyse préalable de la perfusion sanguine tumorale par échographie de contraste avant traitement par sono-perméabilisation empêche d'établir des comparaisons directes sur l'impact de la sono-perméabilisation sur la perfusion et la vascularisation tumorale. En outre, certains paramètres liés à la perfusion et à la perméabilité vasculaire n'ont pas pu être quantifiés de manière satisfaisante, ce qui limite la portée de l'étude pour évaluer précisément l'effet de la sono-perméabilisation sur la perfusion sanguine et son influence sur le microenvironnement tumoral. Ces aspects devront être abordés dans des études futures pour affiner la compréhension des mécanismes sous-jacents et optimiser l'application de cette technique pour la RIV.

Aussi, bien que l'augmentation de CD31 semble être liée à la perturbation des cellules endothéliales, une contribution d'autres cellules exprimant CD31 ne peut être totalement exclue. Afin de confirmer que l'augmentation de CD31 est spécifiquement liée à la perturbation des jonctions endothéliales (Markelc et al. 2018), il serait pertinent de réaliser des analyses complémentaires utilisant des marqueurs endothéliaux spécifiques, tels que VE-cadherin ou CD34. Par exemple une double coloration avec VE-cadhérine et CD31 permettrait de mieux isoler l'impact de la sono-perméabilisation sur les cellules endothéliales. De plus, l'utilisation de marqueurs spécifiques pour d'autres cellules exprimant CD31 (Lertkietmongkol et al. 2016), telles que les plaquettes, monocytes et granulocytes, permettrait de mieux identifier l'origine de l'augmentation de CD31 observée après traitement par sono-perméabilisation. L'expression de CD31 par ces cellules non-endothéliales pourrait influencer les résultats, par exemple en raison de l'activation des plaquettes ou de la migration de monocytes dans la tumeur, rendant l'interprétation plus complexe. Une identification précise des cellules endothéliales, combinée à une analyse de la dynamique des autres cellules exprimant CD31, serait nécessaire pour clarifier l'origine de cette augmentation au niveau de la barrière vasculaire tumorale.

Enfin, les résultats de notre étude suggèrent que la sono-perméabilisation induit une perturbation de la barrière vasculaire, augmentant de manière générale la perméabilité, facilitant l'extravasation du TRITC-dextran. Cette déstabilisation de jonctions entre les cellules endothéliales peut s'expliquer par la formation de "tunnels" ou perforations transendothéliales, induites par la cavitation des microbulles provoquant des oscillations. Ces structures transitoires, ressemblant à des pores formant des canaux transcellulaires, peuvent varier en taille et en forme, ce qui peut rendre leur classification précise difficile. L'intensité de l'effet peut dépendre de la puissance des ultrasons

Cependant, la distinction entre perforation et perturbation reste difficile en l'absence de techniques de microscopie électronique permettant une observation détaillée de la morphologie de ces structures. Une

investigation plus approfondie, combinant microscopie électronique et analyse de perméabilité vasculaire, serait nécessaire pour mieux caractériser les types de perturbations observées induites par sono-perméabilisation.

En résumé, bien que l'utilisation des USMB ait montré un impact modeste sur la distribution et l'accumulation du radiopharmaceutique dans la tumeur, elle semble avoir une influence plus marquée sur la perméabilité vasculaire, favorisant l'extravasation de molécules comme le dextran. Cependant, l'effet sur l'internalisation intracellulaire du médicament et sur la perfusion sanguine tumorale reste limité. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes pour de futures études sur l'amélioration du ciblage tumoral et de l'internalisation des agents thérapeutiques à travers la modification de la perméabilité vasculaire.

IV. ETUDE EN COURS SUR L'EVALUATION DE L'EFFET THERAPEUTIQUE SYNERGIQUE DU [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 COMBINE AUX USMB.

IV.1 CONTEXTE

Bien que les résultats suscitent des interrogations sur l'efficacité des USMB, il est possible que la sono-perméabilisation produise des effets plus significatifs et bénéfiques lorsqu'elle est appliquée dans un contexte thérapeutique. En effet, les essais cliniques de la RIV avec le [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 a montré des réponses thérapeutiques encourageantes, en améliorant la survie sans progression et la survie globale dans le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration. Cependant des risques de surdosage, pouvant entraîner des toxicités dans des organes sensibles comme les reins, la moelle osseuse ou les glandes salivaires, peuvent nécessiter une interruption temporaire du traitement ou son arrêt complet. La sono-perméabilisation pourrait résoudre les problèmes de surdosage et sous-dosage des traitements en améliorant la pénétration des radiopharmaceutiques dans les tumeurs, permettant ainsi d'optimiser l'efficacité à doses plus faibles, de réduire les effets secondaires.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet thérapeutique et synergique du [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 en combinaison avec les USMB sur le cancer de la prostate en utilisant un modèle de xénogreffe murin. Les effets de la sono-perméabilisation en tant que méthode adjuvant et complémentaire au radiopharmaceutique, en observant la croissance tumorale et la survie globale au sein des groupes expérimentaux.

IV.2 MATERIEL ET METHODES

IV.2.1 Synthèse du radiopharmaceutique

La radiosynthèse complète du radiopharmaceutique [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 a été réalisée en collaboration avec la Dr Mylène Richard de l'équipe de Développements de Radiopharmaceutiques et d'Agents d'Imagerie du laboratoire Biomaps et dont la méthode est retranscrite ci-dessous.

IV.2.1.1 HPLC analytique

Les analyses HPLC analytiques ont été réalisées sur un système Waters Alliance (e2695) équipé d'un spectrophotomètre UV (Waters 2489) et d'un détecteur de radioactivité (Berthold LB500 fLumo), et les données ont été analysées à l'aide du logiciel Empower (Waters, version 3.0).

Colonne analytique : Symmetry-M® C-18, 50 x 4,6 mm, 5 μm (Waters) ; éluant A : H₂O contenant le réactif PIC® B7 à faible UV (20 mL pour 1000 mL), éluant B : H₂O / CH₃CN : 30 : 70 (v/v) contenant le réactif PIC® B7 à faible UV (20 mL pour 1000 mL), débit : 2,0 mL/min ; temps d'analyse de 13 minutes avec le gradient suivant : 5 % de l'éluant B pendant 1 minute, de 5 % à 100 % de l'éluant B en 10 minutes, de 100 % à 5 % de l'éluant B en 3 minutes, détection UV à $\lambda = 220 \text{ nm}$.

IV.2.1.2 Marquage de PSMA-617

Le marquage radiopharmaceutique (**Figure 79**) a été réalisé manuellement dans une boîte à gants blindée en plomb de 5 cm en ajoutant [^{177}Lu]LuCl₃ (550 MBq, Lu-177 n.c.a. grade radiopharmaceutique, ITM pharma solutions GmbH, Munich, Allemagne) à PSMA-617 (10 μg dans 100 μL de NaOAc 0,1 M pH 5,0) Après incubation pendant 15 minutes à 90 °C, la conversion du marquage a atteint 100 % (analyse HPLC, Figure 80). Le mélange réactionnel a été dilué avec du NaCl 0,9 % (200 μL) et le [^{177}Lu]-PSMA prêt à l'injection a été obtenu avec une activité moyenne de 55,0 MBq. μg^{-1} ou 57,3 MBq.nmol⁻¹ (n = 1).

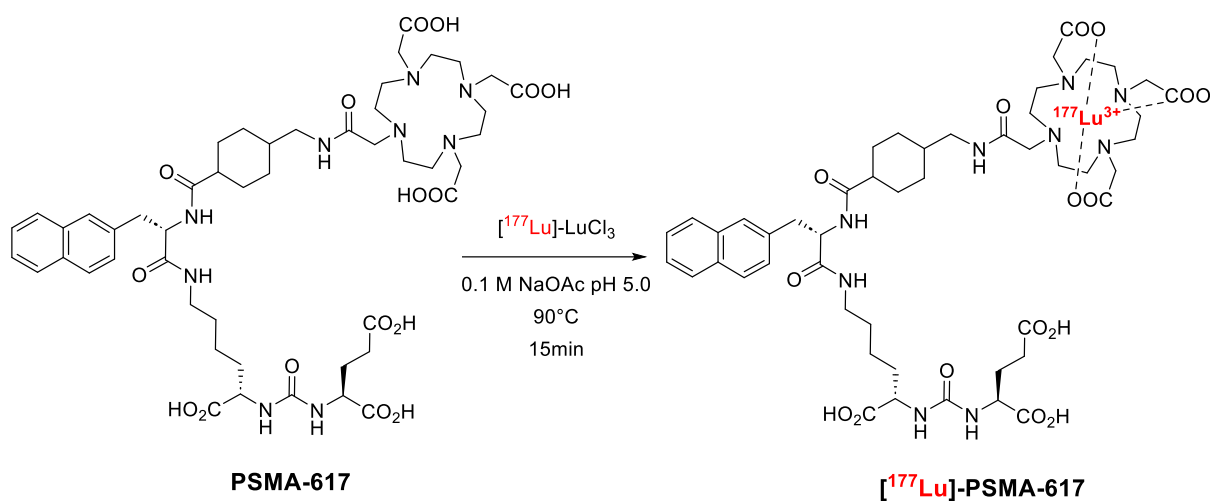


Figure 79 : Marquage de PSMA-617 avec Lu-177

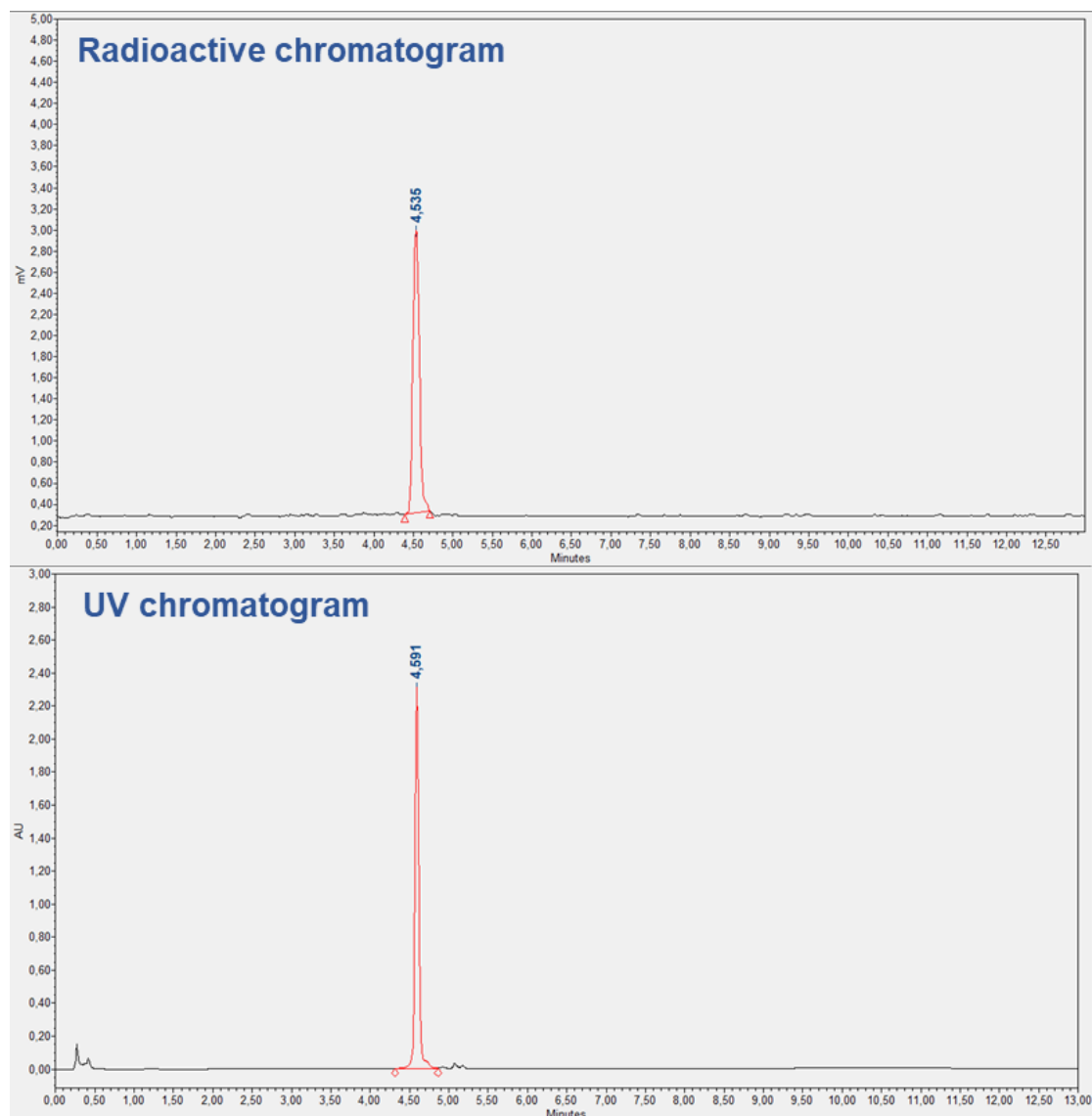


Figure 80 : Analyse HPLC du marquage de PSMA-617 avec Lu-177 (15 min à 90°C)

IV.2.1.3 Stabilité in vitro de [¹⁷⁷Lu]-PSMA

50 MBq (1 µg) de solution de [¹⁷⁷Lu]-PSMA dans une solution de NaCl à 0,9 % (50 µL) ont été ajoutés au sérum ou au plasma de souris (50 µL). Les mélanges ont été incubés à 37 °C pendant 48 heures. Après 1, 4, 24 et 48 heures, des aliquotes (10 µL) ont été prélevées et analysées par HPLC après ajout de 50 mM d'EDTA (2 µL). Aucune dégradation de [¹⁷⁷Lu]-PSMA n'a été détectée dans ces conditions (**Tableau 22**).

Tableau 22 : Stabilité de [¹⁷⁷Lu]-PSMA dans le sérum ou le plasma de souris

Temps	1 h	4 h	24 h	48 h
NaCl 0.9 % (contrôle)	100 %	100 %	87 %	86 %
Plasma	100 %	100 %	96 %	93 %
Sérum	100 %	100 %	94 %	<i>n.d.</i>

IV.2.2 Modèle murin

La même souche de souris (Nude NMRI, Janvier, 12 semaines, 20–25 g) de l'étude de l'impact de la sono-perméabilisation de la biodistribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]-PSMA-1007 a été utilisé comme modèle animal en suivant la même procédure et mêmes conditions d'anesthésie pour l'implantation sous-cutanée au flanc gauche des cellules LNCaP. En revanche, les cellules ont été suspendues à une concentration de 5×10^6 , mais toujours dans un mélange 1:1 de milieu de culture RPMI 1640 et de Matrigel (100 µL).

IV.2.3 Configuration expérimentale ultrason

La configuration expérimentale s'est reposée sur celle de l'étude *in vivo* (cf. section III.1.2).

L'animal est placé ventralement sur un tapis chauffant pour maintenir sa température et fixé pour limiter les mouvements. Il est ensuite positionné sur un absorbeur acoustique et sur la station d'imagerie Vevo (VisualSonics). Le transducteur du système de sono-perméabilisation est monté dans une structure cylindrique remplie d'eau dégazée et couplé à un film transparent et du gel à ultrasons. Il est placé à environ 3 cm de la tumeur sous-cutanée, avec un alignement précis grâce à un système de potence à trois axes.

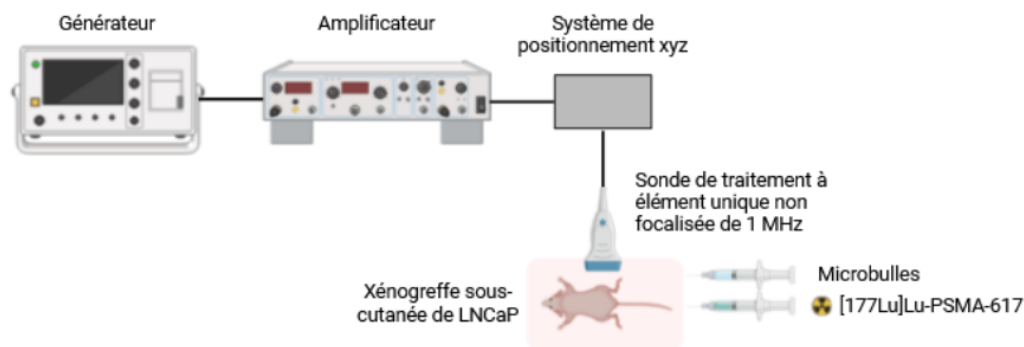


Figure 81 : Schéma de la configuration expérimentale

IV.2.4 Protocole de traitement et conditions expérimentales

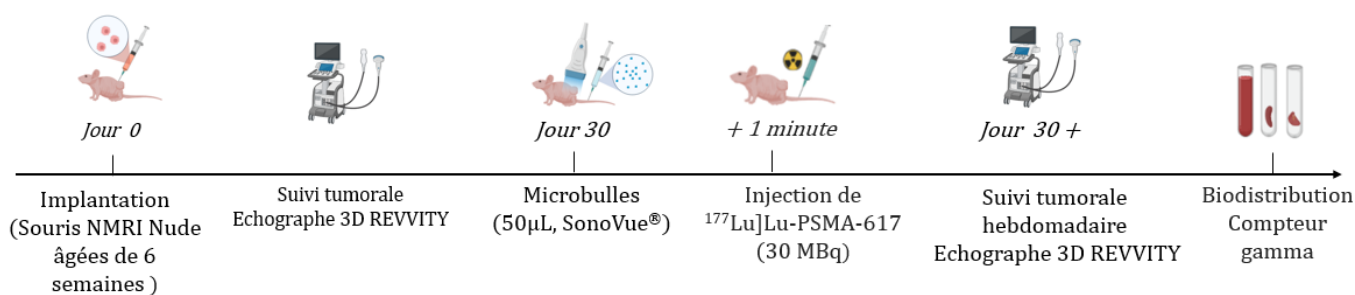


Figure 82 : Timeline du protocole de sono-perméabilisation

L'expérience a été réalisée 30 jours après implantation (**Figure 82**). Les trente souris porteuses de xénogreffes de LNCaP ont été injectées par voie *i.v.* 50 µL de MB SonoVue et randomisées en fonction du volume tumoral dans 4 groupes pour l'étude (Tableau 23) comme suit : (1) témoin avec véhicule seul (solution NaCl 0.9 %), (2) véhicule seul avec US2MB, (3) [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (30 MBq, 100µL) , (4) [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (30 MBq, 100µL) avec US2MB.

La condition US2MB a été choisie à la suite des études menées et décrites précédemment : fréquence de 1 MHz, Pression de raréfaction de 500 kPa, rapport cyclique de 30 % et durée d'exposition de 1 minute. Les souris ont été maintenues sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane (Baxter) dans un mélange Air/O₂ (50/50 %) à un débit d'environ 1,5 L/min. L'agent thérapeutique a été administrée par voie *i.v.* immédiatement après le traitement ultrasonore. La dose du traitement a été basée sur les doses efficaces et bien tolérées dans des études précliniques

Tableau 23 : Conditions ultrasonores des différents groupes expérimentaux

Groupes expérimentaux			
Contrôle (n=5) 50 µL de SonoVue	Condition US2MB (n=5) 50 µL de SonoVue	[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 (n=10) 50 µL de SonoVue	[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 + US2MB (n=10) 50 µL de SonoVue p

IV.2.4.1 Evaluation de la croissance tumorale

Le volume tumoral et le poids corporel ont été mesurés deux fois par semaine jusqu'à 36 jours après traitement. L'évaluation du volume tumorale a été réalisée en trois dimensions par échographie à l'aide du système d'ultrason préclinique Vega (Reevity) et calculée à l'aide du logiciel 3D Slicer.

