

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA), TAAM-UPS44 CNRS, Orléans

Centre d'Etudes et de Recherches Biologiques (CERB), Baugy

THÈSE présentée par :

Laura BRULLÉ

soutenue le : **24 mai 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Développement de stratégies d'imagerie multimodalités pour la pharmacologie des agents anticancéreux

THÈSE dirigée par :

Alain LE PAPE

Directeur de Recherche CNRS, CIPA-TAAM, Orléans

RAPPORTEURS :

Anne CHAUCHEREAU

Valérie TRICHET

Chargée de Recherche, Inserm UMR981, IGR, Villejuif
Maître de Conférences des Universités, LPRO, Inserm UMR957, Nantes

JURY

Jean-Michel POUVESLE

Directeur de Recherche CNRS, GREMI, Orléans
(Président du Jury)

Alain LE PAPE

Directeur de Recherche CNRS, CIPA-TAAM, Orléans

Anne CHAUCHEREAU

Chargée de Recherche, Inserm UMR981, IGR, Villejuif

Valérie TRICHET

Maître de conférences des Universités, LPRO, Inserm UMR957, Nantes

Claudine KIEDA

Directeur de Recherche CNRS, CBM, Orléans

Eric MARTEL

Directeur département pharmacologie, CERB, Baugy

Ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration entre

**Le Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA), TAAM UPS44
du CNRS à Orléans et**

Le Centre de Recherches Biologiques (CERB) à Baugy

**La troisième partie de mon travail de thèse a été réalisée en
collaboration avec le GREMI (Groupe de Recherche sur
l'Energétique des Milieux Ionisés), UMR 7344 CNRS Orléans,
dans le cadre du projet « Plasmed » soutenu par la Région Centre**

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Alain LE PAPE pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour son aide scientifique et pour la grande liberté qu'il a su me laisser dans la gestion de ce projet.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Serge RICHARD, Président Directeur Général du CERB et Pascal CHAMPEROUX, Directeur Recherche et Développement du CERB, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier Anne CHAUCHEREAU et Valérie TRICHET qui m'ont fait l'honneur de rapporter ce mémoire ainsi que Jean-Michel POUVESLE et Claudine KIEDA qui ont accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie particulièrement Stéphanie LERONDEL, responsable du CIPA pour m'avoir accueillie dans son service. Merci Stéphanie pour ta disponibilité et ton soutien, merci aussi pour le temps que tu as pris afin de corriger ma thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Eric MARTEL, directeur du département pharmacologie au CERB, pour m'avoir encadré au sein du CERB. Merci Eric pour votre disponibilité et votre écoute durant ces deux dernières années.

Je remercie aussi Anne MAURIN, pour son encadrement et en particulier pour les études de cast.

Je remercie mes collègues de « bureau » du service AQ du CERB, Nathalie, Timothé, Christine, Nicole, Romaric et Sylvie pour leur bonne humeur et leur disponibilité. Merci Nathalie et Christine pour vos prêts de marqueurs, ciseaux, agrafeuses...

Je remercie tout le personnel du CERB pour leur disponibilité et leur gentillesse. Merci aux Directeurs d'Etudes et en particulier Sébastien JUDÉ, pour m'avoir expliqué les subtilités du plan d'étude, du résumé et du rapport d'étude. Merci aux cadres Techniques, Nelly, Manu, Delphine et tous les autres pour votre aide. Merci aux techniciens et en particulier à Jérôme, pour sa grande rigueur, pour avoir entretenu mes cellules lors de mes absences et pour son aide lors des inductions orthotopiques. Merci aussi à Emilie, pour son œil aiguisé lors des autopsies et à Aurélia pour les casts. Je remercie aussi les zootechniciens qui ont pris soin de mes animaux, merci Magalie pour ta bonne volonté et ton aide. Enfin je remercie le personnel de la maintenance, Daniel, Yves pour leur grande disponibilité et pour tous les « petits travaux » qu'ils ont réalisé et qui ont contribué à l'amélioration de mes résultats.

Comment ne pas remercier Corinne ROUBINET, sans qui mon intégration au CERB n'aurait pu être pas été la même. Merci Corinne pour tout. Merci pour ta gentillesse, ton soutien et grâce à toi RS1 et Latex n'ont plus aucun secret pour moi.

Je tiens maintenant à remercier mes collègues du CIPA qui m'ont beaucoup appris sur l'imagerie et avec qui j'ai passé 3 superbes années ...

Marilyne merci pour ta rigueur et ta bonne humeur, travailler avec toi a été un réel plaisir. Même pour les manips de dernière minute, tu as su faire preuve d'une grande adaptabilité. Stéphanie R., la « maman » du CIPA, merci pour ta gentillesse et ton écoute, je n'oublierai pas tes conseils et recommandations en radioprotection.... Julien, ou pour les Cipasiens « Poupy », merci pour ton aide dans les manips, et ton calme à toute épreuve.

Je remercie Sabrina et Guillaume, les thésards de « première génération ». Merci Sabrina pour ta disponibilité et le partage de tes connaissances en imagerie et plus particulièrement pour m'avoir appris les ficelles de la biolum et de la quantification 3D en TEMP et merci pour les examens d'espèces originales... Guillaume, merci de m'avoir transmis certaines de tes connaissances du scanner, et d'avoir contribué au développement des protocoles d'acquisitions de mes échantillons de cast. Merci pour ta bonne humeur à chaque instant.

Marc, on est arrivé ensemble et on termine pratiquement ensemble, merci pour les bons moments de rigolades et pour tes idées de manips toujours aussi farfelues les unes que les autres. Je me souviendrai de nos excursions à Paris pour les formations et congrès, car on en a passé des heures à attendre dans le train Orléans-Paris...

J'exprime toute ma reconnaissance à l'équipe du GREMI, pour m'avoir permis de tester le plasma gun sur le modèle de cancer du pancréas. Jean-Michel et Eric, je vous remercie de votre confiance et de votre soutien. Vanessa, merci pour ta disponibilité et ton aide lors de certains traitements. Delphine, après de longues heures passées à traiter les cellules et surtout les souris, tu es devenue une pro de la surveillance respiratoire, merci, je te souhaite de réussir dans tes projets.

Je tiens particulièrement à remercier le CEMTHI, nos voisins et en particulier Isidro Da Silva et Thierry Sauvage pour m'avoir fourni le ^{64}Cu . Je remercie aussi tout le personnel, toujours disponible pour me scier, poncer et percer des pièces.

Je remercie le Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, Bouchra RAHBI et le docteur Claudine KIEDA pour m'avoir permis de réaliser les immunomarquages et David GOSSET, responsable technique du service cytométrie pour avoir pris le temps d'imager mes lames en microscopie.

Je remercie Jérôme VICENTE, du laboratoire IUSTI de Marseille pour avoir mis à notre disposition le logiciel iMorph et avoir fait preuve d'une grande patience pour les explications nécessaires à son installation et son utilisation.

Mes derniers remerciements vont à tous ceux qui me sont chers, ma famille et mes amis qui me soutiennent depuis toutes ces années. Moussa, merci de ta patience, d'être toujours là et de me supporter chaque jour. Mon frère merci de ta présence depuis toutes ces années, je te souhaite tout le meilleur. Et bien sûr, je ne peux que remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix et sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, papa maman, merci !

Table des matières

Introduction générale	24
1. IMAGERIE PRÉCLINIQUE ET CANCÉROLOGIE EXPÉRIMENTALE	29
1.1. Les modalités d'imagerie du petit animal	29
1.1.1. Les modalités d'imagerie issues de la médecine	29
1.1.1.1. La Tomodensitométrie X	30
1.1.1.1.1. Principe de formation de l'image	31
1.1.1.1.2. Constitution d'un scanner X	31
1.1.1.1.3. Acquisition et reconstruction de l'image	33
1.1.1.2. L'imagerie nucléaire	35
1.1.1.2.1. La Tomographie d'Emission MonoPhotonique	36
1.1.1.2.2. La Tomographie par Emission de Positons	43
1.1.1.3. Imagerie par Résonance Magnétique	46
1.1.1.3.1. Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique	46
1.1.1.3.2. Les séquences spécifiques	47
1.1.1.3.3. Les agents de contrastes	49
1.1.1.3.4. Autres applications de la résonance magnétique nucléaire	50
1.1.1.4. Imagerie ultrasonore	51
1.1.1.4.1. Échographie	52
1.1.1.4.2. Doppler	53
1.1.2. Développements spécifiques pour l'imagerie du petit animal	54
1.1.2.1. La bioluminescence	54
1.1.2.1.1. Mécanismes chimiques conduisant à la bioluminescence	55
1.1.2.1.2. Acquisition et quantification d'images en bioluminescence	56
1.1.2.1.3. Applications en cancérologie	58
1.1.2.1.4. Avancées technologiques : la bioluminescence 3D	60
1.1.2.1.5. Les limites de la bioluminescence	60
1.1.2.2. L'imagerie de fluorescence	61
1.1.2.2.1. Principe de la fluorescence	62
1.1.2.2.2. Contraintes de l'imagerie de fluorescence in vivo	63
1.1.2.2.3. Propriétés des fluorochromes	65
1.1.2.2.4. Les modalités d'imagerie de fluorescence in vivo	66
1.1.2.2.5. Les avancées technologiques en fluorescence	67
1.1.2.2.6. Les sondes fluorescentes : intérêt pour la recherche en cancérologie	69

1.1.2.3.	Optoacoustique	72
1.1.2.3.1.	Les agents de contrastes exogènes	73
1.1.2.3.2.	Les applications biomédicales	74
1.2.	Quelques grands aspects physiopathologiques du cancer et possibilités d'exploration par imagerie	75
1.2.1.	Angiogenèse	75
1.2.1.1.	Architecture des vaisseaux tumoraux	76
1.2.1.1.1.	L'arborescence vasculaire	76
1.2.1.1.2.	Les mécanismes de formation de la vascularisation	78
1.2.1.2.	Thérapie anti-angiogénique	80
1.2.1.3.	Imagerie de la vascularisation et de l'angiogenèse	84
1.2.1.3.1.	Imagerie anatomique	84
1.2.1.3.2.	Imagerie fonctionnelle	86
1.2.2.	Mort cellulaire et apoptose	88
1.2.2.1.	Généralités	88
1.2.2.1.1.	La nécrose	88
1.2.2.1.2.	L'apoptose	88
1.2.2.2.	Régulation de l'apoptose et cancer	91
1.2.2.3.	Imagerie de l'apoptose	93
1.2.2.3.1.	Imagerie <i>via</i> activation des caspases	93
1.2.2.3.2.	Ciblage des phosphatidylsérines : intérêt de l'Annexine 5	95
1.2.3.	Hypoxie tumorale	97
1.2.3.1.	Mécanisme moléculaire de l'hypoxie	97
1.2.3.2.	Hypoxie tumorale comme cible thérapeutique	99
1.2.3.3.	Evaluation de l'hypoxie tumorale par imagerie	100
1.2.3.3.1.	Imagerie de l'hypoxie en imagerie par résonance magnétique	100
1.2.3.3.2.	Imagerie de l'hypoxie en résonance paramagnétique électronique	100
1.2.3.3.3.	Imagerie moléculaire de l'hypoxie	101
1.2.3.3.4.	Imagerie de l'hypoxie en optoacoustique	105
2.	DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES ANIMAUX	107
2.1.	Intérêt des modèles animaux et limites	107
2.1.1.	Greffes sous cutanées	109
2.1.2.	Greffes orthotopiques	110
2.2.	Le modèle orthotopique de carcinome colorectal HCT116-luc2	111
2.2.1.	Etude bibliographique	112

2.2.1.1.	Le cancer du colon	112
2.2.1.2.	Les traitements	112
2.2.1.2.1.	Les chimiothérapies	114
2.2.1.2.2.	Les thérapies ciblées par anticorps monoclonaux	119
2.2.2.	Matériels et méthodes	121
2.2.2.1.	Les cellules HCT116-luc2	121
2.2.2.2.	Animaux et conditions d'hébergement	122
2.2.2.3.	Induction tumorale	123
2.2.2.4.	Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence	124
2.2.2.5.	Traitement au 5-fluorouracile	124
2.2.2.6.	Nécropsie	125
2.2.3.	Résultats	126
2.2.3.1.	Mise au point du modèle	126
2.2.3.2.	Evaluation de la toxicité du 5-fluorouracile	127
2.2.3.3.	Effet du 5-fluorouracile sur l'évolution tumorale	127
2.2.4.	Discussion	130
2.3.	Modèle orthotopique de carcinome pancréatique MIA Paca2-luc	133
2.3.1.	Etude bibliographique	133
2.3.1.1.	Le cancer du pancréas	133
2.3.1.2.	Les traitements de référence	134
2.3.2.	Matériels et méthodes	137
2.3.2.1.	Les cellules MIA PaCa2	137
2.3.2.1.1.	Transduction des cellules MIA PaCa2-luc	138
2.3.2.1.2.	Impact de la transduction sur les cellules MIA PaCa2	139
2.3.2.2.	Animaux et induction orthotopique des cellules MIA PaCa2-luc	141
2.3.2.3.	Traitement à la Gemcitabine	142
2.3.2.4.	Imagerie de bioluminescence	143
2.3.2.5.	Imagerie de fluorescence de l'expression des intégrines : mime RGD-Cy5.5	144
2.3.2.6.	Imagerie de l'hypoxie : ⁶⁴ Cu-ATSM	144
2.3.2.7.	Imagerie par Tomographie d'Emission de positons	145
2.3.2.8.	Euthanasie et nécropsie	145
2.3.2.9.	Histologie conventionnelle : coloration Hématoxiline Eosine Safran	145
2.3.2.10.	Expression de la luciférase : immunomarquage anti-luciférase	146
2.3.2.11.	Caractérisation histochimique de l'hypoxie par marquage au pimonidazole	147
2.3.3.	Résultats	148
2.3.3.1.	Impact de la transduction sur les cellules MIA PaCa2	148
2.3.3.1.1.	Vérification de la transduction des cellules MIA PaCa2	148
2.3.3.1.2.	Impact de la transduction sur la croissance cellulaire <i>in vitro</i>	149

2.3.3.1.3.	Impact de la transduction sur la sensibilité vis-à-vis d'une chimiothérapie <i>in vitro</i>	150
2.3.3.1.4.	Impact de la transduction des cellules MIA PaCa2 sur la croissance tumorale <i>in vivo</i>	151
2.3.3.2.	Croissance tumorale après induction orthotopique des cellules MIA PaCa2-luc	151
2.3.3.2.1.	Contrôle de la prise de greffe	151
2.3.3.2.2.	Evaluation de la croissance tumorale au cours du temps	153
2.3.3.3.	Détermination de l'origine de la perte du signal de bioluminescence	154
2.3.3.3.1.	Expression des intégrines	155
2.3.3.3.2.	Présence de stroma tumoral	156
2.3.3.3.3.	Expression du gène de la luciférase	156
2.3.3.3.4.	Caractérisation du statut hypoxique des tumeurs	157
2.3.3.4.	Etude d'efficacité avec un traitement de référence, la Gemcitabine	162
2.3.3.4.1.	Détermination de la concentration inhibitrice 50 (CI50) de la gemcitabine <i>in vitro</i> par bioluminescence	162
2.3.3.4.2.	Effet de la gemcitabine sur la croissance tumorale	162
2.3.4.	Discussion	164

3. DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE : LE PLASMA GUN 168

3.1.	Etude bibliographique	168
3.1.1.	Le plasma	168
3.1.1.1.	Les différentes formes de plasma	169
3.1.1.2.	Le plasma froid	170
3.1.1.3.	Plasma fibré : plasma gun	172
3.1.2.	Applications biomédicales des plasmas froids	173
3.1.2.1.	Utilisation des plasmas froids pour la stérilisation	174
3.1.2.2.	Effet des plasmas sur la coagulation	176
3.1.2.3.	Effets des plasmas sur la cicatrisation	177
3.1.2.4.	Utilisations des plasmas froid dans le domaine de la cancérologie	178
3.1.3.	Intérêt du plasma gun en cancérologie par rapport à d'autres modalités thérapeutiques locorégionales	180
3.1.3.1.	Photothérapie dynamique	180
3.1.3.1.1.	Importance de la source lumineuse	181
3.1.3.1.2.	Les principaux photosensibilisants utilisés	182
3.1.3.1.3.	Mécanisme d'action de la photothérapie dynamique	182
3.1.3.1.4.	Effets secondaires de la photothérapie dynamique	183
3.1.3.2.	Traitement des tumeurs par radiofréquence	184
3.1.3.2.1.	Principe du traitement localisé par radiofréquences	184

3.1.3.2.2.	Effets secondaires du traitement par radiofréquence	185
3.2.	Matériels et méthodes	186
3.2.1.	Le plasma gun	186
3.2.2.	Conditions de culture des cellules MIA PaCa2-luc	188
3.2.3.	Induction tumorale et animaux	188
3.2.4.	Traitement au plasma gun	188
3.2.4.1.	Traitement <i>in vitro</i>	188
3.2.4.2.	Traitement <i>in vivo</i>	189
3.2.5.	Traitement par bithérapie plasma gun/gemcitabine	191
3.2.5.1.	Traitement <i>in vitro</i>	191
3.2.5.2.	Traitement <i>in vivo</i>	191
3.2.6.	Imagerie de bioluminescence	193
3.2.6.1.	Imagerie <i>in vitro</i>	193
3.2.6.2.	Imagerie <i>in vivo</i>	193
3.2.7.	Analyse de la fonction pancréatique	194
3.2.7.1.	Mesure de la glycémie	194
3.2.7.2.	Détermination des taux de lipases et amylases plasmatiques	194
3.2.8.	Nécropsie	195
3.3.	Résultats	195
3.3.1.	Effets du plasma gun sur la croissance <i>in vitro</i> de cellules tumorales MIA PaCa2-luc	195
3.3.1.1.	Influence des caractéristiques du plasma	195
3.3.1.1.1.	Impact du flux de gaz	195
3.3.1.1.2.	Effet selon la nature du gaz	197
3.3.1.1.3.	Impact de la fréquence de traitement	198
3.3.1.2.	Effet d'une combinaison plasma gun/gemcitabine	199
3.3.2.	Effets du plasma gun <i>in vivo</i>	201
3.3.2.1.	Effet antitumoral du plasma gun selon la nature du gaz utilisé	201
3.3.2.2.	Effet du traitement et du geste chirurgical sur la fonction pancréatique	203
3.3.2.2.1.	Impact sur le taux de glycémie	203
3.3.2.2.2.	Impact sur les taux de lipase et amylase	203
3.3.2.3.	Effet d'une association plasma gun / gemcitabine sur l'inhibition de la croissance tumorale	204
3.4.	Discussion	207
4.	AUTRES DÉVELOPPEMENTS D'INTÉRÊT POUR L'IMAGERIE EN CANCÉROLOGIE EXPÉRIMENTALE	211

4.1. Modèle de métastases osseuses PC3M-lucC6	211
4.1.1. Etude bibliographique	212
4.1.1.1. Le cancer de la prostate	212
4.1.1.2. Les métastases osseuses	212
4.1.1.2.1. Les métastases osseuses ostéolytiques	214
4.1.1.2.2. Les métastases osseuses ostéocondensantes	216
4.1.2. Matériels et méthodes	217
4.1.2.1. Les cellules PC3M-lucC6	217
4.1.2.2. Induction tumorale et animaux	217
4.1.2.2.1. La voie intra-osseuse	218
4.1.2.2.2. La voie intracardiaque	218
4.1.2.3. Mesure de la pression ventriculaire	219
4.1.2.4. Imagerie de bioluminescence	220
4.1.2.5. Marquage des cellules PC3M-lucC6 à l' ¹¹¹ In	220
4.1.2.6. Radiomarquage du MDP au ^{99m} Tc	221
4.1.2.7. Imagerie scintigraphique	221
4.1.2.8. Imagerie par tomodensitométrie X à haute résolution	222
4.1.2.9. Quantification des lésions observées par Tomodensitométrie X	222
4.1.3. Résultats	223
4.1.3.1. Correspondance entre onde de pression mesurée et ventricule injecté	223
4.1.3.2. Etude de la domiciliation cellulaire après injection intracardiaque	225
4.1.3.3. Suivi de la dissémination métastatique par imagerie	227
4.1.3.3.1. La voie intra-osseuse	227
4.1.3.3.2. La voie intra-cardiaque	229
4.1.4. Discussion	233
4.2. Imagerie à haute résolution de la vascularisation	236
4.2.1. Etude bibliographique	236
4.2.1.1. Casting de la vascularisation	236
4.2.1.2. Effet d'un traitement à la dexaméthasone sur l'architecture vasculaire	237
4.2.2. Matériels et méthodes	238
4.2.2.1. Animaux et induction tumorale	238
4.2.2.2. Traitement à la dexaméthasone	238
4.2.2.3. Formulation de la résine	239
4.2.2.4. Méthode de casting de la vascularisation	239
4.2.2.5. Acquisitions et quantifications par tomodensitométrie X	240
4.2.2.5.1. Les protocoles d'acquisition	240
4.2.2.5.2. Traitement de l'image et quantification	241
4.2.3. Résultats	243

4.2.3.1.	Choix du protocole d'acquisition	243
4.2.3.2.	Détermination de la reproductibilité des acquisitions	244
4.2.3.3.	Imagerie de la vascularisation à proximité de l'os	246
4.2.3.4.	Evaluation des effets d'un traitement sur la vascularisation tumorale	248
4.2.4.	Discussion	250
Discussion générale		253
Références bibliographiques		261
Annexes		285

Liste des abréviations

5-FU	5-Fluorouracile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMM	Autorisation de Mise sur la Marché
AMP	Adénosine Monophosphate
ARM	Angiographie par Résonance Magnétique
ARN	Acide Ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
ATSM	Diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
BOLD	Blood Oxygen Level-Dependant
Caspase	CysteinyI Aspartyl Proteases
CCD	Charge Coupled Device
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CE	Cellules Endothéliales
CI50	Concentration Inhibitrice 50
CPT11	CamPtoThécine
CT	Computed Tomography
DAPI	4',6'-Diamidino-2-PhénylIndole
DBD	Décharge à Barrière Diélectrique
DEVD	Aspartate-Glutamate-Valine-Aspartate
DL50	Dose Létale 50
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DOTA	1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-Tetraacetic Acid
DPD	DihydroPyrimidine Deshydrogénase
DTPA	DiethyleneTriaminePentaAcetic acid
EAE	Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ET-1	Endothéline-1
FAZA	FluoroAZomycine-Arabinoside
FDG	Fluoro-Désoxy-Glucose
FETMIN	Fluoroazomycine-arabinoside
FHR	Fast High Resolution
FITC	Fluoresceine IsoThioCyanate
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
FLICA	Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases
F-MISO	FluoroMISOndazole
FMT	Fluorescence Molecular Tomography
GEM	Gemcitabine
GLUT	Glucose Transporteur
Hb	Hémoglobine
HEPA	High Efficiency Particulate Air
HES	Hématoxiline Eosine Safran
HIF	Hypoxia Inducible Factor

HRE	Hypoxia Response Elements
HYNIC	HYdrazino NICotinamide
IAZA	IodoAZomycin-Arabinoside
IgG	ImmunoGlobuline
INCa	Institut National du Cancer
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MBP	Myelin Basic Protein
MDP	Méthylène Di-Phosphonate
MDR	Multidrug Resistance
MEC	Matrice Extracellulaire
MEM	Minimum Essential Medium
MMP	Matrix Métalloprotéinases
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium
NaITl	Iodure de sodium activé au Thalium
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PTD	Photothérapie Dynamique
PGE2	Prostaglandine E2
PHD	Prolyl Hydroxylase Domain
PTSM	Pyruvaldehyde-bis (N4-methylThioSeMicarbazone)
PZT	Titano-Zirconate de Plomb
RGD	Arginine - Glycine - Acide Aspartique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SE	Spin Echo

SEM	Standard Error of the Mean
SNC	Système Nerveux Central
SO₂	Saturation en Oxygène de l'hémoglobine
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
SVF	Sérum de Veau Fœtal
^{99m}Tc	Technétium 99 métastable
TDM	Tomodensitométrie
TEMP	Tomographie d'Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie d'Emission de Positons
TGF	Transforming Growth Factor
TI	Temps d'Inversion
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRITC	Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate
TTP	Thymidine Triphosphate
UFT	Tegafur-Uracile
UH	Unité Hounsfield
UV	Ultra Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel-Lindau

Liste des figures

Figure 1 : Echelle Hounsfield	30
Figure 2 : Principe du scanner X	31
Figure 3 : Principe de l'acquisition hélicoïdale	32
Figure 4 : Les principaux radioisotopes utilisés en imagerie nucléaire	35
Figure 5 : Emission d'un photon Gamma après remaniement nucléaire	37
Figure 6 : Principe de fonctionnement d'une gamma caméra d'Anger	38
Figure 7 : Principe de la TEMP/TDM	39
Figure 8 : Schémas illustrant deux types de collimation en imagerie TEMP du petit animal	39
Figure 9 : Acquisition avec collimateurs multi-pinholes multiplexés	40
Figure 10 : Liaison des biphosphonates à l'os	41
Figure 11 : Liaison et effets des biphosphonates	42
Figure 12 : Structure du complexe ^{99m} Tc-Biphosphonates	43
Figure 13 : Désintégration du positon et réaction d'annihilation	44
Figure 14 : Tomographe à Emission de Positons	45
Figure 15 : Principe de la résonnance magnétique nucléaire	46
Figure 16: Temps de relaxation T1 et T2 en IRM	47
Figure 17 : Principe d'acquisition en échographie	52
Figure 18 : Effet Doppler	53
Figure 19 : Réaction de bioluminescence (Système de la luciole)	55
Figure 20 : Système d'acquisition en bioluminescence Ivis Lumina II®	57
Figure 21 : Principe du transfert de charge	58
Figure 22 : Acquisition et reconstruction avec le PhotonIMAGER™	60
Figure 23 : Diagramme de Jablonski	62
Figure 24 : Coefficients d'absorption de différents tissus biologiques	64
Figure 25 : Autofluorescence des tissus et fluides biologiques en fonction	64
Figure 26 : Modalités d'imagerie de fluorescence	66
Figure 27 : Système de tomographie moléculaire de fluorescence	68
Figure 28 : Principe d'une sonde fluorescente activable	69
Figure 29 : Principe de l'optoacoustique	73
Figure 30 : Les 6 caractéristiques que les cellules cancéreuses prennent	75
Figure 31 : Artère de moyen calibre et ses trois tuniques : intima, média, adventice	77
Figure 32 : Représentation schématique des systèmes vasculaires	77
Figure 33 : Mécanismes de formation des vaisseaux	78
Figure 34 : Les différentes cibles des traitements anti-angiogéniques	81
Figure 35 : Représentation schématique d'une intégrine avec ses domaines α et β	82

Figure 36 : Stratégies de ciblage des cellules endothéliales et non endothéliales	84
Figure 37 : Différence entre les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques	89
Figure 38 : les différentes voies conduisant à l'apoptose	90
Figure 39 : Impact de différentes classes de molécules sur la régulation de l'apoptose	92
Figure 40 : Principe de l'imagerie de l'apoptose <i>in vivo</i> grâce à la Z-DEVD-aminoluciférine	94
Figure 41 : Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 et gènes activés transcriptionnellement par HIF-1	98
Figure 42 : Mécanisme de rétention du ¹⁸ F-MISO au niveau des tissus hypoxiques	102
Figure 43 : Mécanisme d'action impliqué dans l'absorption et la rétention sélective du Cu-ATSM en conditions hypoxiques	104
Figure 44 : Les stades du cancer colorectal	113
Figure 45 : Formules chimiques du 5-FU et de ses analogues	114
Figure 46 : Métabolisme du 5-Fluorouracile	115
Figure 47 : Prodrogues du 5-Fluorouracile.	116
Figure 48 : Structure chimique du Cis-platine et de l'Oxaliplatine	117
Figure 49 : Formule chimique de la camptothécine et de l'irinotécan	118
Figure 50 : Formule chimique du raltitrexed et de l'acide folique	118
Figure 51 : Mécanismes des principales thérapies ciblées	119
Figure 52 : Mode d'action du Bevacizumab	120
Figure 53 : Mode d'action du Cetuximab	121
Figure 54 : Mise en place du modèle de carcinome colorectal par greffe de fragment	123
Figure 55 : Schéma expérimental du traitement au 5-FU	125
Figure 56 : Prolifération tumorale après greffe de fragment HCT 116-luc sur le caecum	126
Figure 57 : Bioluminescence à J1, avant traitement au 5-FU	127
Figure 58 : Prolifération tumorale chez une souris témoin	128
Figure 59 : Prolifération tumorale chez une souris traitée au 5-FU à 20 mg/kg	128
Figure 60 : Prolifération tumorale chez une souris traitée au 5-FU à 60 mg/kg	128
Figure 61 : Effet du 5-FU sur la croissance tumorale	129
Figure 62 : Bioluminescence <i>ex vivo</i> des organes présentant des nodules	129
Figure 63 : Anatomie du pancréas chez l'homme	134
Figure 64 : Formule chimique de la gemcitabine et de son analogue nucléosidique, la déoxycytidine	135
Figure 65 : Métabolisme et mécanisme cellulaire de la Gemcitabine	135
Figure 66 : Méthode de transduction des cellules MIA PaCa2	138
Figure 67 : Plaque 24 puits imagée par bioluminescence 24h après traitement à la gemcitabine	140
Figure 68 : Photographie (A) et schéma (B) indiquant les vaisseaux	141
Figure 69 : Injection de cellules au niveau du pancréas	142
Figure 70 : Schéma thérapeutique	143
Figure 71 : Principe de l'immunomarquage avec l'anticorps anti-luciférase	146

Figure 72 : Transformation du pimonidazole en situation hypoxique ou normoxique	147
Figure 73 : Principe de l'immunomarquage avec l'anticorps anti-pimonidazole	148
Figure 74 : Cellules MIA PaCa2-luc visualisées au microscope	148
Figure 75 : Mesure de l'activité de la luciférase par spectrophotométrie	149
Figure 76 : Comparaison de la croissance des cellules MIA PaCa2 transduites ou non par le gène de la luciférase	149
Figure 77 : Viabilité cellulaire en fonction de la concentration de gemcitabine	150
Figure 78 : Volume tumoral des souris à J36	151
Figure 79 : Bioluminescence à J3, avant traitement à la gemcitabine.	152
Figure 80 : Suivi de l'évolution de la tumeur primaire par bioluminescence	153
Figure 81 : Localisation des métastases <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> à J50	153
Figure 82 : Perte du signal de bioluminescence chez des animaux du groupe contrôle	154
Figure 83 : Imagerie de bioluminescence et de fluorescence d'une souris greffée en orthotopique par des cellules MIA PaCa2-luc (J43)	155
Figure 84 : Coloration HES d'une coupe de tumeur MIA PaCa2-luc	156
Figure 85 : Immunomarquage avec anticorps anti-luciférase	156
Figure 86 : Imagerie de bioluminescence de souris porteuses de tumeurs sous cutanées MIA PaCa2-luc (J43)	158
Figure 87 : Autoradiographie de la chromatographie sur couche mince	158
Figure 88 : Imagerie TEP, 3h après injection de ⁶⁴ Cu-ATSM	159
Figure 89 : Visualisation de zones hypoxiques sur coupe de tumeur	161
Figure 90 : Courbe de survie après traitement à la gemcitabine	162
Figure 91 : Evolution tumorale après traitement à la gemcitabine	163
Figure 92 : Volume et masse de la tumeur primaire le jour de l'autopsie (J36)	164
Figure 93 : le plasma, 4 ^e état de la matière	169
Figure 94 : Composition du plasma	171
Figure 95 : Comparaison entre gaz et plasma	171
Figure 96 : Place du plasma gun parmi les différents plasmas froids	173
Figure 97 : Zone de décharges et de post-décharges au niveau d'un système de stérilisation par plasma	175
Figure 98 : Principe de la photothérapie dynamique	181
Figure 99 : Relation entre longueur d'onde et pénétration tissulaire	181
Figure 100 : Mécanisme d'action de la photothérapie dynamique sur les tumeurs	183
Figure 101 : Principe du traitement local des tumeurs par radiofréquence	185
Figure 102 : Schéma du dispositif expérimental	186
Figure 103 : Photographie du dispositif expérimental	187
Figure 104 : Jet de plasma dans l'air	187
Figure 105 : plasma gun	188
Figure 106 : Traitement <i>in vitro</i> des cellules en plaque 24 puits	189

Figure 107 : Schéma thérapeutique du traitement au plasma gun hélium ou néon	190
Figure 108 : Traitement de la tumeur primaire au niveau du pancréas	190
Figure 109 : Schéma thérapeutique du traitement au plasma gun et à la gemcitabine	192
Figure 110 : Imagerie de bioluminescence après traitement des cellules MIA PaCa2-luc au plasma gun durant différents temps	193
Figure 111 : Traitement durant 2 minutes à différents flux de gaz hélium	196
Figure 112 : Traitement durant 2 min ou 4 min à différent flux de gaz néon	197
Figure 113 : Effet sur l'inhibition de la croissance cellulaire d'un traitement au plasma gun généré à partir de 2 gaz différents, le néon et l'hélium	198
Figure 114 : Effet de la fréquence d'un traitement au plasma gun hélium	199
Figure 115 : Comparaison plasma seul et plasma en association à la gemcitabine	200
Figure 116 : Evolution tumorale après traitement au plasma gun Hélium ou Néon	201
Figure 117 : Volume de la tumeur primaire le jour de l'autopsie (J36)	202
Figure 118 : Impact de la chirurgie et du traitement au plasma gun sur le taux de glycémie	203
Figure 119 : Impact de l'acte chirurgical sur la sécrétion de lipase (A) et amylase (B)	204
Figure 120 : Comparaison de l'effet d'un traitement au plasma gun seul ou en association à la gemcitabine	205
Figure 121 : Evolution du volume tumoral	206
Figure 122 : Masse tumorale le jour de l'autopsie (J36)	206
Figure 123 : Principe de la dissémination métastatique	214
Figure 124 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement	215
Figure 125 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'une métastase ostéocondensante	216
Figure 126 : Imagerie X planaire du positionnement de l'aiguille	218
Figure 127 : Courbe de pression ventriculaire, auriculaire et aortique	219
Figure 128 : Mesure de la pression ventriculaire par implantation d'un cathéter en intracardiaque	220
Figure 129 : Méthode de quantification des lésions osseuses	223
Figure 130 : Validation de l'injection intracardiaque : confrontation de l'imagerie scintigraphique aux mesures de pression	224
Figure 131 : Domiciliation pulmonaire (emboles) après injection dans le ventricule droit de cellules PC3 marquée à l' ¹¹¹ In	225
Figure 132 : Domiciliation cellulaire systémique (10 min post injection) puis essentiellement hépatique après injection dans le ventricule gauche de cellules PC3 marquée à l' ¹¹¹ In	225
Figure 133 : Domiciliation après injection dans le ventricule gauche d' ¹¹¹ In libre	226
Figure 134 : Evolution tumorale après injection de cellules PC3M-luc en intra-tibial	227
Figure 135 : Visualisation des lésions osseuses par scanner X à J21	228
Figure 136 : Visualisation des lésions osseuses par scanner X à J32	228

Figure 137 : Comparaison de l'évolution du volume osseux du tibia porteur d'une lésion osseuse par rapport au volume osseux du tibia contrôle	229
Figure 138 : Evolution de la dissémination métastatique après injection de cellules PC3M-lucC6 en intracardiaque dans le ventricule gauche	230
Figure 139 : Evolution de la dissémination métastatique après injection de cellules PC3M-lucC6 en intracardiaque dans le ventricule gauche	230
Figure 140 : Les différentes métastases osseuses observées après induction intracardiaque	231
Figure 141 : Imagerie TEMP couplée au scanner X 1h après injection de ^{99m} Tc-MDP à différents stades de la pathologie	232
Figure 142 : injection de la résine	240
Figure 143 : Détermination du seuil de binarisation	242
Figure 144 : Binarisation d'une image	242
Figure 145 : Cast de reins de rat	244
Figure 146 : Répartition des vaisseaux en pourcentage selon leurs diamètres	245
Figure 147 : Comparaison de la répartition des vaisseaux des deux reins	246
Figure 148 : Coupe transversale de colonne de rat en niveaux de gris, avant et après décalcification (seuillages identiques)	247
Figure 149 : Colonne vertébrale de rat castée, avant et après décalcification.	247
Figure 150 : Evolution du volume tumoral avec ou sans traitement à la dexaméthasone	248
Figure 151 : Visualisation de l'impact d'un traitement à la dexaméthasone	249
Figure 152 : Répartition des vaisseaux tumoraux en pourcentage selon 3 classes de diamètres	250

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux organismes bioluminescents	56
Tableau 2 : Principaux fluorochromes utilisés pour l'imagerie <i>in vivo</i>	66
Tableau 3 : Principales sondes fluorescents commercialement disponibles pour l'imagerie <i>in vivo</i> (adapté de la documentation Perkin Elmer)	71
Tableau 4 : Pathologies associés à des dérèglements du processus apoptotique	91
Tableau 5 : Les traitements utilisés en clinique pour le traitement du cancer du colon	113
Tableau 6 : Activités mesurées au niveau des régions tumorales et témoins, corrigées de la décroissance du ^{64}Cu	160
Tableau 7 : Protocoles d'acquisition créés pour le cast	241
Tableau 8 : Répartition des vaisseaux selon 3 classes de diamètres	245

Introduction générale

De la découverte d'une nouvelle molécule d'intérêt thérapeutique jusqu'à l'autorisation de mise sur le marché du médicament, le processus de recherche et développement est long et couteux. Ce processus nécessite une succession d'études scientifiques qui ont pour but de connaître le plus précisément possible le profil d'efficacité et de tolérance du futur médicament. Avant d'estimer l'efficacité d'une nouvelle molécule chez l'homme, une étape indispensable est la phase préclinique, qui consiste à évaluer *in vivo* (dans des systèmes vivants), le comportement du « candidat médicament ». A ce stade, il est primordial de disposer de modèles animaux représentatifs de pathologies humaines ainsi que d'outils performants pour leur suivi afin d'évaluer au mieux son activité, et l'un de ces outils est l'imagerie.

Les méthodes classiques de suivi longitudinal *in vivo* nécessitent le sacrifice régulier de groupes d'animaux, impliquant donc l'utilisation de grands effectifs. L'intérêt des méthodes d'imagerie pré-clinique, pour la plupart issues des modalités d'imagerie médicale, est l'amélioration du suivi de la pathologie au cours du temps et de l'action des thérapeutiques chez le même animal, et cela de façon totalement non invasive. La puissance statistique de l'étude est ainsi renforcée et le nombre d'animaux nécessaire peut être réduit en accord avec les règles éthiques de l'expérimentation animale (règle des 3R : Raffiner, Réduire, Remplacer).

A ce jour, l'imagerie *in vivo* chez le petit animal est en plein essor et présente un intérêt reconnu dans les domaines de la recherche biomédicale et du développement de nouveaux médicaments.

Les applications de l'imagerie du petit animal sont principalement :

- La compréhension des mécanismes de développement d'une pathologie.
- L'activité et l'efficacité biologique d'une nouvelle molécule.
- L'étude et l'évaluation spécifique de la sécurité et de la toxicité de nouvelles thérapies.

Par ailleurs, les modalités d'imagerie du petit animal étant pour la plupart issues de la clinique, elles vont permettre d'explorer les paramètres par les mêmes méthodologies et la même démarche intellectuelle que chez l'homme, et ainsi s'inscrire dans le cadre de la « recherche translationnelle ». Ce type de démarche vise à accélérer l'innovation et le passage en clinique des nouvelles thérapies.

Un des grands axes de développements thérapeutiques est la cancérologie. En effet, le cancer est la première cause de mortalité dans le monde avec chaque année plus de 12 millions de nouveaux cas et 7,6 millions de décès (données OMS, 2008) soit 13% de la mortalité mondiale. Malgré des efforts de dépistage, il est encore parfois difficile d'établir un diagnostic précoce. Les thérapies actuelles entraînent souvent des effets secondaires et des mécanismes de résistance. La recherche biomédicale doit donc apporter de nouvelles solutions diagnostiques et thérapeutiques afin de limiter la mortalité et d'améliorer la spécificité des traitements. Dans ce contexte, l'imagerie pré-clinique en oncologie présente tout son intérêt.

En effet, les avantages de l'imagerie *in vivo* en cancérologie sont nombreux. Elle permet notamment d'évaluer des paramètres inaccessibles par les méthodes conventionnelles, comme par exemple le volume d'une tumeur implantée dans un organe profond de l'animal, tels que les poumons, le cerveau, le pancréas (Bouvet and Hoffman, 2009, Dinca, et al., 2010, Fushiki, et al., 2009, Snyder, et al., 2009) : d'étudier la biodistribution au sein de l'organisme de molécules ou de cellules tumorales préalablement marquées (Mordant, et al., 2011, Serwer, et al., 2011) ; ou encore d'obtenir des informations supplémentaires permettant l'identification des mécanismes à l'origine de l'activité des nouveaux agents anticancéreux, tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés lors de ces études. L'imagerie est donc essentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en oncologie.

L'objectif de cette thèse a été de développer et de caractériser différents modèles expérimentaux de cancer chez le petit animal et d'évaluer les effets de thérapies grâce à plusieurs modalités d'imagerie. Les techniques mises en œuvre ont été l'imagerie optique (bioluminescence et fluorescence), la Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP), la Tomographie d'Emission de Positons (TEP) et la Tomodensitométrie X (TDM X). Ces techniques ainsi que leurs applications seront détaillées dans la première partie de ce mémoire.

Le développement de modèles orthotopiques de cancer fera l'objet de la seconde partie :

- Un modèle d'adénocarcinome colorectal, HCT116-luc, induit au niveau du colon et permettant de générer des métastases a été mis au point. L'évolution tumorale de ce modèle ainsi que l'effet d'un traitement au 5-fluorouracile (traitement de référence dans le traitement du cancer colorectal chez l'homme) ont été étudiés par imagerie de bioluminescence.

- Un modèle orthotopique d'adénocarcinome pancréatique par injection de cellules MIA PaCa2-luc a été validé. L'évolution tumorale ainsi que la réponse à un traitement de référence, la Gemcitabine ont été évalués par imagerie de bioluminescence. Certains paramètres permettant de caractériser la physiologie de la tumeur ont été déterminés par imagerie TEP.

Dans une troisième partie nous présenterons l'évaluation d'une nouvelle thérapie ciblée, par plasma (gaz ionisé) fibré, sur le modèle orthotopique de carcinome pancréatique MIA Paca-luc.

Enfin, dans la quatrième partie sera détaillé le développement de nouveaux outils pour l'optimisation et la caractérisation de modèles ainsi que pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques par imagerie *in vivo* et *ex vivo*, en nous appuyant sur :

- Un modèle de métastases osseuses obtenu par injection de cellules de carcinome prostatique PC3M-luc soit directement au niveau de l'os, soit en intracardiaque par injection de cellules au niveau du ventricule gauche. Nous présenterons notamment comment la mesure de pression intraventriculaire permet d'optimiser l'administration intracardiaque de cellules. L'évolution tumorale de ce modèle a été ensuite évaluée par imagerie de bioluminescence et par TDM, la caractérisation de la nature ostéolytique des cellules PC3M-luc étant effectuée par imagerie TEMP.
- Le développement d'une technique permettant une imagerie *ex vivo* à haute résolution de la vascularisation. Cette technique dite de « casting de la vascularisation », plus simplement appelée Cast, permet de reconstruire l'architecture tridimensionnelle des vaisseaux afin d'étudier par TDM l'effet de certaines molécules ou pathologies sur la vascularisation de manière quantitative et avec une grande sensibilité.

Chapitre 1

Imagerie préclinique et cancérologie expérimentale

1. Imagerie préclinique et cancérologie expérimentale

1.1. Les modalités d'imagerie du petit animal

Historiquement, pour les études précliniques, le suivi longitudinal des effets de nouvelles thérapies nécessitaient le sacrifice régulier de groupes d'animaux. Aujourd'hui, les méthodes d'imagerie précliniques pour la plupart issues des modalités d'imagerie médicale facilitent le suivi de la pathologie au cours du temps et améliorent la connaissance en permettant d'obtenir des informations sur les modes d'action des traitements.

Afin d'utiliser les modalités d'imagerie clinique chez le petit animal et de réaliser des images de sensibilité et de résolution comparativement du même ordre de grandeur que celles obtenues chez l'homme, mais pour des animaux de taille 100 fois plus petite, des ruptures technologiques ont été nécessaires.

Par ailleurs, de nouvelles modalités spécialement développées pour l'imagerie préclinique sont apparues et permettent de s'affranchir de certaines contraintes pour leur exploitation, comme par exemple l'utilisation de la radioactivité, et autorisent une imagerie à plus haut débit, tout en permettant d'accéder à des informations de type moléculaire ou d'expression génique.

Ce chapitre fait l'état des lieux des modalités d'imagerie disponibles à ce jour pour le petit animal avec leurs principaux avantages et limitations.

1.1.1. Les modalités d'imagerie issues de la médecine

En imagerie, on distingue les modalités d'imageries anatomiques, telles que le scanner X ou l'IRM, et les modalités d'imagerie fonctionnelles et moléculaires comme la Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) et la Tomographie d'Emission de Positons (TEP)

Nous présenterons dans un premier temps les imageries mises en œuvre au cours de ce travail de thèse (TDM X, TEMP, PET) puis ferons un bref descriptif des autres modalités disponibles pour l'exploration des modèles animaux (IRM, Ultrasons).

1.1.1.1. La Tomodensitométrie X

La Tomodensitométrie X (TDM) appelée aussi scanner X, a été inventée par GN Hounsfield et AM Cormack au début des années 70. Elle est couramment utilisée chez l'homme et consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus puis, par traitement informatique, à numériser et enfin reconstruire des structures anatomiques.

L'acquisition des données emploie la technique d'analyse tomographique ou "par coupes", en soumettant l'échantillon au balayage d'un faisceau de rayons X.

L'image radiographique résulte de la différence d'atténuation des rayons X dans les différents milieux traversés. Chaque tissu a son coefficient d'absorption propre qui dépend de la densité du tissu et de l'énergie du faisceau de rayons X le traversant.

L'ordinateur attribue à chaque pixel d'image une valeur d'échelle de gris proportionnelle à l'absorption des rayons X par le volume corporel correspondant. La densité mesurée en unités Hounsfield (UH) va de -1000 pour l'air à +1000 pour l'os dense cortical, en passant par -50 pour la graisse et 0 pour l'eau (figure 1).

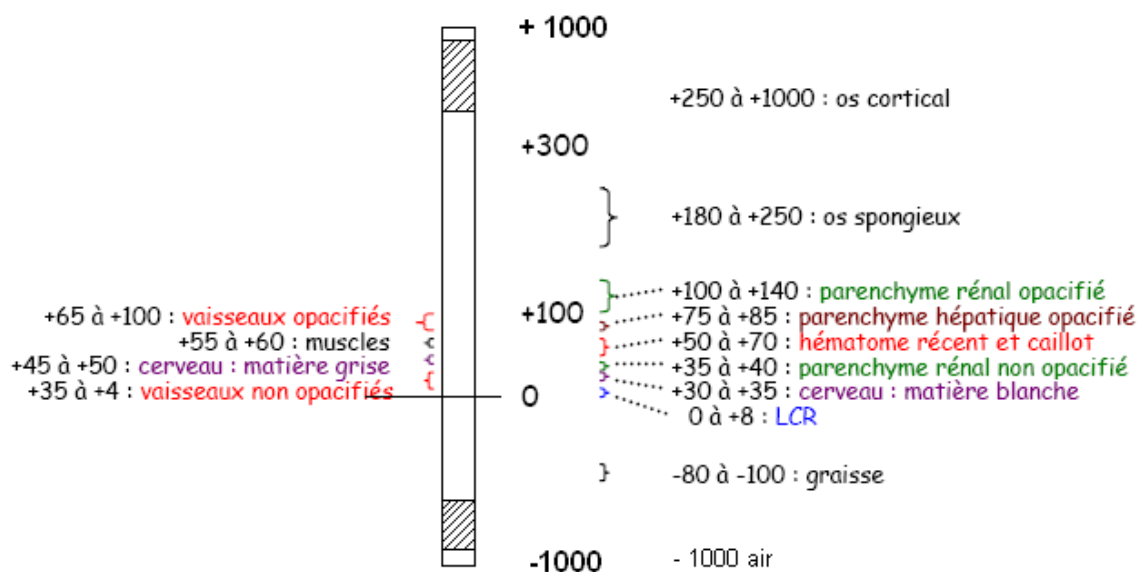


Figure 1 : Echelle Hounsfield

1.1.1.1.1. Principe de formation de l'image

Le scanner est une chaîne radiologique composée d'un générateur, d'un tube à rayons X et d'un ensemble de détecteurs disposés en couronne (figure 2).

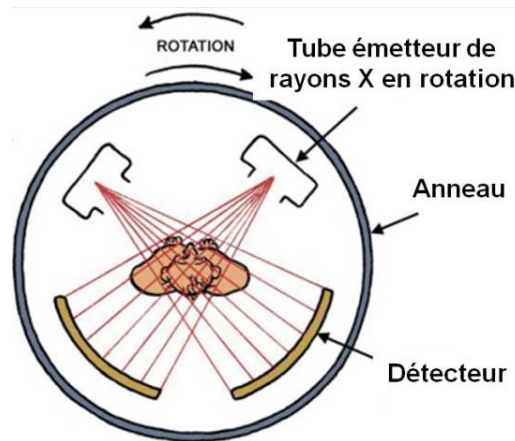


Figure 2 : Principe du scanner X

Une partie du rayonnement incident qui entre en contact avec le corps est absorbée par les tissus traversés. Le rayonnement qui a traversé est ensuite capté par les détecteurs électroniques qui tournent en même temps que le tube à rayons X.

Les détecteurs électroniques recueillent donc le rayonnement résiduel après traversée de l'organe à explorer et, par comparaison avec un rayonnement témoin, mesurent l'atténuation des rayons X. Les détecteurs convertissent les signaux des rayons X en signaux électroniques eux-mêmes convertis en informations numériques exploitables par les logiciels de l'ordinateur.

1.1.1.1.2. Constitution d'un scanner X

Les éléments de base nécessaires au fonctionnement du scanner X sont retrouvés au niveau du statif et de la chaîne radiologique.

Le statif

Le statif est composé de deux ensembles mobiles et solidaires, le tube et les détecteurs qui vont se déplacer autour du patient. Plusieurs générations de statifs se sont succédées.

La dernière génération a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives en tomodensitométrie et consiste en une rotation continue associée à une acquisition hélicoïdale caractérisée par la rotation continue du couple tube/détecteurs autour du lit d'examen qui se déplace à vitesse constante durant l'acquisition. Le tube à rayons X réalise ainsi un déplacement en hélice, décrivant un cylindre (figure 3).

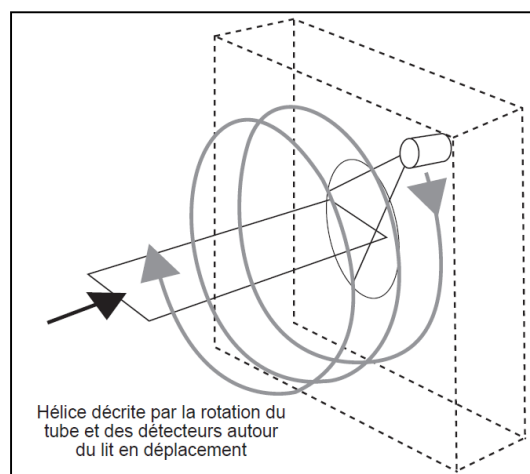


Figure 3 : Principe de l'acquisition hélicoïdale

(Boyer et al. 2003)

Les avantages de ce scanner sont qu'il permet de générer un plus grand nombre de coupes en un temps plus court et de générer des coupes jointives, ce qui permet d'obtenir une reconstruction en 3D de meilleure qualité. Le principal inconvénient de cette méthode est la dose absorbée qui est plus importante, ce qui peut être gênant pour des études de cancérologie. En effet, dans le cas de tumeurs radiosensibles, la dose administrée à la tumeur lors de l'imagerie X peut, à elle seule, avoir un impact sur la prolifération tumorale (Kersemans, et al., 2011).

La chaîne radiologique

- **Le générateur de rayons X :** Le générateur alimente le tube à rayons X et délivre une haute tension continue ainsi qu'une intensité constante.

- **Le tube** : il génère les rayons X suite à l'application d'une haute tension électrique entre deux électrodes qui produit un courant d'électrons de la cathode vers l'anode. Les électrons, freinés par les atomes de la cible, provoquent un rayonnement continu de freinage dont une partie du spectre est dans le domaine des rayons X. Parmi les tubes on distingue les tubes à cathode froide et les tubes à cathode chaude, ces derniers étant les plus utilisés et entrent eux-mêmes dans la composition des tubes à anode tournante qui permettent d'obtenir des intensités de rayons X plus importantes.
- **Filtration et collimation** : la filtration et la collimation vont permettre la mise en forme du faisceau de rayons X.
- **Les détecteurs** : les détecteurs transforment les photons X en signal électrique. On distingue 2 types de détecteurs : les chambres d'ionisation au Xénon et les détecteurs solides qui équipent les systèmes récents. Dans ce cas, les photons X sont absorbés par un scintillateur puis convertis en photons lumineux eux-mêmes convertis en signal électrique par une matrice de photodiodes.

1.1.1.1.3. Acquisition et reconstruction de l'image

En Tomodensitométrie le choix des paramètres d'acquisition (Binning, voltage, temps exposition....) influence directement la qualité de l'image. Selon le but recherché, il est nécessaire de trouver des compromis pour obtenir une qualité d'image optimale sans perturber l'état physiologique ou, dans notre cas, la croissance tumorale. Les principaux paramètres modifiés selon les acquisitions sont les suivants :

- **Tension et intensité**: la modulation de ces paramètres vise à améliorer le compromis entre qualité d'image et irradiation et à diminuer le bruit de fond. Plus on augmente la tension, plus les rayons X sont énergétiques et donc traversant. L'intensité influence le nombre de rayons X émis par unité de temps, plus l'intensité est élevée plus la quantité de signal détectée est grande ce qui améliore la précision de la mesure (augmente la statistique de comptage) ainsi que le contraste de l'image mais augmente d'autant la dose délivrée à l'animal.
- **Binning** : c'est le processus d'addition de la valeur des voxels adjacents pour produire un nouveau pixel de plus grande dimension, il est parfois appelé « regroupement de pixels ». Cette technique permet d'améliorer le rapport

signal/bruit mais dégrade la résolution. En principe, le bruit est dispersé dans une image de manière uniforme, mais le signal est concentré dans des zones spécifiques.