IV.2.4.2 Étude de survie chez la souris avec [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617

Les souris ont été sacrifiées lorsqu'elles présentaient une perte de poids sévère et des signes de détérioration de la santé tels qu'une posture voûtée, déshydratation et respiration difficile. L'état général des animaux a été régulièrement évalué à l'aide du score de condition corporelle, qui permet de suivre l'évolution de leur santé au fil du temps. Ce score, allant de 1 (très mauvaise condition) à 5 (excellente condition), prend en compte des critères tels que la visibilité des os, la palpation de la colonne vertébrale et des os pelviens, ainsi que la perte de graisse corporelle.

En plus du score de condition corporelle, les souris ont été surveillées pour d'autres signes cliniques de dégradation de leur santé, tels que la déshydratation et la difficulté respiratoire, qui peuvent être des indicateurs de complications graves. Ces critères ont permis d'assurer une prise en charge éthique des animaux en minimisant leur souffrance et en garantissant que les expérimentations respectaient les standards de bien-être animal.

IV.2.4.3 Biodistribution

Au moment des euthanasies, la tumeur et les organes (sang, tumeur, glandes salivaires sous-maxillaires, cœur, foie, reins bilatéraux, rate, intestins muscle, os) ont été prélevés et pesés avant la comptabilisation gamma pour la quantification de l'activité (WIZARD2, Perkin Elmer)

L'objectif principal de cette étude de survie était d'évaluer la toxicité aiguë et chronique des traitements administrés, ainsi que leur impact sur la durée de vie des souris. Ces données sont essentielles pour déterminer la sécurité des protocoles de traitement avant toute utilisation clinique. Les résultats de cette étude sont en cours d'analyse et seront mis à jour prochainement

V. CONCLUSION

Ces études précliniques marquent une étape clé dans la transposition des approches diagnostiques et thérapeutiques pour le cancer de la prostate, en combinant l'utilisation de sondes bimodales et la sono-perméabilisation avec des radiopharmaceutiques ciblant le PSMA. L'objectif principal était d'évaluer la biodistribution du radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$, une sonde hybride permettant d'exploiter simultanément l'imagerie TEP et optique pour analyser la distribution du traceur dans un modèle murin de cancer de la prostate. Bien que cette approche offre des possibilités intéressantes sur la distribution tumorale et l'impact des ultrasons et microbulles sur la pénétration du radiotracer, un obstacle majeur demeure.

En effet bien que le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ ait montré une accumulation tumorale satisfaisante, sa biodistribution a révélé une accumulation excessive dans le foie et la rate, suggérant que la sonde fluorescente Cy7 modifie la distribution du traceur, rendant la comparaison avec les données cliniques plus complexe. Afin de surmonter ces limitations, une réévaluation a conduit à l'utilisation du radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$, déjà validé dans un cadre clinique et présentant une biodistribution plus favorable pour les applications diagnostiques et thérapeutiques. Ce choix permet d'éviter les biais liés à une biodistribution imprévisible et de garantir des résultats plus fiables pour évaluer l'impact de la sono-perméabilisation sur la délivrance ciblée du radiopharmaceutique.

Dans le cadre de cette recherche, la RIV se confirme être une option thérapeutique prometteuse pour traiter les formes avancées et résistantes du cancer de la prostate. Sa capacité à délivrer un rayonnement ciblé aux cellules tumorales tout en minimisant les effets secondaires en fait une approche d'avenir, mais la distribution homogène des agents thérapeutiques reste un défi majeur. C'est ici qu'intervient la sono-perméabilisation, une technique complémentaire qui semble avoir un potentiel synergique. L'optimisation de la perméabilité vasculaire via cette méthode pourrait en effet améliorer la pénétration des molécules thérapeutiques et renforcer l'efficacité des traitements ciblés, notamment en facilitant la distribution des radiopharmaceutiques au sein des tumeurs.

Cependant, les résultats obtenus soulignent un effet mitigé de la sono-perméabilisation. Malgré l'évaluation de trois conditions ultrasonores et précisément 3 régimes oscillatoires de MB, l'ouverture de la barrière vasculaire tumorale reste insuffisante, tant pour les grandes molécules comme le dextran que pour le $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$. En ce sens, la sono-perméabilisation semble jouer un rôle limité et, à priori, peu efficace pour les tumeurs périphériques, notamment en comparaison avec l'ouverture de la BH dans d'autres contextes. Ce constat s'aligne avec certains travaux de la littérature, où l'impact de la sono-perméabilisation sur la perméabilité vasculaire est variable et dépend fortement des paramètres utilisés. Par ailleurs, les US semblent avoir un effet notable sur les cellules tumorales, avec une augmentation de la perméabilisation membranaire, ce qui pourrait s'avérer davantage intéressant pour des thérapies géniques.

Un autre point à considérer est qu'à partir de fortes et brèves impulsions, des signes de déstructuration tissulaire ont été observés, ce qui soulève des questions de sécurité et d'efficacité à long terme. Bien que

l'étude n'ait pas révélé de nécrose ou de signes de mal-être chez les animaux entre les différents protocoles ultrasonores, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour valider la sécurité et l'efficacité de ces traitements combinés dans des modèles plus complexes et évaluer les effets à long terme de cette technique dans un contexte clinique, notamment en ce qui concerne les effets secondaires possibles, la spécificité du ciblage tumoral, et la faisabilité de l'optimisation des doses de traitement.

Cependant, plusieurs aspects nécessitent d'être approfondis dans des recherches futures notamment sur la perturbation des structures vasculaires par sono-perméabilisation et ses effets sur la microcirculation tumorale. L'utilisation de techniques de microscopie électronique et de marqueurs spécifiques permettrait d'analyser de manière plus précise les mécanismes sous-jacents à la perturbation de la barrière vasculaire induite par la sono-perméabilisation. Ces travaux permettront non seulement d'optimiser cette technologie, mais aussi de mieux cibler les traitements dans le cadre du cancer de la prostate.

Enfin, bien que des défis subsistent, l'association de la RIV et de la sono-perméabilisation ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement personnalisé du cancer. Il est envisageable que la sono-perméabilisation, montre des effets plus significatifs et bénéfiques lorsqu'elle est utilisée dans un cadre thérapeutique. La prochaine étape de recherche consiste à explorer la complémentarité de la RIV et du lutétium dans l'optimisation des traitements du cancer de la prostate. Cette phase constitue le cœur de notre étude actuelle dont les analyses sont en cours et devraient permettre de mieux comprendre l'impact de ces approches combinées, afin de développer des stratégies plus ciblées et personnalisées pour cette pathologie complexe.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

I. EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE CELLULAIRE ET LA DELIVRANCE DE MEDICAMENTS, DANS DEUX MODELES <i>IN VITRO</i> DISTINCTS	230
I.1 SYNTHÈSE DES RESULTATS.....	230
I.1.1 <i>Effet transitoire de la sono-perméabilisation et un impact sur la perméabilité d'un modèle épithéliale en monocouche cellulaire</i>	<i>230</i>
I.1.2 <i>Impact de la sono-perméabilisation sur la perméabilité membranaire et viabilité cellulaire sur un modèle de cellules tumorales prostatiques en suspension.....</i>	<i>231</i>
I.2 LIMITATIONS	232
I.2.1 <i>Modèle de la barrière épithéliale en monocouche cellulaire</i>	<i>232</i>
I.2.1.1 Variabilité des résultats selon les conditions expérimentales	232
I.2.1.2 Dispositif d'étude	232
I.2.1.3 Modèle <i>in vitro</i> simple.....	232
I.2.2 <i>Modèle in vitro de cellules prostatiques tumorales en suspension.....</i>	<i>233</i>
I.2.2.1 Réponse hétérogène entre les lignées cellulaires	233
I.2.2.2 Limites d'efficacité et cytotoxicité.....	233
I.2.3 <i>Limitations des modèles in vitro et besoins d'optimisation des paramètres ultrasonores.....</i>	<i>233</i>
I.3 PERSPECTIVES	234
I.3.1 <i>Modèle de la barrière épithéliale en monocouche cellulaire</i>	<i>234</i>
I.3.1.1 Utilisation de plusieurs marqueurs de perméabilité	234
I.3.1.2 Analyse par microscopie de l'impact de la sono-perméabilisation.....	234
I.3.1.2.1 Accumulation intracellulaire	234
I.3.1.2.2 Impact sur l'expression et la localisation des jonctions serrées	234
I.3.1.3 Évaluation de la viabilité cellulaire	235
I.3.2 <i>Modèle in vitro de cellules prostatiques tumorales en suspension.....</i>	<i>235</i>
I.3.2.1 Études comparatives entre d'autres lignées cellulaires	235
I.3.2.2 Évaluation du temps d'ouverture des membranes cellulaires	235
II. ÉVALUATION DE LA DELIVRANCE D'UN RADIOPHARMACEUTIQUE A USAGE DIAGNOSTIQUE PAR ULTRASONS DANS UNE TUMEUR DE LA PROSTATE.....	236
II.1 SYNTHÈSE DES RESULTATS.....	236
II.1.1 <i>Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques.....</i>	<i>236</i>
II.1.2 <i>Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate.....</i>	<i>237</i>
II.2 LIMITATIONS.....	238

II.2.1	<i>Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques</i>	238
II.2.1.1	Défis liés à la précision de l'imagerie bimodale	238
II.2.1.2	Variabilité de la biodistribution et implications pour la transposition clinique	238
II.2.2	<i>Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate</i>	238
II.2.2.1	Dispositif du système de sono-perméabilisation	238
II.2.2.2	Absence d'analyse préalable de la perfusion	239
II.2.2.3	Effets limités sur l'internalisation intracellulaire	239
II.2.2.4	Perturbation tissulaire	239
II.2.2.5	Complexité de l'interprétation des résultats liés à CD31 : impact de l'analyse de la barrière endothéliale tumorale	239
II.2.2.6	Limites liées aux microbulles	240
II.2.2.1	Hétérogénéité de la réponse tumorale : limite du modèle murin	240
II.3	PERSPECTIVES	241
II.3.1	<i>Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques</i>	241
II.3.1.1	Évaluation de la biodistribution <i>ex vivo</i>	241
II.3.1.2	Optimisation de la détection et de l'administration des traceurs pour les tumeurs prostatiques	241
II.3.2	<i>Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate</i>	241
II.3.2.1	Amélioration des techniques d'imagerie	241
III.	PERSPECTIVES GLOBALES : OPTIMISATION DE LA SONO-PERMEABILISATION DANS LES MODELES IN VITRO ET IN VIVO	242
III.1.1	Optimisation des paramètres ultrasonores	242
III.1.2	Mesure de la cavitation passive	242
III.1.3	Optimisation du modèle expérimental	242

Le travail de cette thèse a été motivé par le besoin d'étudier en *in vitro* et *in vivo* l'association entre la RIV et les USMB, afin d'évaluer si cette combinaison pourrait améliorer l'efficacité thérapeutique en facilitant la délivrance des radiopharmaceutiques. Nous postulons que l'USMB pourrait induire des réponses synergiques tant au niveau des cellules tumorales que du microenvironnement tumoral, optimisant ainsi l'action des radiopharmaceutiques. Parallèlement, l'imagerie TEP a été utilisée pour suivre la distribution des radiopharmaceutiques et mieux comprendre l'impact de la sono-perméabilisation sur leur pénétration tumorale. Cette dernière partie synthétise les résultats principaux de nos recherches sur l'amélioration de délivrance d'agents diagnostiques par sono-perméabilisation dans le traitement du cancer de la prostate, mettant en lumière les applications expérimentales développées. Cette section aborde également les implications cliniques limites rencontrées à chaque étude ainsi que les développements et études nécessaires pour surmonter les limitations actuelles et compléter nos recherches sur la sono-perméabilisation pour chaque étude. Nous discuterons des améliorations possibles des modèles expérimentaux, ainsi que sur l'optimisation des protocoles de sono-perméabilisation de sono-perméabilisation pour améliorer l'efficacité du traitement, tout en garantissant la sécurité et la reproductibilité des résultats. Des perspectives seront proposées pour l'évolution des traitements futurs, en particulier dans le cadre de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques plus ciblées.

I. EFFET DES USMB SUR LA PERMEABILITE CELLULAIRE ET LA DELIVRANCE DE MEDICAMENTS, DANS DEUX MODELES *IN VITRO* DISTINCTS

I.1 SYNTHÈSE DES RESULTATS

I.1.1 Effet transitoire de la sono-perméabilisation et un impact sur la perméabilité d'un modèle épithéliale en monocouche cellulaire

Cette étude a exploré l'effet des ultrasons et des microbulles SonoVue sur la perméabilité d'une barrière cellulaire épithéliale polarisée, en utilisant un modèle *in vitro* de monocouche de cellules MDCK II-MDR1. L'objectif était d'évaluer si la combinaison de ces technologies pourrait améliorer la délivrance de molécules thérapeutiques en modifiant temporairement l'intégrité de la barrière. Les paramètres ultrasonores ont été ajustés pour tester leur impact sur la perméabilité de la barrière, en mesurant la résistance électrique transépithéliale et la perméabilité d'un traceur fluorescent ciblant le PSMA, utilisé dans le cadre du cancer de la prostate.

La molécule froide fluorescente du [^{18}F]F-Cy7-PSMA a montré une perméabilité élevée, suggérant qu'en l'absence de traitement par USMB, les petites molécules traversent efficacement les espaces intercellulaires, témoignant ainsi d'une perméabilité naturelle importante de la barrière. Toutefois,

l'application d'USMB a induit une augmentation transitoire de la perméabilité, particulièrement sous impulsions ultrasonores fortes et courtes (US3MB) ainsi que modérées (US2MB), entraînant une baisse significative du TEER (16,7 % pour le groupe US3MB), suivie d'une récupération partielle après environ 3 heures. Les meilleures conditions, caractérisées par une pression élevée (500 et 800 kPa) combinées à un rapport cyclique réduit (30 et 10%) se sont révélées les plus efficaces pour augmenter la perméabilité.

En somme, cette étude valide que la sono-perméabilisation, induite par l'association des ultrasons et des microbulles, peut perturber temporairement les jonctions serrées des cellules épithéliales, facilitant ainsi le passage de petites molécules hydrophile. Cependant, l'optimisation du protocole ultrasonore est nécessaire pour maximiser cette approche et améliorer son efficacité dans la délivrance ciblée de traitements thérapeutiques.

I.1.2 Impact de la sono-perméabilisation sur la perméabilité membranaire et viabilité cellulaire sur un modèle de cellules tumorales prostatiques en suspension

Cette étude a exploré l'efficacité de la sono-perméabilisation combinant ultrasons et microbulles SonoVue pour moduler la perméabilité cellulaire et la viabilité des cellules cancéreuses prostatiques en suspension (lignées LNCaP et 22RV1). L'absorption d'iodure de propidium et de la molécule froide du [¹⁸F]F-Cy7-PSMA a été utilisé pour évaluer l'impact du traitement.

La perméabilité des membranes a augmenté significativement en particulier avec les paramètres US2MB et US3MB. Cependant, cette augmentation de la perméabilité s'accompagne d'une variation dans la viabilité cellulaire : les cellules LNCaP, plus sensibles, ont montré des taux de viabilité inférieurs à 80 %, tandis que les cellules 22RV1 ont maintenu une viabilité plus élevée, sauf soumises à des impulsions brèves de forte pression de raréfaction (US3MB). Les différences observées entre les lignées peuvent être liées à leur expression du PSMA et à leurs réponses distinctes à la sono-perméabilisation. Les cellules LNCaP, exprimant fortement le PSMA, ont montré une meilleure internalisation du traceur ciblé, tandis que celles de la lignée 22RV1, avec une expression plus faible, ont montré une réponse plus modérée. Les cellules 22RV1 ont généralement conservé une viabilité supérieure à 80 %, sauf avec l'US3MB où celle-ci a chuté à 61 %. En revanche, les cellules LNCaP ont montré une mortalité cellulaire accrue, notamment sous US2MB et US3MB, suggérant que les effets de cavitation sont responsables de l'augmentation de la perméabilité et de la cytotoxicité.

L'étude souligne l'importance de l'expression des récepteurs cibles dans la réussite de la sono-perméabilisation, et démontre son potentiel pour améliorer la délivrance de molécules dans le cadre de traitements ciblés, en particulier pour le cancer de la prostate. Bien que l'effet observé soit modeste, les résultats offrent des perspectives pour l'optimisation de protocoles thérapeutiques et précliniques visant à améliorer la pénétration des traitements dans les tumeurs.

I.2 LIMITATIONS

I.2.1 Modèle de la barrière épithéliale en monocouche cellulaire

I.2.1.1 Variabilité des résultats selon les conditions expérimentales

Bien que notre modèle MDCK II-MDR1 ait montré des valeurs de TEER conformes aux critères de la FDA (100 à 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), la formation homogène de la monocouche cellulaire n'a pas été systématiquement atteinte, ce qui pourrait influencer l'interprétation des données de perméabilité. Une homogénéité de la culture est cruciale pour assurer des résultats reproductibles. De plus, les résultats observés peuvent être affectés par plusieurs facteurs expérimentaux, notamment les différences de position des électrodes, la température du milieu, ou les variations dans la préparation des cultures cellulaires.

I.2.1.2 Dispositif d'étude

Dans ce système, il est difficile de maintenir un rapport constant et contrôlé entre les microbulles et les cellules. L'efficacité de l'USMB repose sur l'interaction directe entre les microbulles et les cellules, mais il est complexe de garantir que les microbulles restent systématiquement proches de la barrière épithéliale au cours de l'expérience. Cette imprécision peut entraîner des variations dans les résultats, affectant ainsi la fiabilité et la reproductibilité des observations. En effet, pour que l'effet des microbulles soit optimal, elles doivent interagir de manière précise avec les cellules afin de moduler efficacement la perméabilité de la barrière.

I.2.1.3 Modèle *in vitro* simple

Ce modèle *in vitro* reste simplifié et ne prend pas en compte les interactions complexes dans un environnement biologique plus réaliste, comme un tissu vivant ou une barrière endothéliale ou épithéliale en trois dimensions. Cela limite la portée des conclusions concernant les applications cliniques. En outre, les modèles transwell, utilisés pour étudier le passage de substances à travers des membranes cellulaires, ne reproduisent pas la contrainte de cisaillement, essentiel dans le fonctionnement des cellules endothéliales et de leur environnement. De plus, la physique d'une microbulle oscillante au-dessus d'une monocouche libre diffère considérablement de celle d'un vaisseau sanguin par exemple, où des facteurs mécaniques et hydrodynamiques, tels que la pression sanguine et le flux pulsatile, influencent de manière significative le comportement des cellules et la perméabilité de la barrière vasculaire. Cette différence fondamentale pourrait affecter la précision et la transférabilité des résultats obtenus à partir de modèles simplifiés vers des conditions *in vivo*.