- **Temps d'exposition** : le temps d'exposition joue sur la qualité des images ; plus le temps d'exposition est grand, plus le signal recueilli est important et donc meilleure est l'image. Ce paramètre est évidemment lié à la dose d'irradiation délivrée au patient, le temps d'exposition devant donc être choisi le plus faible possible et compatible avec l'obtention d'une image exploitable.
- **Gain** : il correspond à la tension en volt appliquée au détecteur, plus le gain augmente, plus la sensibilité est améliorée mais plus le bruit augmente aussi.
- **Nombre de projections** : le fait d'augmenter le nombre de projection permet d'augmenter le nombre de mesures ce qui réduit le bruit de fond. Toutefois, l'augmentation de cette valeur signifie un temps d'acquisition plus long.
- **Frame average (projection moyennée)**: permet de réduire le bruit de fond, en réalisant une moyenne de plusieurs projections acquises sous le même angle de vue.

La tomodensitométrie X est une méthode relativement simple et rapide à mettre en œuvre pour obtenir des images avec une bonne résolution (<100 μm en routine). Compte tenu de cette résolution, il est parfois nécessaire de synchroniser l'acquisition sur des paramètres biologiques (électrocardiogramme, mouvement de la cage thoracique...) afin de s'affranchir du flou physiologique lié aux battements cardiaques et à la respiration.

Mais, de part l'émission de rayons X, les examens ne peuvent être répétés trop souvent et la dose délivrée doit être contrôlée.

L'imagerie par tomodensitométrie X qui permet d'obtenir des images anatomiques est souvent associée aux imageries métaboliques et fonctionnelles (TEP/TDM, SPECT/TDM) en tant que bimodalité de repérage anatomique.

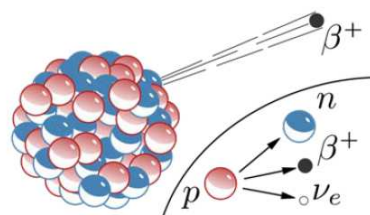
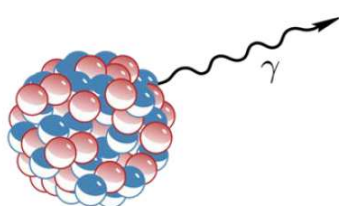
1.1.1.2. L'imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire regroupe les modalités d'imagerie qui mettent en œuvre des radio-isotopes utilisés pour marquer une molécule ou un système biologique et suivre son devenir *in vivo*.

L'utilisation de radio-isotopes en médecine a débuté rapidement après la découverte de la radioactivité par Becquerel en 1896. Dès 1913, du radium était injecté par voie intraveineuse afin de traiter diverses pathologies. Les premières études utilisant des radiotraceurs chez l'animal ont débuté en 1924 (de Hevesy, 1950) et permettaient d'améliorer la compréhension des processus métaboliques. Toutefois, l'essor de l'imagerie nucléaire commença véritablement avec le développement de la gamma caméra d'Anger (Anger, 1952), des cyclotrons (Mitchell, 1946) et des radioisotopes artificiels comme le technétium.

Les deux principales techniques d'imagerie nucléaire sont : la Tomographie par Emission de Positons (TEP) lorsque l'isotope utilisé émet des positons, et la scintigraphie planaire ou la Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) lorsque l'isotope utilisé émet des photons gamma (figure 4).

L'imagerie nucléaire permet de réaliser, grâce à l'utilisation de radiotraceurs, une imagerie fonctionnelle quantitative apportant des informations relatives à l'activité métabolique ou moléculaire d'un organe/tissu étudié.



Emetteur gamma	Energie principale (keV) + abondance (%)	Demi-vie
^{99m}Tc	140 (88)	6,02 heures
^{123}I	159 (83)	13,2 heures
^{111}In	171 (90) 245 (94)	2,8 jours

Emetteur positon	Energie max du positon (MeV)	Demi-vie
^{18}F	0,64	110 min
^{11}C	0,96	20,4 min
^{64}Cu	0,65	12,7 h

Figure 4 : Les principaux radioisotopes utilisés en imagerie nucléaire

Les radiotraceurs utilisés peuvent être soit des atomes seuls, soit des traceurs (molécules simples, médicaments, cellules, hormones ou anticorps) marquées avec un atome radioactif. Ces radioisotopes doivent pouvoir se fixer chimiquement sur leur cible sans en altérer ses propriétés.

Le choix de l'isotope radioactif se fait sur plusieurs critères :

- La nature de son rayonnement, selon que l'on veut réaliser une imagerie TEP ou TEMP.
- La demi-vie de l'isotope doit être suffisamment longue pour permettre le suivi du processus biologique mais suffisamment courte pour ne pas irradier le patient inutilement.
- L'énergie des photons gamma doit être suffisamment élevée pour qu'ils puissent traverser l'organisme afin d'être détectés mais pas trop forte pour permettre une interaction efficace avec les détecteurs ; une haute sensibilité de détection permettant la mise en œuvre de doses réduites de radioactivité.

1.1.1.2.1. La Tomographie d'Emission MonoPhotonique

La Tomographie d'Emission MonoPhotonique (TEMP) appelée SPECT en anglais (Single Photon Emission Computed Tomography) a été décrite pour la première fois par Ronald J. Jaszczak (Jaszczak, et al., 1976). C'est une technique d'imagerie médicale nucléaire tomographique basée sur le même principe que la scintigraphie planaire mais permettant de réaliser des images tridimensionnelles.

La TEMP utilise des isotopes qui se désintègrent en émettant directement un photon γ qui sera recueilli par une gamma-caméra (figure 5).

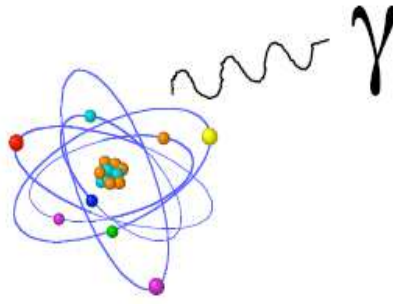


Figure 5 : Emission d'un photon Gamma après remaniement nucléaire

Dispositif d'acquisition et de reconstruction

La gamma caméra est l'élément principal du dispositif d'acquisition. Elle permet de détecter et de comptabiliser les photons gamma émis par le radiotraceur dans l'organisme, de recueillir et de stocker des informations relatives à ces photons (position, énergie). A partir de ces données l'algorithme de reconstruction pourra déterminer la localisation des sources d'émission.

La gamma caméra est constituée des éléments suivants (figure 6) :

- **Le collimateur** : il sert à sélectionner les photons γ arrivant selon une incidence particulière. Réalisé dans un matériau absorbant comme le plomb ou le tungstène, il peut être parallèle, convergent/divergent ou pinhole. L'avantage du collimateur parallèle est qu'il permet de conserver une bonne sensibilité alors que le pinhole permet d'améliorer la résolution au détriment de la sensibilité.
- **Le cristal scintillant** : il permet de transformer l'énergie déposée par les photons incidents en énergie lumineuse via un effet photoélectrique. Il est en général constitué d'iodure de sodium activé au Thallium (NaITl).
- **Les photomultiplicateurs** : ils détectent les photons incidents émis par le cristal scintillant et transfèrent les données à l'ordinateur.

L'image finale représente ainsi l'accumulation des photons détectés en chaque point de la gamma caméra.

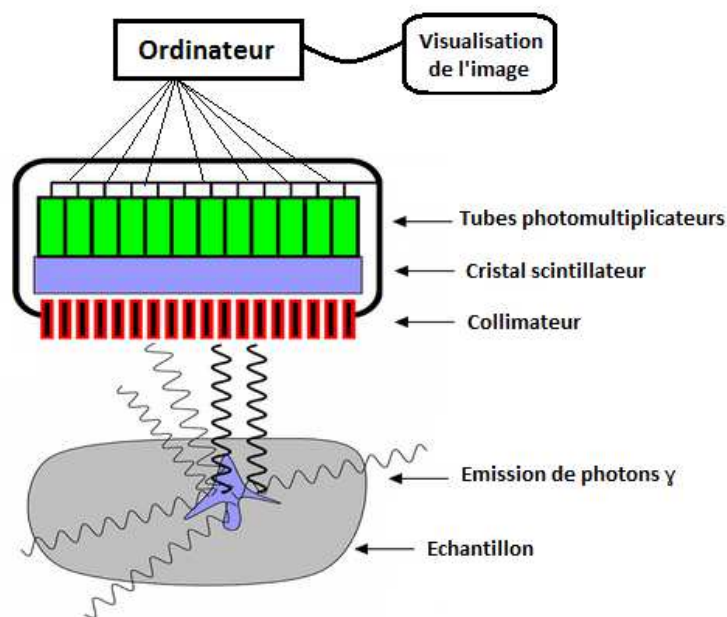


Figure 6 : Principe de fonctionnement d'une gamma caméra d'Anger

(Source: JM Lina et C. Laporte)

Des appareils de Tomographie d'Emission MonoPhotonique spécialement dédiés au petit animal ont été développés. Il s'agit en général de systèmes constitués de plusieurs détecteurs qui tournent autour de l'animal et peuvent être couplés à un scanner X ce qui va permettre de donner des informations supplémentaires, notamment anatomiques, et permettre une meilleure localisation des foyers visualisés en TEMP.

Ces nouveaux appareils permettent de réaliser des images avec une résolution effective inférieure au millimètre. Afin d'obtenir une telle résolution, la multiplication des détecteurs n'était pas suffisante. Une rupture technologique, basée sur l'utilisation de collimateurs multi-pinholes multiplexés, a permis d'augmenter cette résolution tout en conservant la sensibilité. (système NanoSPECT Bioscan Inc, (figure 7)).

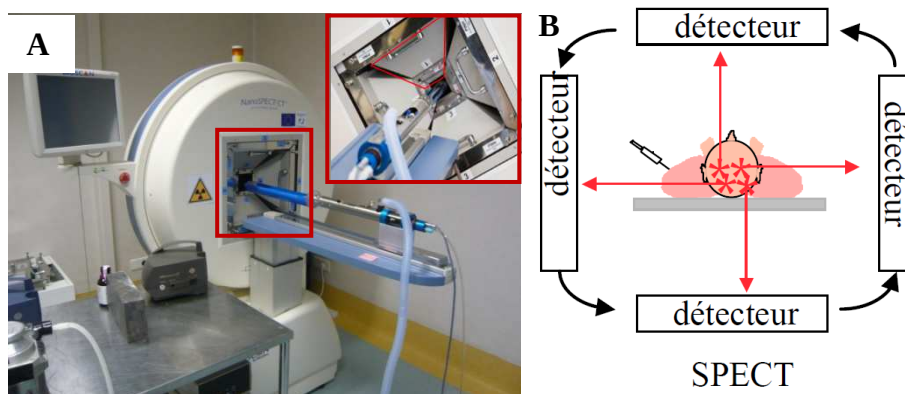


Figure 7 : Principe de la TEMP/TDM

A : NanoSPECT/CT (Bioscan) ; B : positionnement des détecteurs (Buvat, 2006)

En effet, pour chaque collimateur (4 pour la NanoSPECT) on obtient autant d'images haute résolution qu'il y a de pinholes mais elles sont partiellement superposées (9 par collimateurs pour la nanoSPECT).

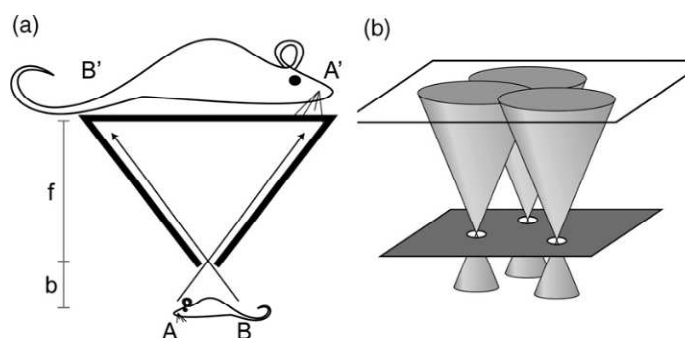


Figure 8 : Schémas illustrant deux types de collimation en imagerie TEMP du petit animal

a) collimateur pinhole simple ; b) collimateur multi-pinhole plan avec recouvrement partiel de projections. (Constantinesco, 2007)

A la fin de l'acquisition, les images vont subir une déconvolution afin d'obtenir des images non superposées qui pourront alors être additionnées pour restaurer la sensibilité finale (figure 9).

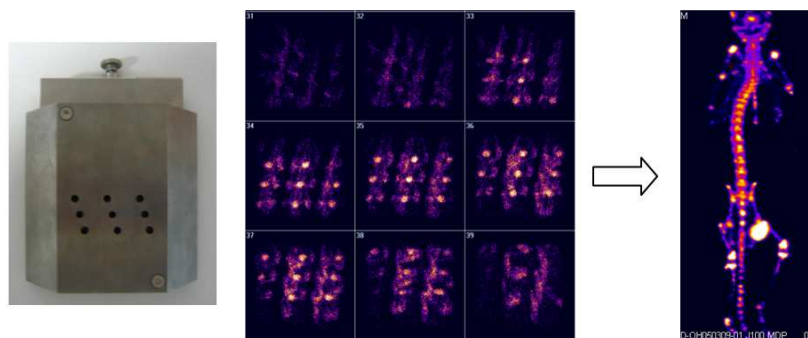


Figure 9 : Acquisition avec collimateurs multi-pinholes multiplexés

A gauche un collimateur avec 9 multipinholes, au centre visualisation en cours d'acquisition et à droite résultat final après déconvolution

Grâce à cette technologie, la résolution des images réalisées en TEMP peut aller, selon les collimateurs utilisés, jusqu'à 0,43 mm.

Les émetteurs gamma

En TEMP, l'isotope le plus utilisé est le Technétium 99 métastable noté ^{99m}Tc . Le ^{99m}Tc a une demi-vie courte de 6,02 heures, une énergie de 140 keV (bien adaptée à la détection par un cristal d'iodure de sodium) et émet 98% de rayonnements gamma. Sa demi-vie assez courte ainsi que l'absence de raies d'émission secondaires permettent de limiter la dose délivrée aux patients.

Le ^{99m}Tc peut être produit facilement sous forme de pertechnétate de sodium ($\text{Na}^+\text{TcO}_4^-$) à partir de générateurs de molybdène ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) : la désintégration β^- du Molybdène 99 donne du Technétium 99m qui se trouve dans un état excité métastable.

D'autres isotopes peuvent être utilisés comme par exemple l'Indium 111 noté ^{111}In dont la demi-vie est plus longue (2,8 jours) ce qui permet de réaliser un suivi ou une étude cinétique sur des temps beaucoup plus longs (~ 1 semaine).

Exemple d'application : Imagerie de la balance ostéolyse/ostéogénèse

L'exploration scintigraphique du squelette utilise comme traceurs des biphosphonates marqués au Technétium 99m tels que le méthylène di-phosphonate (MDP). L'utilisation de MDP pour l'imagerie osseuse a été décrite pour la première fois dans les années 1970 (Subramanian, et al., 1975).

- **Mécanisme de fixation des biphosphonates au niveau de l'os**

Les biphosphonates sont très utilisés aussi bien pour l'imagerie du squelette que pour le traitement des pertes osseuses. Ces molécules vont réduire le remodelage osseux en se liant à la surface minéralisée (Russell, et al., 2008) de l'os et inhiber la résorption osseuse par les ostéoclastes matures (figure 10).

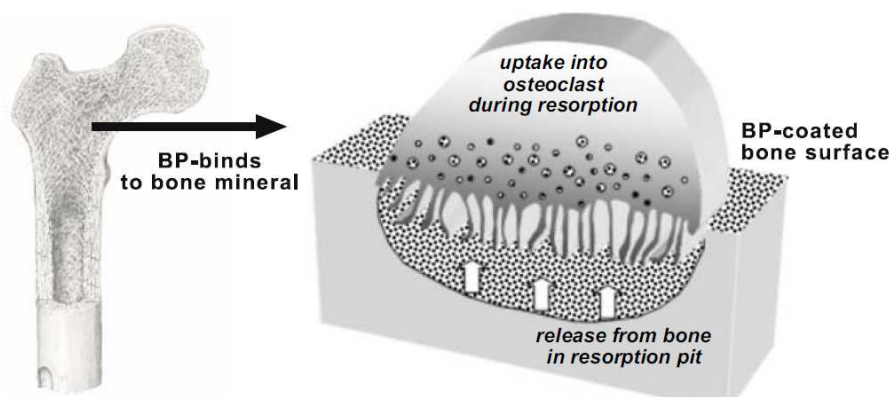


Figure 10 : Liaison des biphosphonates à l'os

(Russell, et al., 2008)

L'approche la plus décrite pour expliquer la fixation des biphosphonates sur l'os est la fixation sur la phase minérale, et plus spécifiquement sur le front de minéralisation de l'os lors de l'ostéoformation (Einhorn, et al., 1986, Toegel, et al., 2006).

Les molécules de phosphonates des biphosphonates vont interagir avec les molécules de phosphates des cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) qui constituent la majorité de la phase minérale de l'os. Ce mécanisme s'explique par une analogie de structure entre l'hydroxyapatite et les biphosphonates qui contiennent chacun des molécules de phosphates leur donnant un pouvoir de chélation pour les ions calcium.

Les bisphosphonates sont des analogues structuraux du pyrophosphate où la liaison P-O-P est remplacée par une liaison P-C-P. Ces molécules diffèrent également par la nature des chaînes latérales R1 et R2 (figure 11).

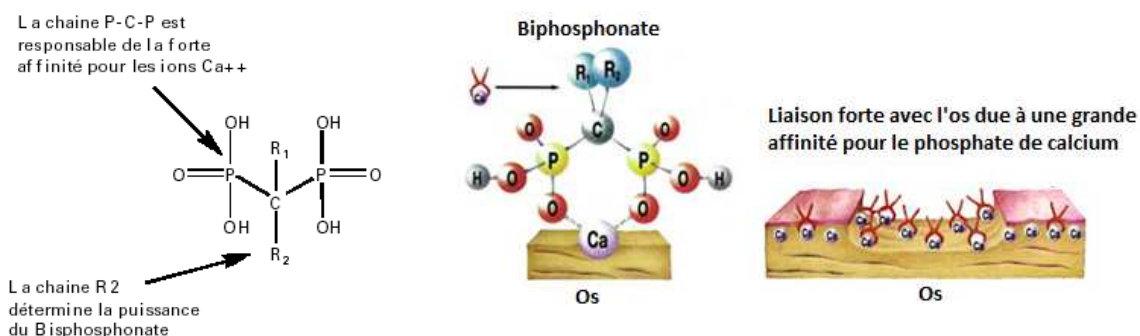


Figure 11 : Liaison et effets des biphosphonates

(Bartl, 2008)

Le groupement P-C-P permet la liaison des biphosphonates au calcium. Cette propriété de liaison des biphosphonates en fait des agents pharmacochimiques de choix pour cibler l'os. La nature de la chaîne R2 modifie leurs propriétés biologiques, telle que leur capacité à inhiber la résorption osseuse *in vivo*. Ainsi, selon le groupement présent au niveau de la chaîne R2 l'activité des biphosphonates est modifiée. Par exemple, un groupement amine primaire ($-\text{NH}_2$) renforce l'effet chélatant ainsi que la stabilité du complexe ce qui permet d'augmenter la puissance inhibitrice du biphosphonate sur la résorption osseuse (Cleazardin, et al., 2000).

- **Les biphosphonates marqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$**

Afin de visualiser le squelette par scintigraphie, il est possible de marquer les biphosphonates avec des radionucléides. Le radioisotope le plus utilisé pour marquer les biphosphonates est le Technétium 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ peut exister sous neuf degrés d'oxydation différents et créer jusqu'à six liaisons covalentes avec des atomes tels que l'azote, le soufre ou l'oxygène afin de former des complexes stables. Les complexes biphosphonates- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ impliquent deux molécules de biphosphonates entourant un atome de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ au degré d'oxydation +IV. Les liaisons covalentes se font avec les deux atomes d'oxygène des groupements phosphates (PO_3). Les deux liaisons restantes sont oxydatives avec deux molécules d' H_2O (figure 12). L'effet chélate des ligands sur le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ induit une grande stabilité du complexe formé.

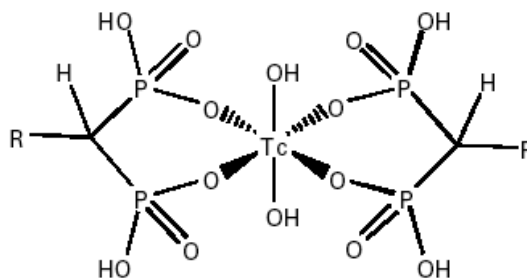


Figure 12 : Structure du complexe ^{99m}Tc -Biphosphonates

Les biphosphonates technétiés sont utilisés à doses traceuses de l'ordre du microgramme et sont donc dépourvus d'action pharmacologique qui chez l'homme requiert une dose de l'ordre du gramme.

1.1.1.2.2. La Tomographie par Emission de Positons

Les émetteurs de positons sont utilisés en médecine nucléaire depuis les années 1970, date à laquelle les premiers tomographes à émission de positons (caméras TEP) utilisables dans un environnement clinique ont été construits (Terpogossian, et al., 1975). Les émetteurs de positons sont des isotopes radioactifs (^{11}C , ^{64}Cu , ^{15}O , ^{18}F) dont certains peuvent facilement être incorporés aux molécules, sans altérer leurs propriétés biologiques. Les premières molécules marquées (au ^{18}F) ont été synthétisées à la même époque (Reivich, et al., 1979).

La réalisation d'un examen TEP est le résultat d'un ensemble d'opérations comprenant la production de l'isotope, la synthèse de la molécule, l'injection du traceur radioactif, la détection des rayonnements ainsi que la reconstruction tomographique afin de fournir une image représentative de la distribution du traceur au sein du sujet étudié (Foehrenbach, et al., 2003).

Les émetteurs de positons

Aujourd'hui, la molécule la plus utilisée en clinique est le désoxyglucose marqué au fluor 18 (^{18}F FDG). Ce traceur, analogue du glucose, permet une prise en charge et un suivi des patients atteints de maladies néoplasiques, de par le métabolisme glucidique des tumeurs qui est généralement plus important que celui des tissus sains (Maublant, et al., 1998). En

clinique, le ^{18}F -FDG est notamment utilisé pour la détection de tumeurs pulmonaires, mammaires, colorectales et dans le cas de cancer de la tête et du cou (Almuhaideb, 2011) cependant ce traceur n'est en aucun cas spécifique des tumeurs et présente une forte fixation dans les foyers inflammatoires *via* les macrophages.

Les émetteurs de positons sont caractérisés par un excès de charges positives dans leurs noyaux. Ils se désintègrent vers un état stable, par une transformation d'un proton en un neutron qui conduit à l'émission d'un positon. Celui-ci est de masse égale à celle d'un électron mais de charge opposée. Une fois émis, le positon parcourt quelques millimètres dans les tissus, où il perd toute son énergie cinétique. Le positon au repos interagit avec un électron du milieu, une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma de 511 keV, émis dans des directions opposées, se produit (figure 13). Le principe de base de la TEP consiste ainsi à détecter les deux photons de 511 keV pour déterminer le lieu de la réaction d'annihilation (Foehrenbach, et al., 2003).

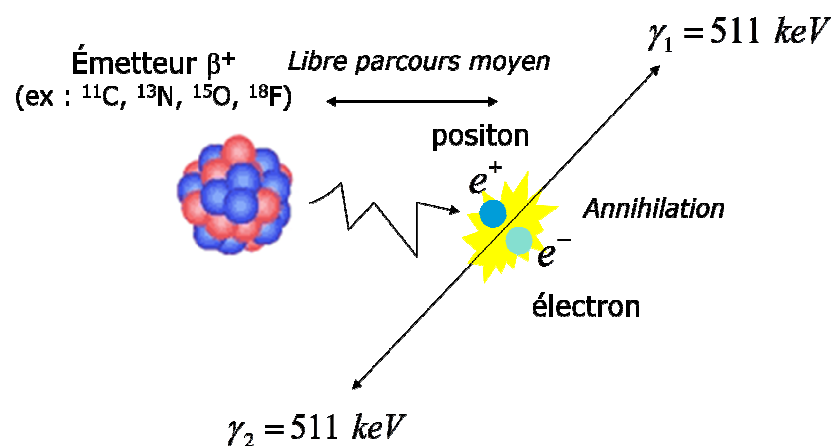


Figure 13 : Désintégration du positon et réaction d'annihilation

La détection et l'acquisition en TEP

Les caméras TEP sont constituées d'une ou deux couronnes de détecteurs au centre desquelles l'animal est placé. Chaque détecteur est optimisé pour la détection des photons gamma de 511 keV (figure 14). Le circuit de coïncidence, permet de déterminer au moyen de deux détecteurs élémentaires la projection du lieu d'annihilation. L'information mesurée est alors intégrée dans une matrice qui contient l'ensemble des projections de l'objet.

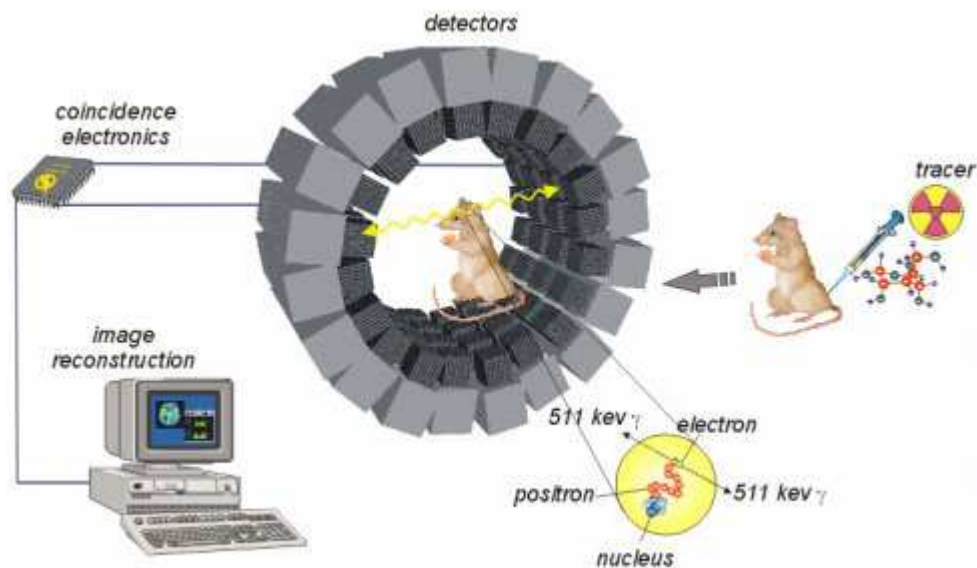


Figure 14 : Tomographe à Emission de Positons

(Source ; www2.fz-juelich.de)

L'énergie lumineuse créée, proportionnelle à l'énergie déposée dans le cristal, est ensuite dirigée vers l'électronique de détection. Le signal en sortie fournit une impulsion électrique mesurable, proportionnelle à l'énergie du photon déposée dans le cristal.