I.2.2 Modèle *in vitro* de cellules prostatiques tumorales en suspension

I.2.2.1 Réponse hétérogène entre les lignées cellulaires

Les deux lignées cellulaires utilisées dans l'étude (LNCaP et 22RV1) ont montré des réponses distinctes à la sono-perméabilisation. Les cellules LNCaP, qui expriment fortement le PSMA, ont montré une perméabilisation accrue et une plus grande sensibilité à la mortalité cellulaire que les cellules 22RV1. Cette hétérogénéité suggère que l'efficacité de l'USMB peut varier considérablement en fonction des caractéristiques biologiques des cellules ciblées. De plus, la morphologie cellulaire joue un rôle dans cette dynamique : les cellules LNCaP, plus adhérentes, facilitent l'interaction avec le traceur, tandis que les cellules 22RV1, plus hétérogènes, montrent une absorption moins efficace. Enfin, la résistance potentielle des 22RV1 aux ultrasons, liée à leur agressivité et leur comportement moins adhérent, pourrait expliquer cette différence de résultat.

I.2.2.2 Limites d'efficacité et cytotoxicité

Bien que l'USMB augmente la perméabilité de la barrière cellulaire, l'efficacité reste modérée et varie en fonction des paramètres des ultrasons. En outre, l'effet cytotoxique de la sono-perméabilisation, particulièrement visible dans les groupes US2MB et US3MB, soulève la question de l'équilibre entre efficacité thérapeutique et préservation de la viabilité cellulaire. La sensibilité accrue des cellules LNCaP à la cavitation et aux dommages membranaires suggère que des protocoles d'optimisation sont nécessaires pour minimiser cette toxicité.

Les résultats de la sono-perméabilisation ont montré une réponse variable selon les lignées cellulaires, avec une perméabilité moindre pour les cellules 22RV1, probablement due à leur faible expression du PSMA. Bien que l'absorption du traceur (IP) ait significativement augmenté dans certains groupes traités par USMB, l'effet est resté limité, et cette augmentation de la perméabilité a été accompagnée d'une diminution marquée de la viabilité cellulaire, surtout pour les cellules LNCaP. Cette observation renforce la nécessité de trouver un compromis entre l'efficacité de la perméabilisation et la préservation de la viabilité cellulaire. En outre, les effets des paramètres ultrasonores et de la dynamique des microbulles sur la perméabilité et la cytotoxicité nécessitent encore des éclaircissements.

I.2.3 Limitations des modèles *in vitro* et besoins d'optimisation des paramètres ultrasonores

L'efficacité globale de la méthode demeure faible et nécessite des optimisations des paramètres ultrasonores et l'utilisation des microbulles. De plus, les résultats obtenus à partir de modèles *in vitro*, qu'il s'agisse de monocouches cellulaires ou de suspensions cellulaires, restent limités par rapport à des modèles plus complexes, tels que les cultures tridimensionnelles ou les études *in vivo*, qui reproduisent de manière plus fidèle l'environnement tumoral.

I.3 PERSPECTIVES

I.3.1 Modèle de la barrière épithéliale en monocouche cellulaire

I.3.1.1 Utilisation de plusieurs marqueurs de perméabilité

Afin d'examiner comment l'application des USMB influence la perméabilité des barrières biologiques en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules, telles que l'hydrophilie et le poids moléculaire, une étude sera nécessaire. Différents marqueurs de perméabilité devront être utilisés afin de représenter une gamme de molécules ayant des poids moléculaires et des polarités variés. Ces marqueurs permettront d'analyser l'effet des USMB sur le transport transcellulaire et paracellulaire, en étudiant comment ces ondes ultrasonores peuvent modifier l'intégrité des jonctions serrées.

L'idée est de déterminer si les USMB peuvent faciliter le passage de molécules hydrophiles ou de plus grande taille (qui normalement peinent à traverser la barrière), et ce, en fonction de leur capacité à modifier la structure ou la fonction des jonctions cellulaires. Ces données permettront de mieux comprendre comment les USMB peuvent être utilisées pour améliorer la délivrance de médicaments à travers des barrières biologiques

I.3.1.2 Analyse par microscopie de l'impact de la sono-perméabilisation

I.3.1.2.1 Accumulation intracellulaire

Afin de compléter notre étude sur l'impact des USMB sur la perméabilité de la barrière épithéliale, il serait pertinent d'explorer l'accumulation intracellulaire induite par la sono-perméabilisation (USMB) parallèlement l'augmentation du transport paracellulaire de notre molécule froide fluorescente [¹⁹F]-Cy7-PSMA améliorée par USMB. En utilisant la microscopie à fluorescence, l'accumulation intracellulaire pourrait être mise en évidence et quantifiée. (Rousou et al. 2022) . Cela permettrait de confirmer que l'USMB influence non seulement la perméabilité des membranes cellulaires, mais aussi l'internalisation des molécules via les interstices entre les cellules. Cette approche permettrait également de mieux comprendre si l'effet de la sono-perméabilisation la perméabilité des membranes cellulaires en fonction de la taille de la molécule utilisée.

I.3.1.2.2 Impact sur l'expression et la localisation des jonctions serrées

Dans les épithéliums cellulaires MDCK II, la perméabilité ionique est principalement régulée par la perméabilité des jonctions serrées au niveau du transport paracellulaire. Les cellules MDCK II expriment les protéines claudines 1 à 4 ainsi qu'occludine, la protéine de liaison cytoplasmique associée aux jonctions serrées, la zonula occludens-1 (ZO-1) et la protéine intégrale des jonctions adhérentes, l'E-cadhérine, et sa protéine de liaison, la β -caténine (Singh et al. 2007)

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'USMB modifie l'expression et la localisation de ces protéines des jonctions serrées et adhérentes dans les cellules MDCK II. L'analyse sera réalisée par

microscopie immunofluorescence pour observer la localisation de ces protéines au niveau des jonctions intercellulaires et les changements dans leur expression ou leur redistribution suite à un traitement par USMB, ce qui pourrait influencer la perméabilité de la barrière cellulaire.

Ces analyses complémentaires permettront de mieux comprendre l'impact de l'USMB sur la perméabilité de la barrière épithéliale, et de valider son potentiel d'amélioration du transport de molécules thérapeutiques par le biais de la modification des jonctions cellulaires (par exemple, une déstabilisation ou une réorganisation des complexes protéiques associés aux jonctions).

I.3.1.3 Évaluation de la viabilité cellulaire

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des USMB sur la viabilité cellulaire à travers un modèle de barrière épithéliale en monocouche. Cela implique de mesurer l'effet des USMB sur la survie des cellules après traitement, en utilisant des tests de viabilité standards (par exemple, MTT, Live/Dead, ou d'autres techniques de mesure de la prolifération ou de la mort cellulaire).

I.3.2 Modèle *in vitro* de cellules prostatiques tumorales en suspension

I.3.2.1 Études comparatives entre d'autres lignées cellulaires

Des études supplémentaires sont nécessaires pour développer des protocoles personnalisés pour chaque lignée cellulaire, basés sur leur réponse aux ultrasons et leur capacité à internaliser des molécules thérapeutiques, en tenant compte des différences dans l'expression des récepteurs cible.

Il serait pertinent d'évaluer d'autres lignées cellulaires prostatiques tumorales telle que la lignée PC3 (exprimant faiblement le PSMA) afin de comparer leur réponse à la sono-perméabilisation avec celle des cellules LNCaP et 22RV1. Cela permettrait d'analyser l'impact de l'expression du PSMA sur la perméabilisation de la membrane et l'absorption des traceurs thérapeutiques. Une étude de l'expression du PSMA et des modifications morphologiques des cellules après traitement (comme la formation de protrusions au niveau des jonctions intercellulaires) fournirait également des informations essentielles pour optimiser les stratégies thérapeutiques ciblées.

I.3.2.2 Évaluation du temps d'ouverture des membranes cellulaires

L'objectif de cette étude est de comprendre et de caractériser les mécanismes moléculaires et biophysiques qui régissent la sono-perméabilisation, en particulier en ce qui concerne l'ouverture transitoire des membranes cellulaires sous l'effet des ultrasons et des microbulles. L'étude cherchera à identifier les caractéristiques spécifiques de ces pores, comme leur taille, forme, et durée de persistance après l'activation des ultrasons. Ces informations sont cruciales pour déterminer dans quelle mesure la sono-perméabilisation peut être contrôlée pour optimiser la délivrance de traitements thérapeutiques.

II. ÉVALUATION DE LA DELIVRANCE D'UN RADIOPHARMACEUTIQUE A USAGE DIAGNOSTIQUE PAR ULTRASON DANS UNE TUMEUR DE LA PROSTATE

II.1 SYNTHÈSE DES RESULTATS

II.1.1 Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques

Cette étude a impliqué le développement d'une sonde bimodale composée d'un ligand ciblant le PSMA conjugué à un fluorophore cyanine (Cy7) et au radionucléide fluor-18 ($[^{18}\text{F}]$), permettant une imagerie combinée TEP et optique pour suivre la distribution du radiotraceur dans les tumeurs prostatiques.

L'objectif était de déterminer la biodistribution du traceur dans un modèle préclinique murin et à comparer l'efficacité des imageries TEP et optique pour détecter les tumeurs, tout en validant la spécificité du radiotraceur pour le PSMA. Le potentiel de la sonde bimodale a été exploré avant d'envisager l'étude de l'impact des ultrasons et microbulles sur la délivrance de la sonde dans les tumeurs prostatiques.

Un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules tumorales prostatiques humaines LNCaP chez des souris Nude/NMRI a été utilisé pour évaluer la biodistribution du traceur. Les résultats d'imagerie TEP dynamique ont révélé une accumulation importante du radiotraceur dans les tumeurs, avec un pic d'activité de 3,4 %ID.cm⁻³ à 45 minutes post-injection. Le traceur a montré une élimination rapide via les reins, la vessie et le foie, ainsi qu'une excrétion prolongée dans le système intestinal, avec une diffusion rapide dans les organes exprimant le PSMA, comme les glandes salivaires et lacrymales. Les résultats d'imagerie optique et TEP ont montré une bonne corrélation pour la quantification de l'activité tumorale, avec un ratio tumeur/tissu normal moyen de 1,85, malgré un signal élevé dans le foie qui compliquait la détection des tumeurs en imagerie optique. Enfin, l'expérience de blocking a confirmé la spécificité du radiotraceur pour le PSMA, en réduisant l'absorption tumorale lorsqu'un excès de ligand froid est administré. Ce blocking a également modifié la biodistribution du traceur, diminuant son activité dans les glandes salivaires, lacrymales et les reins.

Les résultats montrent que la combinaison de l'imagerie TEP et optique avec des radiotraceurs ciblant le PSMA présente des bénéfices pour la visualisation des tumeurs prostatiques, tout en révélant certaines limitations liées à la biodistribution du traceur et à l'impact de la sonde fluorescente. En particulier, la différence de biodistribution observée entre les radiotraceurs préclinique ($[^{18}\text{F}]$ F-Cy7-PSMA) et clinique actuel ($[^{18}\text{F}]$ F-PSMA-1007) souligne l'importance d'une meilleure compréhension des caractéristiques de ces sondes afin de maximiser leur efficacité en clinique. Pour orienter les ajustements nécessaires à l'optimisation de la détection des tumeurs prostatiques, cette étude s'est concentrée sur l'amélioration de la délivrance du radiopharmaceutique clinique actuel, le $[^{18}\text{F}]$ F-PSMA-1007.

II.1.2 Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution d'un radiopharmaceutique [¹⁸F]F-PSMA-1007, dans un modèle murin inoculée avec des xénogreffes de cellules prostatiques tumorales LNCaP.

En termes de biodistribution, le radiotraceur a montré une accumulation prédominante dans les reins et la vessie, en raison de l'excrétion urinaire, et une accumulation modérée dans la rate, liée à la filtration par les macrophages. La sono-perméabilisation n'a pas entraîné de changements notables dans la biodistribution des organes sains, à l'exception d'une différence dans l'accumulation du radiotraceur au niveau du rein gauche dans le groupe US2MB ($p < 0,05$), suggérant un effet de la technique sur la captation ou l'excrétion rénale. En ce qui concerne la perfusion et la distribution tumorale, une légère augmentation bien que non significative de l'absorption tumorale a été observée dans les groupes traités par USMB, à l'exception du groupe US3MB où l'effet était moins prononcé.

En revanche, une corrélation significative ($p < 0,01$) a été observée entre l'intensité du pic de contraste à l'échographie et l'absorption du radiotraceur dans les groupes US1MB (longues impulsions à faible pression de raréfaction) et US2MB, suggérant que l'intensité du contraste pourrait être liée à une meilleure accumulation dans les tumeurs.

Une augmentation significative de l'extravasation du TRITC-dextran, utilisé comme marqueur pour tester la perméabilité vasculaire, a été observée, particulièrement dans le groupe US3MB, ce qui indique une amélioration de la perméabilité vasculaire. Cependant, l'internalisation intracellulaire du dextran n'a montré aucune différence significative entre les groupes traités et le groupe contrôle, bien que les groupes US1MB et US2MB aient montré une légère tendance à une amélioration. La sono-perméabilisation a montré une perturbation des jonctions endothéliales, avec une augmentation de l'expression de CD31 (marqueur des cellules endothéliales) dans les vaisseaux tumoraux, suggérant une altération de la structure des cellules endothéliales et une meilleure exposition de cette molécule. Cependant, les effets étaient modérés et plus marqués dans le groupe US3MB, où des signes de détérioration tissulaire en immunofluorescence ont été observés.

L'étude montre que la sono-perméabilisation pourrait jouer un rôle complémentaire dans l'amélioration de la distribution des radiopharmaceutiques ciblant le PSMA dans les tumeurs prostatiques. Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus, notamment sur la perméabilité vasculaire et l'extravasation des agents thérapeutiques, les effets sur l'internalisation intracellulaire du radiotraceur et la perfusion tumorale restent limités.

Toutefois, il est possible que la sono-perméabilisation révèle des effets plus significatifs et bénéfiques lorsqu'elle est appliquée dans un cadre thérapeutique plutôt que diagnostique. Notre prochaine étude actuellement en cours explore la synergie entre la radiothérapie interne vectorisée et le lutétium, dans le but d'optimiser les traitements du cancer de la prostate.

II.2 LIMITATIONS

II.2.1 Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques

II.2.1.1 Défis liés à la précision de l'imagerie bimodale

Bien que l'utilisation combinée de l'imagerie TEP et optique soit prometteuse, elle présente certaines limitations. L'intensité du signal provenant de la tumeur dans l'imagerie optique est influencée par un bruit de fond élevé, particulièrement en raison de l'élimination hépatique. Cette interférence peut nuire à la distinction claire entre les tissus tumoraux et normaux. De plus, la corrélation entre les deux techniques d'imagerie reste à affiner pour optimiser la détection et la quantification de la tumeur.

II.2.1.2 Variabilité de la biodistribution et implications pour la transposition clinique

La biodistribution du radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ présente des différences notables par rapport à celle des radiopharmaceutiques diagnostiques cliniques, comme le $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$, qui montre une accumulation plus ciblée dans les tumeurs avec une excrétion rénale prédominante. À l'inverse, le $[^{18}\text{F}]\text{F-Cy7-PSMA}$ s'accumule de manière significative dans le foie et la rate, en raison de son élimination hépatobiliaire, ce qui complique la visualisation précise de la tumeur et rend difficile la comparaison directe avec les radiotraceurs cliniques. En conséquence, bien que la sonde présente une accumulation tumorale significative, cette différence de biodistribution, due à l'ajout de la sonde fluorescente Cy7, constitue un obstacle majeur à la transposition des résultats précliniques vers des applications cliniques actuelles.

II.2.2 Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique $[^{18}\text{F}]\text{F-PSMA-1007}$ dans un modèle murin de cancer de la prostate

II.2.2.1 Dispositif du système de sono-perméabilisation

Le support cylindrique en plastique imprimé en 3D, qui contient le transducteur et est rempli d'eau milli-Q préalablement dégazée, est doté d'un film transparent pour fermer l'ouverture de la structure. Cette configuration complique parfois la manipulation lors des expériences in vivo. En particulier, si une bulle se forme à l'intérieur du support, elle peut entraver la propagation des ultrasons, nécessitant son retrait. Ce processus de réajustement, bien qu'inévitable, est non seulement chronophage, mais peut également altérer les performances du transducteur à chaque utilisation, introduisant ainsi un biais potentiel dans les résultats expérimentaux.

II.2.2.2 Absence d'analyse préalable de la perfusion

L'étude n'a pas inclus de mesure préalable de la perfusion sanguine tumorale avant l'application des ultrasons. Cette absence d'évaluation préalable empêche une compréhension complète de l'impact de la sono-perméabilisation sur la perfusion tumorale. En l'absence de données contrôles sur la perfusion, il est difficile de tirer des conclusions précises concernant l'effet des ultrasons sur la circulation sanguine au sein de la tumeur. De plus, certains paramètres critiques liés à la perfusion, tels que le flux sanguin et la perméabilité vasculaire, n'ont pas pu être mesurés de manière adéquate, limitant ainsi la capacité à évaluer de façon détaillée l'impact des ultrasons sur le microenvironnement tumoral et sur la réponse vasculaire.

II.2.2.3 Effets limités sur l'internalisation intracellulaire

Bien que la sono-perméabilisation semble améliorer l'extravasation du dextran, un résultat positif pour la diffusion de grandes molécules hors des vaisseaux sanguins vers les tissus tumoraux, cela n'a pas entraîné une meilleure internalisation intracellulaire. En effet la perturbation de la barrière vasculaire ne se traduit pas nécessairement par une meilleure absorption intracellulaire du radiopharmaceutique. Cela indique que d'autres facteurs peuvent limiter l'internalisation intracellulaire des radiopharmaceutiques, comme la capacité des cellules à les capturer, leur taille, leur charge, ou encore la dynamique de la membrane cellulaire. L'impact global de la sono-perméabilisation sur la distribution intracellulaire des agents thérapeutiques semble donc restreint et nécessite une investigation plus poussée pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette limitation.

II.2.2.4 Perturbation tissulaire

Des signes de déstructuration tissulaire ont été observés au microscope à fluorescence notamment dans le groupe traité avec des ultrasons à haute intensité (US3MB). Cela soulève des préoccupations quant à l'efficacité à long terme de cette approche, notamment en termes de nécrose tissulaire et de perturbation. Ces résultats suggèrent qu'un contrôle précis des paramètres ultrasonores, tels que l'intensité et la durée des traitements, est crucial pour garantir que la méthode soit à la fois efficace et sûre dans des applications cliniques futures.

II.2.2.5 Complexité de l'interprétation des résultats liés à CD31 : impact de l'analyse de la barrière endothéliale tumorale

L'augmentation observée du marqueur CD31, qui est généralement associé à la vascularisation et à l'intégrité des cellules endothéliales, pourrait être due à l'activation de plusieurs populations cellulaires exprimant ce marqueur, telles que les plaquettes, les monocytes. Cette activation de multiples types cellulaires pourrait être à l'origine de l'augmentation de ce marqueur, rendant difficile l'identification précise du mécanisme sous-jacent de la perturbation de la barrière vasculaire. Il devient donc compliqué de déterminer si les effets observés sont spécifiquement dus à la sono-perméabilisation et à son impact sur les cellules endothéliales. De plus, la caractérisation des phénomènes de perturbation vasculaire par sono-perméabilisation reste un point de limitation majeur dans cette étude.

II.2.2.6 Limites liées aux microbulles

La stabilité des microbulles peut être considérablement affectée par la saturation en gaz du sang. Par exemple, l'utilisation de l'O₂ réduira considérablement la stabilité de la plupart des microbulles. De plus, les microbulles ont une durée de vie limitée dans le flacon et à température ambiante, ce qui nécessite une planification rigoureuse de leur utilisation dans les études. L'emploi de petits animaux comme les souris peut entraîner des effets hors cible (au niveau des reins, foie, ou rate), augmentant ainsi la toxicité et réduisant la survie.

Néanmoins, le problème le plus fréquent est l'échec de l'injection des microbulles par voie i.v. ou encore le manque de perfusion du site cible, ce qui suggère que, dans ces conditions, l'efficacité de cette technique de traitement pourrait être limitée.

II.2.2.1 Hétérogénéité de la réponse tumorale : limite du modèle murin

Les résultats observés dans les différents modèles murins ont montré une hétérogénéité marquée dans la croissance tumorale. Bien que les souris Nude/NMRI porteuses de tumeurs LNCaP aient été choisies comme modèle principal en raison de leur prise tumorale relativement rapide et de la disponibilité de l'implantation de tumeurs prostatiques humaines, des variations importantes dans la croissance tumorale ont été constatées entre les différents animaux. Cette variabilité pourrait être expliquée à des différences individuelles dans la réaction immunitaire des souris, dans l'implantation ou la vascularisation des tumeurs, ainsi que dans la dynamique de croissance tumorale. La variabilité de la réponse tumorale entre les animaux et la lenteur de croissance dans certains modèles rendent l'étude moins homogène et peuvent affecter la reproductibilité des résultats expérimentaux.

De plus, une des limitations majeures de notre modèle réside dans la différence d'expression du PSMA entre les modèles murins et humains. Bien que le PSMA soit un marqueur clé dans le ciblage des tumeurs prostatiques humaines, l'expression du PSMA peut être moins intense ou distribuée différemment dans les tumeurs murines, notamment dans les modèles LNCaP. Cette disparité dans l'expression du PSMA entre espèces est un facteur limitant majeur, car elle peut influencer l'efficacité du radiotraceur ciblant le PSMA et réduire la pertinence des modèles murins pour prédire les résultats cliniques chez l'Homme. La capacité de la sono-perméabilisation à induire une meilleure pénétration des radiopharmaceutiques et des agents thérapeutiques pourrait donc être impactée par cette différence d'expression du PSMA, rendant plus difficile la transposition directe des résultats précliniques vers des applications humaines.

Ainsi, l'hétérogénéité de la réponse tumorale et les différences d'expression du PSMA entre espèces limitent la précision et la reproductibilité des études précliniques et compliquent l'évaluation de l'efficacité de cette approche dans le cadre clinique.

II.3 PERSPECTIVES

II.3.1 Évaluation de la biodistribution d'une sonde bimodale préclinique en imagerie TEP et optique pour la détection des tumeurs prostatiques

II.3.1.1 Evaluation de la biodistribution *ex vivo*

Une analyse *ex vivo* approfondie de la biodistribution du radiotraceur pourrait permettre de mieux comprendre les cinétiques de distribution et d'élimination du traceur, et de valider la corrélation entre les résultats obtenus en imagerie TEP et optique. Cette étape serait cruciale pour la mise au point de méthodes d'imagerie plus précises et fiables dans un contexte clinique.

II.3.1.2 Optimisation de la détection et de l'administration des traceurs pour les tumeurs prostatiques

L'utilisation combinée de l'imagerie TEP et optique montre un grand potentiel pour la détection des tumeurs prostatiques, mais nécessite encore des optimisations. Il est essentiel de réduire le bruit de fond dans des organes tels que le foie et la rate pour améliorer la précision des images et mieux distinguer les tissus tumoraux des tissus sains. De plus, la stratégie d'administration des radiotraceurs doit être ajustée pour améliorer leur biodistribution, en ciblant plus efficacement les tissus tumoraux tout en limitant l'accumulation dans les organes non tumoraux.

II.3.2 Évaluation de l'impact de la sono-perméabilisation sur la distribution du radiopharmaceutique [^{18}F]F-PSMA-1007 dans un modèle murin de cancer de la prostate

II.3.2.1 Amélioration des techniques d'imagerie

Une des voies envisagées pour optimiser la sono-perméabilisation repose sur l'amélioration des techniques d'imagerie et de ciblage, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la perturbation de la barrière vasculaire induite par les ultrasons. L'utilisation de technologies d'imagerie avancées, comme la microscopie électronique et la double coloration des marqueurs endothéliaux, permettrait de visualiser précisément les changements dans la structure de la barrière vasculaire au niveau cellulaire, et d'évaluer les effets en temps réel sur les jonctions serrées. Cette approche améliorerait notre compréhension de la perméabilité vasculaire et aiderait à affiner les protocoles de traitement en fournissant des informations plus détaillées sur la réponse des vaisseaux tumoraux. Parallèlement, des méthodes plus précises de quantification de la perméabilité vasculaire et de la microcirculation tumorale (par exemple des nanocapsules) permettraient de mieux cibler les régions tumorales et d'optimiser la diffusion des molécules thérapeutiques dans les tumeurs.

III. PERSPECTIVES GLOBALES : OPTIMISATION DE LA SONO-PERMEABILISATION DANS LES MODELES *IN VITRO* ET *IN VIVO*

III.1.1 Optimisation des paramètres ultrasonores

L'efficacité globale de la sono-perméabilisation reste limitée, tant dans les modèles *in vitro* que *in vivo*, et nécessite des améliorations significatives. Les résultats obtenus *in vitro*, que ce soit sur des monocouches cellulaires ou des suspensions, sont encore éloignés de la réalité des environnements tumoraux complexes, comme les cultures tridimensionnelles ou les modèles animaux. Bien que les études *in vivo* montrent un potentiel prometteur, elles révèlent aussi que des optimisations sont indispensables, tant pour les paramètres ultrasonores (par exemple, la pression de raréfaction, rapport cyclique et la période d'exposition) que pour l'utilisation des microbulles (par exemple, la taille, la concentration, la composition de la coque). Ces ajustements doivent prendre en compte la différence entre les conditions *in vitro* et *in vivo*, où la structure biologique complexe et les interactions tissulaires influencent fortement l'efficacité du traitement. Il est essentiel d'optimiser la taille, la stabilité et la distribution des microbulles dans les vaisseaux tumoraux pour améliorer leur efficacité. Une approche plus précise dans l'ajustement des paramètres ultrasonores et dans l'administration des microbulles est donc cruciale pour maximiser l'impact de la sono-perméabilisation et faciliter sa translation vers des applications cliniques.

III.1.2 Mesure de la cavitation passive

Le suivi en temps réel des émissions acoustiques des microbulles pourrait fournir des informations précieuses sur leur comportement et leur interaction avec la membrane cellulaire, notamment une quantitative en calculant des indicateurs acoustiques (doses) de cavitation, permettant ainsi de mieux contrôler et prédire l'efficacité du traitement, notamment dans les thérapies ciblées pour le cancer de la prostate. Une piste d'amélioration serait donc l'installation d'un dispositif ultrasonore de détection passive de cavitation pour contrôler l'oscillation des microbulles pendant la thérapie

III.1.3 Optimisation du modèle expérimental

Un axe de recherche dans les études *in vitro* pourrait consister à exploiter les modèles 3D de tumeurs, tels que les organoïdes tumoraux et les dispositifs microfluidiques, qui offrent une reproduction plus réaliste du microenvironnement tumoral humain. En intégrant des éléments essentiels comme la vascularisation et la perméabilité des barrières vasculaires, ces modèles permettent d'étudier plus précisément les interactions entre les radioligands et la barrière vasculaire tumorale, ce qui influence directement la délivrance et l'efficacité des traitements. De plus, l'inclusion de facteurs biologiques comme l'hypoxie et l'inflammation dans ces modèles permet de simuler des conditions cliniques complexes, optimisant ainsi la prédiction des réponses thérapeutiques et l'efficacité des traitements,

notamment en ce qui concerne leur impact sur la progression tumorale et l'invasion.

Le développement de modèles murins transgéniques représente également une piste importante pour améliorer la pertinence des études précliniques. Les souris transgéniques exprimant le PSMA humain ou ces variantes pourraient mieux reproduire l'expression du PSMA dans les tumeurs humaines, en particulier la surexpression du PSMA dans la néovascularité tumorale et les cellules cancéreuses. Cela permettrait une meilleure correspondance entre les résultats *in vitro* et *in vivo*.

En résumé, cette étude pionnière s'inscrit dans un projet ambitieux de développement d'une approche théranostique combinant RIV et USMB pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer et répondre à la demande croissante de solutions thérapeutiques pour la prise en charge des patients. Elle pose les bases des travaux à venir afin d'orienter les futures recherches dans ce domaine prometteur. L'association de la RIV et des USMB offre un potentiel prometteur pour améliorer la délivrance ciblée de médicaments, et ouvre la voie à l'élaboration de protocoles optimisés pour améliorer l'efficacité des traitements thérapeutiques. Avec des recherches supplémentaires, cette approche pourrait rapidement trouver sa place dans les traitements cliniques, offrant une nouvelle avenue pour des thérapies plus efficaces et personnalisées.

RÉFÉRENCES

- Abate-Shen, Cory, et Francisca Nunes de Almeida. 2022. « Establishment of the LNCaP cell line – the dawn of an era for prostate cancer research ». *Cancer research* 82(9): 1689-91. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-1065.
- Abu-Zidan, Fikri M, Ashraf F Hefny, et Peter Corr. 2011. « Clinical ultrasound physics ». *Journal of Emergencies, Trauma and Shock* 4(4): 501-3. doi:10.4103/0974-2700.86646.
- Aldrich, John E. 2007. « Basic Physics of Ultrasound Imaging ». *Critical Care Medicine* 35(5 Suppl): S131-137. doi:10.1097/01.CCM.0000260624.99430.22.
- Alizadeh, M., et S. Alizadeh. 2014. « Survey of Clinical and Pathological Characteristics and Outcomes of Patients With Prostate Cancer ». *Global Journal of Health Science* 6(7): 49-57. doi:10.5539/gjhs.v6n7p49.
- Ammari, Habib, Brian Fitzpatrick, David Gontier, Hyundae Lee, et Hai Zhang. 2018. « Minnaert resonances for acoustic waves in bubbly media ». *Annales de l'Institut Henri Poincaré C, Analyse non linéaire* 35(7): 1975-98. doi:10.1016/j.anihpc.2018.03.007.
- ARCAGY-GINECO, Dr Bernard Poletto-. 2024. « Les Formes Histologiques de Cancer de La Prostate ». *Infocancer*. <https://www.arcagy.org/infocancer/localisations/cancers-masculins/cancer-prostate/formes-de-la-maladie/les-formes-histologiques.html/> (5 août 2024).
- Auberger, Benjamin. 2022. « [147] Movember Day13 : La radiothérapie interne vectorisée au Lutétium PSMA, un nouvel atout de précision dans le cancer de la prostate métastatique! » <https://fr.linkedin.com/pulse/movember-day13-la-radioth%C3%A9rapie-vectoris%C3%A9e-au-psma-un-auberger> (19 juin 2024).
- Aurilio, Gaetano, Alessia Cimadamore, Roberta Mazzucchelli, Antonio Lopez-Beltran, Elena Verri, Marina Scarpelli, Francesco Massari, et al. 2020. « Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications ». *Cells* 9: 2653. doi:10.3390/cells9122653.
- Barthélémy, Philippe. 2016. « Voie de signalisation des androgènes, altérations génomiques et progression du cancer de la prostate ». phdthesis. Université de Strasbourg. <https://theses.hal.science/tel-01490601> (31 juillet 2024).

- Batra, Jaspreet S., Muhammad Junaid Niaz, Young E. Whang, Arif Sheikh, Charlene Thomas, Paul Christos, Shankar Vallabhajosula, et al. 2020. « Phase I trial of docetaxel plus lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 (177Lu-J591) for metastatic castration-resistant prostate cancer ». *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 38(11): 848.e9-848.e16. doi:10.1016/j.urolonc.2020.05.028.
- Beattie, Bradley J., Tim J. Akhurst, Finn Augensen, et John L. Humm. 2022. « SUVfdg: A standard-uptake-value (SUV) body habitus normalizer specific to fluorodeoxyglucose (FDG) in humans ». *PLoS ONE* 17(4): e0266704. doi:10.1371/journal.pone.0266704.
- Bednarek, Radoslaw. 2022. « In Vitro Methods for Measuring the Permeability of Cell Monolayers ». *Methods and Protocols* 5(1): 17. doi:10.3390/mps5010017.
- Beekers, Inés, Simone A. G. Langeveld, Bram Meijlink, Antonius F. W. van der Steen, Nico de Jong, Martin D. Verweij, et Klazina Kooiman. 2022. « Internalization of targeted microbubbles by endothelial cells and drug delivery by pores and tunnels ». *Journal of Controlled Release* 347: 460-75. doi:10.1016/j.jconrel.2022.05.008.
- Blandeau, Valentin. 2020. « [114] 68Ga-PSMA-11, un nouveau traceur TEP pour l'imagerie du cancer prostatique : essais de production au sein de la radiopharmacie du CHU d'Angers ». <https://dune.univ-angers.fr/fichiers/20102166/2020PDEPH12566/fichier/12566F.pdf> (15 juin 2024).
- Bol, Ludivine. 2014. « [264][277] Conception d'un microsystème pour l'évaluation du passage de biomolécules à travers la barrière pulmonaire ». Université Paris Sud - Paris XI.
- Bol, Ludivine. « Conception d'un microsystème pour l'évaluation du passage de biomolécules à travers la barrière pulmonaire ».
- Bouakaz, Ayache, et Jean Michel Escoffre. 2024. « From concept to early clinical trials: 30 years of microbubble-based ultrasound-mediated drug delivery research ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 206: 115199. doi:10.1016/j.addr.2024.115199.
- Bouleau, Alizée. 2021. « Développement de nouveaux radioligands pour l'imagerie immunoTEP de PD-L1 ». These de doctorat. université Paris-Saclay. <https://theses.fr/2021UPAST130> (15 juin 2024).
- Bousset, Laura. 2019. « Cancer de la prostate et mécanismes de résistance à la castration : étude du rôle des récepteurs nucléaires LXR ». phdthesis. Université Clermont Auvergne [2017-2020]. <https://theses.hal.science/tel-03132200> (2 juin 2024).

- Bowen, Stephen R., Albert J. van der Kogel, Marianne Nordmark, Søren M. Bentzen, et Robert Jeraj. 2011. « Characterization of positron emission tomography hypoxia tracer uptake and tissue oxygenation via electrochemical modeling ». *Nuclear Medicine and Biology* 38(6): 771-80. doi:10.1016/j.nucmedbio.2011.02.002.
- Brady, Darren, Joe M. O'Sullivan, et Kevin M. Prise. 2013. « What is the Role of the Bystander Response in Radionuclide Therapies? » *Frontiers in Oncology* 3: 215. doi:10.3389/fonc.2013.00215.
- Brady, Lauren, et Peter S. Nelson. 2023. « Heterogeneity and the tumor microenvironment in neuroendocrine prostate cancer ». *The Journal of endocrinology* 256(2): e220211. doi:10.1530/JOE-22-0211.
- Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Isabelle Soerjomataram, et Ahmedin Jemal. 2024a. « Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 74(3): 229-63. doi:10.3322/caac.21834.
- Bray, Freddie, Mathieu Laversanne, Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Isabelle Soerjomataram, et Ahmedin Jemal. 2024b. « Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 74(3): 229-63. doi:10.3322/caac.21834.
- Brenot-Rossi, Isabelle. 2019. « L'imagerie par TEP-18F-choline et TEP-PSMA en onco-urologie : qu'en attendre et quand la demander en 2019 ? » *Le point sur*. . .
- Cabane, Etienne, Xiaoyan Zhang, Karolina Langowska, Cornelia G. Palivan, et Wolfgang Meier. 2012. « Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine ». *Biointerphases* 7(1): 1-27. doi:10.1007/s13758-011-0009-3.
- Cai, Maoping, Xian-Lu Song, Xin-An Li, Mingkun Chen, Jiading Guo, Dong-Hua Yang, Zhanghui Chen, et Shan-Chao Zhao. 2023. « Current therapy and drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer ». *Drug Resistance Updates* 68: 100962. doi:10.1016/j.drug.2023.100962.
- Calais, Jérémie. 2023. « Théranostique ciblant le PSMA : de la recherche clinique à la norme de soins standards ». phdthesis. Université Paris-Saclay. <https://theses.hal.science/tel-04403563> (19 juin 2024).

- Cancers - Santé Publique France. 2024. « Cancers - Santé Publique France ». *Santé publique France*. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers> (11 novembre 2024).
- Carpentier, Alexandre, Roger Stupp, Adam M. Sonabend, Henry Dufour, Olivier Chinot, Bertrand Mathon, François Ducray, et al. 2024. « Repeated Blood–Brain Barrier Opening with a Nine-Emitter Implantable Ultrasound Device in Combination with Carboplatin in Recurrent Glioblastoma: A Phase I/II Clinical Trial ». *Nature Communications* 15(1): 1650. doi:10.1038/s41467-024-45818-7.
- Castle, Jason, Spiros Kotopoulos, et Flemming Forsberg. 2020. « Sonoporation for Augmenting Chemotherapy of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2059: 191-205. doi:10.1007/978-1-4939-9798-5_9.
- Chanchou, M., et P. Robin. 2023. « La tomographie par émission de positons aux ligands de l’antigène membranaire spécifique de la prostate (TEP-PSMA) dans le cancer de la prostate en France en 2023 : actualités et perspectives ». *Médecine Nucléaire* 47(5): 258-65. doi:10.1016/j.med-nuc.2023.07.003.
- Chandran, Elias, William D. Figg, et Ravi Madan. 2024. « [145] Lutetium-177-PSMA-617: A Vision of the Future ». *Cancer Biology & Therapy* 23(1): 186-90. doi:10.1080/15384047.2022.2037985.
- Chandrasekar, Thenappan. 2023. « [20] Cancer de la prostate - Troubles génito-urinaires ». *Édition professionnelle du Manuel MSD*. <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-génito-urinaires/cancers-génito-urinaires/cancer-de-la-prostate> (3 juin 2024).
- Chen, Jiaxuan, Shuzhen Liao, Zengzhi Xiao, Quanren Pan, Xi Wang, Kangyuan Shen, Shuting Wang, et al. 2022. « The Development and Improvement of Immunodeficient Mice and Humanized Immune System Mouse Models ». *Frontiers in Immunology* 13: 1007579. doi:10.3389/fimmu.2022.1007579.
- Chen, Ko-Ting, Ya-Jui Lin, Wen-Yen Chai, Chia-Jung Lin, Pin-Yuan Chen, Chiung-Yin Huang, John S. Kuo, Hao-Li Liu, et Kuo-Chen Wei. 2020. « Neuronavigation-guided focused ultrasound (NaviFUS) for transcranial blood-brain barrier opening in recurrent glioblastoma patients: clinical trial protocol ». *Annals of Translational Medicine* 8(11): 673. doi:10.21037/atm-20-344.
- Chen, Liyu, Ratneswary Sutharsan, Jonathan Lf Lee, Esteban Cruz, Blaise Asnicar, Tishila Palliyaguru, Joanna M. Wasielewska, et al. 2022. « Claudin-5 Binder Enhances Focused Ultrasound-Mediated Opening in an in Vitro Blood-Brain Barrier Model ». *Theranostics* 12(5): 1952-70. doi:10.7150/thno.65539.