Enfin, la reconstruction tomographique va générer des images qui pourront être analysées et quantifiées.

Les modalités d'imagerie nucléaire largement utilisées chez l'homme en cancérologie permettent de réaliser des examens fonctionnels non invasifs avec une bonne sensibilité, mais ces modalités d'imagerie tridimensionnelles peuvent conduire à des examens longs limitant ainsi la résolution temporelle. En effet, si les phénomènes biologiques à documenter sont rapides, il est impossible de les détecter par des modalités d'imagerie 3D et seules les acquisitions dynamiques en scintigraphie planaire (2D) sont utilisables. Enfin, l'émission de rayonnements ionisants rend leur utilisation de plus en plus contraignante par rapport à la radioprotection et à la réglementation.

1.1.1.3. Imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et exploite les propriétés magnétiques des noyaux d'hydrogène, présents dans les molécules d'eau qui constituent 80 % du corps. Soumis à un champ magnétique et à des ondes radiofréquences, ces noyaux émettent des signaux. Le traitement numérique de ces signaux fournit une carte de la répartition de l'eau dans l'organisme permettant de visualiser les organes et de suivre les phénomènes étudiés.

L'IRM est une modalité d'imagerie dont le potentiel est extrêmement important. La possibilité de réaliser des examens fonctionnels (détection des aires cérébrales activées lors de la réalisation d'une tâche grâce au suivi en temps réel de la consommation d'oxygène dans le cortex cérébral par exemple) et l'absence de radiations ionisantes rendent cet examen moins contraignant que les autres modalités d'imagerie et contribuent à sa popularité.

1.1.1.3.1. Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique

Lors d'un examen IRM, les protons présents dans l'animal s'alignent dans le même sens que le champ magnétique de l'appareil. Des ondes radiofréquences vont entraîner un réalignement des protons. Lorsque les ondes radio et les protons vibrent à la même fréquence, ils entrent en résonance et les protons absorbent une partie de l'énergie des ondes radio (figure 15).

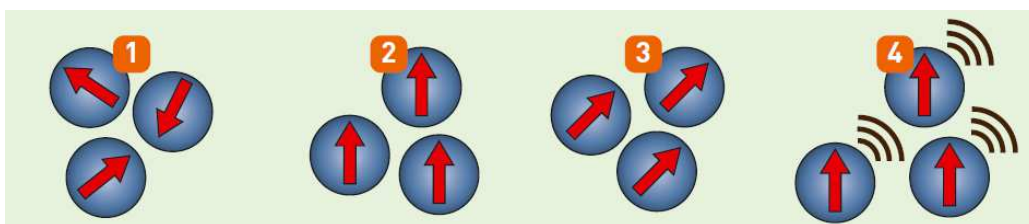


Figure 15 : Principe de la résonance magnétique nucléaire

1/ Les noyaux sont dotés d'un moment magnétique appelé « spin ». 2/ Dans un champ magnétique, le spin se comporte comme une aiguille aimantée qui s'oriente dans la direction du champ. 3/ Si on lui applique alors une série d'ondes radio, son orientation bascule. 4/ A la fin de chacune de ces impulsions, le spin retourne spontanément à sa position initiale en émettant une onde de la même fréquence que celle qui l'a désorienté. Le noyau entre en résonance.

Lorsque l'émission des ondes radio s'arrête, les atomes d'hydrogène reprennent leur position d'équilibre dans le champ magnétique en redonnant de l'énergie, c'est le phénomène de relaxation. Cette énergie peut être décomposée suivant deux axes :

- Un axe parallèle au champ magnétique ou relaxation longitudinale T1
- Un axe perpendiculaire au champ magnétique ou relaxation transversale T2

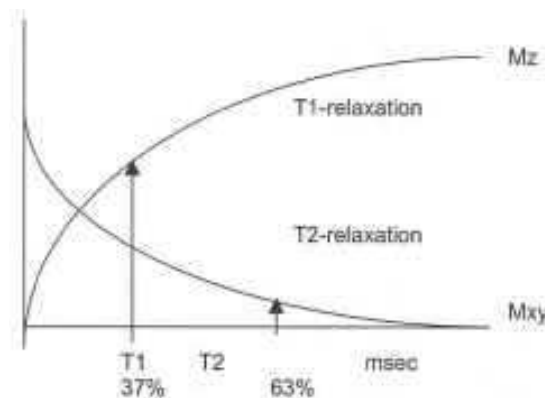


Figure 16: Temps de relaxation T1 et T2 en IRM

(Source : VU university medical center)

La relaxation T1 correspond au retour au niveau de basse énergie des spins excités suivant une courbe exponentielle croissante. Le T1 correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale retourne à 63 % de sa valeur finale. Ce temps est caractéristique des tissus et dépend de la mobilité des molécules où sont engagés les noyaux d'hydrogène.

La relaxation T2 est due au déphasage des spins. Ce phénomène va entraîner une diminution de l'aimantation transversale selon une courbe exponentielle décroissante. Le T2 correspond ainsi au temps mis par l'aimantation transversale pour revenir à 37 % de sa valeur initiale.

La relaxation transversale est beaucoup plus rapide que la relaxation longitudinale : T2 est toujours plus court ou égal à T1.

1.1.1.3.2. Les séquences spécifiques

Afin d'améliorer la qualité et la rapidité d'acquisition des images et d'améliorer la spécificité en fonction des tissus étudiés, de nombreuses séquences ont été créées. Celles-ci

peuvent être séparées en deux groupes : les séquences écho de spin et les séquences écho de gradient.

Séquences écho de spin

La séquence IRM la plus classique est la séquence écho de spin (SE). Cette séquence est caractérisée par le fait que l'impulsion de départ est suivie d'une impulsion de rephasage qui remet les spins en phase et permet d'obtenir un signal. Même si les avantages de ces séquences sont multiples, faible sensibilité aux artefacts, pondération en T1 et T2 possible, elles présentent comme inconvénient des durées d'acquisitions très longues.

Séquences écho de gradient (T2*)

La séquence en écho de gradient, de par son absence d'impulsion de rephasage et son angle de bascule inférieur à celui de l'écho de spin permet un retour des spins à l'état d'équilibre plus rapide. L'avantage est donc une diminution importante des temps d'acquisition, permettant notamment la réalisation d'image 3D.

L'inconvénient de cette séquence est l'augmentation de la sensibilité aux artefacts.

Compte tenu des limites de l'utilisation des séquences en écho de spin et en écho de gradient, de nouveaux outils sont apparus afin de modifier le contraste de l'image, d'augmenter la rapidité des séquences et de diminuer les artefacts.

- **Modification du contraste de l'image :**

- Séquences Inversion/récupération : Pour une valeur donnée d'un paramètre appelé temps d'inversion (TI), la séquence d'inversion-récupération permet de supprimer de manière non sélective le signal de l'eau (séquence FLAIR), de la graisse (STIR) et même du silicone. STIR est particulièrement adapté à l'étude de l'appareil locomoteur car elle permet de mettre en évidence une infiltration métastatique ou un œdème médullaire par exemple. FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) en supprimant le signal provenant du liquide céphalo-rachidien est bien adaptée à l'imagerie cérébrale.

- Saturation des graisses (Fatsat) : Dans les molécules de triglycérides des tissus graisseux, l'environnement électronique des protons n'est pas le même que dans celui des molécules d'eau. La différence de fréquence de résonance des protons dans ces deux milieux va permettre de sélectionner et de supprimer spécifiquement la fréquence de résonance des protons dans la graisse. La graisse aura ainsi un signal atténué par rapport aux autres tissus.

- **Augmentation de la rapidité des séquences**

La méthode principale pour augmenter la rapidité d'acquisition des séquences est le « train d'écho ». Après le premier écho, on applique de nouvelles impulsions de 180° , afin d'obtenir un train d'échos de spin. Ces séquences permettent d'obtenir plusieurs images d'un même niveau de coupe sans accroître le temps d'acquisition global.

- **Diminution des artefacts**

Les principaux artefacts rencontrés en IRM sont principalement liés aux mouvements du patient. Pour cela plusieurs solutions sont possibles, anesthésie générale, synchronisation des acquisitions sur la respiration ou sur le rythme cardiaque par exemple.

1.1.1.3.3. Les agents de contrastes

Les agents de contraste utilisés en IRM réagissent au champ magnétique, ils sont dit paramagnétiques. Le rôle des agents de contraste est d'accélérer les vitesses de relaxation magnétiques $1/T_1$ et $1/T_2$ des protons des molécules d'eau afin d'augmenter l'intensité des signaux.

L'ion gadolinium Gd^{3+} du fait de ses propriétés paramagnétiques est l'élément de choix pour concevoir des agents de contraste IRM. Il est aujourd'hui largement utilisé dans les produits de contraste mais il ne peut être utilisé sous sa forme ionique libre Gd^{3+} à cause de sa haute toxicité et doit être chélaté pour devenir biocompatible (exemple : Gd-DTPA, Gd-DOTA...). Cette molécule a la propriété de posséder sept électrons célibataires non appariés, caractéristique qui va permettre de réduire les temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2) des tissus adjacents, aboutissant à la création d'un signal plus intense en T_1 .

1.1.1.3.4. Autres applications de la résonance magnétique nucléaire

Spectroscopie par résonance magnétique

La Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM) est une méthode de détection non invasive des métabolites actifs utilisés comme biomarqueurs au niveau d'un élément de volume spatialement défini au sein de l'organisme par IRM ou pour les localisations superficielles à l'aplomb d'antennes de surface.

La SRM utilise les modifications du signal que provoquent les différences chimiques entre les divers métabolites contenus dans la cellule. L'utilisation de champs magnétiques élevés permet d'obtenir des spectres de haute résolution d'une région précise d'un organe. Les applications cliniques concernent le système nerveux central, la prostate, les voies aérodigestives supérieures ou les sarcomes des tissus mous (Hernando, et al., 2010).

Cette méthode est un outil de choix pour suivre les processus métaboliques cellulaires. Parmi les noyaux les plus utilisés, on retrouve le ^1H , ^{31}P ou le ^{13}C . Le spectre du ^{31}P donne une information directement utilisable, contrairement aux spectres ^1H et ^{13}C et peut être employé par exemple dans le cas de modèles animaux d'hypoglycémie ou d'épilepsie (Ackerman, et al., 1980). La détection des métabolites du proton nécessite l'élimination du signal de l'eau et des lipides

La SRM est une nouvelle approche pour la caractérisation des cancers. Par exemple, dans le cas de suspicion de tumeur de la prostate (augmentation de l'antigène spécifique de la prostate), la détection de métabolites tels que le citrate et la choline par SRM sera prédictif de ce type de cancer (Younes, et al., 2007).

Angiographie par résonance magnétique

L'Angiographie par Résonance Magnétique (ARM) est devenue une alternative non invasive et non irradiante aux explorations conventionnelles des pathologies vasculaires. Elle permet d'associer une étude anatomique et fonctionnelle précise des vaisseaux.

Le principe de l'ARM, basé sur les phénomènes de flux circulatoires, est d'obtenir un contraste élevé entre les vaisseaux circulants et les structures immobiles. L'ARM utilise les séquences d'écho de gradient afin de réaliser des acquisitions très courtes.

L'ARM peut être réalisée avec ou sans agents de contraste :

- en l'absence d'injection de produits de contraste, l'ARM « temps de vol » permet de visualiser la vascularisation en étudiant les flux rapides. Ainsi, les protons mobiles présenteront un signal très intense contrairement aux protons fixes.
- l'ARM par l'injection de produits de contraste paramagnétiques (Gadolinium par exemple) permet de raccourcir le temps T1 du sang et d'accentuer le contraste entre le compartiment vasculaire et les tissus environnants.

1.1.1.4. Imagerie ultrasonore

Les techniques ultrasonores appliquées au domaine médical ont été développées dans les années 1950 (Donald, et al., 1958) et c'est au début des années 1970 que leur utilisation en routine a commencé. Ces techniques sont sensibles aux propriétés mécaniques des tissus.

En effet, l'onde ultrasonore est une onde de pression se propageant dans un milieu élastique qui ne peut se faire dans le vide, contrairement aux rayonnements électromagnétiques, comme par exemple les rayons X.

Les ondes ultrasonores, concentrées sous forme de faisceaux vont être dirigées sur l'échantillon et interagir avec la matière qu'elles traversent. Plusieurs phénomènes vont se produire et conduire à l'atténuation de ces ondes. D'une part l'absorption dans les milieux homogènes et d'autre part les réflexions, réfractions et diffusions lors des changements de milieux.

L'onde ultrasonore est caractérisée par plusieurs paramètres :

- **Célérité et impédance** : la célérité de l'onde acoustique représente la vitesse de propagation de la variation de pression dans le milieu. Le comportement d'un milieu vis-à-vis des ultrasons est exprimé par une constante appelée impédance acoustique Z. L'impédance acoustique dépend de la masse volumique et de la compressibilité du milieu.
- **Fréquence et longueur d'onde** : l'onde sonore en déplacement dans un milieu est caractérisée par sa fréquence (f) et sa longueur d'onde (λ). Ces deux paramètres vont permettre de déterminer la vitesse de propagation des sons (v) dans le milieu grâce à la formule : $v = \lambda \times f$.

Les ondes ultrasonores présentent de nombreux avantages : elles sont faciles à mettre en œuvre, non invasives et ne produisent pas de rayonnements ionisants. De plus, cette modalité d'imagerie permet une visualisation en temps réel des organes.

Deux modalités d'imagerie couramment utilisées chez l'homme sont basées sur le principe des ondes ultrasonores, l'échographie et le doppler.

1.1.1.4.1. Échographie

Lors d'une échographie, une impulsion acoustique est envoyée dans l'échantillon, impulsion qui sera en partie réfléchiée par les interfaces entre des tissus d'impédances différentes permettant à la majeure partie de l'onde d'être transmise aux interfaces. La faible partie de l'onde qui est réfléchiée, l'écho, est enregistrée par le transducteur (système de détection), l'un des principaux éléments de l'échographe.

Celui-ci va agir à la fois comme émetteur et comme récepteur des signaux acoustiques. Il transforme dans un premier temps l'impulsion électrique en onde ultrasonore puis convertit par la suite les informations ultrasonores en signaux électriques. Un transducteur est constitué d'une céramique piézoélectrique qui, lorsqu'elle est soumise à des impulsions électriques, vibre et génère des ultrasons. Ce transducteur est mis en contact avec l'échantillon à travers un gel de couplage qui assure l'adaptation de l'impédance acoustique. Le signal est recueilli puis analysé par un système informatique qui retransmet en direct une image sur un écran vidéo.

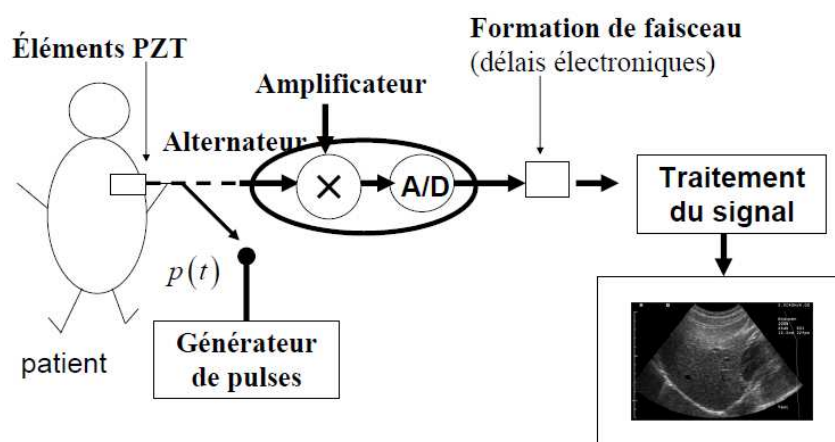


Figure 17 : Principe d'acquisition en échographie

(Elsa Angelini, 2007)

La résolution spatiale d'un échographe en général de l'ordre du millimètre peut aller jusque 30 μm pour des appareils haute résolution destinés à l'imagerie préclinique. Cette résolution spatiale dépend principalement de la fréquence des ultrasons qui varient de 2 à 80 MHz. Par contre, plus la fréquence des ultrasons est élevée, meilleure est la résolution mais plus l'épaisseur de tissu imagé est faible.

1.1.1.4.2. Doppler

Découvert indépendamment par Christian Doppler en 1842, puis par Hippolyte Fizeau, l'effet Doppler, parfois appelé effet Doppler-Fizeau, est la variation apparente de la fréquence d'une onde émise par une source en mouvement par rapport à un observateur.

Cette technique permet d'étudier le mouvement des fluides biologiques, comme par exemple la mesure de la direction et l'intensité du flux dans les vaisseaux sanguins.

Le principe de l'effet Doppler est le suivant : lorsqu'un objet est immobile, il envoie des ondes de mêmes fréquences en toutes directions. Lorsqu'il est en mouvement, les ondes se resserrent dans le sens du mouvement (la fréquence augmente) et s'écartent dans la traînée de l'objet (la fréquence diminue) (figure 18).

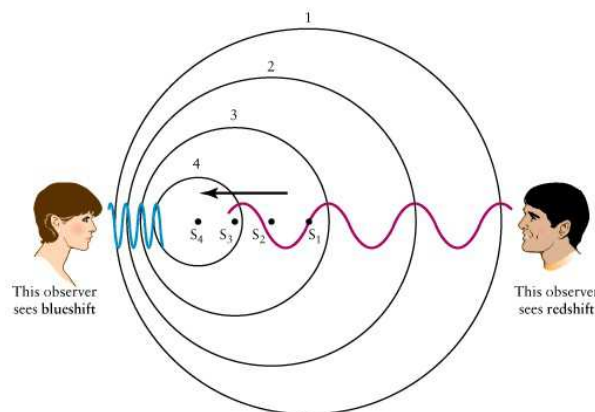


Figure 18 : Effet Doppler

Une source lumineuse se déplace à vitesse constante de la droite vers la gauche. Au temps t_1 elle est située en S_1 , plus tard au temps t_2 elle est en S_2 puis à t_3 et t_4 en S_3 et S_4 respectivement. Les ondes reçues par les observateurs à chaque position (numérotées de 1 à 4) seront perçues différemment par les observateurs. La personne de gauche voit un décalage vers le bleu et la personne de droite voit un décalage vers le rouge (Source : <http://wisp.physics.wisc.edu>).

Deux types de doppler existent :

- Le Doppler à émission continue, où le cristal émetteur envoie un faisceau d'ultrasons de façon continue à une fréquence donnée, mais cette méthode ne permet pas de visualiser les vaisseaux situés en profondeur.
- Le Doppler à émission pulsé, qui repose sur le même principe, mais avec des ultrasons émis de façon discontinue. La sonde est alternativement émettrice et réceptrice. Ce type de doppler permet de visualiser des vaisseaux plus profonds.

Les avantages des ultrasons par rapport aux autres modalités d'imagerie anatomiques (TDM et IRM) sont d'une part leur coût nettement plus faible, leur innocuité ainsi que la possibilité de réaliser des images en temps réel. L'évolution des techniques d'imagerie ultrasonore a permis d'améliorer la résolution (inférieure au mm) et la miniaturisation des sondes permet aujourd'hui d'explorer les compartiments endovasculaires.

Cependant, les ultrasons présentent certaines limites, d'une part leur profondeur d'exploration est faible et d'autre part, leur incapacité à traverser les os ou les organes contenant de l'air limite leurs champs d'applications.

1.1.2. Développements spécifiques pour l'imagerie du petit animal

Ces quinze dernières années, de nombreux développements ont été réalisés spécialement pour l'imagerie préclinique et concernent plus particulièrement l'imagerie photonique.

1.1.2.1. La bioluminescence

La bioluminescence correspond à l'émission de lumière par un organisme vivant, résultant d'une réaction le plus souvent enzymatique, qui va permettre de convertir une énergie chimique en énergie lumineuse. La bioluminescence est retrouvée chez de nombreux êtres vivants et a de nombreuses fonctions parmi lesquelles l'attraction, la répulsion, la communication et le camouflage.

Le mécanisme chimique de ce phénomène a été mis en évidence par Raphaël Dubois lors d'une expérience réalisée sur des lucioles (Dubois, 1960). L'étude de ce système biochimique a alors montré que la réaction impliquait un substrat, la luciférine et une enzyme, la luciférase. Quelques années plus tard, WD. Mc Elroy a démontré que cette réaction enzymatique nécessitait de l'oxygène et de l'ATP en présence de l'ion divalent magnésium (Mg^{2+}) (Plant, et al., 1968).

1.1.2.1.1. Mécanismes chimiques conduisant à la bioluminescence

Le mécanisme général des réactions bioluminescentes résulte de la combinaison de la luciférine avec la luciférase. Dans le système de la luciole, le plus utilisé en imagerie biophotonique, la première réaction, catalysée par la luciférase, est l'activation de la luciférine avec formation de luciféryl adénylate liée à l'enzyme. Cette réaction est réversible et libère le pyrophosphate inorganique. La luciféryl adénylate formée est oxydée par l'oxygène moléculaire et donne un peroxyde très instable, l'oxyluciférine, qui va rapidement se cycliser après une libération d'AMP. Cette molécule, dans un état électronique excité, retourne à l'état stable par une réaction de décarboxylation. Cette réaction va entraîner l'émission d'un photon lumineux, dont la longueur d'onde dépend de la structure du complexe luciférine-luciférase (pic d'émission à 560 nm dans le système de la luciole), et former du CO_2 (figure 19). L'enzyme se libère ensuite pour aller catalyser une autre réaction (Brovko, et al., 1994).

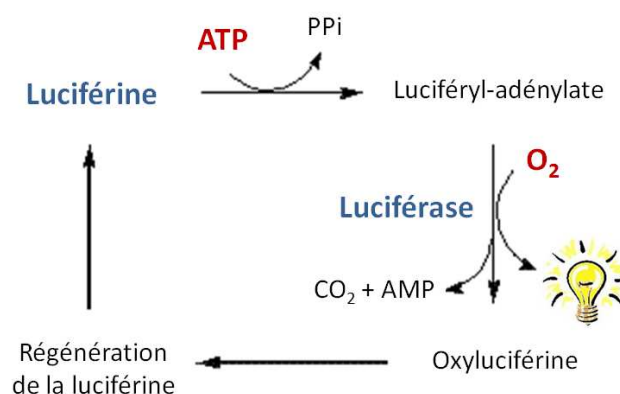


Figure 19 : Réaction de bioluminescence (Système de la luciole)

Le système de la luciole (*Photynus pyralis*) n'est pas le seul système bioluminescent existant, on en retrouve d'autres dont les mécanismes d'action sont très différents. Ces systèmes proviennent de nombreux organismes, principalement marins (tableau 1).

Organismes bioluminescents	Luciférine	Pic d'émission
Luciole	Luciférine de luciole	560 nm
Cnidaires (méduses)	Coelenterazine	480 nm
Dinoflagellés	Luciférine Dinoflagellé	470 nm
Bactéries	Luciférine bactérienne	variable

Tableau 1 : Les principaux organismes bioluminescents

L'avantage du système de la luciole pour l'imagerie *in vivo* par rapport aux autres luciférines est son pic d'émission à 560 nm, qui permet de limiter l'absorption.

Afin de modifier les caractéristiques de la luciférine, et permettre d'améliorer sa biodisponibilité et sa spécificité, plusieurs dérivés de la luciférine ont été développés. Le noyau benzène de la luciférine est particulièrement adapté aux modifications chimiques, et le remplacement de la fonction alcool par une fonction amine permet d'améliorer sa pharmacocinétique (Shinde, et al., 2006). Dans ce cas, la luciférine est une aminoluciférine qui peut être conjuguée à différents groupements afin de modifier sa biodisponibilité. Par exemple, la conjugaison d'un groupement glutamate (Glu) sur l'aminoluciférine va permettre de distinguer les événements intra et extracellulaires. La conjugaison d'un fluorochrome (Cyanine 5) émettant dans l'infrarouge facilite la détection de signaux provenant d'organes plus profonds. Enfin, la conjugaison d'un groupement DEVD sur l'aminoluciférine va permettre de réaliser une imagerie de l'apoptose par bioluminescence (Takakura, et al., 2011).

1.1.2.1.2. Acquisition et quantification d'images en bioluminescence

Les systèmes d'acquisition d'images en bioluminescence sont constitués d'une enceinte étanche à la lumière ainsi que d'une caméra CCD (Charge Coupled Device ou Dispositif à

Transfert de Charges en français) qui assure la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique (figure 20).

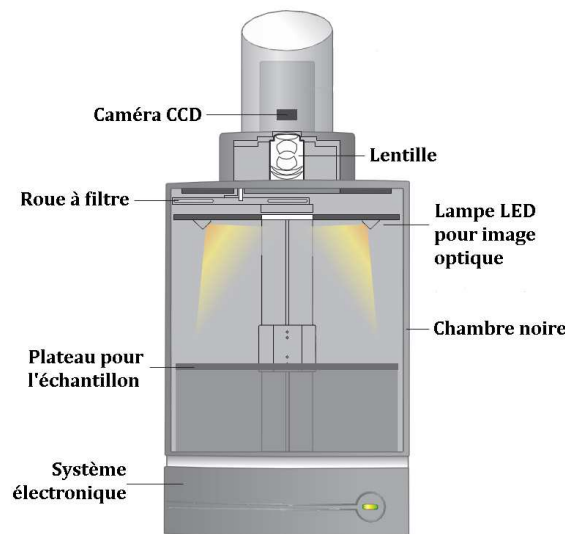


Figure 20 : Système d'acquisition en bioluminescence Ivis Lumina II®
(Caliper Life Science)

Le signal de bioluminescence émis dans la souris étant très faible, l'utilisation de caméras très sensibles est nécessaire. Ces caméras doivent être refroidies à des températures relativement basses, entre -70°C et -90°C afin de diminuer le bruit de fond thermique et gagner en sensibilité.

Un capteur CCD est une surface photosensible. Le matériel de base de la surface photosensible est le silicium, qui est dopé de manière à acquérir des propriétés photoélectriques, c'est-à-dire qu'un photon incident est susceptible d'y produire une charge électrique (électrons). La surface du capteur CCD est constituée d'un réseau de pixels.

Compte tenu de la complexité du principe physique d'un capteur CCD, son mode de fonctionnement peut être illustré de la façon suivante : les pixels sont représentés par des seaux et les photons par des gouttes de pluies. Un réseau de seaux est distribué régulièrement sur une grande surface (figure 21). Après une forte averse, les seaux remplis d'eau sont transportés sur des tapis roulants jusqu'à une zone où la quantité d'eau tombée dans un seau sera mesurée avec une grande précision. Grâce à ce principe, il devient possible de déterminer la quantité totale de pluie qui est tombée sur le terrain ainsi que sa distribution spatiale. En appliquant ce principe aux pixels et aux photons, on peut donc mesurer grâce à ces caméras la quantité de photons collectée sur chaque pixel.

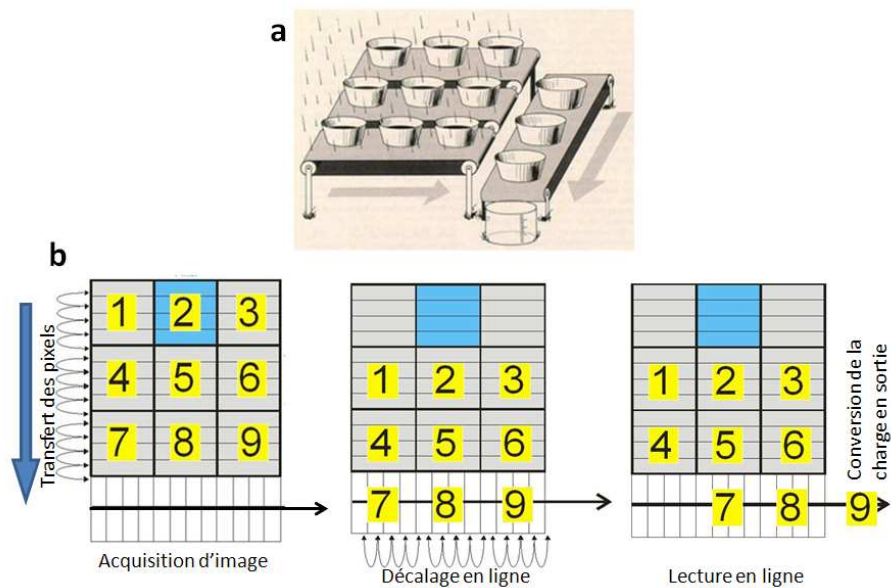


Figure 21 : Principe du transfert de charge

(a) Système imagé, (b) transfert de charge (Source : www.optique-ingenieur.org)

La charge de chaque pixel est ensuite amplifiée, puis passée dans un convertisseur analogique-numérique qui code sa valeur sur 8, 12, 14 ou 16 bits. Le signal est alors envoyé à l'ordinateur qui va reconstruire l'image.

Un paramètre important utilisé lors d'une acquisition est le binning, paramètre qui consiste à regrouper les pixels par 4 (binning 2x2), par 16 (binning 4x4) ou par 64 (binning 8x8). Ainsi la valeur d'un pixel de l'écran de l'ordinateur correspond à la somme de celles de 4, 16 ou 64 pixels voisins. L'augmentation du binning permet d'augmenter la sensibilité (4 pixels reçoivent plus de lumière qu'un seul) mais cela au détriment de la résolution.

1.1.2.1.3. Applications en cancérologie

L'un des principaux domaines de mise en œuvre de la bioluminescence est la cancérologie expérimentale.

Depuis quelques années de nombreux modèles animaux de cancer ont été développés en bioluminescence. Pour ce faire, les cellules tumorales ont été préalablement modifiées afin d'exprimer le gène de la luciférase. La technique la plus utilisée pour le transfert de gène est la transduction virale, cette méthode consistant à introduire le gène de la luciférase dans les

cellules tumorales grâce aux propriétés naturelles de la particule virale qui contient le transgène. Dans ces modèles bioluminescents de cancer, l'émission de lumière est corrélée au volume tumoral, cette technique très sensible permettant de mettre en évidence la croissance de tumeurs primaires et la prolifération métastatiques au sein du petit animal (Jenkins, et al., 2003, Vooijs, et al., 2002).

De nouveaux gènes de la luciférase sont utilisés pour la transfection et la transduction et permettent d'augmenter l'activité de bioluminescence et ainsi la sensibilité de détection. Par exemple, le gène de la luciférase Luc 2 a été conçu afin d'améliorer l'expression cellulaire grâce à l'optimisation des codons, les cellules transfectées par ce gène étant jusqu'à 10 fois plus bioluminescentes. De nouveaux gènes, Luc2P, et « RapidResponseTM » sont des gènes luc 2 couplés à des séquences de dégradation ce qui permet d'influencer la demi vie cellulaire du gène Luc-2.

Enfin, des modèles animaux transgéniques bioluminescents ont été développés. Pour ces modèles, le gène rapporteur de la luciférase est sous le contrôle d'un promoteur différent. En oncologie, les souris transgéniques les plus utilisées sont les souris NFκB-luc et VEGF-luc. Ces souris vont permettre de visualiser l'expression de NFκB (impliqué dans l'inhibition de l'apoptose) ou du VEGF (facteur de croissance vasculaire impliqué dans l'angiogenèse) au sein de l'animal. Les principaux inconvénients de ces modèles résident dans leur coût qui est très élevé et dans le bruit de fond tissulaire qu'ils présentent à l'état basal, suite à une activation non spécifique du promoteur.

Parmi les dernières avancées technologiques moléculaires, la complémentation de la luciférase (Luker and Luker, 2011), qui permet de détecter et de quantifier les interactions protéine-protéine *in vivo* ainsi que le marquage d'anticorps par la luciférase Renilla pour la détection de tumeur (Venisnik, et al., 2006) ont été mis en œuvre.

Enfin, un autre champ d'application en imagerie biphotonique est la chimiluminescence dont le phénomène est basé sur une réaction chimique contrairement à la bioluminescence fondée sur une réaction enzymatique. La chimiluminescence présente de nombreuses applications biologiques, hormis son utilisation principale en criminologie pour la détection du sang sur les scènes de crime, et peut être mise en œuvre en cancérologie. Des études ont ainsi démontré que l'utilisation du luminol en tant que sonde permettait de détecter des cellules cancéreuses (Hun, et al., 2011) ainsi que l'amplification des télomérases (Weizmann, et al., 2004) facteur de susceptibilité aux cancers.

1.1.2.1.4. Avancées technologiques : la bioluminescence 3D

Des avancées technologiques ont été réalisées en bioluminescence, avec notamment l'apparition de la bioluminescence 3D.

Deux systèmes permettent à ce jour de réaliser de la bioluminescence 3D : l'IVIS[®] Spectrum (Perkin Elmer) qui réalise une analyse multi-spectrale et génère une image 3D grâce à la reconstruction (principe de tomographie de diffusion de l'image de bioluminescence) et le PhotonIMAGER[™] (Biospace Lab) qui réalise, grâce à des miroirs, une imagerie en temps réelle et sur plusieurs incidences (figure 22).

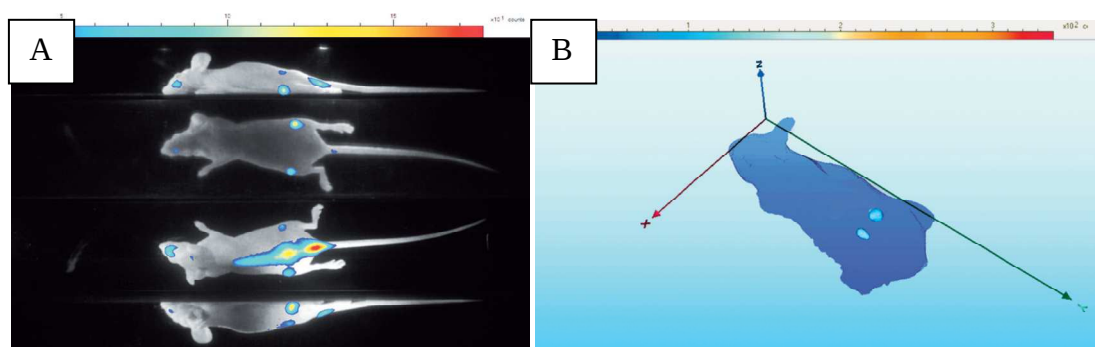


Figure 22 : Acquisition et reconstruction avec le PhotonIMAGER[™]

A : Acquisition d'images dans les 4 faces ; B : Reconstruction volumétrique du signal afin d'obtenir une image 3D. (Extrait BiospaceLab)

Ces systèmes permettent de visualiser des signaux de bioluminescence très faibles et de localiser les foyers dans les 3 dimensions afin de faciliter leur localisation anatomique, mais ces modalités d'imagerie 3D ne permettent pas de réaliser de vraies images tomographiques et l'augmentation des temps d'acquisitions peut limiter leur utilisation.

1.1.2.1.5. Les limites de la bioluminescence

Ce mécanisme d'émission de lumière basé sur une réaction biochimique, même s'il est largement utilisé aujourd'hui en imagerie préclinique, possède quelques facteurs limitants.

Tout d'abord, comme nous l'avons vu précédemment, la réaction enzymatique de bioluminescence fait intervenir plusieurs molécules dont la luciférine, l'oxygène et l'ATP. Si une ou plusieurs de ces molécules sont en quantité insuffisante, la réaction ne peut se faire

correctement et l'émission de lumière mesurée n'est plus proportionnelle à la quantité de luciférase présente et donc au nombre de cellules tumorales. En cancérologie expérimentale, le phénomène le plus courant et le plus pénalisant pour la bioluminescence est l'hypoxie. En effet, lorsqu'elles grossissent, les tumeurs deviennent hypoxiques, les cellules continuent à croître, mais dans un environnement anaérobie, l'O₂ ainsi que l'ATP sont en défaut et la bioluminescence mesurée n'est plus corrélée au volume tumoral.

D'autre part, l'absorption par les tissus des photons émis par l'animal peut être très gênante notamment si la source d'émission des photons a une localisation profonde (tumeurs pulmonaires par exemple), conduisant à une perte de l'intensité du signal et donc à un biais lors de la quantification. Dans ce cas des méthodes de corrections de l'absorption basées sur l'analyse spectrale des photons peuvent être utilisées (Pesnel, et al., 2011).

Enfin, l'expression de la luciférase étant obtenue après modification de la cellule, par des méthodes de transduction ou de transfection, il est indispensable de vérifier que cette modification n'impacte pas la cellule du point de vue de sa croissance et de sa sensibilité aux traitements par exemple. De plus, une modification génétique des cellules étant indispensable pour qu'elles puissent émettre de la lumière, toute application de la bioluminescence en clinique est inenvisageable.

1.1.2.2. L'imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est basée sur l'excitation d'une molécule par de la lumière à une longueur d'onde donnée, entraînant la réémission de lumière à une énergie plus faible et donc de longueur d'onde plus grande.

L'imagerie de fluorescence est une méthode très sensible mais la résolution spatiale de cette modalité d'imagerie est faible et la profondeur de détection du signal est très limitée. Contrairement à la bioluminescence qui présente un bruit de fond minimum et un excellent rapport signal/bruit, la fluorescence *in vivo* est largement handicapée par le phénomène d'autofluorescence.

C'est toutefois une méthode rapide et peu coûteuse pour imager des molécules ou des cellules chez le petit animal.

1.1.2.2.1. Principe de la fluorescence

La fluorescence est l'émission d'énergie sous forme lumineuse d'une molécule lors de son retour à un état basal, après excitation.

Les différents processus électroniques de l'absorption de lumière par une substance fluorescente (fluorochrome) peuvent être représentés par le diagramme de Jablonski (figure 23).

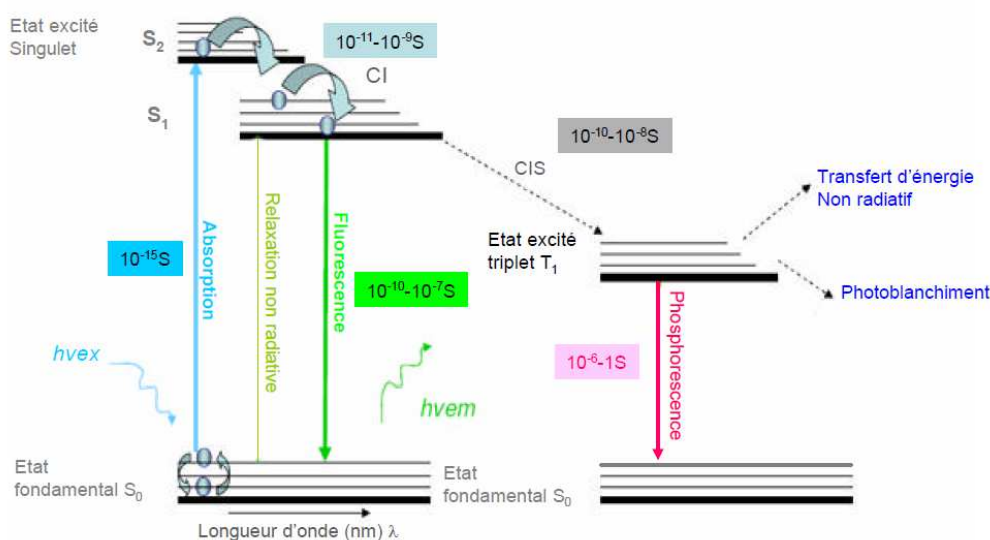


Figure 23 : Diagramme de Jablonski

Lorsqu'une molécule absorbe de l'énergie $h\nu_{\text{ex}}$ provenant d'une source lumineuse, il y a un passage d'un état fondamental S₀ à un état excité S₂ avec changement d'orbitale des électrons. Cet état excité S₂ a une durée de vie très courte (de l'ordre de la nanoseconde). Des changements conformationnels et des interactions avec les molécules environnantes font passer la molécule de l'état excité S₂ à un état excité plus stable S₁ : ce mécanisme est appelé conversion interne. Le passage de l'état excité S₁ à l'état fondamental S₀ se fait avec libération d'un photon d'énergie inférieure $h\nu_{\text{em}}$. Cette différence d'énergie (le shift de Stokes $h\nu_{\text{ex}} - h\nu_{\text{em}}$) est due à la dissipation d'énergie durant l'étape 2. La longueur d'onde du photon réémis par le fluorochrome est donc toujours supérieure à la longueur d'onde du photon d'excitation.

1.1.2.2.2. Contraintes de l'imagerie de fluorescence *in vivo*

La contrainte principale de l'imagerie de fluorescence *in vivo* est la présence de tissus biologiques sur le trajet des rayonnements lumineux. En effet, les photons d'excitation du fluorochrome subissent plusieurs phénomènes avant d'atteindre leur cible tels que la dispersion, l'anisotropie et la réfraction par les tissus traversés. Les photons émis par le fluorochrome après excitation subissent ensuite les mêmes contraintes.

Les principales contraintes de la fluorescence *in vivo* sont les suivantes :

- **L'absorption (et la diffusion)** du rayonnement lumineux lors de la traversée des tissus entraîne une perte de l'intensité du signal de fluorescence.
- **L'auto-fluorescence** correspond à la fluorescence naturelle émise par l'animal (tissus, hémoglobine, nourriture).

Afin de limiter le phénomène d'absorption, l'utilisation de fluorochromes ayant des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission comprises entre 650 et 900 nm est fortement préconisée (rouge à infrarouge). En effet, en dessous de 650 nm, dans le visible, la lumière ne peut pas pénétrer profondément dans les tissus, en particulier à cause de la présence d'oxy- et déoxy-hémoglobine, de lipides et d'eau qui absorbent fortement à ces longueurs d'ondes (Klohs, et al., 2008).

La figure 24 représente la variation des coefficients d'absorption de différents tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde.

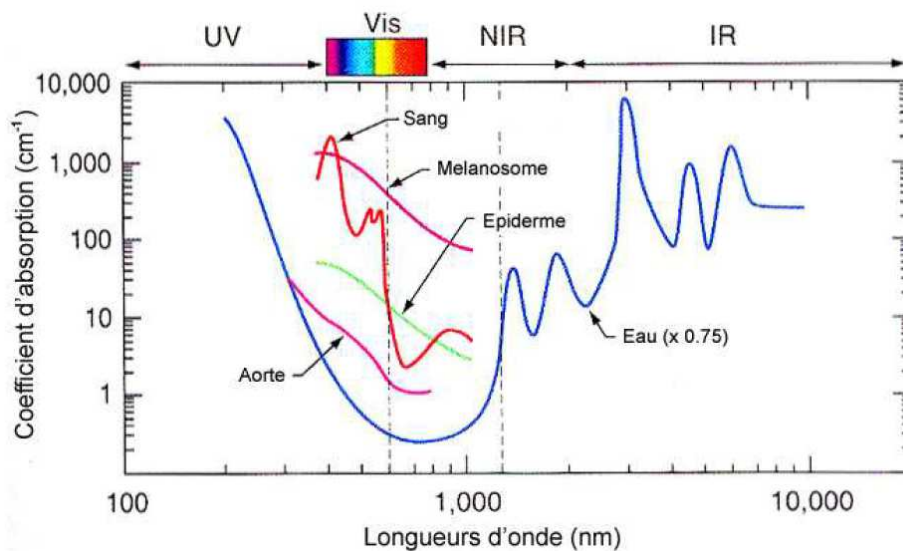


Figure 24 : Coefficients d'absorption de différents tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde
(Goutayer, 2008)

Ce schéma montre que la fenêtre optimale pour l'imagerie de fluorescence se situe entre 600 et 900 nm, gamme où l'absorption de l'hémoglobine et de l'eau devient faible, permettant ainsi une visualisation des fluorophores avec un contraste bien plus important (Frangioni, 2003). En plus du phénomène d'absorption, l'autofluorescence des tissus peut fortement diminuer le rapport signal sur bruit car en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission mises en œuvre, l'autofluorescence des tissus est plus ou moins importante (figure 25).

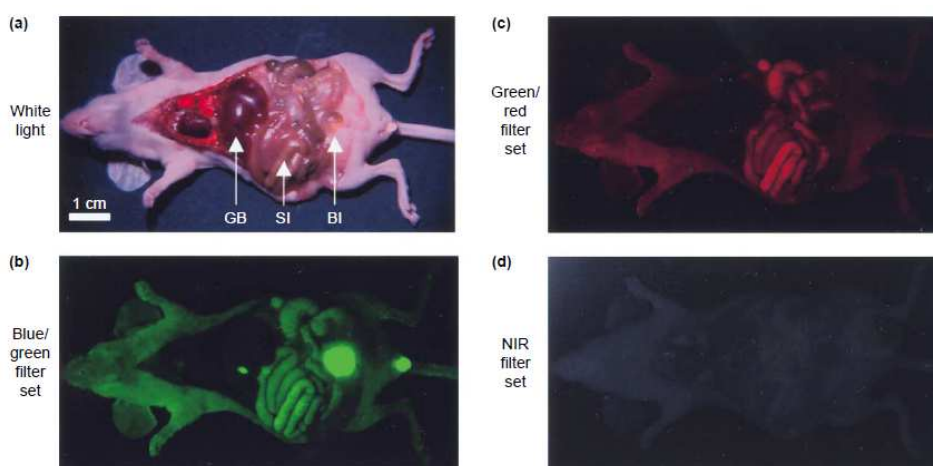


Figure 25 : Autofluorescence des tissus et fluides biologiques en fonction de la longueur d'onde
(Frangioni, 2003)

Dans le bleu/vert (460-500 nm/505-560 nm), l'autofluorescence de la peau, des viscères, et surtout de la vésicule biliaire, de l'intestin grêle et de l'urine est très importante. Dans le vert/rouge (525-555 nm/590-650 nm), l'autofluorescence diminue mais les intestins restent fluorescents. Enfin, dans le proche infrarouge (725-775 nm/790-830 nm) l'autofluorescence des tissus est absente.

Ainsi, que ce soit pour limiter les phénomènes d'absorption ou l'autofluorescence, il est essentiel de travailler dans le proche infrarouge (650-900 nm) pour les études *in vivo*. Des fluorochromes ayant des longueurs d'ondes de plus en plus élevées sont développés, comme par exemple un phytochrome (iRFP) dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission maximales sont respectivement de 690 nm et 713 nm (Filonov, et al., 2011). Toutefois, même dans cette gamme de longueur d'onde, la diffusion des photons reste importante et dégrade la résolution.

1.1.2.2.3. Propriétés des fluorochromes

Le choix du fluorochrome est déterminant dans la démarche expérimentale. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte :

- **La longueur d'onde** correspondant aux pics des spectres d'excitation et d'émission. Pour l'imagerie de fluorescence *in vivo*, le domaine de longueur d'onde se situe donc dans le proche infrarouge (650 et 900 nm).
- **Le coefficient d'extinction**, reliant la quantité de lumière absorbée à une longueur d'onde donnée à la concentration du fluorochrome en solution.
- **Le rendement quantique** correspondant à l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation (nombre de photons émis/nombre de photons absorbés).
- **La durée de vie à l'état excité** c'est à dire le temps durant lequel la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état basal.

Le tableau 2 présente une liste non exhaustive de fluorochromes utilisés en imagerie préclinique.

Fluorochromes	Excitation (nm)	Emission (nm)
GFP	475	509
YFP	514	527
DsRed	558	583
mCherry	587	610
Katushka	588	635
mPlum	590	649
Cyanine : Cy5	650	670
Cy7	743	767
Alexa Fluor® 680	684	707
Alexa Fluor® 750	752	776

Tableau 2 : Principaux fluorochromes utilisés pour l'imagerie *in vivo*

1.1.2.2.4. Les modalités d'imagerie de fluorescence *in vivo*

Le principe de l'imagerie de fluorescence consiste à illuminer un tissu avec un laser ou de la lumière blanche filtrée et à enregistrer la fluorescence émise grâce à une caméra CCD munie de filtres appropriés. On distingue 2 modalités d'imagerie de fluorescence : l'épi-illumination et la trans-illumination.

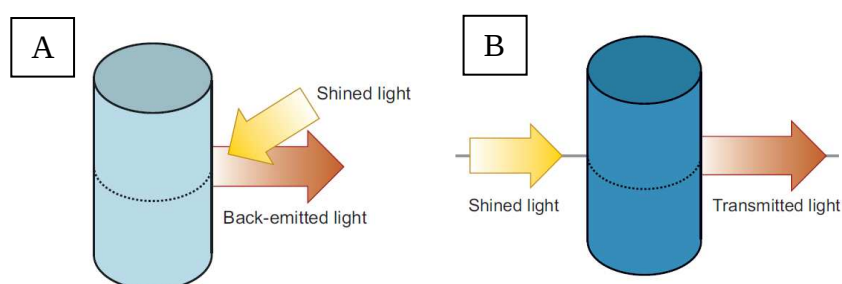


Figure 26 : Modalités d'imagerie de fluorescence

A : Epi-illumination ; B : Trans-illumination (Ntziachristos, 2006)

- **L'épi-illumination** : la source de lumière excitatrice et la caméra de détection des photons émis sont du même côté (figure 26A). Par analogie à la microscopie, cette modalité est aussi appelée fluorescence par réflectance. Cette technique est facile à

mettre en œuvre mais présente certains inconvénients, principalement dus à l'autofluorescence de la peau et des tissus qui masque la fluorescence interne. En effet, elle ne permet pas de déterminer la profondeur de la zone fluorescente au sein de l'animal. Ceci empêche de quantifier les valeurs de fluorescence obtenues par imagerie bidimensionnelle. En effet, deux tumeurs ayant la même concentration en fluorochrome n'auront pas la même intensité de fluorescence en épi-illumination si elles sont à des profondeurs différentes puisque l'atténuation des photons ne sera pas la même (Ntziachristos, 2006).

- **La trans-illumination** : la lumière excitatrice passe à travers le tissu car la source lumineuse et le détecteur sont disposés de chaque côté de l'échantillon (figure 26B). L'avantage de cette technique est de limiter l'autofluorescence, puisque la surface où le signal est détecté n'est pas exposée à la lumière excitatrice. De plus, cette modalité permet d'exciter le site d'intérêt (tumeur) en le traversant, ce qui permet d'imager des foyers plus profonds qu'en épi-illumination. Cette technique beaucoup moins utilisée en imagerie planaire que l'épi-illumination ne permet pas à elle seule de pouvoir quantifier des foyers.

1.1.2.2.5. Les avancées technologiques en fluorescence

Imagerie bidimensionnelle

Afin d'améliorer les images obtenues en 2D, les constructeurs ont développé plusieurs outils principalement basés sur l'analyse spectrale.

Deux méthodes, la déconvolution spectrale (spectrale unmixing) et l'analyse spectrale multiplexée permettent grâce à des algorithmes appliqués aux images de fluorescence de limiter les effets dus à l'autofluorescence des tissus. Ces techniques permettent de séparer les fluorochromes présents et d'améliorer la qualité de l'image (Mansfield, et al., 2005, Xu and Rice, 2009).

Imagerie Tridimensionnelle

Les avancées technologiques permettent aujourd'hui de réaliser de la fluorescence 3D dont la principale ambition est d'accéder à l'information « profondeur » du foyer et donc à la quantification. Pour cela trois méthodes sont actuellement utilisées :

- Mise en œuvre de miroirs permettant d'imager les quatre faces de l'animal (Cf. principe partie 1.1.2.1.1.).
- La tomographie moléculaire de fluorescence : dans ce système, l'échantillon est éclairé par trans-illumination, soit avec un laser, soit avec de la lumière blanche filtrée. Suite à l'acquisition, une analyse spectrale permet de reconstruire le volume tridimensionnel.

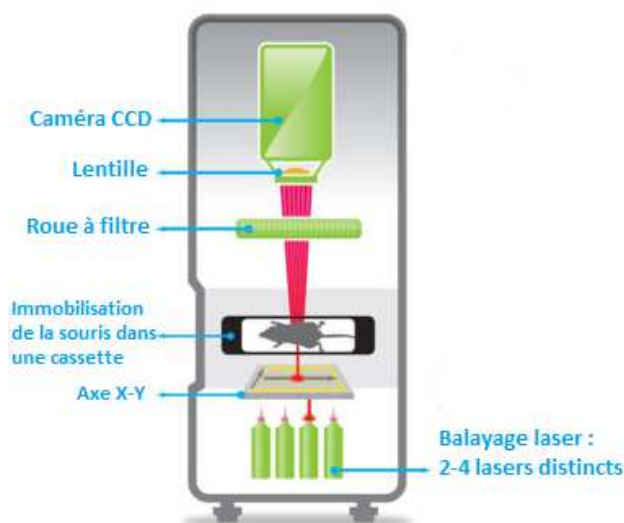


Figure 27 : Système de tomographie moléculaire de fluorescence

Ce système génère une carte de données de la fluorescence corrélée à l'absorption à partir de 10 000-100 000 projections mesurées. Les valeurs de fluorescence mesurées sont ensuite normalisées avant d'être reconstruites par des algorithmes (Perkin Elmer).

- La tomographie « vraie », pour lequel le couple excitation/détection tourne autour de l'animal, et permet de réaliser une image optique à 360°. Ce système, grâce à un anneau rotatif composé de 48 détecteurs, permet de réaliser un balayage complet dans les trois dimensions du marqueur fluorescent.

1.1.2.2.6. Les sondes fluorescentes : intérêt pour la recherche en cancérologie

Avec le développement des nouvelles modalités d'imagerie de fluorescence et plus particulièrement de la fluorescence 3D rendant possible la quantification, de nombreuses sondes permettant de cibler des mécanismes d'actions biologiques ont été développées avec notamment l'apparition de sondes activables.

- Les sondes activables permettent l'imagerie *in vivo* de certains processus biologiques. A l'état basal, la fluorescence des sondes est «quenchée» (éteinte). La présence de séquences peptidiques au niveau de ces sondes leur permet d'être clivées par des enzymes spécifiques. La sonde ainsi libérée de son quencher peut alors émettre de la fluorescence (figure 28).