- Chen, Yu, Charles L. Sawyers, et Howard I. Scher. 2008. « Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer ». *Current opinion in pharmacology* 8(4): 440-48. doi:10.1016/j.coph.2008.07.005.
- Chhabra, Anupriya, et Mathew L. Thakur. 2022. « Theragnostic Radionuclide Pairs for Prostate Cancer Management: $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$, Can Be a Budding Hot Duo ». *Biomedicines* 10(11): 2787. doi:10.3390/biomedicines10112787.
- Chowdhury, Sayan Mullick, Lotfi Abou-Elkacem, Taehwa Lee, Jeremy Dahl, et Amelie M. Lutz. 2020. « Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: Underlying mechanisms and future outlook ». *Journal of Controlled Release* 326: 75-90. doi:10.1016/j.jconrel.2020.06.008.
- Constantinesco, André. 2007. « [212] Biophysique des ultrasons et échographie ENSPS ISPV ». http://ghanen.free.fr/cours/ultrasons_echographie_2007.pdf (16 août 2024).
- Conway, Grace E., Anurag N. Paranjape, Xucai Chen, et Flordeliza S. Villanueva. 2024. « Development of an In Vitro Model to Study Mechanisms of Ultrasound-Targeted Microbubble Cavitation-Mediated Blood-Brain Barrier Opening ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 50(3): 425-33. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2023.12.005.
- Couturier, O.-F., O. Medhioub, M. Bourgeois, et F. Lacoeyille. 2023. « [102] L'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) et ses ligands radiomarqués pour la médecine nucléaire ». *Médecine Nucléaire* 47(5): 241-46. doi:10.1016/j.mednuc.2023.08.001.
- Cunningham, David, et Zongbing You. 2015. « In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research ». *Journal of biological methods* 2(1): e17. doi:10.14440/jbm.2015.63.
- Czerwińska, Malwina, Aleksander Bilewicz, Marcin Kruszewski, Aneta Wegierek-Ciuk, et Anna Lankoff. 2020. « [103] Targeted Radionuclide Therapy of Prostate Cancer—From Basic Research to Clinical Perspectives ». *Molecules* 25(7): 1743. doi:10.3390/molecules25071743.
- Daguenet, Elisabeth, Safa Louati, Anne-Sophie Wozny, Nicolas Vial, Mathilde Gras, Jean-Baptiste Guy, Alexis Vallard, Claire Rodriguez-Lafrasse, et Nicolas Magné. 2020. « Radiation-Induced Bystander and Abscopal Effects: Important Lessons from Preclinical Models ». *British Journal of Cancer* 123(3): 339-48. doi:10.1038/s41416-020-0942-3.
- Damiana, Tyrillshall S. T., et Simone U. Dalm. 2021. « Combination Therapy, a Promising Approach to Enhance the Efficacy of Radionuclide and Targeted Radionuclide Therapy of Prostate and Breast Cancer ». *Pharmaceutics* 13(5): 674. doi:10.3390/pharmaceutics13050674.

- Dauba, Ambre, Anthony Delalande, Hermes A. S. Kamimura, Allegra Conti, Benoit Larrat, Nicolas Tsapis, et Anthony Novell. 2020. « Recent Advances on Ultrasound Contrast Agents for Blood-Brain Barrier Opening with Focused Ultrasound ». *Pharmaceutics* 12(11): 1125. doi:10.3390/pharmaceutics12111125.
- De Palma, Michele, et Claire E. Lewis. 2013. « Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anti-cancer Therapies ». *Cancer Cell* 23(3): 277-86. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.013.
- Delalande, Anthony, Chloé Leduc, Patrick Midoux, Michiel Postema, et Chantal Pichon. 2015. « Efficient Gene Delivery by Sonoporation Is Associated with Microbubble Entry into Cells and the Clathrin-Dependent Endocytosis Pathway ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 41(7): 1913-26. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2015.03.010.
- Delalande, Anthony, Michiel Postema, Nathalie Mignet, Patrick Midoux, et Chantal Pichon. 2012. « Ultrasound and Microbubble-Assisted Gene Delivery: Recent Advances and Ongoing Challenges ». *Therapeutic Delivery* 3(10): 1199-1215. doi:10.4155/tde.12.100.
- Deprez, J., G. Lajoinie, Y. Engelen, S. C. De Smedt, et I. Lentacker. 2021. « Opening Doors with Ultrasound and Microbubbles: Beating Biological Barriers to Promote Drug Delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 172: 9-36. doi:10.1016/j.addr.2021.02.015.
- Deshayes, Dr Emmanuel. 2022. « [148] RADIOTHÉRAPIE INTERNE VECTORISÉE ENJEUX CLINIQUES ACTUELS & PERSPECTIVES ». https://indico.in2p3.fr/event/25268/contributions/107046/attachments/69443/98059/01_Deshayes.pdf.
- Dimcevski, Georg, Spiros Kotopoulos, Tormod Bjnes, Dag Hoem, Jan Schjøtt, Bjørn Tore Gjertsen, Martin Biermann, et al. 2016. « A Human Clinical Trial Using Ultrasound and Microbubbles to Enhance Gemcitabine Treatment of Inoperable Pancreatic Cancer ». *Journal of Controlled Release*.
- Dimitrakopoulou-Strauss, Antonia, Leyun Pan, et Christos Sachpekidis. 2021. « Kinetic modeling and parametric imaging with dynamic PET for oncological applications: general considerations, current clinical applications, and future perspectives ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 48(1): 21-39. doi:10.1007/s00259-020-04843-6.
- Dindyal, Shiva, et Constantinos Kyriakides. 2011. « Ultrasound Microbubble Contrast and Current Clinical Applications ». *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 6(1): 27-41. doi:10.2174/157489011794578446.

- de Dreuille, O., P. Maszelin, H. Foehrenbach, G. Bonardel, et J. -F. Gaillard. 2004. « Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP) ». *EMC - Radiologie* 1(1): 2-35. doi:10.1016/j.emcrad.2003.12.001.
- Dukes, Joseph D, Paul Whitley, et Andrew D Chalmers. 2011. « The MDCK Variety Pack: Choosing the Right Strain ». *BMC Cell Biology* 12(1): 43. doi:10.1186/1471-2121-12-43.
- Duran, Audrey. 2022. « Intelligence artificielle pour la caractérisation du cancer de la prostate par agressivité en IRM multiparamétrique ». phdthesis. Université de Lyon. <https://theses.hal.science/tel-03789679> (2 juin 2024).
- Eisenbrey, John R., Flemming Forsberg, Corinne E. Wessner, Lauren J. Delaney, Kristen Bradigan, Sriharsha Gummadi, Mohamed Tantawi, et al. 2021. « US-Triggered Microbubble Destruction for Augmenting Hepatocellular Carcinoma Response to Transarterial Radioembolization: A Randomized Pilot Clinical Trial ». *Radiology* 298(2): 450-57. doi:10.1148/radiol.2020202321.
- El Fakiri, Mohamed, Nicolas M. Geis, Nawal Ayada, Matthias Eder, et Ann-Christin Eder. 2021. « PSMA-Targeting Radiopharmaceuticals for Prostate Cancer Therapy: Recent Developments and Future Perspectives ». *Cancers* 13(16): 3967. doi:10.3390/cancers13163967.
- El-Bandar, Nasrin, Markus Lerchbaumer, Robert Peters, Andreas Maxeiner, Katja Kotsch, Arne Sattler, Kurt Miller, et al. 2022. « Kidney Perfusion in Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) Correlates with Renal Function in Living Kidney Donors ». *Journal of Clinical Medicine* 11: 791. doi:10.3390/jcm11030791.
- Epelbaum, Stéphane, Ninon Burgos, Michael Canney, Dawn Matthews, Marion Houot, Mathieu D. Santin, Carole Desseaux, et al. 2022. « Pilot Study of Repeated Blood-Brain Barrier Disruption in Patients with Mild Alzheimer's Disease with an Implantable Ultrasound Device ». *Alzheimer's Research & Therapy* 14(1): 40. doi:10.1186/s13195-022-00981-1.
- Erra, B., et B. Pradere. 2019. « Place de la médecine nucléaire au sein de la prise en charge du cancer de la prostate ». *Progrès en Urologie* 29: S2-7. doi:10.1016/S1166-7087(19)30165-4.
- Escoffre, Jean-Michel, et Ayache Bouakaz. 2019. « Minireview: Biophysical Mechanisms of Cell Membrane Sonopermeabilization. Knowns and Unknowns ». *Langmuir* 35(31): 10151. doi:10.1021/acs.langmuir.8b03538.
- Escoffre, Jean-Michel, Najib Sekkat, Edward Oujagir, Sylvie Bodard, Coralie Mousset, Antoine Presset, Romain Chautard, et al. 2022. « [238] Delivery of Anti-Cancer Drugs Using Microbubble-Assisted Ultrasound in Digestive Oncology: From Preclinical to Clinical Studies ».

- European Committee for Ultrasound Radiation Safety — The Watchdogs. 1997. « Terms used in describing ultrasonic exposures ». *European Journal of Ultrasound* 5(2): 127-30. doi:10.1016/S0929-8266(97)00215-2.
- Evangelista, Laura, Tobias Maurer, Henk van der Poel, Filippo Alongi, Jolanta Kunikowska, Riccardo Laudicella, Stefano Fanti, et Michael S. Hofman. 2022. « [68Ga]Ga-PSMA Versus [18F]PSMA Positron Emission Tomography/Computed Tomography in the Staging of Primary and Recurrent Prostate Cancer. A Systematic Review of the Literature ». *European Urology Oncology* 5(3): 273-82. doi:10.1016/j.euo.2022.03.004.
- Fagerland, Stein-Martin T., Sigrid Berg, Deborah K. Hill, Sofie Snipstad, Einar Sulheim, Astrid Hyldbakk, Jana Kim, et Catharina de Lange Davies. 2020. « Ultrasound-Mediated Delivery of Chemotherapy into the Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Model ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46(11): 3032-45. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2020.07.004.
- Fan, Zhenzhen, Di Chen, et Cheri Deng. 2014. « Characterization of the Dynamic Activities of a Population of Microbubbles Driven by Pulsed Ultrasound Exposure in Sonoporation ». *Ultrasound in medicine & biology* 40. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.12.002.
- Fateh, Sepand Tehrani, Lida Moradi, Elmira Kohan, Michael R. Hamblin, et Amin Shiralizadeh Dezfouli. 2021. « Comprehensive Review on Ultrasound-Responsive Theranostic Nanomaterials: Mechanisms, Structures and Medical Applications ». *Beilstein Journal of Nanotechnology* 12(1): 808-62. doi:10.3762/bjnano.12.64.
- Felix, Kannapin, Schmitz Tobias, Hansmann Jan, Schlegel Nicolas, et Meir Michael. 2021. « Measurements of Transepithelial Electrical Resistance (TEER) Are Affected by Junctional Length in Immature Epithelial Monolayers ». *Histochemistry and Cell Biology* 156(6): 609-16. doi:10.1007/s00418-021-02026-4.
- Fix, Samantha. 2019. « Applying a Molecular Pharmaceuticals Framework to the Study of Ultrasound Contrast Agents ». The University of North Carolina at Chapel Hill University Libraries. doi:10.17615/83W0-5R82.
- Flores-Téllez, Teresita del N. J., et Esther Baena. 2022. « Experimental challenges to modeling prostate cancer heterogeneity ». *Cancer Letters* 524: 194-205. doi:10.1016/j.canlet.2021.10.012.
- « Focused Ultrasound Foundation | State of the Field ». 2023. *Focused Ultrasound Foundation*. <https://www.fusfoundation.org/the-technology/mechanisms-of-action/> (16 août 2024).

- Frinking, Peter, Tim Segers, Ying Luan, et François Tranquart. 2020. « [183] Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46(4): 892-908. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2019.12.008.
- Fu, Haitian, Kequan Lou, Huihui He, Yanjuan Wang, Yuanyuan Mi, Wenjin Li, Liping Chen, Yu Zhang, et Chunjing Yu. 2024. « A Novel PSMA Targeted Dual-Function near-Infrared Fluorescence and PET Probe for the Image-Guided Surgery and Detection of Prostate Cancer ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 51(10): 2998-3008. doi:10.1007/s00259-023-06492-x.
- Gandaglia, Giorgio, Firas Abdollah, Jonas Schiffmann, Vincent Trudeau, Shahrokh F. Shariat, Simon P. Kim, Paul Perrotte, et al. 2014. « Distribution of Metastatic Sites in Patients with Prostate Cancer: A Population-Based Analysis ». *The Prostate* 74(2): 210-16. doi:10.1002/pros.22742.
- Garcia, Guadalupe G., Christopher J. Schmidt, et Cynthia Hajal. 2024. « The Tumor Microenvironment in Therapy Resistance ». *Frontiers in Lab on a Chip Technologies* 3. doi:10.3389/frlct.2024.1420233.
- García-Román, Jonathan, et Alejandro Zentella-Dehesa. 2013. « [161] Vascular Permeability Changes Involved in Tumor Metastasis ». *Cancer Letters* 335(2): 259-69. doi:10.1016/j.canlet.2013.03.005.
- Gauthé, Mathieu. 2024. « [140] TEP/TDM au ligands du PSMA marqués au gallium-6 ». <https://onco-nouvelle-aquitaine.fr/wp-content/uploads/2021/08/2-mathieu-gauthe-gtr-med-nuc-190919.pdf> (18 juin 2024).
- Ge, Rongbin, Zongwei Wang, et Liang Cheng. 2022. « Tumor microenvironment heterogeneity an important mediator of prostate cancer progression and therapeutic resistance ». *NPJ Precision Oncology* 6: 31. doi:10.1038/s41698-022-00272-w.
- Giraudet, A. -L., P. -A. Hamon, J. Coulot, P. Pascal, E. Deshayes, F. Courbon, et P. -Y. Salaun. 2024. « Étude capacité théranostique 2023–2024 – Modélisation sur la base de la RIV-PSMA. Radiothérapie interne vectorisée (RIV), une approche théranostique à laquelle le patient doit avoir accès. Partie II : analyse approfondie ». *Médecine Nucléaire* 48(4): 189-223. doi:10.1016/j.med-nuc.2024.09.002.
- Giraudet, Anne-Laure. 2018. « Radiothérapie interne vectorisée appliquée aux synoviosarcomes : mise en place d’une étude de phase 1 ». These de doctorat. Lyon. <https://theses.fr/2018LYSE1253> (15 juin 2024).

- Gourni, Eleni, et Gjermund Henriksen. 2017. « Metal-Based PSMA Radioligands ». *Molecules* 22(4): 523. doi:10.3390/molecules22040523.
- Grizzi, Fabio, Mohamed A. A. Hegazi, Matteo Zanoni, Paolo Vota, Giovanni Toia, Maria Chiara Clementi, Cinzia Mazzieri, Maurizio Chiriva-Internati, et Gianluigi Taverna. 2023. « Prostate Cancer Microvascular Routes: Exploration and Measurement Strategies ». *Life* 13(10): 2034. doi:10.3390/life13102034.
- Groener, Daniel, Cam Tu Nguyen, Justus Baumgarten, Benjamin Bockisch, Karen Davis, Christian Happel, Nicolai Mader, et al. 2021. « Hematologic Safety of ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *EJNMMI research* 11(1): 61. doi:10.1186/s13550-021-00805-7.
- Grogan, Scott P., et Cristin A. Mount. 2024. « Ultrasound Physics and Instrumentation ». In *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570593/> (7 juillet 2024).
- Gudkov, Sergey V., Natalya Yu Shilyagina, Vladimir A. Vodeneev, et Andrei V. Zvyagin. 2015. « Targeted Radionuclide Therapy of Human Tumors ». *International Journal of Molecular Sciences* 17(1): 33. doi:10.3390/ijms17010033.
- Gumbleton, M., et K. L. Audus. 2001. « Progress and Limitations in the Use of in Vitro Cell Cultures to Serve as a Permeability Screen for the Blood-Brain Barrier ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90(11): 1681-98. doi:10.1002/jps.1119.
- Han, Yiping W., Akihiko Ikegami, Peter Chung, Lei Zhang, et Cheri X. Deng. 2007. « Sonoporation Is an Efficient Tool for Intracellular Fluorescent Dextran Delivery and One-Step Double-Crossover Mutant Construction in *Fusobacterium Nucleatum* ». *Applied and Environmental Microbiology* 73(11): 3677. doi:10.1128/AEM.00428-07.
- « HAS - Autorisation d'accès précoce octroyée à la spécialité RADELUMIN ». 2022. *Haute Autorité de Santé*. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3337433/fr/radelumin-18f-psma-1007-cancer-de-la-prostate (3 juillet 2024).
- HAS - Biopsies ciblées dans le diagnostic du cancer de la prostate. 2023. « HAS - Biopsies ciblées dans le diagnostic du cancer de la prostate ». https://www.has-sante.fr/jcms/p_3483677/fr/biopsies-ciblees-dans-le-diagnostic-du-cancer-de-la-prostate-rapport-d-evaluation (3 juin 2024).

- « HAS - Cancer de la prostate : Rapport d'orientation ». 2012. https://www.has-sante.fr/jcms/c_1238318/fr/cancer-de-la-prostate-identification-des-facteurs-de-risque-et-pertinence-d-un-depistage-par-dosage-de-l-antigene-specifique-de-la-prostate-psa-de-populations-d-hommes-a-haut-risque (3 juin 2024).
- « HAS - Référentiel de pratiques : Détection précoce du cancer de la prostate ». 2013. *Haute Autorité de Santé*. https://www.has-sante.fr/jcms/c_1623737/fr/detection-precoce-du-cancer-de-la-prostate (3 juin 2024).
- He, Yundong, Weidong Xu, Yu-Tian Xiao, Haojie Huang, Di Gu, et Shancheng Ren. 2022. « Targeting Signaling Pathways in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Trials ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7(1): 1-31. doi:10.1038/s41392-022-01042-7.
- Hennrich, Ute, et Matthias Eder. 2021. « [68Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer ». *Pharmaceuticals* 14(8). doi:10.3390/ph14080713.
- Henríquez, Iván, Mack Roach, Todd M. Morgan, Alberto Bossi, Junior A. Gómez, Oscar Abuchaibe, et Felipe Couñago. 2021. « Current and Emerging Therapies for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (MCRPC) ». *Biomedicines* 9(9): 1247. doi:10.3390/biomedicines9091247.
- Hensel, Karin, Martin P. Mienkine, et Georg Schmitz. 2011. « Analysis of Ultrasound Fields in Cell Culture Wells for In Vitro Ultrasound Therapy Experiments ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 37(12): 2105-15. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.09.007.
- Hofman, Michael S, Louise Emmett, Shahneen Sandhu, Amir Iravani, James P Buteau, Anthony M Joshua, Jeffrey C Goh, et al. 2024. « Overall survival with [177Lu]Lu-PSMA-617 versus cabazitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer (TheraP): secondary outcomes of a randomised, open-label, phase 2 trial ». *The Lancet Oncology* 25(1): 99-107. doi:10.1016/S1473-2045(23)00529-6.
- Hofman, Michael S, Louise Emmett, Shahneen Sandhu, Amir Iravani, Anthony M Joshua, Jeffrey C Goh, David A Pattison, et al. 2021. « [177Lu]Lu-PSMA-617 versus Cabazitaxel in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (TheraP): A Randomised, Open-Label, Phase 2 Trial ». *The Lancet* 397(10276): 797-804. doi:10.1016/S0140-6736(21)00237-3.
- Holland, Jason P., Vadim Divilov, Neil H. Bander, Peter M. Smith-Jones, Steven M. Larson, et Jason S. Lewis. 2010. « 89Zr-DFO-J591 for immunoPET imaging of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in vivo ». *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 51(8): 1293-1300. doi:10.2967/jnumed.110.076174.

- Hoskins, Peter R., Kevin Martin, et Abigail Thrush, éd. 2010. *Diagnostic Ultrasound: Physics and Equipment*. 2^e éd. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511750885.
- Hu, Yaxin, Jennifer M. F. Wan, et Alfred C. H. Yu. 2013. « Membrane Perforation and Recovery Dynamics in Microbubble-Mediated Sonoporation ». *Ultrasound in Medicine and Biology* 39(12): 2393-2405. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2013.08.003.
- Huang, Siyu, Sean Ong, Dean McKenzie, Adam Mirabelli, David C. Chen, Thilakavathi Chengodu, Declan G. Murphy, et al. 2023. « Comparison of 18F-Based PSMA Radiotracers with [68Ga]Ga-PSMA-11 in PET/CT Imaging of Prostate Cancer—a Systematic Review and Meta-Analysis ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*: 1-11. doi:10.1038/s41391-023-00755-2.
- Hughes, Alec, Dure S. Khan, et Ryan Alkins. 2023. « Current and Emerging Systems for Focused Ultrasound-Mediated Blood–Brain Barrier Opening ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 49(7): 1479-90. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2023.02.017.
- Humphrey, Victor F. 2007. « Ultrasound and matter—Physical interactions ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 93(1): 195-211. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.024.
- Idbaih, Ahmed, Michael Canney, Lisa Belin, Carole Desseaux, Alexandre Vignot, Guillaume Bouchoux, Nicolas Asquier, et al. 2019. « Safety and Feasibility of Repeated and Transient Blood-Brain Barrier Disruption by Pulsed Ultrasound in Patients with Recurrent Glioblastoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25(13): 3793-3801. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3643.
- If, Tannock, de Wit R, Berry W, Horti J, Pluzanska A, Chi Kn, Oudard S, et al. 2004. « Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer ». *The New England journal of medicine* 351(15). doi:10.1056/NEJMoa040720.
- « Inserts de culture cellulaire - Thermo Fisher Scientific ». <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-culture/cell-culture-plastics/cell-culture-inserts.html> (12 novembre 2024).
- Irvine, Jennifer D., Lori Takahashi, Karen Lockhart, Jonathan Cheong, John W. Tolan, H.E. Selick, et J. Russell Grove. 1999. « MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(1): 28-33. doi:10.1021/js9803205.
- Ismail, Uzma, et Robert B. Killeen. 2024. « Taxane Toxicity ». In *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589655/> (7 août 2024).

- Jain, Ankit, Ankita Tiwari, Amit Verma, et Sanjay K. Jain. 2018. « Ultrasound-Based Triggered Drug Delivery to Tumors ». *Drug Delivery and Translational Research* 8(1): 150-64. doi:10.1007/s13346-017-0448-6.
- Jameel, Ayesha, Peter Bain, Dipankar Nandi, Brynmor Jones, et Wladyslaw Gedroyc. 2021. « Device Profile of ExAblate Neuro 4000, the Leading System for Brain Magnetic Resonance Guided Focused Ultrasound Technology: An Overview of Its Safety and Efficacy in the Treatment of Medically Refractory Essential Tremor ». *Expert Review of Medical Devices* 18(5): 429-37. doi:10.1080/17434440.2021.1921572.
- Ji, Shiyu, Wenbo Wu, et Qi Jiang. 2023. « Crosstalk between Endothelial Cells and Tumor Cells: A New Era in Prostate Cancer Progression ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(23): 16893. doi:10.3390/ijms242316893.
- Jin, Xiannu, Thu-Lan Luong, Necole Reese, Heather Gaona, Vanessa Collazo-Velez, Chau Vuong, Brittney Potter, et al. 2014. « Comparison of MDCK-MDR1 and Caco-2 Cell Based Permeability Assays for Anti-Malarial Drug Screening and Drug Investigations ». *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 70(2): 188-94. doi:10.1016/j.vascn.2014.08.002.
- Kang, Juening, Federico La Manna, Francesco Bonollo, Natalie Sampson, Ian L. Alberts, Clemens Mingels, Ali Afshar-Oromieh, George N. Thalmann, et Sofia Karkampouna. 2022. « Tumor microenvironment mechanisms and bone metastatic disease progression of prostate cancer ». *Cancer Letters* 530: 156-69. doi:10.1016/j.canlet.2022.01.015.
- Karshafian, Raffi, Peter D. Bevan, Ross Williams, Sanya Samac, et Peter N. Burns. 2009. « Sonoporation by Ultrasound-Activated Microbubble Contrast Agents: Effect of Acoustic Exposure Parameters on Cell Membrane Permeability and Cell Viability ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 35(5): 847-60. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2008.10.013.
- Karzova, Maria, Petr Yuldashev, V. Khokhlova, Fedor Nartov, Kyle Morrison, et Tatiana Khokhlova. 2021. « Dual-Use Transducer for Ultrasound Imaging and Pulsed Focused Ultrasound (pFUS) Therapy ». *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* PP: 1-1. doi:10.1109/TUFFC.2021.3070528.
- Kawamura, Kasumi, Fei Qi, et Junya Kobayashi. 2018. « Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production ». *Journal of Radiation Research* 59(suppl_2): ii91-97. doi:10.1093/jrr/rrx091.

- Kim, Cho-Hee, Subrata Bhattacharjee, Deekshitha Prakash, Suki Kang, Nam-Hoon Cho, Hee-Cheol Kim, et Heung-Kook Choi. 2021. « Artificial Intelligence Techniques for Prostate Cancer Detection through Dual-Channel Tissue Feature Engineering ». *Cancers* 13(7): 1524. doi:10.3390/cancers13071524.
- Kleinendorst, Simone C., Egbert Oosterwijk, Johan Bussink, Harm Westdorp, Mark W. Konijnenberg, et Sandra Heskamp. 2022. « Combining Targeted Radionuclide Therapy and Immune Checkpoint Inhibition for Cancer Treatment ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 28(17): 3652-57. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-4332.
- Kooiman, K., M. Emmer, M. Foppen-Harteveld, A. Van Wamel, et N. De Jong. 2010. « Increasing the Endothelial Layer Permeability Through Ultrasound-Activated Microbubbles ». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 57(1): 29-32. doi:10.1109/TBME.2009.2030335.
- Kooiman, Klazina, Silke Roovers, Simone A. G. Langeveld, Robert T. Kleven, Heleen Dewitte, Meaghan A. O'Reilly, Jean-Michel Escoffre, et al. 2020. « Ultrasound-Responsive Cavitation Nuclei for Therapy and Drug Delivery ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46(6): 1296-1325. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2020.01.002.
- Kothapalli, Satya V. V. N. 2015. « Nano-Engineered Contrast Agents : Toward Multimodal Imaging and Acoustophoresis ». <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:kth:diva-172397> (14 mai 2023).
- Kotopoulos, Spiros, Georg Dimcevski, Odd Helge Gilja, Dag Hoem, et Michiel Postema. 2013. « Treatment of Human Pancreatic Cancer Using Combined Ultrasound, Microbubbles, and Gemcitabine: A Clinical Case Study ». *Medical Physics* 40(7): 072902. doi:10.1118/1.4808149.
- Kotopoulos, Spiros, Georg Dimcevski, Bjørn Tore Gjertsen, Odd Helge Gilja, Emmet Mc Cormack, et Michiel Postema. 2014. « [232] Sonoporation: From the Lab to Human Clinical Trials ». IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), Chicago.
- Kouriefs, Chrysanthos, Mukhtar Sahoyl, Philippe Grange, et Gordon Muir. 2009. « Prostate Specific Antigen through the Years ». *Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia: Organo Ufficiale [di] Societa Italiana Di Ecografia Urologica E Nefrologica* 81(4): 195-98.
- Kratochwil, Clemens, Wolfgang P. Fendler, Matthias Eiber, Michael S. Hofman, Louise Emmett, Jeremie Calais, Joseph R. Osborne, et al. 2023. « Joint EANM/SNMMI Procedure Guideline for the

- Use of ^{177}Lu -Labeled PSMA-Targeted Radioligand-Therapy (^{177}Lu -PSMA-RLT) ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 50(9): 2830-45. doi:10.1007/s00259-023-06255-8.
- Kuntner, Claudia, et David Stout. 2014. « Quantitative preclinical PET imaging: opportunities and challenges ». *Frontiers in Physics* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2014.00012> (8 juillet 2022).
- Lafforgue, Claire, Guillaume Lassailly, Clio Baillet, Damien Huglo, et Sébastien Dharancy. 2019. « Intérêt pronostique du TEP-TDM dans la prise en charge du carcinome hépatocellulaire ». *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive* 26(9): 896-904. doi:10.1684/hpg.2019.1846.
- Lafond, Maxime. 2016. « [198] Confocal Ultrasound for the Potentiation of Chemotherapy by Ultrasonic Cavitation without External Nucleation Agents ». Cancer. Université de Lyon.
- Lafond, Maxime, Thomas Lambin, Robert Andrew Drainville, Aurélien Dupré, Mathieu Pioche, David Melodelima, et Cyril Lafon. 2022. « Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Emerging Therapeutic Uses of Focused Ultrasound ». *Cancers* 14(11): 2577. doi:10.3390/cancers14112577.
- Lammertink, Bart H. A., Clemens Bos, Roel Deckers, Gert Storm, Chrit T. W. Moonen, et Jean-Michel Escoffre. 2015. « Sonochemotherapy: From Bench to Bedside ». *Frontiers in Pharmacology* 6. doi:10.3389/fphar.2015.00138.
- Lammertink, Bart H. A., Clemens Bos, Kim M. van der Wurff-Jacobs, Gert Storm, Chrit T. Moonen, et Roel Deckers. 2016. « Increase of intracellular cisplatin levels and radiosensitization by ultrasound in combination with microbubbles ». *Journal of Controlled Release* 238: 157-65. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.049.
- Laporte, Philippe, Claire Cohalan, et Jean-François Carrier. 2023. « Static Segmentations in Dynamic PET Images: The Need for a New Method ». <http://arxiv.org/abs/2306.16243> (9 août 2024).
- Lee, Jae Young, Do-Youn Oh, Kyung-Hun Lee, Sang Hyub Lee, Dong Ho Lee, Kookjin Kang, Soo Yeon Kang, et Dong Hyuk Park. 2023. « Combination of Chemotherapy and Focused Ultrasound for the Treatment of Unresectable Pancreatic Cancer: A Proof-of-Concept Study ». *European Radiology* 33(4): 2620-28. doi:10.1007/s00330-022-09271-8.
- Leighton, T. G. 2004. « [185] From Seas to Surgeries, from Babbling Brooks to Baby Scans: The Acoustics of Gas Bubbles in Liquids ». *International Journal of Modern Physics B* 18(25): 3267-3314. doi:10.1142/S0217979204026494.

- Lentacker, I., I. De Cock, R. Deckers, S.C. De Smedt, et C.T.W. Moonen. 2014. « Understanding Ultrasound Induced Sonoporation: Definitions and Underlying Mechanisms ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 72: 49-64. doi:10.1016/j.addr.2013.11.008.
- Lertkiatmongkol, Panida, Danying Liao, Heng Mei, Yu Hu, et Peter J. Newman. 2016. « Endothelial Functions of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) ». *Current Opinion in Hematology* 23(3): 253-59. doi:10.1097/MOH.0000000000000239.
- Li, Duocai, Weidong Xu, Yifan Chang, Yutian Xiao, Yundong He, et Shancheng Ren. 2023. « Advances in landscape and related therapeutic targets of the prostate tumor microenvironment ». *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 55(6): 956-73. doi:10.3724/abbs.2023092.
- Li, Ying Suet, Emma Davidson, Cherith N. Reid, et Anthony P. McHale. 2009. « Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) *in vitro* and prolonged expression of a transgene *in vivo*: Potential applications for gene therapy of cancer ». *Cancer Letters* 273(1): 62-69. doi:10.1016/j.canlet.2008.07.030.
- Li, Yun Hua, Li Fang Jin, Lian-Fang Du, Qiu Sheng Shi, Long Liu, Xiao Jia, Ying Wu, Fan Li, et Hang Hui Wang. 2013. « Enhancing HSP70-ShRNA transfection in 22RV1 prostate cancer cells by combination of sonoporation, liposomes and HTERT/CMV chimeric promoter ». *International Journal of Oncology* 43(1): 151-58. doi:10.3892/ijo.2013.1921.
- Liao, Jinfeng, Yanpeng Jia, Yongzhi Wu, Kun Shi, Dawei Yang, Pei Li, et Zhiyong Qian. 2020. « Physical-, Chemical-, and Biological-Responsive Nanomedicine for Cancer Therapy ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 12(1): e1581. doi:10.1002/wnan.1581.
- Lim, D. J., X. L. Liu, D. M. Sutkowski, E. J. Braun, C. Lee, et J. M. Kozlowski. 1993. « Growth of an Androgen-Sensitive Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP, in Nude Mice ». *The Prostate* 22(2): 109-18. doi:10.1002/pros.2990220203.
- Lin, Yutong, Lizhou Lin, Mouwen Cheng, Lifang Jin, Lianfang Du, Tao Han, Lin Xu, Alfred C. H. Yu, et Peng Qin. 2017. « Effect of Acoustic Parameters on the Cavitation Behavior of SonoVue Microbubbles Induced by Pulsed Ultrasound ». *Ultrasonics Sonochemistry* 35: 176-84. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.09.016.
- Linz, Georg, Suzana Djeljaidni, Lea Steinbeck, Gurbet Köse, Fabian Kiessling, et Matthias Wessling. 2020. « Cell barrier characterization in transwell inserts by electrical impedance spectroscopy ». *Biosensors and Bioelectronics* 165: 112345. doi:10.1016/j.bios.2020.112345.

- Liu, Weiyong, Yunkai Zhu, Lei Ye, Yajuan Zhu, et Yuhao Wang. 2021. « Comparison of Tumor Angiogenesis in Subcutaneous and Orthotopic LNCaP Mouse Models Using Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging ». *Translational Cancer Research* 10(7): 3268-77. doi:10.21037/tcr-21-372.
- Lopes, Joana, Gory Santos, Pedro Coelho, Rita Oliveira, et Carla Lopes. 2013. « Physical and Chemical Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems: Targeted Delivery and Main Routes of Administration ». *Current pharmaceutical design* 19. doi:10.2174/13816128113199990698.
- Lorion, R, F. Bladou, A. Spatz, L. van Kempen, et J. Irani. 2016. « [39][45] Microenvironnement du cancer de la prostate : structure, fonctions et applications thérapeutiques ». *Progrès en Urologie* (26): 464-76.
- Lu, Shirui, Pengxuan Zhao, Youbin Deng, et Yani Liu. 2022. « Mechanistic Insights and Therapeutic Delivery through Micro/Nanobubble-Assisted Ultrasound ». *Pharmaceutics* 14(3): 480. doi:10.3390/pharmaceutics14030480.
- Makino, Tomoyuki, Kouji Izumi, et Atsushi Mizokami. 2021. « Undesirable Status of Prostate Cancer Cells after Intensive Inhibition of AR Signaling: Post-AR Era of CRPC Treatment ». *Biomedicines* 9(4): 414. doi:10.3390/biomedicines9040414.
- Maluf, Fernando Cotait, Felipe Moraes Toledo Pereira, Adriano Gonçalves Silva, Aldo Lourenço Abade Dettino, Ana Paula Garcia Cardoso, André Seeke Sasse, Andrey Soares, et al. 2021. « Consensus on the Treatment and Follow-Up for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Report From the First Global Prostate Cancer Consensus Conference for Developing Countries (PCCCDC) ». *JCO Global Oncology* (7): 559-71. doi:10.1200/GO.20.00511.
- Manna, Federico La, Sofia Karkampouna, Eugenio Zoni, Marta De Menna, Janine Hensel, George N. Thalmann, et Marianna Kruithof-de Julio. 2019. « Metastases in Prostate Cancer ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 9(3): a033688. doi:10.1101/cshperspect.a033688.
- Mansinho, André, Daniela Macedo, Isabel Fernandes, et Luís Costa. 2018. « Castration-Resistant Prostate Cancer: Mechanisms, Targets and Treatment ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1096: 117-33. doi:10.1007/978-3-319-99286-0_7.
- Marín, Alicia, Margarita Martín, Olga Liñán, Felipe Alvarenga, Mario López, Laura Fernández, David Büchser, et Laura Cerezo. 2014. « Bystander effects and radiotherapy ». *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 20(1): 12-21. doi:10.1016/j.rpor.2014.08.004.

- Markelc, Bostjan, Elisabeth Bellard, Gregor Sersa, Tanja Jesenko, Sandrine Pelofy, Justin Teissié, Robert Frangez, et al. 2018. « Increased Permeability of Blood Vessels after Reversible Electroporation Is Facilitated by Alterations in Endothelial Cell-to-Cell Junctions ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 276: 30-41. doi:10.1016/j.jconrel.2018.02.032.
- Masson, Elsevier. 2011. « [58] Cancer de la prostate à haut risque de progression. Article de revue du comité de cancérologie de l'association française d'urologie ». *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/674998/cancer-de-la-prostate-a-haut-risque-de-progression> (6 août 2024).
- Maurer, Tobias, Matthias Eiber, Markus Schwaiger, et Jürgen E. Gschwend. 2016. « Current Use of PSMA–PET in Prostate Cancer Management ». *Nature Reviews Urology* 13(4): 226-35. doi:10.1038/nrurol.2016.26.
- McKinnon, Katherine M. 2018. « Flow Cytometry: An Overview ». *Current protocols in immunology* 120: 5.1.1-5.1.11. doi:10.1002/cpim.40.
- Meng, Ying, Maged Goubran, Jennifer S. Rabin, Melissa McSweeney, Julie Ottoy, Christopher B. Pople, Yuexi Huang, et al. 2023. « Blood-Brain Barrier Opening of the Default Mode Network in Alzheimer's Disease with Magnetic Resonance-Guided Focused Ultrasound ». *Brain: A Journal of Neurology* 146(3): 865-72. doi:10.1093/brain/awac459.
- Meng, Zheyang, Yang Zhang, E Shen, Wei Li, Yanjie Wang, Krishnan Sathiyamoorthy, Wei Gao, et al. 2021. « Marriage of Virus-Mimic Surface Topology and Microbubble-Assisted Ultrasound for Enhanced Intratumor Accumulation and Improved Cancer Theranostics ». *Advanced Science* 8(13): 2004670. doi:10.1002/advs.202004670.
- Metz, Raphaël. 2023. « [139] Impact clinique de la TEP/TDM au 68Ga-PSMA versus 18F-Choline pour guider le traitement par radiothérapie externe des patients en récurrence locale ou oligométastatique de cancer de prostate avec une faible valeur de PSA ». <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03921261v1/document> (19 juin 2024).
- Miller, Douglas, Nadine Smith, Michael Bailey, Gregory Czarnota, Kullervo Hynynen, et Inder Makin. 2012. « Overview of Therapeutic Ultrasound Applications and Safety Considerations ». *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 31(4): 623-34.
- Miller, Jessica P., Christopher Egbulefu, Julie L. Prior, Mingzhou Zhou, et Samuel Achilefu. 2016. « Gradient-Based Algorithm for Determining Tumor Volumes in Small Animals Using Planar Fluorescence Imaging Platform ». *Tomography* 2(1): 17. doi:10.18383/j.tom.2016.00100.