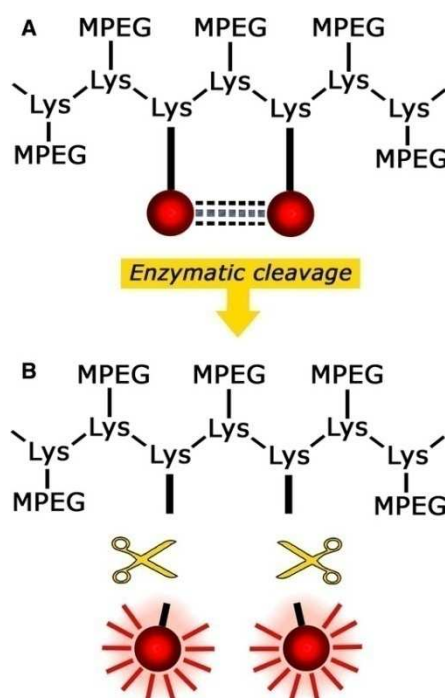


Figure 28 : Principe d'une sonde fluorescente activable

(Pleijhuis, et al., 2009)

L'avantage des sondes activables est qu'elles permettent de minimiser le bruit de fond car tant que les sondes n'ont pas atteint leur cible, aucune fluorescence n'est émise. Le contraste et la sensibilité de détection en sont améliorés.

- Les sondes déjà actives sont en général des ligands spécifiques d'une cible sur lesquels est fixé un fluorochrome.

L'élaboration de ces sondes est semblable à l'élaboration des sondes destinées à l'imagerie nucléaire, sauf que les radioisotopes sont remplacés par les fluorochromes. Il est cependant important de noter que les fluorochromes sont généralement des molécules de grande taille et qu'ils peuvent donc modifier les propriétés de la molécule (encombrement stérique, changement de conformation). Le fluorochrome libre étant fluorescent, il est nécessaire de l'éliminer en purifiant les sondes marquées, afin de limiter le bruit de fond et le signal non spécifique dans l'animal (Ntziachristos, 2006, Rao, et al., 2007).

	Inflammation aigue	Angiogenèse	Apoptose	Arthrite	Athérosclérose	Perte osseuse	Maladies cardiovasculaires	Hypertension	Oncologie	Hypoxie	Maladies vasculaires
Sondes fluorescentes activables											
Activité Cathepsine B <i>Cat B 680 et 750 FASTTM</i>	x			x	x		x		x		x
Activité Cathepsine K <i>Cat K 680 FAST</i>						x					
Activité Matrix Metalloproteinases <i>MMPsense[®] 680 et 750 FAST</i>	x			x	x		x		x		x
Activité Elastase (cellules neutrophiles) <i>Neutrophil Elastase 680 FAST</i>	x										
Activité protéases (Cathepsines B, L et S, Plasmine) <i>ProSense 680, 750 et 750 FAST</i>	x			x	x		x		x		x
Activation voie rénine angiotensine <i>ReninSense 680 Fast</i>								x			
Sondes fluorescentes activées											
Liaison aux phosphatidylsérines <i>Annexin-Vivo 750</i>			x								
Liaison aux intégrines $\alpha V\beta 3$ <i>IntegriSenseTM 680 et 750</i>		x			x		x		x		x
Liaison à l'hydroxyapatite <i>Osteosense[®] 680, 750 et 800</i>				x	x	x	x		x		
Liaison à l'anhydrase carbonique IX <i>HypoxiSense[®] 680</i>										x	
Liaison aux N-acétylglucosamines <i>TLectinSenseTM 680</i>		x							x		
Liaison à HER2 <i>HER2SenseTM 645</i>									x		
Liaison aux récepteurs α du folate <i>FolateRSenseTM 680</i>									x		
Sondes fluorescentes vasculaires											
<i>AngioSense[®] 680 et 750</i>	x	x		x			x		x		x
<i>AngioSPARK[®] 680 et 750</i>	x			x	x		x	x	x		x
<i>SuperhanceTM 680</i>	x	x		x			x		x		x

Tableau 3 : Principales sondes fluorescentes commercialement disponibles pour l'imagerie in vivo (adapté de la documentation Perkin Elmer)

L'imagerie de fluorescence présente un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres modalités d'imagerie. Il s'agit notamment d'une technique qui n'utilise pas de radiations ionisantes, elle est donc beaucoup plus simple à mettre en œuvre et moins contraignante à utiliser en routine.

Aujourd'hui, de nouvelles applications apparaissent pour l'imagerie de fluorescence. La réalisation d'examens quantitatifs et spécifiques notamment avec le développement de la tomofluorescence (fluorescence 3D) ainsi que l'accroissement du nombre de sondes fluorescentes disponibles pour l'imagerie *in vivo* chez le petit animal offrent des perspectives particulièrement intéressantes pour l'exploration d'une large gamme de fonctions ou de biomarqueurs.

Contrairement à la bioluminescence, l'imagerie de fluorescence présente un intérêt en imagerie clinique locorégionale. Des applications de la fluorescence infrarouge existent déjà, notamment pour l'imagerie per opératoire dans le cas du cancer du sein. Cette technique permet par exemple la détermination des marges chirurgicale aux stades précoces (Pleijhuis, et al., 2009) ainsi que la détection du ganglion sentinelle (Crane, et al., 2010).

La fluorescence présente toutefois certaines limites liées en particulier à la chimie du marquage qui peut modifier les propriétés de la molécule marquée ainsi que des imperfections au niveau des caractéristiques d'émission des protéines rapporteuses, ce qui nécessite de bien caractériser les sondes fluorescentes avant leur utilisation à des fins diagnostiques.

1.1.2.3. Optoacoustique

L'optoacoustique (ou photoacoustique) est une modalité d'imagerie qui couple des ondes acoustiques à des ondes optiques afin de tirer parti des informations optiques révélées par la lumière et de la résolution spatiale apportée par les ondes acoustiques.

L'imagerie optoacoustique permet de générer des ultrasons à partir de lumière selon le principe suivant : l'onde électromagnétique qui illumine l'échantillon est en partie absorbée par le milieu. L'énergie absorbée par le milieu va produire de la chaleur, ce qui va entraîner une dilatation du matériau. Cette dilatation crée des ondes acoustiques qui vont se propager dans toutes les directions.

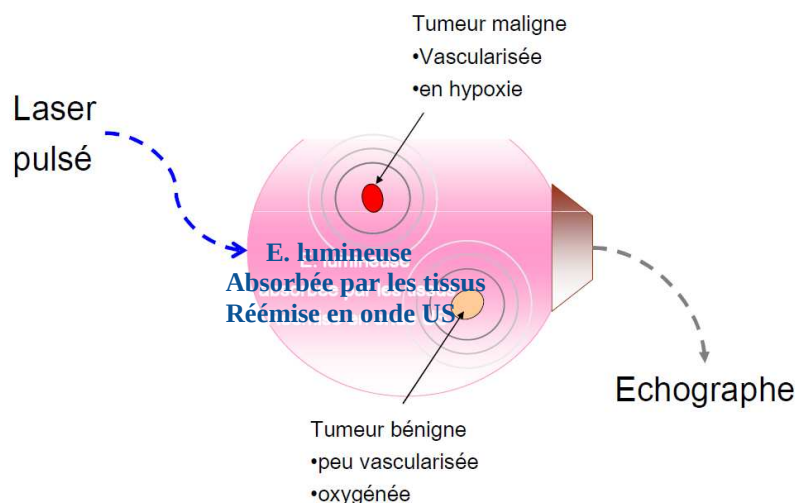


Figure 29 : Principe de l'optoacoustique

Un laser envoie des pulses lumineux à la surface du tissu, ce qui conduit à un échauffement local entraînant une expansion thermique. Une onde de pression acoustique est alors générée (d'après J. Boutet).

L'imagerie photoacoustique, en utilisant les contrastes endogènes, permet de réaliser une imagerie anatomique et fonctionnelle.

Les modifications de l'absorption optique mesurée en optoacoustique sont fonction des propriétés optiques de nombreux chromophores endogènes tels que la mélanine, l'oxy- (HbO_2) et la désoxy-hémoglobine (Hb). Ces caractéristiques vont permettre par exemple de différencier les veines des artères (différence d'absorption entre Hb et HbO_2) et ouvrent des perspectives très intéressantes pour les examens tissulaires et plus particulièrement pour l'exploration des foyers hypoxiques.

Même si l'imagerie photoacoustique peut être réalisée grâce aux chromophores endogènes, l'utilisation d'agents de contraste exogènes permet d'améliorer considérablement la qualité des images et de réaliser potentiellement une imagerie moléculaire et cellulaire de nombreux phénomènes biologiques (Mallidi, et al., 2011).

1.1.2.3.1. Les agents de contrastes exogènes

De nombreux agents de contraste ont été développés, les principaux étant les sondes fluorescentes et les nanoparticules, fonctionnalisées ou non.

- **Fluorochromes en proche infrarouge** : plusieurs fluorochromes bio-compatibles sont utilisés pour l'imagerie optoacoustique, tels que l'Indocyanine Green (Kim, et al., 2007), l'IRDye800CW (Stantz, et al., 2010), l'AlexaFluor750 (Bhattacharyya, et al., 2008) et le bleu de méthylène (Song, et al., 2008). Ces molécules présentent l'avantage d'être non toxiques et de rester longtemps en circulation.
- **Nanoparticules** : Les nanoparticules à base de métaux nobles (or et argent), sont largement utilisées en optoacoustique. Elles présentent un contraste supérieur aux fluorochromes, leur circulation est plus longue mais leur toxicité potentielle limite leur utilisation.

1.1.2.3.2. Les applications biomédicales

L'optoacoustique, en permettant une imagerie anatomique et fonctionnelle du réseau vasculaire présente de nombreuses applications. Cette modalité d'imagerie non invasive est principalement utilisée pour l'imagerie fonctionnelle du cerveau, l'exploration de la plaque d'athérome et pour la cancérologie (Luke, et al., 2012).

Les applications dans le domaine de la cancérologie sont multiples et peuvent être réalisées avec ou sans injection de produits de contrastes. Par exemple, dans le cas de mélanomes, la détection ou le suivi de la prolifération tumorale peuvent être obtenus grâce au contraste provenant du taux élevé de mélanine (qui joue le rôle de chromophore endogène) par rapport aux tissus sains environnants (Oh, et al., 2006).

L'optoacoustique est donc une modalité d'imagerie très prometteuse, notamment dans le domaine de la cancérologie, car elle permet de s'intéresser en temps réel et de manière non invasive à l'angiogénèse et l'hypoxie, paramètres qui conditionnent l'évolution tumorale et la réponse aux thérapeutiques. Mais ses limites (les mêmes que l'échographie) dues à la profondeur d'investigation et aux propriétés mécaniques des tissus ne permettent pas de couvrir tous les organes (poumons par exemple), et l'application de cette modalité pour la détection de tumeurs profondes (> 1-2 cm) est à ce jour impossible.

1.2. Quelques grands aspects physiopathologiques du cancer et possibilités d'exploration par imagerie

Le cancer est caractérisé par un dérèglement des processus cellulaires normaux présentés sur la figure 30.

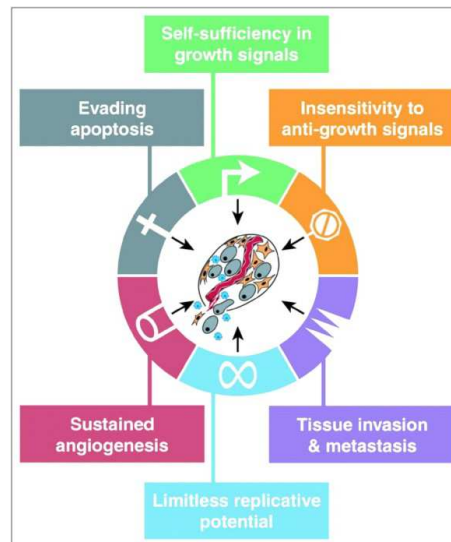


Figure 30 : Les 6 caractéristiques que les cellules cancéreuses prennent pour survivre et métastaser
(Gambhir, 2008)

Le dérèglement de ces processus permet la croissance tumorale et génère des phénomènes physiopathologiques caractéristiques des tumeurs, comme l'activation de l'angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose mais également la présence de zones hypoxiques auxquelles nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement.

1.2.1. Angiogenèse

L'angiogenèse tumorale est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (Carmeliet and Collen, 1999). Elle se différencie de la vasculogenèse qui est la formation directe de néovaisseaux à partir de précurseurs mésenchymateux (Risau, 1997).

Dans des conditions physiologiques normales, la néo-vascularisation est finement régulée. Elle joue un rôle essentiel lors du développement embryonnaire puis est fortement inhibée

après la naissance. A l'âge adulte, un équilibre entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques va permettre de maintenir les cellules en quiescence. Toutefois, certains mécanismes physiologiques bien précis vont nécessiter l'activation du processus d'angiogenèse, comme par exemple lors de la réparation tissulaire (Li, et al., 2003), et du développement du corps jaune et de l'endomètre utérin (Fujimoto, et al., 2003). Mais dans certaines situations, l'angiogenèse est activée de façon inopportune et conduit à des situations pathologiques telles que les rétinopathies, les maladies inflammatoires, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, le développement tumoral et la dissémination métastatique (Dvorak, et al., 1999).

1.2.1.1. Architecture des vaisseaux tumoraux

Lorsque la tumeur atteint une taille critique conduisant à un manque de nutriments et d'oxygène, un réseau vasculaire se met en place afin de pallier ce déficit et de lui permettre de proliférer. Ce réseau vasculaire doit s'adapter continuellement aux besoins de la tumeur. Ainsi, en permanence, des capillaires disparaissent pendant que d'autres se développent rapidement, drainant à leur profit l'essentiel du flux circulatoire sanguin. Ce remodelage vasculaire conduit à une vascularisation totalement désorganisée.

1.2.1.1.1. L'arborescence vasculaire

La paroi interne de tous les vaisseaux sanguins est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) en contact direct avec le sang, l'*intima*. Ces cellules reposent sur la membrane basale de la matrice extracellulaire (MEC) qui permet la séparation des cellules endothéliales du tissu conjonctif sous-jacent (Jain, 2003). D'autres cellules entrent dans la composition des vaisseaux, ce sont notamment les cellules musculaires lisses et les péricytes. Les cellules musculaires lisses, constituants principaux de la *média* des vaisseaux, bordent les artères, artérioles, veines et veinules. Elles servent à la régulation du flux sanguin et à la perméabilité vasculaire, en permettant la vasoconstriction. Les péricytes sont des cellules musculaires lisses qui servent notamment de support aux vaisseaux et contrôlent la vaso-activité grâce à leurs myofilaments.

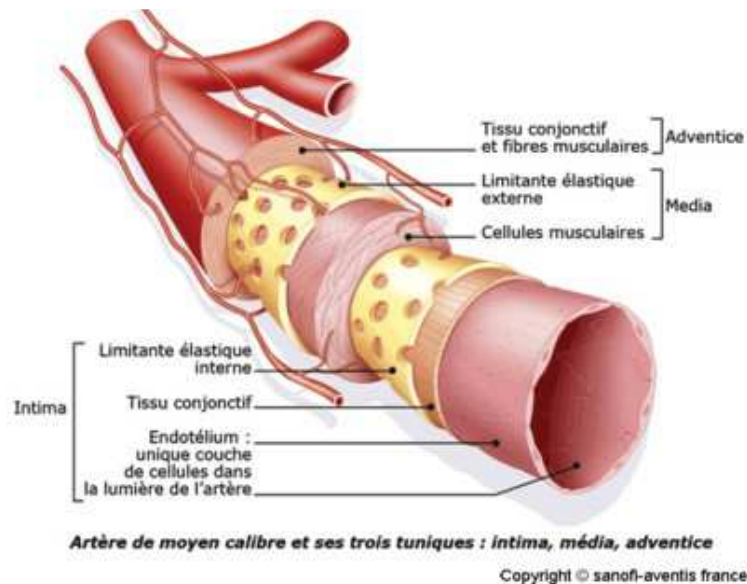


Figure 31 : Artère de moyen calibre et ses trois tuniques : intima, média, adventice

Contrairement au réseau vasculaire normal, les vaisseaux tumoraux ont une structure et des caractéristiques très différentes (figure 32), essentiellement dues à la sécrétion constante de facteurs pro-angiogéniques par les cellules cancéreuses (McDonald and Choyke, 2003).

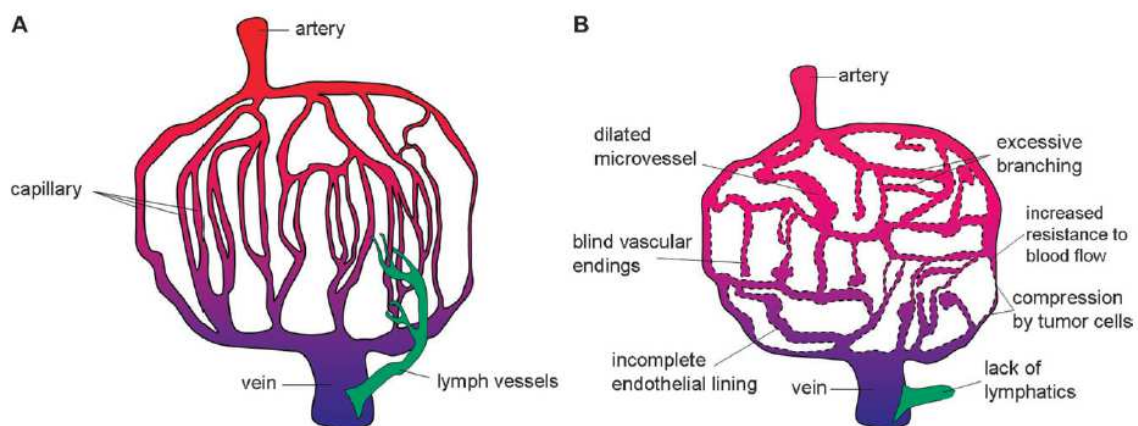


Figure 32 : Représentation schématique des systèmes vasculaires

A : Tissu sain ; B : Tumeur solide. Les vaisseaux rouges représentent le sang artériel bien oxygéné, les vaisseaux bleus représentent le sang veineux faiblement oxygéné. En vert sont représentés les vaisseaux lymphatiques (Tredan, et al., 2007).

Les vaisseaux formés dans la tumeur sont en général totalement désorganisés, très tortueux et dilatés avec des embranchements excessifs (Eberhard, et al., 2000). Il manque souvent des péricytes, ce qui induit la quiescence endothéliale par inhibition de contact. Les vaisseaux présentent également une grande perméabilité. Au niveau de l'ultrastructure, l'endothélium est discontinu à de nombreux endroits, avec une absence de jonctions

cellulaires, une absence partielle ou totale de membrane basale. La conséquence en est un flux sanguin très chaotique et variable, induisant des zones hypoxiques et nécrotiques.

1.2.1.1.2. Les mécanismes de formation de la vascularisation

La croissance du cancer et l'apparition de métastases sont étroitement liées à la vascularisation de la tumeur primitive. La compréhension des mécanismes de formation des nouveaux vaisseaux permet de développer des stratégies anticancéreuses qui la prennent pour cible. Plusieurs mécanismes de formation des vaisseaux ont été identifiés. L'angiogenèse, la vasculogenèse, l'intussusception et la co-option des vaisseaux (figure 33).

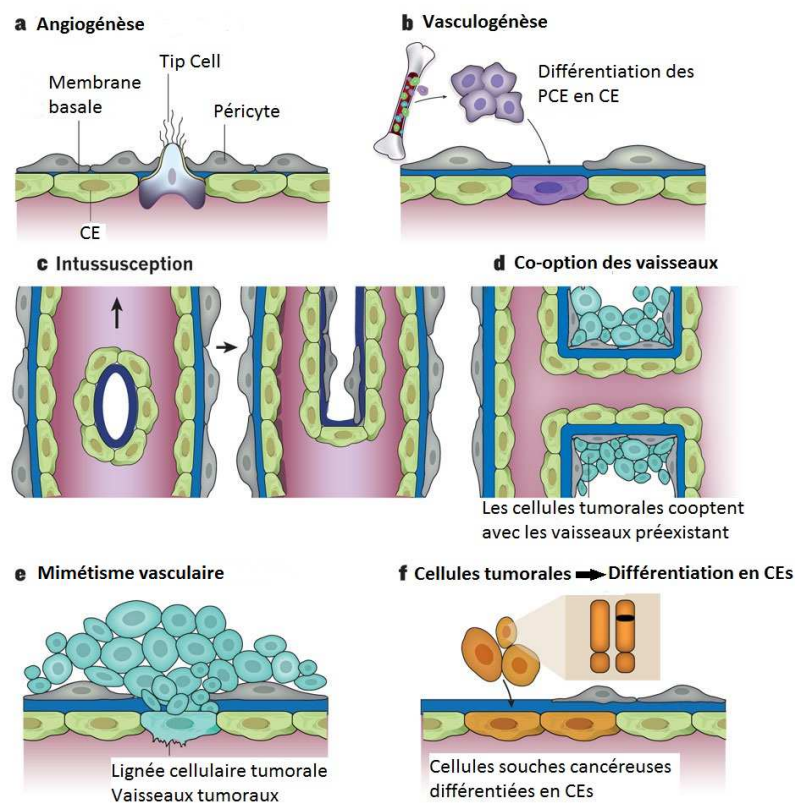


Figure 33 : Mécanismes de formation des vaisseaux

Plusieurs mécanismes permettent de former des vaisseaux sanguins dans les tissus normaux et tumoraux. La formation de nouveaux vaisseaux peut survenir par angiogénèse (a), par recrutement de précurseurs de la moelle osseuse ou de progéniteurs des cellules endothéliales (PCE) qui vont se différencier en cellules endothéliales (CEs)(b), ou par intussusception (c). Les cellules tumorales peuvent co-opter les vaisseaux pré-existants (d), les vaisseaux tumoraux peuvent être bordés de cellules tumorales (mimétisme vasculaire)(e), ou par les cellules endothéliales, suite à des anomalies cytogénétiques dans leurs chromosomes(f). Contrairement aux tissus normaux, qui utilisent uniquement l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'intussusception (a-c), les tumeurs peuvent utiliser les 6 modes de formation des vaisseaux (a-f) (Carmeliet and Jain, 2011).

- **Angiogenèse** : Ce processus débute par la sortie de quiescence des cellules endothéliales des vaisseaux péricarcinomaux provoquée par le switch angiogénique, c'est-à-dire lorsque l'équilibre entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques est rompu en faveur des facteurs pro-angiogéniques (Hillen and Griffioen, 2007).

L'angiogenèse se décompose en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, les cellules endothéliales, activées par des facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) vont libérer des enzymes en particulier des protéases (Matrix Metalloprotéinase, MMP), conduisant à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC), étape qui permet de perméabiliser les vaisseaux. S'ensuit une étape de migration des CE à l'aide de molécules d'adhésion (intégrines) ainsi qu'une phase de prolifération dans la matrice environnante. Enfin, par différenciation et polarisation, les CE s'organisent en structures tubulaires avec une nouvelle lame basale, des « bourgeons » se connectent aux vaisseaux voisins pour créer de nouveaux vaisseaux. Afin de stabiliser ces néo-vaisseaux immatures, les CE vont induire la mise en place de la paroi vasculaire et la MEC va se régénérer.

- **Vasculogenèse** : La vasculogenèse peut être définie comme un processus entraînant la formation de nouveaux vaisseaux *de novo* suite au recrutement de différents types de précurseurs endothéliaux (Bertolini, et al., 2006).
Lors de la vasculogenèse, les précurseurs endothéliaux, plus particulièrement ceux dérivés de la moelle osseuse, contribuent à la vascularisation tumorale en combinaison avec l'angiogenèse (Asahara, et al., 1999). Les cellules souches hématopoïétiques et vasculaires (hémangioblastes) donnent naissance à des cellules progénitrices endothéliales matures qui vont former un plexus vasculaire uniforme. Ce plexus sera ensuite remodelé afin de former un système vasculaire mature.
- **Intussusception** : Ce mécanisme, indépendant de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales consiste en l'insertion d'un pilier tissulaire au niveau de la lumière du vaisseau, entraînant la partition de cette lumière en deux ou plusieurs canaux indépendants. Lors de l'intussusception, il n'y a pas de prolifération importante des CE mais plutôt un réarrangement des structures préformées (Patan, et al., 1996).
- **Co-option des vaisseaux** : Ce mécanisme a été décrit plus récemment, il montre que l'angiogenèse ne se fait pas uniquement par bourgeonnement. La co-option des

vaisseaux consiste en une capture des vaisseaux préexistants dans le stroma tumoral (Leenders, et al., 2002, Ribatti, et al., 2003).

- **Mimétisme vasculaire** : Le mimétisme est un processus de vascularisation assez particulier que l'on rencontre dans de nombreux cancers. Certaines cellules cancéreuses acquièrent une morphologie de cellule endothéliale et expriment différents gènes spécifiques des cellules endothéliales (Dome, et al., 2007). Ce mimétisme vasculaire aboutit à la formation d'un réseau capillaire dont l'endothélium est composé essentiellement de cellules cancéreuses au phénotype endothélial (Paulis, et al., 2010).

1.2.1.2. Thérapie anti-angiogénique

Du fait de l'importance de l'angiogenèse dans le développement tumoral, les vaisseaux sanguins sont rapidement apparus comme une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement du cancer. Les premiers inhibiteurs angiogéniques destinés à être utilisés en clinique ont été développés dans les années 70 sur des modèles animaux (Folkman, 1972).

Depuis, de nombreuses stratégies anti-angiogéniques ciblant différents mécanismes, molécules ou facteurs impliqués dans l'angiogenèse ont été développées.

Les principales cibles des thérapies anti-angiogéniques sont présentées dans la figure ci-dessous :

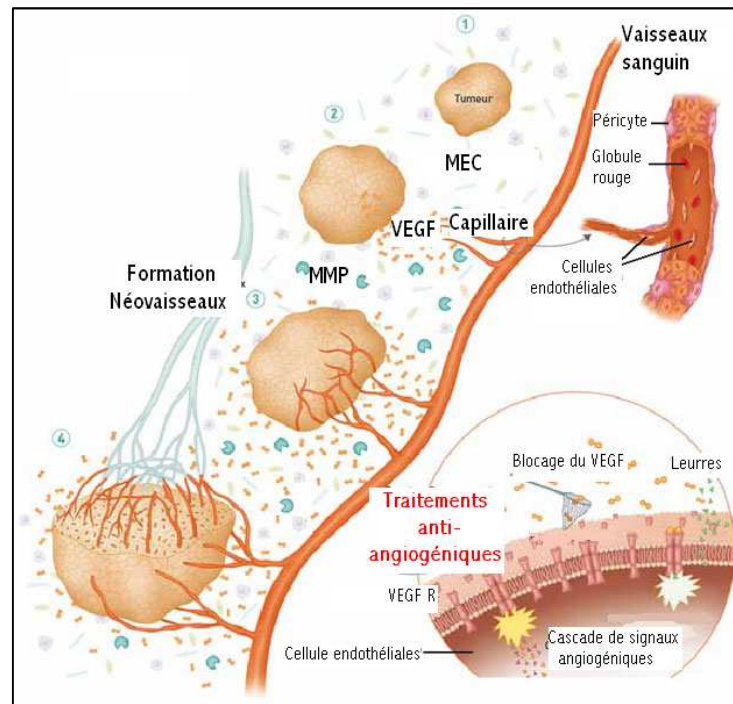


Figure 34 : Les différentes cibles des traitements anti-angiogéniques
(d'après Lamoglia, Institut Curie)

Inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire

L'inhibition de la dégradation de la MEC va permettre de bloquer les étapes d'invasion et de migration des cellules endothéliales. Cette stratégie repose principalement sur l'inhibition des MMPs grâce à des inhibiteurs synthétiques (Coussens, et al., 2002).