- Minshall, R. D., et A. B. Malik. 2006. « Transport across the Endothelium: Regulation of Endothelial Permeability ». *Handbook of Experimental Pharmacology* (176 Pt 1): 107-44. doi:10.1007/3-540-32967-6_4.
- Morigi, J. J., N. Kovaleva, et S. Phan. 2022. « Spotlight on: “Dynamic PET/CT Imaging” ». *Clinical and Translational Imaging* 10(3): 239-41. doi:10.1007/s40336-022-00500-0.
- Morris, Michael J., Johann S. De Bono, Kim N. Chi, Karim Fizazi, Ken Herrmann, Kambiz Rahbar, Scott T. Tagawa, et al. 2021. « Phase III study of lutetium-177-PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (VISION). » *Journal of Clinical Oncology* 39(18_suppl): LBA4-LBA4. doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.LBA4.
- Moya, Leire, Carina Walpole, Fiona Rae, Srilakshmi Srinivasan, Inge Seim, John Lai, David Nicol, et al. 2023. « Characterisation of Cell Lines Derived from Prostate Cancer Patients with Localised Disease ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 26(3): 614-24. doi:10.1038/s41391-023-00679-x.
- Murray, Toby B. J. 2021. « The Pathogenesis of Prostate Cancer ». In *Prostate Cancer*, éd. Simon RJ Bott et Keng Lim Ng. Brisbane (AU): Exon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK571321/> (5 août 2024).
- Murthi, Sarah, Mary Ferguson, et Amy Sisley. 2010. « Ultrasound Physics and Equipment ». In , 57-80. doi:10.1007/978-0-387-79830-1_4.
- Muz, Barbara, Pilar de la Puente, Feda Azab, et Abdel Kareem Azab. 2015. « The Role of Hypoxia in Cancer Progression, Angiogenesis, Metastasis, and Resistance to Therapy ». *Hypoxia* 3: 83-92. doi:10.2147/HP.S93413.
- Muzi, Mark, Finbarr O’Sullivan, David Mankoff, Robert Doot, Larry Pierce, Brenda Kurland, Hannah Linden, et Paul Kinahan. 2012. « QIN: Quantitative Assessment of Dynamic PET Imaging Data in Cancer Imaging ». *Magnetic resonance imaging* 30(9): 1203-15. doi:10.1016/j.mri.2012.05.008.
- Naeem, Abdulghani A, Saud A Abdulsamad, Asmaa Al Bayati, Jiacheng Zhang, Mohammed I Malki, et Youqiang Ke. « Prostate Cell Lines ». . *Prostate* 5(2).
- Navalkisoor, Shaunak, et Ashley Grossman. 2018. « Targeted Alpha Particle Therapy for Neuroendocrine Tumours: The Next Generation of Peptide Receptor Radionuclide Therapy ». *Neuroendocrinology* 108(3): 256-64. doi:10.1159/000494760.

- Nehls, Stefan, Helen Nöding, Susanne Karsch, Franziska Ries, et Andreas Janshoff. 2019. « Stiffness of MDCK II Cells Depends on Confluency and Cell Size ». *Biophysical Journal* 116(11): 2204-11. doi:10.1016/j.bpj.2019.04.028.
- Novell, Anthony, Jean-Michel Escoffre, et Ayache Bouakaz. 2013. « Ultrasound Contrast Imaging in Cancer –Technical Aspects and Prospects ». *Current Molecular Imaging* 2: 77-88. doi:10.2174/2211555211302010009.
- Nyborg, Wesley. 2001. « Biological Effects of Ultrasound: Development of Safety Guidelines. Part II: General Review ». *Ultrasound in medicine & biology* 27: 301-33. doi:10.1016/S0301-5629(00)00333-1.
- O'Reilly, Julie-Ann, et Richard J. O'Kennedy. 2017. « Prostate Cancer Detection: Complexities and Strategies ». *Journal of Cancer Treatment and Diagnosis* 1(2). <https://www.cancertreatment-journal.com/articles/prostate-cancer-detection-complexities-and-strategies.html> (6 août 2024).
- Owen, Joshua, Eloise Thomas, Jyothi Menon, Michael Gray, Irini Skaripa-Koukelli, Martin R. Gill, Sheena Wallington, et al. 2020. « Indium-111 Labelling of Liposomal HEGF for Radionuclide Delivery via Ultrasound-Induced Cavitation ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 319: 222-33. doi:10.1016/j.jconrel.2019.12.045.
- Parekh, Kavya, Suzanne LeBlang, Javad Nazarian, Sabine Mueller, Stergios Zacharoulis, Kullervo Hynynen, et Lauren Powlovich. 2023. « Past, present and future of Focused Ultrasound as an adjunct or complement to DIPG/DMG therapy: A consensus of the 2021 FUSF DIPG meeting ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 37: 100876. doi:10.1016/j.neo.2023.100876.
- Parker, C., E. Castro, K. Fizazi, A. Heidenreich, P. Ost, G. Procopio, B. Tombal, et S. Gillessen. 2020. « Prostate Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up† ». *Annals of Oncology* 31(9): 1119-34. doi:10.1016/j.annonc.2020.06.011.
- Parsi, Meghana, Milap H. Desai, Devashish Desai, Sachi Singhal, Pushti M. Khandwala, et Rashmika R. Potdar. 2021. « PSMA: A Game Changer in the Diagnosis and Treatment of Advanced Prostate Cancer ». *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 38(8): 89. doi:10.1007/s12032-021-01537-3.
- Peltek, Oleksii O., Albert R. Muslimov, Mikhail V. Zyuzin, et Alexander S. Timin. 2019. « Current outlook on radionuclide delivery systems: from design consideration to translation into clinics ». *Journal of Nanobiotechnology* 17(1): 90. doi:10.1186/s12951-019-0524-9.

- Peruzzi, Giovanna, Giorgia Sinibaldi, Giulia Silvani, Giancarlo Ruocco, et Carlo Massimo Casciola. 2018. « Perspectives on Cavitation Enhanced Endothelial Layer Permeability ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 168: 83-93. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.02.027.
- Petitprin, Aurélie. 2024. « [71] Le RAFT-RGD radiomarqué avec un émetteur α - comme nouvel agent de radiothérapie interne vectorisée ». <https://theses.hal.science/tel-00820235/document> (12 juin 2024).
- Pignot, G. 2023. « Comment je prescris une hormonothérapie intensifiée ? » *Progrès en Urologie - FMC* 33(2): F53-56. doi:10.1016/j.fpurol.2022.12.001.
- Pitt, William G., Ghaleb A. Hussein, et Bryant J. Staples. 2004. « Ultrasonic Drug Delivery – A General Review ». *Expert opinion on drug delivery* 1(1): 37-56. doi:10.1517/17425247.1.1.37.
- Ploussard, G., et J.-N. Cornu. 2019. « [25] Cancer de la prostate résistant à la castration ». <https://www.urofrance.org/sites/default/files/fileadmin/documents/data/PU/2019/3247/73401/FR/1287332/index.pdf> (5 août 2024).
- Ploussard, G., G. Roubaud, E. Barret, J. -B. Beauval, L. Brureau, G. Créhange, C. Dariane, et al. 2022. « French AFU Cancer Committee Guidelines - Update 2022-2024: prostate cancer - Management of metastatic disease and castration resistance ». *Progrès en Urologie* 32(15): 1373-1419. doi:10.1016/j.purol.2022.07.147.
- Poletto, Giulia, Diego Cecchin, Paola Bartoletti, Francesca Venturini, Nicola Realdon, et Laura Evangelista. 2022. « Radionuclide Delivery Strategies in Tumor Treatment: A Systematic Review ». *Current Issues in Molecular Biology* 44(8): 3267-82. doi:10.3390/cimb44080225.
- Posey, James, Priscilla Machado, John R. Eisenbrey, Babar Bashir, Patrick Johnston Mille, Atrayee Basu Mallick, Rajan Singla, et al. 2023. « Sonoporation for disrupting the pancreatic cancer microenvironment to enhance chemotherapy delivery and improve outcomes. » *Journal of Clinical Oncology* 41(4_suppl): TPS777-TPS777. doi:10.1200/JCO.2023.41.4_suppl.TPS777.
- Postema, Michiel, Spiros Kotopoulos, Anthony Delalande, et Odd Helge Gilja. 2011. « Ultrasound-guided delivery and sonoporation ». In *Ultrasound in Gastroenterology: 10-years Anniversary of National Centre for Ultrasound in Gastroenterology. A Symposium in Honour of Professor Svein Ødegaard*, Bergen, Norway, 57-59. <https://hal.science/hal-03189353> (5 juillet 2024).
- Postema, Michiel, Philippe Marmottant, Charles T. Lancée, Sascha Hilgenfeldt, et Nico de Jong. 2004. « Ultrasound-induced microbubble coalescence ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 30(10): 1337-44. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2004.08.008.

- Pouget, Jean-Pierre, Alexandros G. Georgakilas, et Jean-Luc Ravanat. 2018. « Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy: Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 29(15): 1447-87. doi:10.1089/ars.2017.7267.
- Powles, Alexander EJ, David J. Martin, Irving TP Wells, et Christopher R. Goodwin. 2018. « Physics of Ultrasound ». *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 19(4): 202-5. doi:10.1016/j.mpaic.2018.01.005.
- Prunier, Chloé. 2015. « [27] Figure 9: Le Processus Métastatique Permet Aux Cellules Tumorales... » *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/figure/Le-processus-metastatique-permet-aux-cellules-tumorales-denvahir-dautres-organes-et-de_fig8_322725232 (15 juin 2024).
- Puscas, Ina. 2019. « [265] Développement d'un modèle in vitro de la barrière hémato-encéphalique ». https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/24000/Puscas_Ina_2019_memoire.pdf (23 septembre 2024).
- Qin, Jiale, Tzu-Yin Wang, et Jürgen K. Willmann. 2016. « Sonoporation: Applications for Cancer Therapy ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 880: 263-91. doi:10.1007/978-3-319-22536-4_15.
- Quarato, Carla Maria Irene, Donato Lacedonia, Michela Salvemini, Giulia Tuccari, Grazia Mastrodonato, Rosanna Villani, Lucia Angela Fiore, et al. 2023. « A Review on Biological Effects of Ultrasounds: Key Messages for Clinicians ». *Diagnostics* 13(5): 855. doi:10.3390/diagnostics13050855.
- Ravi, Praful, Bridget Whelpley, Emma Kelly, Andrew Wolanski, Jolivette Ritzer, Matthew Robertson, Hina Shah, et al. 2023. « Clinical Implementation of ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 in the United States: Lessons Learned and Ongoing Challenges ». *Journal of Nuclear Medicine*. doi:10.2967/jnumed.122.265194.
- Rea, Domenica, Vitale del Vecchio, Giuseppe Palma, Antonio Barbieri, Michela Falco, Antonio Luciano, Davide De Biase, et al. 2016. « Mouse Models in Prostate Cancer Translational Research: From Xenograft to PDX ». *BioMed Research International* 2016: 9750795. doi:10.1155/2016/9750795.
- Rebello, Richard J., Christoph Oing, Karen E. Knudsen, Stacy Loeb, David C. Johnson, Robert E. Reiter, Silke Gillesen, Theodorus Van der Kwast, et Robert G. Bristow. 2021. « Prostate Cancer ». *Nature Reviews Disease Primers* 7(1): 1-27. doi:10.1038/s41572-020-00243-0.

- « Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - cancer de la prostate - diagnostic et prise en charge de la maladie localisée ». 2022. <https://www.uro-france.org/recommandation/recommandations-du-comite-de-cancerologie-de-lassociation-francaise-durologie-actualisation-2022-2024-cancer-de-la-prostate-diagnostic-et-prise-en-charge-de-la-maladie-localise/> (7 août 2024).
- Reeves, Fairleigh, Nikhil Sapre, Niall Corcoran, et Christopher Hovens. 2013. « Tumor Vascularity in Prostate Cancer: An Update on Circulating Endothelial Cells and Platelets as Noninvasive Biomarkers ». *Biomarkers in Medicine* 7(6): 879-91. doi:10.2217/bmm.13.100.
- Riss, Terry L., Richard A. Moravec, Andrew L. Niles, Sarah Duellman, Hélène A. Benink, Tracy J. Worzella, et Lisa Minor. 2016. Assay Guidance Manual [Internet] *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (26 avril 2022).
- Robu, Stephanie, Alexander Schmidt, Matthias Eiber, Margret Schottelius, Thomas Günther, Behrooz Hooshyar Yousefi, Markus Schwaiger, et Hans-Jürgen Wester. 2018. « Synthesis and preclinical evaluation of novel 18F-labeled Glu-urea-Glu-based PSMA inhibitors for prostate cancer imaging: a comparison with 18F-DCFPyl and 18F-PSMA-1007 ». *EJNMMI Research* 8(1): 30. doi:10.1186/s13550-018-0382-8.
- Rodriguez-Devora, Jorge I, Sunny Ambure, Zhi-Dong Shi, Yuyu Yuan, Wei Sun, et Tao Xu. 2012. « Physically Facilitating Drug-Delivery Systems ». *Therapeutic Delivery* 3(1): 125-39. doi:10.4155/tde.11.137.
- Rohith, Gorrepati. 2021. « VISION trial: 177Lu-PSMA-617 for progressive metastatic castration-resistant prostate cancer ». *Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India* 37(4): 372-73. doi:10.4103/iju.iju_292_21.
- « Rôle du microenvironnement dans la tumorigénèse et la progression tumorale - Fondation ARC ». 2013. <https://sfpo.com/role-du-microenvironnement-dans-la-tumorigenese-et-la-progression-tumorale/> (4 juin 2024).
- van Rooij, Tom, Ilya Skachkov, Inés Beekers, Kirby R. Lattwein, Jason D. Voorneveld, Tom J. A. Kokhuis, Deep Bera, et al. 2016. « Viability of Endothelial Cells after Ultrasound-Mediated Sonoporation: Influence of Targeting, Oscillation, and Displacement of Microbubbles ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 238: 197-211. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.037.

- Roovers, Silke, Tim Segers, Guillaume Lajoinie, Joke Deprez, et Michel Versluis. 2019. « [260] The Role of Ultrasound-Driven Microbubble Dynamics in Drug Delivery: From Microbubble Fundamentals to Clinical Translation ». 35(31): 10173-91.
- Rousou, Charis, Josanne de Maar, Boning Qiu, Kim van der Wurff-Jacobs, Marika Ruponen, Arto Urtti, Sabrina Oliveira, et al. 2022. « The Effect of Microbubble-Assisted Ultrasound on Molecular Permeability across Cell Barriers ». *Pharmaceutics* 14(3): 494. doi:10.3390/pharmaceutics14030494.
- Rousseau, C., M. Le Thiec, V. Fleury, D. Rusu, A. Denis, M. Colombié, F. Kraeber-Bodéré, et J. F. Chatal. 2017. « Le cancer de prostate métastatique. Une cible : le PSMA – un traitement : la radioimmunothérapie ». *Médecine Nucléaire* 41(3): 228-31. doi:10.1016/j.med-nuc.2017.02.011.
- Rouyer, Magali, Stéphane Oudard, Florence Joly, Karim Fizazi, Florence Tubach, Jérémy Jove, Clémentine Lacueille, et al. 2019. « Overall and Progression-Free Survival with Cabazitaxel in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer in Routine Clinical Practice: The FUJI Cohort ». *British Journal of Cancer* 121(12): 1001-8. doi:10.1038/s41416-019-0611-6.
- Rozet, F. et al. 2020. « [68] Urofrance | Recommandations françaises du comité de cancérologie de l'AFU pour le cancer de la prostate : cancer de prostate métastatique hormono-sensible–actualisation 2020 - Urofrance ». <https://www.urofrance.org/recommandation/recommandations-francaises-du-comite-de-cancerologie-de-lafu-pour-le-cancer-de-la-prostate-cancer-de-prostate-metastatique-hormono-sensible-actualisation-2020/> (6 juin 2024).
- Rubin, M. A., M. Buyyounouski, E. Bagiella, S. Sharir, A. Neugut, M. Benson, A. de la Taille, et al. 1999. « Microvessel Density in Prostate Cancer: Lack of Correlation with Tumor Grade, Pathologic Stage, and Clinical Outcome ». *Urology* 53(3): 542-47. doi:10.1016/s0090-4295(98)00561-5.
- Ruigrok, Eline A. M., Wytke M. van Weerden, Julie Nonnekens, et Marion de Jong. 2019. « The Future of PSMA-Targeted Radionuclide Therapy: An Overview of Recent Preclinical Research ». *Pharmaceutics* 11(11): 560. doi:10.3390/pharmaceutics11110560.
- Salih, Suliman, Ajnas Alkatheeri, Wijdan Alomaim, et Aisyah Elliyanti. 2022. « Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges ». *Molecules* 27(16): 5231. doi:10.3390/molecules27165231.

- Saranyutanon, Sirin, Sanjeev Kumar Srivastava, Sachin Pai, Seema Singh, et Ajay Pratap Singh. 2019. « Therapies Targeted to Androgen Receptor Signaling Axis in Prostate Cancer: Progress, Challenges, and Hope ». *Cancers* 12(1): 51. doi:10.3390/cancers12010051.
- Sarkar, Chandrani, Sandeep Goswami, Sujit Basu, et Debanjan Chakroborty. 2020. « Angiogenesis Inhibition in Prostate Cancer: An Update ». *Cancers* 12(9): 2382. doi:10.3390/cancers12092382.
- Sartor, Oliver, Johann de Bono, Kim N. Chi, Karim Fizazi, Ken Herrmann, Kambiz Rahbar, Scott T. Tagawa, et al. 2021. « Lutetium-177–PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *New England Journal of Medicine* 385(12): 1091-1103. doi:10.1056/NEJMoa2107322.
- Sartori, David A., et Daniel W. Chan. 2014. « Biomarkers in prostate cancer: what's new? » *Current opinion in oncology* 26(3): 259-64. doi:10.1097/CCO.0000000000000065.
- Schottelius, Margret, Alexander Wurzer, Katharina Wissmiller, Roswitha Beck, Maximilian Koch, Dimitrios Gorpas, Johannes Notni, et al. 2019. « Synthesis and Preclinical Characterization of the PSMA-Targeted Hybrid Tracer PSMA-I&F for Nuclear and Fluorescence Imaging of Prostate Cancer ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 60(1): 71-78. doi:10.2967/jnumed.118.212720.
- Schreyer, Edwige, Philippe Barthélémy, Félicie Cottard, Pauline Ould Madi-Berthélémy, Frédérique Schaff-Wendling, Jean-Emmanuel Kurtz, et Jocelyn Céraline. 2017. « Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate ». *médecine/sciences* 33(8-9): 758-64. doi:10.1051/medsci/20173308021.
- Schultz, Christopher W., Gorka Ruiz de Garibay, Anika Langer, Ji-Bin Liu, Teena Dhir, Calum Leitch, Corinne E. Wessner, et al. 2021. « Selecting the Optimal Parameters for Sonoporation of Pancreatic Cancer in a Pre-Clinical Model ». *Cancer Biology & Therapy* 22(3): 204-15. doi:10.1080/15384047.2021.1881026.
- Scott, Robert, Cindy Neeley, et Joseph Granchelli. 2013. « Application Properties of Materials Used for Porous Membranes in Cell Culture Inserts ».
- Sgouros, George, Lisa Bodei, Michael R. McDevitt, et Jessie R. Nedrow. 2020. « Radiopharmaceutical Therapy in Cancer: Clinical Advances and Challenges ». *Nature Reviews Drug Discovery* 19(9): 589-608. doi:10.1038/s41573-020-0073-9.