Inhibition de l'adhésion cellulaire

L'adhésion des cellules endothéliales à la MEC est régulée par des récepteurs présents à leur surface, notamment les intégrines. Ces molécules sont insérées dans la membrane plasmique et comportent deux domaines : un domaine dit « large », extracellulaire, et un domaine dit « court » intracellulaire (figure 35). Les intégrines sont organisées sous la forme d'hétérodimères consistant en une sous-unité alpha et une sous-unité bêta. Il existe environ 18 sous-unités alpha et 8 sous-unités bêta (Giancotti and Ruoslahti, 1999), correspondant à une vingtaine de combinaisons possibles d'intégrines.

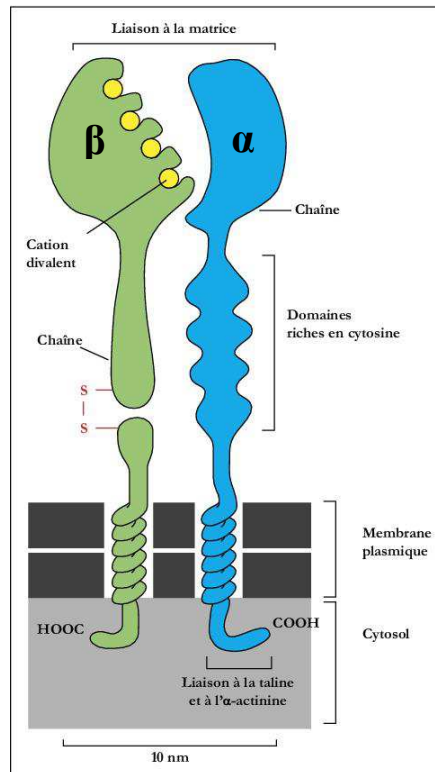


Figure 35 : Représentation schématique d'une intégrine avec ses domaines α et β
(Poupon, 2006)

L'intégrine $\alpha\beta3$ est impliquée dans l'angiogenèse et le remodelage vasculaire. Elle est exprimée essentiellement au niveau des cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux (Brooks, et al., 1994, Max, et al., 1997).

Les ligands extracellulaires de l'intégrine $\alpha\beta3$ sont des protéines de la MEC tels que la fibronectine, la thrombospondine, l'ostéopontine... Ces protéines lient $\alpha\beta3$ par une séquence tripeptidique arginine-glycine-aspartyl (RGD).

Des molécules antagonistes des intégrines ont ainsi été développées. En empêchant l'adhésion des CE, ces peptides vont inhiber leur prolifération et induire leur apoptose (Robinson and Hodivala-Dilke, 2011).

Inhibition de l'activation des cellules endothéliales

L'angiogenèse peut être inhibée par action directe sur les cellules endothéliales. Par exemple une diminution de la synthèse de $TNF\alpha$ suite à l'administration de thalidomide entraîne une activité anti-cytokine et antiproliférative des cellules cancéreuses (Liu, et al., 2009). On peut également citer l'utilisation de combretastatine, qui se lie spécifiquement à la

tubuline et va induire spécifiquement l'apoptose des cellules endothéliales en prolifération (Lunt, et al., 2011).

Inhibition des facteurs de croissance et de leurs récepteurs

L'angiogenèse étant initiée suite à la sécrétion de facteurs de croissance et à la surexpression de leurs récepteurs sur les cellules endothéliales, une stratégie consiste à inhiber des facteurs tumoraux endogènes, à bloquer leur fixation sur leurs récepteurs ou bien à empêcher la transduction du signal.

Parmi les molécules entraînant une diminution de l'expression des facteurs de croissance et/ou des récepteurs on retrouve des molécules inhibant la fixation du VEGF sur son récepteur. Dans ce cas, la thérapie la plus utilisée consiste en l'administration d'anticorps monoclonaux comme le bevacizumab (Avastin[®]) qui va se lier spécifiquement au VEGF et empêcher sa fixation sur son récepteur (Wahl, et al., 2011).

Une autre stratégie consiste en l'utilisation de protéines contenant les domaines extracellulaires des récepteurs tels que le VEGF-Trap. Ces récepteurs solubles vont capturer le VEGF circulant et diminuer sa biodisponibilité. L'administration de VEGF-Trap supprime la croissance tumorale et la vascularisation *in vivo*, conduisant à l'inhibition de la vascularisation tumorale et à une diminution du nombre de métastases (Lassoued, et al., 2010, Torimura, et al., 2008).

Un grand nombre d'approches sont donc possibles et la figure 36 représente une synthèse des différentes stratégies permettant d'inhiber l'angiogenèse tumorale.

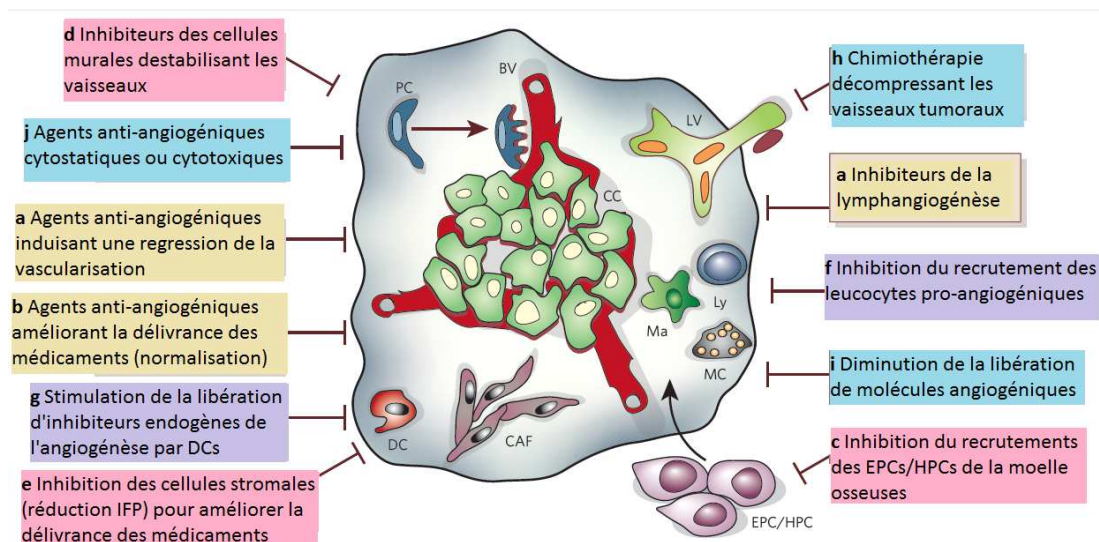


Figure 36 : Stratégies de ciblage des cellules endothéliales et non endothéliales pour inhiber l'angiogénèse tumorale
(Carmeliet, 2005)

1.2.1.3. Imagerie de la vascularisation et de l'angiogénèse

Il est donc bien reconnu que la néoangiogénèse tumorale est l'un des déterminants majeurs de la croissance locale des tumeurs mais également de la diffusion à distance des lésions secondaires. L'étude de cette néoangiogénèse revêt donc un caractère essentiel dès lors que l'on souhaite évaluer le potentiel de croissance de la tumeur mais aussi la réponse tumorale à des traitements spécifiques.

La plupart des modalités d'imagerie décrites dans la partie 1.1 permettent de s'intéresser à la vascularisation tumorale. Le paragraphe suivant propose donc quelques exemples du potentiel des différentes modalités d'imagerie pour l'étude de l'angiogénèse et de la vascularisation.

1.2.1.3.1. Imagerie anatomique

L'imagerie de la microcirculation doit permettre d'étudier des paramètres tels que la perfusion, la perméabilité et le volume sanguin de manière quantitative. Trois modalités d'imagerie sont utilisées en routine et permettent de s'intéresser à ces caractéristiques en

réalisant une imagerie anatomique de la vascularisation tumorale : il s'agit de l'IRM, de la TDM X et des ultrasons.

Imagerie de la microcirculation par injection d'agents de contraste

- **IRM** : Afin de visualiser la microcirculation, l'une des modalités d'imagerie principalement mise en œuvre est l'IRM avec injection d'agent de contraste. Comme déjà évoqué, les agents de contraste les plus utilisés sont constitués par des petites molécules à base de chélates de gadolinium. Ces molécules diffusent rapidement dans les espaces extravasculaire et extracellulaire, permettant de calculer la fraction du volume vasculaire dans un tissu, la perfusion tissulaire et la perméabilité capillaire. Ceci permet notamment de différencier les tissus sains des tissus malins (Padhani and Patel, 2011). Une étude récente a démontré que l'IRM avec injection d'agents de contraste permettait d'évaluer les effets d'une nouvelle molécule anti-angiogénique dans un modèle de carcinome ovarien (Yang, et al., 2011).

Toutefois cet examen qui semble avoir une bonne sensibilité a montré par ailleurs une faible spécificité pour l'imagerie clinique de la vascularisation des tumeurs mammaires (Heijblom, et al., 2011).

- **TDM X** : Comme pour l'IRM, la visualisation de la vascularisation tumorale par tomодensitométrie est réalisée suite à l'injection de produits de contraste. Cette technique est aussi appelée tomодensitométrie de perfusion. Actuellement, les produits de contraste les plus utilisés sont les agents iodés qui vont permettre d'opacifier la vascularisation. La TDM de perfusion a montré qu'elle peut par exemple être utilisée pour prédire la réponse à une thérapie antitumorale par mesure du volume sanguin chez des patients (Petràlia, et al., 2011).

L'imagerie *in vivo* par tomодensitométrie de perfusion ne permet toutefois pas d'obtenir des images d'une résolution suffisante pour quantifier précisément l'impact d'un traitement sur la microvascularisation tumorale. L'amélioration de la résolution se fait soit par des ruptures technologiques, grâce à des imageurs plus performants, tels que les microCT, qui permettent de réaliser des acquisitions avec une résolution de l'ordre du micromètre ou bien par amélioration des protocoles d'acquisitions des imageurs dédiés au petit animal par augmentation du temps d'acquisition (et donc de

la dose de rayons X délivrée). Dans ces deux cas, il est impossible de réaliser les examens sur animal vivant, car d'une part, les microCT ne permettent pas d'imager des animaux mais uniquement des échantillons de petite taille, et d'autre part, l'augmentation des temps d'acquisitions (plusieurs heures) ainsi que l'augmentation des doses délivrées ne sont pas compatibles avec des études de cancérologie. Une solution, consiste à réaliser une image *ex vivo* de tumeur.

Pour cela, une technique par injection de résine radio-opaque au niveau de la vascularisation a été développée. Cette méthode de « Casting de la vascularisation » que nous allons nommer plus simplement Cast est une méthode qui va permettre de reconstruire la structure tri-dimensionnelle des vaisseaux sanguins des organes et des tissus par injection d'une résine dans la circulation (Konerding, et al., 1999). L'ajout de composé radio-opaque dans la formulation de la résine permet alors de visualiser les vaisseaux « castés » par TDM (Meyer, et al., 2007).

Imagerie de la vascularisation par étude des flux sanguins

- **Ultrasons** : Une autre modalité permettant l'étude de l'angiogenèse tumorale est l'écho-doppler qui est principalement mis en œuvre dans le cas de tumeurs superficielles (mélanomes et cancers du sein). Elle permet la détection du flux anormal caractéristique d'une tumeur maligne (Hata and Miyazaki, 2003). Cette technique permet d'évaluer relativement simplement l'efficacité des nouvelles thérapeutiques anti-angiogéniques par visualisation des flux lents dans des microvaisseaux et d'estimer très précocement l'efficacité d'un traitement, avant apparition des modifications du volume tumoral.

1.2.1.3.2. Imagerie fonctionnelle

L'évolution des modalités d'imagerie a permis la mise au point d'approches moléculaires pour l'étude du cancer (Schirner, et al., 2004).

Quelles que soient les stratégies développées, le principe est le même. Il consiste en la fixation d'un marqueur (radioisotope, fluorochrome, ...) sur des ligands (anticorps, peptides, ...) spécifiques de la cible.

Les modalités d'imagerie nucléaire (TEP et TEMP) sont les plus utilisées pour détecter précocement les tumeurs aux premiers stades de croissance, c'est-à-dire dès la mise en place du switch angiogénique.

Imagerie de l'expression des intégrines

L'imagerie de l'expression des intégrines consiste en l'utilisation de peptides RGD marqués par des isotopes ou des fluorochromes. Ces peptides vont cibler spécifiquement les intégrines (principalement l'intégrine $\alpha\beta3$) exprimée au niveau des néovaisseaux tumoraux.

Il a ainsi été montré que le radiotracer ^{18}F -Galacto-RGD permet de visualiser l'expression des intégrines $\alpha\beta3$ en TEP (Beer, et al., 2006). Afin de visualiser par imagerie TEMP la prolifération de cellules étoilées du foie qui expriment des intégrines $\alpha\beta3$ lorsqu'elles sont activées, un peptide cyclique de RGD a été marqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Li, et al., 2011) et a montré tout son intérêt. Des liposomes chélatant le gadolinium et couplés à un anticorps monoclonal spécifique des intégrines (LM609) sont utilisés en IRM (Sipkins, et al., 1998). Enfin, l'IntegriSenseTM, molécule commercialisée pour l'imagerie préclinique (Tekabe, et al., 2011) est un peptide RGD couplé à un fluorochrome qui émet dans l'infrarouge (750 nm) et qui permet également de s'intéresser à l'imagerie de l'expression des intégrines.

Ciblage du VEGF

Afin de cibler le VEGF, fortement exprimé par les néovaisseaux tumoraux, plusieurs traceurs ont été développés :

- En imagerie TEMP, une des applications est l'utilisation d'un VEGF recombinant marqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Ce peptide permet de visualiser l'expression du récepteur au VEGF et par exemple de déterminer la réponse ou non à un traitement par le pazopanib (inhibiteur du VEGFR) (Blankenberg, et al., 2010).
- La conjugaison à la surface des microbulles d'un peptide spécifique du récepteur au VEGF (VEGFR2), via des phospholipides (Pillai, et al., 2010) a permis d'imager l'expression de VEGFR2 par imagerie ultrasonore.
- Enfin, l'utilisation de VEGF recombiné (scVEGF) marqué avec un fluorochrome Cy5.5 a permis de cibler les récepteurs au VEGF pour l'imagerie de fluorescence (Backer, et al., 2007).

Ciblage de MMPs

L'activation des MMPs est caractéristique de la croissance tumorale, cette activation apparaissant dès les stades précoces de la tumorigenèse. Une sonde fluorescente activable, le MMPsense[®] (Perkin Elmer) permet de détecter cette activation. Elle a été utilisée par exemple pour la détection précoce d'adénomes colorectaux (Clapper, et al., 2011).

1.2.2. Mort cellulaire et apoptose

1.2.2.1. Généralités

Il existe 4 types de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose dont les mécanismes ont été les plus décrits et qui seront détaillés ci-dessous ainsi que l'autophagie et la sénescence.

1.2.2.1.1. La nécrose

La nécrose est une mort cellulaire accidentelle qui survient lors d'un dommage tissulaire et implique des groupes de cellules. La nécrose est considérée comme une mort cellulaire désordonnée, avec des modifications apparaissant au niveau du cytoplasme et du noyau qui va se condenser. L'ADN nucléaire va ainsi être dégradé de manière aléatoire (Bicknell and Cohen, 1995) par des endonucléases.

Lors de la nécrose, la cellule gonfle en se remplissant d'eau, puis la membrane cellulaire éclate sous l'effet de la pression, provoquant le relargage du contenu cytoplasmique dans le milieu environnant et induisant localement une inflammation. Celle-ci est provoquée par la présence d'enzymes et de substances inflammatoires dans le cytosol telles que les cytokines, le TGF-beta1 et la PGE-2 (Maderna and Godson, 2003).

1.2.2.1.2. L'apoptose

L'apoptose, appelée aussi mort cellulaire programmée, est hautement régulée et indispensable à la survie des organismes multicellulaires ainsi qu'au maintien de l'homéostasie.

Morphologiquement, l'apoptose correspond à une rétraction progressive de la cellule, avec condensation de la chromatine et du cytoplasme, suivie d'une fragmentation caractéristique de l'ADN aboutissant à la formation de fragments cellulaires ou corps apoptotiques (figure 37).

Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne va pas induire d'inflammation puisque l'intégrité de la membrane plasmique est conservée, évitant tout déversement du contenu cellulaire vers l'extérieur.

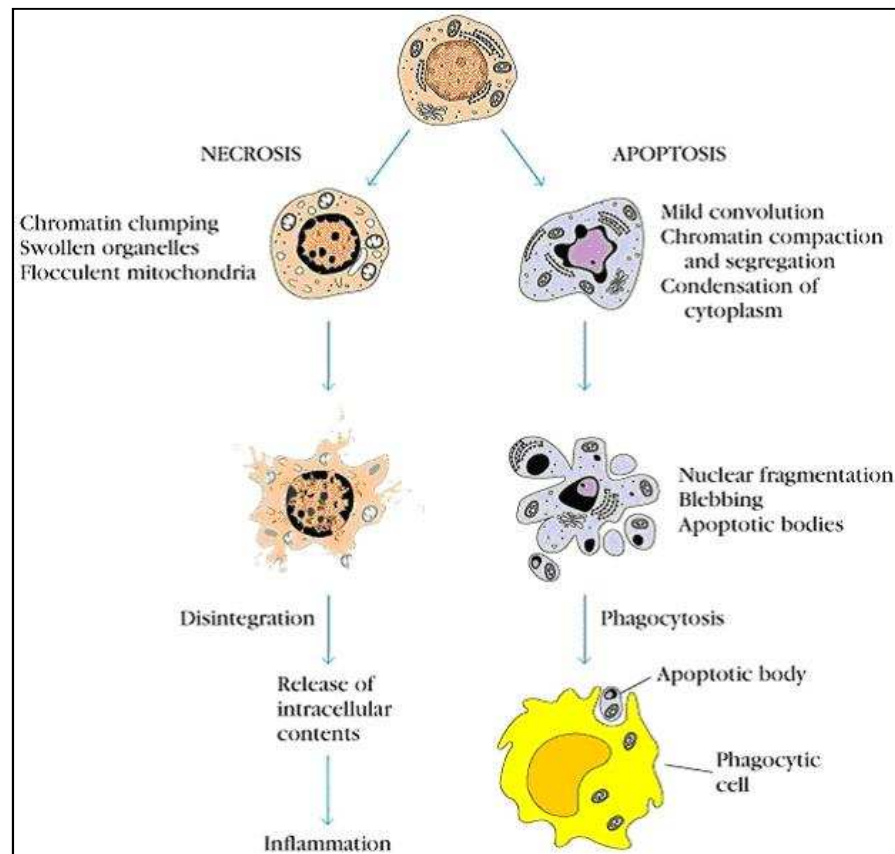


Figure 37 : Différence entre les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques

(American Institutes for Biological & Nutritional Sciences, 2005)

Le processus d'apoptose est médié par plusieurs voies d'activation dont deux sont caspases dépendantes (voies intrinsèque et extrinsèque) et une caspase indépendante.

Concernant les voies caspases dépendantes :

- **La voie extrinsèque** est induite par un stimulus passant par des récepteurs de mort cellulaire tels que le récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs au Tumor Necrosis Factor (TNF) (Song and Steller, 1999).

- **La voie intrinsèque** cible le métabolisme cellulaire et plus précisément le métabolisme mitochondrial avec la libération de cytochrome c par la mitochondrie (Bossy-Wetzel and Green, 1999) et l'activation des caspases (Chang and Yang, 2000). Cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2.

Ces deux voies conduisent à l'activation de caspases après clivage protéolytique de protéines précurseurs, les pro-caspases. Cela va induire une cascade d'événements morphologiques et biochimiques tels que l'exposition de phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire (Castedo, et al., 1996), l'arrêt de la réplication, la fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

Il existe également une autre voie apoptotique qui se déroule sans l'intervention des caspases, dont l'acteur principal est le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor)

Une synthèse des différentes voies d'activation de l'apoptose est présentée figure 38.

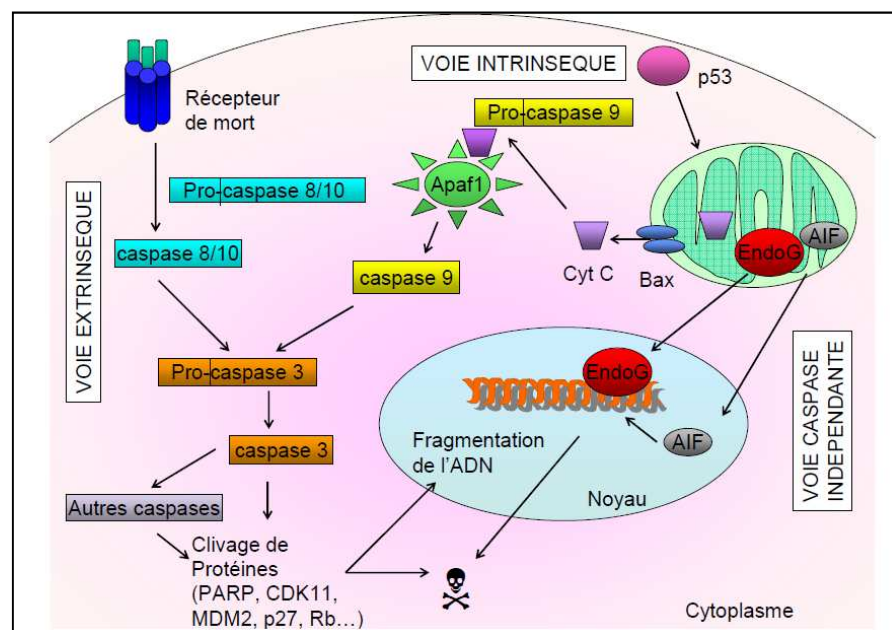


Figure 38 : les différentes voies conduisant à l'apoptose

Les 3 voies apoptotiques sont représentées sur le schéma. La voie intrinsèque dépendante des caspases (en haut) implique l'apoptosome assemblé grâce au cytochrome C relargué de la mitochondrie, et active la caspase 9. La voie extrinsèque dépendante des caspases (à gauche) implique les récepteurs de mort et entraîne l'activation des caspases 8/10. La voie caspase indépendante (à droite) entraîne la translocation d'AIF et de l'endonucléase G (endoG) de la mitochondrie au noyau (d'après Le Bouffant, R., 2007).

1.2.2.2. Régulation de l'apoptose et cancer

L'apoptose intervient dans de nombreux processus physiologiques comme le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation, la régulation et le fonctionnement du système immunitaire. Elle permet ainsi à l'organisme de se débarrasser des cellules indésirables. Toutefois, des anomalies dans la régulation de ce processus apoptotique peuvent contribuer à divers états pathologiques, notamment lors de certaines pathologies neurodégénératives, de maladies auto-immunes et de cancers (tableau 4).

Type de pathologie	Exemples	Apoptose
Maladie neurodégénérative	Alzheimer Sclérose latérale amyotrophique Parkinson	} Suractivée
Désordre immunitaire	Maladie autoimmunes SIDA Diabète Thyroïdite	Inhibée Suractivée Suractivée Suractivée
Néoplasie	Lymphome Astrocytome Hépatome Mélanome	} Inhibée
Divers	Vieillissement Alopécie	} Suractivée

Tableau 4 : Pathologies associés à des dérèglements du processus apoptotique

Le cancer apparaît lorsque l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire est perturbé. L'objectif d'un traitement anticancéreux est ainsi de déclencher l'apoptose dans les cellules tumorales sans affecter les cellules saines.

L'apoptose est un processus d'équilibre entre protéines pro- et anti-apoptotiques. Les voies moléculaires intrinsèques et extrinsèques qui régulent l'apoptose et donc l'équilibre entre ces protéines pro- et anti-apoptotiques sont donc des cibles très intéressantes afin d'obtenir une activité thérapeutique potentielle.

Plusieurs agonistes de récepteurs pro-apoptotiques qui activent sélectivement la voie extrinsèque ont déjà été développés. Des inhibiteurs spécifiques de la voie TRAIL, voie intrinsèque, ont aussi été conçus (de Vries, et al., 2006).

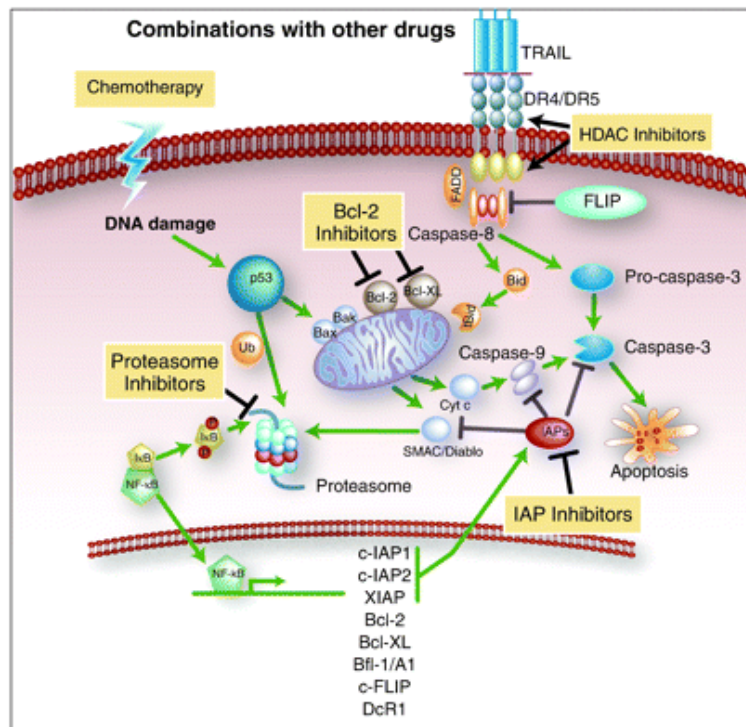


Figure 39 : Impact de différentes classes de molécules sur la régulation de l'apoptose

Illustration de la façon dont les molécules tels que les chimiothérapies ainsi que les inhibiteurs du protéasome, les inhibiteurs des histones désacétylase (HDAC), les inhibiteurs des membres de la superfamille des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et les inhibiteurs des protéines apoptotiques (IAP), interfèrent dans la voie de signalisation TRAIL et peuvent potentialiser les effets de rhTRAIL (de Vries, et al., 2006)

Afin d'inhiber la voie de signalisation TRAIL, un certain nombre de chimiothérapies ont été développées. Celles-ci sont réparties en 4 grandes familles d'inhibiteurs :

- Les inhibiteurs du protéasome : celui-ci étant responsable de la dégradation de la majorité des protéines intracellulaires, y compris les protéines pro-apoptotiques, ces inhibiteurs vont affecter les multiples voies de signalisation cellulaire.
- Les inhibiteurs des histones désacétylases induisent une différenciation et/ou l'apoptose de nombreux types cellulaires en activant la transcription de gènes cible. Ces inhibiteurs agissent en synergie avec TRAIL, par exemple en induisant TRAIL-DR4 et TRAIL-DR5 via l'activation du facteur nucléaire NFκB et de certains membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 engageant la voie mitochondriale.
- Les inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-XL) ou les inhibiteurs des protéines apoptotiques capables d'éliminer les obstacles de la voie de signalisation TRAIL.