- Shang, Yonggang, Dong Cui, et Shanhong Yi. 2014. « Opening Tight Junctions may be Key to Opening the Blood–Prostate Barrier ». *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 20: 2504-7. doi:10.12659/MSM.890902.
- Sharma, Deepa, Kai Xuan Leong, et Gregory J. Czarnota. 2022. « Application of Ultrasound Combined with Microbubbles for Cancer Therapy ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(8): 4393. doi:10.3390/ijms23084393.
- Sharma, Deepa, Kai Xuan Leong, Daniel Palhares, et Gregory J. Czarnota. 2023. « Radiation combined with ultrasound and microbubbles: A potential novel strategy for cancer treatment ». *Zeitschrift für Medizinische Physik* 33(3): 407-26. doi:10.1016/j.zemedi.2023.04.007.
- Shiner, Audrey, Rubens Copia Sperandio, Mahdi Naimi, et Urban Emmenegger. 2024. « Prostate Cancer Liver Metastasis: An Ominous Metastatic Site in Need of Distinct Management Strategies ». *Journal of Clinical Medicine* 13(3): 734. doi:10.3390/jcm13030734.
- Shore, N., L. Oliver, I. Shui, A. Gayle, O. Y. Wong, J. Kim, S. Payne, S. Amin, et S. Ghate. 2021. « [24] Systematic Literature Review of the Epidemiology of Advanced Prostate Cancer and Associated Homologous Recombination Repair Gene Alterations | Journal of Urology ». <https://www.aua-journals.org/doi/10.1097/JU.0000000000001570> (5 août 2024).
- Simons, Brian W., Norman F. Turtle, David H. Ulmert, Diane S. Abou, et Daniel L. J. Thorek. 2019. « PSMA Expression in the Hi-Myc Model; Extended Utility of a Representative Model of Prostate Adenocarcinoma for Biological Insight and as a Drug Discovery Tool ». *The Prostate* 79(6): 678-85. doi:10.1002/pros.23770.
- Singh, Amar B., Keisuke Sugimoto, Punita Dhawan, et Raymond C. Harris. 2007. « Juxtacrine Activation of EGFR Regulates Claudin Expression and Increases Transepithelial Resistance ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 293(5): C1660-1668. doi:10.1152/ajpcell.00274.2007.
- Ślusarczyk, Aleksander, Michael Baboudjian, Piotr Zapła, Takafumi Yanagisawa, Marcin Miszczyk, Marcin Chłosta, Paul Krumpoeck, et al. 2023. « Survival Outcomes of Patients Treated with Local Therapy for Nonmetastatic Prostate Cancer with High Prostate-Specific Antigen Concentrations ». *The Prostate* 83(15): 1504-15. doi:10.1002/pros.24609.
- Snipstad, Sofie, Sigurd Hanstad, Astrid Bjørkøy, Ýrr Mørch, et Catharina de Lange Davies. 2021. « Sonoporation Using Nanoparticle-Loaded Microbubbles Increases Cellular Uptake of Nanoparticles Compared to Co-Incubation of Nanoparticles and Microbubbles ». *Pharmaceutics* 13(5): 640. doi:10.3390/pharmaceutics13050640.

- Snipstad, Sofie, Ýrr Mørch, Einar Sulheim, Andreas Åslund, André Pedersen, Catharina de Lange Davies, Rune Hansen, et Sigrid Berg. 2021. « Sonopermeation Enhances Uptake and Therapeutic Effect of Free and Encapsulated Cabazitaxel ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 47(5): 1319-33. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2020.12.026.
- Soeda, Fumihiko, Tadashi Watabe, Sadahiro Naka, Yuwei Liu, Genki Horitsugi, Oliver C. Neels, Klaus Kopka, et al. 2019. « Impact of 18F-PSMA-1007 Uptake in Prostate Cancer Using Different Peptide Concentrations: Preclinical PET/CT Study on Mice ». *Journal of Nuclear Medicine* 60(11): 1594-99. doi:10.2967/jnumed.118.223479.
- Sonabend, Adam M., Andrew Gould, Christina Amidei, Rachel Ward, Karyn A. Schmidt, Daniel Y. Zhang, Cristal Gomez, et al. 2023. « Repeated Blood-Brain Barrier Opening with an Implantable Ultrasound Device for Delivery of Albumin-Bound Paclitaxel in Patients with Recurrent Glioblastoma: A Phase 1 Trial ». *The Lancet. Oncology* 24(5): 509-22. doi:10.1016/S1470-2045(23)00112-2.
- Sooriakumaran, P., et R. Kaba. 2005. « Angiogenesis and the tumour hypoxia response in prostate cancer: A review ». *International Journal of Surgery* 3(1): 61-67. doi:10.1016/j.ijssu.2005.03.013.
- Sorvina, Alexandra, Christie A. Bader, Chiara Caporale, Elizabeth A. Carter, Ian R.D. Johnson, Emma J. Parkinson-Lawrence, Peter V. Simpson, et al. 2018. « Lipid profiles of prostate cancer cells ». *Oncotarget* 9(85): 35541-52. doi:10.18632/oncotarget.26222.
- Soussan, M., J.-L. Galas, M.-J. Ouvrier, G. Pop, A. Neuman, et P. Weinmann. 2011. « [118] Impact clinique de la technique du temps-de-vol en TEP ». *Médecine Nucléaire* 35(7): 401-5. doi:10.1016/j.mednuc.2011.05.005.
- Srinivasan, Balaji, Aditya Reddy Kolli, Mandy Brigitte Esch, Hasan Erbil Abaci, Michael L. Shuler, et James J. Hickman. 2015. « TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems ». *Journal of laboratory automation* 20(2): 107-26. doi:10.1177/2211068214561025.
- Stokke, Caroline, Monika Kvassheim, et Johan Blakkisrud. 2022. « Radionuclides for Targeted Therapy: Physical Properties ». *Molecules* 27(17): 5429. doi:10.3390/molecules27175429.
- Tagawa, Scott T., Matthew I. Milowsky, Michael Morris, Shankar Vallabhajosula, Paul Christos, Naveed H. Akhtar, Joseph Osborne, et al. 2013. « Phase II Study of Lutetium-177-Labeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Monoclonal Antibody J591 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19(18): 5182-91. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0231.

- Tagawa, Scott T., Charlene Thomas, A. Oliver Sartor, Michael Sun, Judith Stangl-Kremser, Mahelia Bissassar, Shankar Vallabhajosula, et al. 2024. « Prostate-Specific Membrane Antigen–Targeting Alpha Emitter via Antibody Delivery for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Phase I Dose-Escalation Study of 225Ac-J591 ». *Journal of Clinical Oncology* 42(7): 842-51. doi:10.1200/JCO.23.00573.
- Tanter, Mickaël. 2019. « [168] Ultrasons biomédicaux · Inserm, La science pour la santé ». *Inserm*. <https://www.inserm.fr/dossier/ultrasons-biomedicaux/> (30 juin 2024).
- Tateishi, Ukihide. 2020. « Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-ligand positron emission tomography and radioligand therapy (RLT) of prostate cancer ». *Japanese journal of clinical oncology* 50. doi:10.1093/jjco/hyaa004.
- Telichko, Arsenii V., Huaijun Wang, Sunitha Bachawal, Sukumar U. Kumar, Jagathesh C. Bose, Ramasamy Paulmurugan, et Jeremy J. Dahl. 2021. « Therapeutic Ultrasound Parameter Optimization for Drug Delivery Applied to a Murine Model of Hepatocellular Carcinoma ». *Ultrasound in medicine & biology* 47(2): 309-22. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2020.09.009.
- Thomas, Alec Nelson, et Eleanor Stride. 2020. « An Indispensable Tool for Ultrasound Based Diagnostics and Therapies - Microbubbles: Invited Editorial ». *Journal of the Nuffield Department of Surgical Sciences* 1(3). doi:10.37707/jnds.v1i3.87.
- Thomas, Eloise, Jyothi U. Menon, Joshua Owen, Irini Skaripa-Koukelli, Sheena Wallington, Michael Gray, Christophoros Mannaris, et al. 2019. « Ultrasound-mediated cavitation enhances the delivery of an EGFR-targeting liposomal formulation designed for chemo-radionuclide therapy ». *Theranostics* 9(19): 5595-5609. doi:10.7150/thno.34669.
- Thomsen, Martin K., et Morten Busk. 2023. « Pre-Clinical Models to Study Human Prostate Cancer ». *Cancers* 15(17): 4212. doi:10.3390/cancers15174212.
- Townsend, DW. 2004. « Physical Principles and Technology of Clinical PET Imaging ». 33(2).
- Tranquart, F., T. Bettinger, et J. M. Hyvelin. 2014. « Ultrasound and Microbubbles for Treatment Purposes: Mechanisms and Results ». *Clinical and Translational Imaging* 2(1): 89-97. doi:10.1007/s40336-014-0052-4.
- Tw, Prior. « Exablate Neuro pour traiter le tremblement essentiel ».

- « Urofrance | Recommandations du comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie - actualisation 2022-2024 : cancer de la prostate - diagnostic et prise en charge de la maladie localisée - Urofrance ». <https://www.urofrance.org/recommandation/recommandations-du-comite-de-cancerologie-de-lassociation-francaise-durologie-actualisation-2022-2024-cancer-de-la-prostate-diagnostic-et-prise-en-charge-de-la-maladie-localise/> (7 août 2024).
- Van de Wiele, Christophe, Mike Sathekge, Bart de Spiegeleer, Pieter Jan De Jonghe, Philip R. Debruyne, Marleen Borms, Laurence Beels, et Alex Maes. 2020. « PSMA Expression on Neovasculation of Solid Tumors ». *Histology and Histopathology* 35(9): 919-27. doi:10.14670/HH-18-215.
- Vaquero, Juan José, et Paul Kinahan. 2015. « Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems ». *Annual review of biomedical engineering* 17: 385-414. doi:10.1146/annurev-bioeng-071114-040723.
- Vecchione, Andrea, Fedra Gottardo, Leonard Gomella, B Wildemore, Matteo Fassan, E Bragantini, F Pagano, et Raffaele Baffa. 2007. « Molecular genetics of prostate cancer: Clinical translational opportunities ». *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 26: 25-37.
- Verry, Camille, Sébastien Vincendeau, Marc Massetti, Martin Blachier, Alexandre Vimont, Marie-Laure Bazil, Pauline Bernardini, Ségolène Pettré, et Marc-Olivier Timsit. 2022. « Pattern of Clinical Progression Until Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: An Epidemiological Study from the European Prostate Cancer Registry ». *Targeted Oncology* 17(4): 441-51. doi:10.1007/s11523-022-00899-6.
- van Wamel, Annemieke, Ayache Bouakaz, Bert Bernard, Folkert ten Cate, et Nico de Jong. 2004. « Radionuclide Tumour Therapy with Ultrasound Contrast Microbubbles ». *Ultrasonics* 42(1-9): 903-6. doi:10.1016/j.ultras.2003.11.013.
- van Wamel, Annemieke, Klazina Kooiman, Miranda Harteveld, Marcia Emmer, Folkert J. ten Cate, Michel Versluis, et Nico de Jong. 2006. « Vibrating Microbubbles Poking Individual Cells: Drug Transfer into Cells via Sonoporation ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 112(2): 149-55. doi:10.1016/j.jconrel.2006.02.007.
- Wang, Liang. 2016. « Applications of Acoustic Radiation Force Impulse Quantification in Chronic Kidney Disease: A Review ».
- Wang, Yanjie, Yan Li, Kun Yan, Lin Shen, Wei Yang, Jifang Gong, et Ke Ding. 2018. « Clinical study of ultrasound and microbubbles for enhancing chemotherapeutic sensitivity of malignant tumors

- in digestive system - Chinese Journal of Cancer Research ». *Chinese Journal of Cancer Research*. https://www.cjcrcn.org/article/html_9832.html (18 août 2024).
- WANG, YU, WEN-KUN BAI, E. SHEN, et BING HU. 2013. « Sonoporation by low-frequency and low-power ultrasound enhances chemotherapeutic efficacy in prostate cancer cells in vitro ». *Oncology Letters* 6(2): 495-98. doi:10.3892/ol.2013.1389.
- WANG, YU, YI-NI CHEN, WEI ZHANG, YU YANG, WEN-KUN BAI, E SHEN, et BING HU. 2016. « Upregulation of ULK1 expression in PC-3 cells following tumor protein P53 transfection by sonoporation ». *Oncology Letters* 11(1): 699-704. doi:10.3892/ol.2015.3946.
- Wei, Jinlong, Bin Wang, Huanhuan Wang, Lingbin Meng, Qin Zhao, Xinyu Li, Ying Xin, et Xin Jiang. 2019. « Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019(1): 3010342. doi:10.1155/2019/3010342.
- Wei, Kuo-Chen. 2023. « CTNI-63. A PHASE IIA CLINICAL TRIAL FOR COMBINATION OF NAVIGATION-GUIDE FOCUSED ULTRASOUND AND BEVACIZUMAB FOR PATIENTS WITH RECURRENT GLIOBLASTOMA ». *Neuro-Oncology* 25(Supplement_5): v91. doi:10.1093/neuonc/noad179.0345.
- Wharton, Iain, Ian Rivens, Gail Ter Haar, David Gilderdale, David Collins, Jeff Hand, Promise Abel, et Nandita deSouza. 2007. « Design and development of a prototype endocavitary probe for high-intensity focused ultrasound delivery with integrated magnetic resonance imaging ». *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 25: 548-56. doi:10.1002/jmri.20833.
- White, Emily, Sara Myhre, Mary Rose Serafini, et al. 2024. « [213] Focused-Ultrasound-Foundation-State-of-the-Field-Report-2024_August-1.pdf ». https://cdn.fusfoundation.org/2024/08/05123918/Focused-Ultrasound-Foundation-State-of-the-Field-Report-2024_August-1.pdf (17 août 2024).
- Worsley, Catherine M., Rob B. Veale, et Elizabeth S. Mayne. 2022. « The Acidic Tumour Microenvironment: Manipulating the Immune Response to Elicit Escape ». *Human Immunology* 83(5): 399-408. doi:10.1016/j.humimm.2022.01.014.
- Wu, Jiacheng, Hao Ji, Tiantian Li, Haifeng Guo, HaiFei Xu, Jinfeng Zhu, Jiale Tian, et al. 2024. « Targeting the prostate tumor microenvironment by plant-derived natural products ». *Cellular Signalling* 115: 111011. doi:10.1016/j.cellsig.2023.111011.

- Xia, Haizhui, Decao Yang, Wei He, Xuehua Zhu, Ye Yan, Zenan Liu, Tong Liu, et al. 2021. « Ultrasound-mediated microbubbles cavitation enhanced chemotherapy of advanced prostate cancer by increasing the permeability of blood-prostate barrier ». *Translational Oncology* 14(10): 101177. doi:10.1016/j.tranon.2021.101177.
- Yeung, A.W.K. 2019. « The “As Low As Reasonably Achievable” (ALARA) principle: a brief historical overview and a bibliometric analysis of the most cited publications ». *Radioprotection* 54(2): 103-9.
- Yoon, Young Il, Tae-Jong Yoon, et Hak Jong Lee. 2015. « Optimization of Ultrasound Parameters for Microbubble-Nanoliposome Complex-Mediated Delivery ».
- Zafrani, L, et G Monneret. 2017. « Comprendre la cytométrie en flux ».
- Zeghimi, A., J. M. Escoffre, et A. Bouakaz. 2015. « Role of Endocytosis in Sonoporation-Mediated Membrane Permeabilization and Uptake of Small Molecules: A Electron Microscopy Study ». *Physical Biology* 12(6): 066007. doi:10.1088/1478-3975/12/6/066007.
- Zerbib, M, et P Beuzeboc. 2012. « [10] De la physiopathologie aux nouvelles approches thérapeutiques hormonales dans les cancers de prostate résistants à la castration ». https://e-memoire.academie-chirurgie.fr/ememoires/005_2012_11_1_056x059.pdf (5 août 2024).
- Zhang, Hanbo, Stella Koumna, Frédéric Pouliot, Jean-Mathieu Beauregard, et Michael Kolinsky. 2021. « PSMA Theranostics: Current Landscape and Future Outlook ». *Cancers* 13(16): 4023. doi:10.3390/cancers13164023.
- Zhang, Mingru, Weidong Yang, Fei Kang, et Jing Wang. 2024. « PET and optical dual-modality image-guided surgery in prostate cancer using 68Ga- PSMA-IRDye800CW | Journal of Nuclear Medicine ». https://jnm.snmjournals.org/content/65/supplement_2/241784 (12 novembre 2024).
- Zhang, Wei, Shu-liang Nan, Wen-kun Bai, et Bing Hu. 2022. « Low-Frequency Ultrasound Combined with Microbubbles Improves Gene Transfection in Prostate Cancer Cells in Vitro and in Vivo ». *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 18(1): 93-98. doi:10.1111/ajco.13521.
- Zhang-Yin, Jules. 2020. « [98] Nouveaux radio-pharmaceutiques pour imagerie moléculaire dans le cancer de la prostate ». Université de Sorbonne. <https://theses.hal.science/tel-03494318/document>.

- Zheng, Zhuangzhuang, Jing Su, Xueying Bao, Huanhuan Wang, Chenbin Bian, Qin Zhao, et Xin Jiang. 2023. « Mechanisms and Applications of Radiation-Induced Oxidative Stress in Regulating Cancer Immunotherapy ». *Frontiers in Immunology* 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1247268.
- Zhou, Biqiang, Qingshu Lian, Chunchun Jin, Jianghao Lu, Lifeng Xu, Xuehao Gong, et Peng Zhou. 2022. « Human clinical trial using diagnostic ultrasound and microbubbles to enhance neoadjuvant chemotherapy in HER2- negative breast cancer ». *Frontiers in Oncology* 12: 992774. doi:10.3389/fonc.2022.992774.
- Zhou, Haoxi, Yachao Liu, Xiaojun Zhang, Kuang Chen, Yuan Li, Xiaodan Xu, et Baixuan Xu. 2022. « A Preliminary Study of PSMA Fluorescent Probe for Targeted Fluorescence Imaging of Prostate Cancer ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 27(9): 2736. doi:10.3390/molecules27092736.
- Zhou, Y., K. Yang, J. Cui, J. Y. Ye, et C. X. Deng. 2012. « Controlled permeation of cell membrane by single bubble acoustic cavitation ». *Journal of Controlled Release* 157(1): 103-11. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.068.
- Zukotynski, Katherine, Hossein Jadvar, Jacek Capala, et Frederic Fahey. 2016. « Targeted Radionuclide Therapy: Practical Applications and Future Prospects ». *Biomarkers in Cancer* 8(Suppl 2): 35-38. doi:10.4137/BIC.S31804.