De nombreuses protéines jouent un rôle dans l'apoptose induite par TRAIL. L'inhibition spécifique de ces protéines devrait permettre d'améliorer le ciblage tumoral ainsi que la personnalisation des traitements anti-apoptotiques.

1.2.2.3. Imagerie de l'apoptose

Dans le domaine de l'imagerie en cancérologie expérimentale, la possibilité de visualiser le processus apoptotique présente un intérêt particulier puisque cela doit permettre d'apprécier la réponse de la tumeur à un traitement. Ainsi, en clinique, cela doit conduire à évaluer la réponse d'un patient à la chimiothérapie, rapidement, pour éventuellement le réorienter vers d'autres approches thérapeutiques en cas de non réponse.

Pour réaliser cette imagerie, plusieurs démarches sont possibles et nous proposons d'en présenter deux basées sur le ciblage des caspases et la détection des phosphatidylsérines.

1.2.2.3.1. Imagerie *via* activation des caspases

Récemment, des constructions bioluminescentes et/ou fluorescentes permettant de suivre spécifiquement l'activation des caspases *in vivo* ont été décrites.

Une des première molécule développée, le FLICA, un inhibiteur des caspases relié à un fluorochrome, a démontré une forte affinité pour les cystéines présentes au niveau du site actif des caspases, et a permis une détection de l'activité apoptotique *in vitro* et *in vivo* (Lee, et al., 2008). Cependant, des résultats complémentaires ont remis en cause la spécificité du marquage par les inhibiteurs des caspases puisque l'équipe de Kuzelova a obtenu un signal fluorescent suite à des liaisons non spécifiques de FLICA (Kuzelova, et al., 2007).

Afin d'améliorer la spécificité des traceurs, le couplage à un groupement pouvant être spécifiquement reconnu par les caspases semble donc une approche intéressante.

Des sondes activables fluorescentes, séparées par une séquence DEVD ont permis de détecter une activation spécifique des caspases, mais actuellement ces sondes sont encore en développement (Barnett, et al., 2009).

Une nouvelle molécule pour l'imagerie de bioluminescence, la Z-DEVD-aminoluciférine, basée sur le même principe que les sondes fluorescentes, est commercialisée et permet de réaliser une imagerie *in vivo* de l'apoptose avec un signal de bruit de fond très faible, contrairement aux sondes fluorescentes.

Z-DEVD-aminoluciférine

Un substrat a été développé (VivoGlo™ Caspase-3/7 Substrate, Promega) afin de réaliser une imagerie de l'apoptose par bioluminescence. Le principe de ce substrat est présenté figure 40.

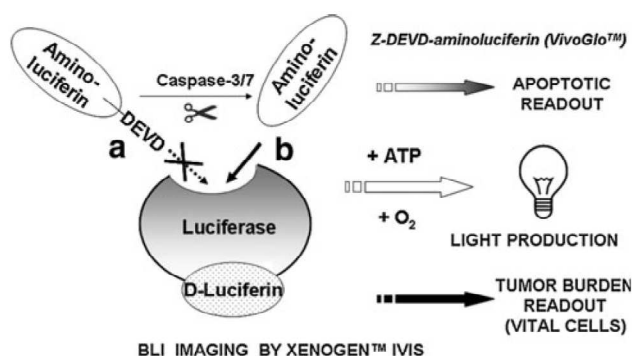


Figure 40 : Principe de l'imagerie de l'apoptose *in vivo* grâce à la Z-DEVD-aminoluciférine
(Scabini, et al., 2011)

A l'état basal, la Z-DEVD-aminoluciférine ne peut pas interagir avec la luciférine, à cause de l'encombrement stérique du groupement DEVD. Après clivage spécifique de la liaison DEVD-aminoluciférine par les caspases 3 et 7, l'aminoluciférine libre va pouvoir interagir avec la luciférase et aboutir, en présence d'O₂ et d'ATP, à la réaction classique de bioluminescence.

Des études ont ainsi montré l'efficacité de cette molécule pour la détection de l'apoptose dans des modèles murins. Une augmentation de l'intensité du signal de bioluminescence après injection de Z-DEVD-aminoluciférine a été observée suite à un traitement au docétaxel dans des tumeurs SKOV3-luc et MDA-MB-231-luc-LN (Hickson, et al., 2010), et lors d'un traitement de tumeurs colorectales HCT116-luc par de l'irinotécan (Scabini, et al., 2011).

Ce substrat présente donc un intérêt important pour imager l'apoptose médiée par les caspases 3 et 7. Toutefois, très peu de travaux ont fait l'objet de publications à ce jour. Il

semblerait que des problèmes soient rencontrés notamment du fait d'une dégradation basale de la Z-DEVD-aminoluciférine entraînant un signal de bioluminescence très important avant injection du traitement, et de la difficulté à normaliser le signal de bioluminescence apoptose à un paramètre objectif (prolifération tumorale évaluée par BLI classique ou volume tumoral mesuré au pied à coulisse).

1.2.2.3.2. Ciblage des phosphatidylsérines : intérêt de l'Annexine 5

Lors du processus d'apoptose l'exposition de phosphatidylsérines au niveau de la membrane cellulaire est un phénomène qui survient précocement. Ces phosphatidylsérines peuvent être ciblées par des ligands spécifiques, en particulier l'annexine 5 qui est une protéine humaine endogène dont les propriétés biologiques sont attribuées à sa liaison de haute affinité aux phospholipides membranaires chargés négativement, en présence de calcium Ca^{2+} à concentration physiologique. Ainsi, l'annexine 5 se lie spécifiquement avec une grande affinité aux phosphatidylsérines présentes au niveau des membranes cellulaires (Tait and Gibson, 1990).

Aujourd'hui, cette molécule est couramment utilisée pour l'imagerie de l'apoptose. Elle peut être marquée, selon la modalité d'imagerie considérée, par des radioisotopes ou des fluorochromes.

Imagerie TEMP

L'un des premiers essais chez l'animal permettant d'évaluer l'induction de l'apoptose fut réalisé en TEMP par injection d'annexine 5 HYNIC (Blankenberg, et al., 1998). En clinique la mise en œuvre d'une annexine 5 recombinante humaine (rh-annexin 5) liée à du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ via un radioligand de pentioate (N2S2) a permis de visualiser des foyers hypoxiques (Boersma, et al., 2003).

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ n'est pas le seul radioisotope permettant de marquer l'annexine 5 pour l'imagerie TEMP. L' ^{111}In par exemple (Zhang, et al., 2011), a également été mis en œuvre, l'avantage de ce radioélément étant sa demi-vie plus grande qui permet le suivi du processus apoptotique sur une durée plus longue.

Imagerie TEP

De nombreuses approches ont permis de marquer l'annexine 5 au ^{18}F . L'une des méthodes consiste à utiliser du N-succinimidyl 4-fluorobenzoate afin de synthétiser de la ^{18}F -Annexine 5 (Grierson, et al., 2004, Murakami, et al., 2004). L'avantage de cette sonde est une fixation moindre au niveau du foie, des reins et de la rate par rapport à l'annexine 5 HYNIC. Toutefois, la chimie nécessaire à ce type de marquage ne peut pas être utilisée en routine dans les services de médecine nucléaire (Reshef, et al., 2010)

D'autres radioisotopes ont été utilisés comme par exemple le ^{68}Ga ou le ^{64}Cu . Dans ces deux cas, le couplage à l'annexine 5 est réalisé *via* du DOTA. La mauvaise biodistribution de ces deux composés n'a pas permis de montrer leur supériorité par rapport à l'annexine 5 HYNIC (Blankenberg, 2008, Lahorte, et al., 2004). Par ailleurs, l'accès à ces isotopes étant actuellement restreint, il serait très compliqué d'utiliser ce type de sonde pour une exploitation en routine chez le patient.

Imagerie de fluorescence

Une sonde fluorescente est commercialisée depuis peu ; il s'agit de l'Annexin VivoTM 750 (Perkin Elmer) qui permet de réaliser une imagerie *in vivo* chez le petit animal, dans le proche infrarouge. Cette sonde a notamment permis de mettre en évidence une augmentation de l'apoptose au niveau d'une tumeur U87 (glioblastome) traitée par doxorubicine chez la souris (Agarwal, et al., 2011).

L'imagerie clinique de l'apoptose n'est toujours pas utilisée en routine et de nombreux développements restent à faire en imagerie préclinique. Les pistes de recherche actuelles semblent s'orienter vers le développement de sondes de petite taille (plus faciles à marquer et avec des profils de biodistribution et de clairance mieux adaptés) ou encore sur la détection du collapse du potentiel membranaire mitochondrial (Reshef, et al., 2010)

1.2.3. Hypoxie tumorale

L'exigence métabolique que provoque la croissance d'une tumeur dépasse les possibilités d'apport en oxygène de la vascularisation normale et induit une néoangiogenèse. Cette vascularisation anarchique des tumeurs ne permet pas de répondre aux besoins tissulaires et aggrave l'hypoxie. Dans le cas des tumeurs solides, l'hypoxie peut représenter jusqu'à 60 % de la masse tumorale.

Les tumeurs solides présentent donc des zones où la pression partielle en oxygène est très faible et cet état physiopathologique conduit à des modifications du métabolisme des cellules cancéreuses.

Au niveau moléculaire, l'hypoxie agit sur les différents mécanismes de signalisation cellulaire en modifiant non seulement la radiosensibilité mais aussi la croissance, l'angiogenèse ou le potentiel métastatique d'une tumeur (Denekamp and Dasu, 1999, Graeber, et al., 1996, Ikeda, et al., 1995, Zagzag, et al., 2000).

1.2.3.1. Mécanisme moléculaire de l'hypoxie

Les cellules tumorales en condition d'hypoxie présentent un phénotype particulier avec une instabilité génomique, des variations épigénétiques et des altérations de l'expression post-transcriptionnelle.

Nous considérons dans ce paragraphe la voie effectrice de l'hypoxie ayant fait l'objet de la description la plus importante dans la littérature, celle dépendante de HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) (Huchet, et al., 2009, Serganova, et al., 2004, Tredan, et al., 2008).

HIF-1 est composé d'une sous-unité HIF-1 α , dont l'expression est stabilisée partiellement par la pression partielle en oxygène, et d'une sous-unité HIF-1 β exprimée de façon constitutive. La forme active de HIF-1 est issue de l'union de ses deux sous-unités α et β .

En conditions physiologiques, les prolyl-hydroxylases telles que les protéines PHD (Prolyl Hydroxylase Domain) utilisent l'oxygène pour hydroxyler HIF-1 α et lui permettre d'interagir avec la protéine de von Hippel-Lindau (VHL). Le complexe multiprotéique généré après ubiquitination (HIF-1 α -VHL-Ub) est dégradé *via* la sous-unité 26S du protéasome (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2006).

En condition d'hypoxie, la diminution de l'hydroxylation de HIF-1 α protège cette sous-unité de la dégradation protéasomale, aboutissant à la stabilisation et à la translocation de la protéine dans le noyau qui va se fixer à la sous-unité HIF-1 β . Le complexe HIF-1 formé se fixe à une séquence nucléotidique spécifique appelée HRE (Hypoxia Response Elements). HIF-1 active alors plus de 50 gènes codant pour des facteurs protéiques impliqués dans la néo-angiogenèse (comme le VEGF, PDGF, angiopoietin-2 ou FGF), le métabolisme du glucose, les modifications de la matrice extracellulaire et la survie cellulaire (Lauzier, et al., 2006), comme indiqué figure 41.

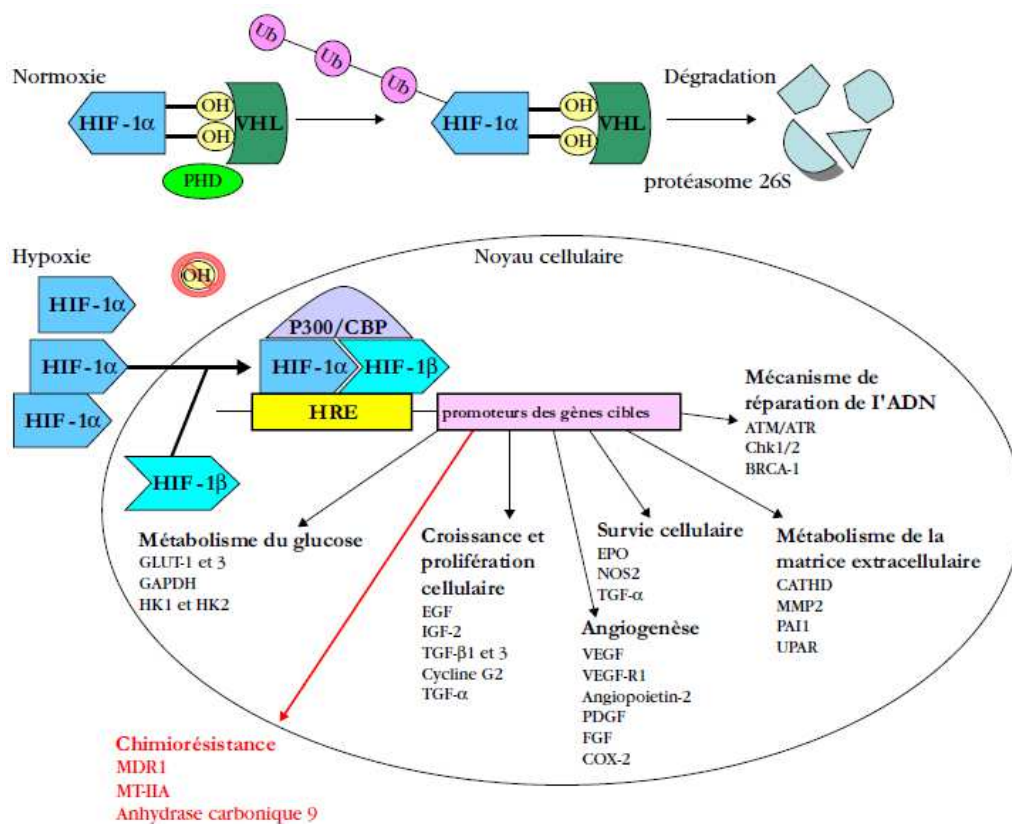


Figure 41 : Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1 et gènes activés transcriptionnellement par HIF-1

(Tredan, et al., 2008)

La détection de la protéine HIF-1 α dans les tumeurs a été corrélée à une diminution de la survie et à une moindre chimiosensibilité d'un certain nombre de tumeurs (Tredan, et al., 2007).

1.2.3.2. Hypoxie tumorale comme cible thérapeutique

Sachant que l'hypoxie est très spécifique des tumeurs et qu'elle joue un rôle non négligeable dans le développement de chimio et de radiorésistances, ce paramètre représente ainsi une cible potentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le concept de traitement ciblant spécifiquement les cellules en condition d'hypoxie est apparu dans les années 1970 avec l'étude de quinones tels que la mitomycine C (Teicher, et al., 1981). Durant la même période, des composés analogues au nitro-imidazole ont été étudiés, mais ceux-ci ont présenté une toxicité importante.

Compte tenu de l'importance de HIF-1 dans la résistance des cellules hypoxiques aux chimiothérapies, le ciblage spécifique de ce facteur a été étudié. Il a ainsi été démontré *in vitro* que l'utilisation d'un inhibiteur de HIF-1 α permettait de rétablir la chimiosensibilité de lignées cellulaires résistantes à l'étoposide en condition hypoxique (Brown, et al., 2006). Cette approche a conduit à une étude clinique, qui a démontré que l'utilisation de 2-méthoxy-estradiol diminuait le taux de HIF-1 α améliorant ainsi la réponse à la chimiothérapie.

Les limites des traitements ciblant l'hypoxie sont multiples. D'une part, il a été démontré que certaines molécules comme par exemple la tirapazamine, présentaient une distribution intratumorale faible (Hicks, et al., 2003). D'autre part, la toxicité hématopoïétique de ces molécules est en général très importante (Parmar, et al., 2007). Enfin, l'inhibition de la cascade d'activation génique par ciblage spécifique de HIF-1 semble intéressante afin d'optimiser les traitements anticancéreux, mais la conséquence de cette inhibition sur les tissus non cancéreux parfois en condition d'hypoxie (lors d'artériopathies, de coronaropathies, de rétinopathies...) et sur la réponse immunitaire reste mal connue (Tredan, et al., 2008).

De nombreuses thérapies ciblant l'hypoxie tumorale ont été développées, mais leur efficacité reste contestable, et leurs mécanismes d'action sont encore peu connus. Toutefois, l'efficacité de certains agents ciblant l'hypoxie tumorale ouvre des perspectives pour des associations thérapeutiques. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des outils permettant une identification plus spécifique des régions hypoxiques au sein des tumeurs afin de mieux comprendre les mécanismes d'action et d'évaluer les nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.2.3.3. Evaluation de l'hypoxie tumorale par imagerie

La méthode de référence pour l'évaluation de l'hypoxie tumorale est la mesure directe de la pression partielle en oxygène dans les tissus (Horsman, 1998). Cette méthode qui implique l'implantation d'une électrode au sein de la tumeur est très invasive. C'est pourquoi de nouvelles approches d'imagerie moléculaire ont été développées afin de permettre une évaluation atraumatique et une cartographie de l'état d'oxygénation d'un tissu donné.

Différentes stratégies permettant de réaliser une imagerie moléculaire de l'hypoxie sont actuellement disponibles : l'Imagerie par Résonance Magnétique, la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), les techniques de médecine nucléaire et l'optoacoustique.

1.2.3.3.1. Imagerie de l'hypoxie en imagerie par résonance magnétique

L'IRM est sensible à la Saturation en Oxygène de l'hémoglobine (SO₂) via l'effet BOLD (Blood Oxygen Level-Dependant). Plusieurs études ont notamment montré que le paramètre T2* mesuré par IRM était sensible à l'hypoxie tumorale (Baudalet and Gallez, 2005). Récemment, une étude a permis d'évaluer et de valider l'intérêt de cette mesure dans le cas d'ischémie cérébrale chez le rat (An, et al., 2009). D'autre part, l'oxymétrie par ¹⁹F IRM a été mise en œuvre afin d'étudier l'oxygénation de tumeur mammaire chez le rat (Zhao, et al., 2009).

L'utilisation d'agents de contrastes pour cibler l'hypoxie par SRM est en cours d'évaluation. Le 2-Nitro-alpha-([2,2,2-trifluoroethoxy]methyl)-imidazole-1ethanol, a déjà été testé avec succès chez la souris (Procissi, et al., 2007), mais malgré sa facilité de mise en œuvre, la SRM présente une faible résolution spatiale ce qui limite ses applications.

1.2.3.3.2. Imagerie de l'hypoxie en résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode spectroscopique basée sur l'absorption d'ondes électromagnétiques par des atomes, des molécules et des ions. Son principe est analogue à celui de la RMN, à la différence près qu'en RPE, ce sont les spins des

électrons qui sont excités plutôt que les spins des noyaux atomiques. La RPE permet ainsi de détecter des atomes dotés d'électrons non appariés tels que l'oxygène moléculaire. Il est donc possible d'acquérir un spectre RPE de l'oxygène gazeux à pO_2 très basse.

Des études précliniques ont montré qu'il était possible de réaliser une imagerie reproductible de l'hypoxie par RPE (Gallez, et al., 2004, Khan, et al., 2012). La technique a été validée en corrélation avec les électrodes à oxygène (Goda, et al., 1997), les données histologiques (Josse, et al., 2001) et les mesures réalisées avec l'effet BOLD (Dunn, et al., 2002).

1.2.3.3.3. Imagerie moléculaire de l'hypoxie

Aujourd'hui, l'imagerie moléculaire de l'hypoxie en médecine nucléaire permet d'obtenir une résolution spatiale supérieure à celle de la SRM, c'est pourquoi les modalités (TEP et TEMP) sont actuellement les plus couramment utilisées pour visualiser les régions hypoxiques. Le ^{18}F -MISO, traceur historique, a été le plus étudié et le plus utilisé mais de nouveaux traceurs ont été développés à la fois en TEP et en TEMP. Avec l'avènement de l'imagerie optique et l'émergence de la fluorescence 3D, de nouvelles molécules sont apparues et sont exploitables pour ces modalités.

On différencie classiquement les traceurs de l'hypoxie «imidazolés» des traceurs «non imidazolés».

Traceurs imidazolés

Ces composés sont réduits en métabolites réactifs intermédiaires par les réductases intracellulaires, *via* un processus directement dépendant du niveau d'oxygénation cellulaire.

- **^{18}F -MISO** : Le ^{18}F fluoromisonidazole a été proposé pour évaluer l'hypoxie tumorale *in vivo* en TEP dès 1984. Depuis, il est devenu le dérivé imidazole le plus utilisé pour cette imagerie (Dubois, et al., 2004).

Le ^{18}F -MISO s'est révélé sélectif des cellules hypoxiques *in vitro* et *in vivo*. En recherche clinique, il est utilisé pour évaluer quantitativement l'hypoxie tumorale dans les cancers du poumon, les glioblastomes, les tumeurs des voies aérodigestives supérieures (Bruehlmeier, et al., 2004, Eschmann, et al., 2005) ainsi que pour les

patients atteints d'ischémie myocardique (Guadagno, et al., 2004, Markus, et al., 2004).

Le ^{18}F -MISO s'accumule dans les tissus en se liant aux macromolécules intracellulaires, lorsque la pression partielle en oxygène est inférieure à 10 mmHg. La rétention tissulaire dépend de l'activité de la nitroréductase (figure 42).

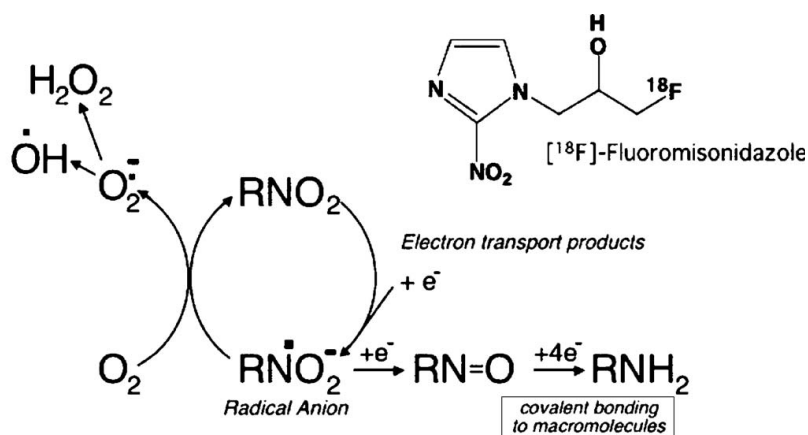


Figure 42 : Mécanisme de rétention du ^{18}F -MISO au niveau des tissus hypoxiques

Lorsque le ^{18}F -MISO est dans un environnement où le transport d'électron est possible (tissus vivant), le groupement $-\text{NO}_2$ (qui possède une grande affinité pour les électrons) capte un électron pour former un radical anion. En présence d' O_2 , l'électron est rapidement transféré à l'oxygène, le ^{18}F -MISO retrouve sa structure d'origine et peut sortir de la cellule. En l'absence d'oxygène, si un second électron provenant du métabolisme cellulaire réagit avec le composé nitroimidazole, un produit de réduction est formé, celui-ci va réagir avec les peptides et l'ARN et rester piégé dans la cellule (Padhani, et al., 2007).

Une fois dans la cellule, le ^{18}F -MISO est métabolisé et réduit par la nitroréductase intracellulaire (xanthine oxydase) afin de se lier sélectivement aux macromolécules dans les cellules hypoxiques. Bien que le ^{18}F -MISO soit relativement hydrophile, il diffuse à travers les membranes cellulaires, montrant ainsi une distribution passive dans les tissus normaux (Bruehlmeier, et al., 2004). Même si la rétention du ^{18}F -MISO est inversement reliée à la pression partielle en oxygène intracellulaire, il existe un seuil limite en dessous duquel la bioréduction et l'absorption du ^{18}F -MISO n'augmentent plus (Couturier, et al., 2004). Cette limite peut conduire dans certaines conditions à une sous estimation de l'hypoxie.

- **^{18}F -FAZA** : Le ^{18}F -fluoroazomycine-arabinoside est un nucléoside azomyciné présentant un mécanisme d'action similaire au ^{18}F -MISO. Il a été montré que la cinétique d'élimination du ^{18}F -FAZA était plus rapide que celle du ^{18}F -MISO, permettant une clairance plus rapide du traceur au niveau des vaisseaux sanguins et des tissus non spécifiques pour réduire le bruit de fond et améliorer le rapport signal sur bruit (Piert, et al., 2005, Reischl, et al., 2007).
- **^{18}F -FETMIN** : Le ^{18}F -fluoroerythronitroimidazole, permet aussi une amélioration de la qualité de l'image et du rapport signal/bruit par rapport au ^{18}F -MISO. Des études précliniques sur un modèle de carcinome mammaire CH3 chez la souris ont ainsi montré un signal de bruit de fond plus faible après administration de ^{18}F -FETMIN (Gronroos, et al., 2004).
- **IAZA** : L'Iodoazomycin-Arabinoside est comme le ^{18}F -FAZA, un nucléoside azomyciné. Il peut être couplé à l'iode radioactif, ce qui permet de l'utiliser en TEP (^{124}I) ou en TEMP (^{131}I , ^{123}I). Pour l'imagerie TEP, l'IAZA ne permet pas d'améliorer le rapport signal sur bruit par rapport au FAZA pour des images réalisées à des temps très courts. L'élimination du IAZA étant plus longue que celle du FAZA, une amélioration du ratio tumeur/bruit de fond peut être observée pour des images réalisées plus tardivement après injection (Reischl, et al., 2007).

Traceurs non imidazolés

- **^{64}Cu -ATSM** : L'imagerie moléculaire de l'hypoxie par le Cu(II)-diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) ou Cu-ATSM a pour principe d'utiliser l'affinité d'un métal chélate pour les cellules hypoxiques (Huchet, et al., 2009). Le Cu-ATSM utilisé en TEP a été développé comme alternative au ^{18}F -MISO et plusieurs isotopes du cuivre émetteurs de positons sont disponibles (^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu et ^{64}Cu). Le ^{64}Cu avec sa demi-vie de 12,7 heures est l'isotope du cuivre le plus utilisé car il permet d'obtenir des informations biologiques sur une période de 48 heures.

Le mécanisme de rétention du Cu-ATSM est complexe et s'effectue à plusieurs niveaux de la cellule (Fujibayashi, et al., 1997). Il est réalisé aussi bien dans les cellules normoxiques que dans les cellules hypoxiques qui intègrent le Cu(II)-ATSM

stable (Dearling, et al., 2002). Au niveau cellulaire les oxydoréductases réduisent le Cu(II)-ATSM en Cu(I)-ATSM qui devient instable. En l'absence d'O₂, le Cu(I)-ATSM se dissocie complètement et reste dans la partie intracellulaire alors qu'en présence d'O₂, le Cu(I)-ATSM se réoxyde en Cu(II)-ATSM qui ressort de la cellule (Figure 43). Le Cu-ATSM montre ainsi une fixation sélective et une cinétique d'élimination plus lente dans les cellules hypoxiques que normoxiques permettant de mettre en évidence les territoires hypoxiques (Lewis, et al., 1999).

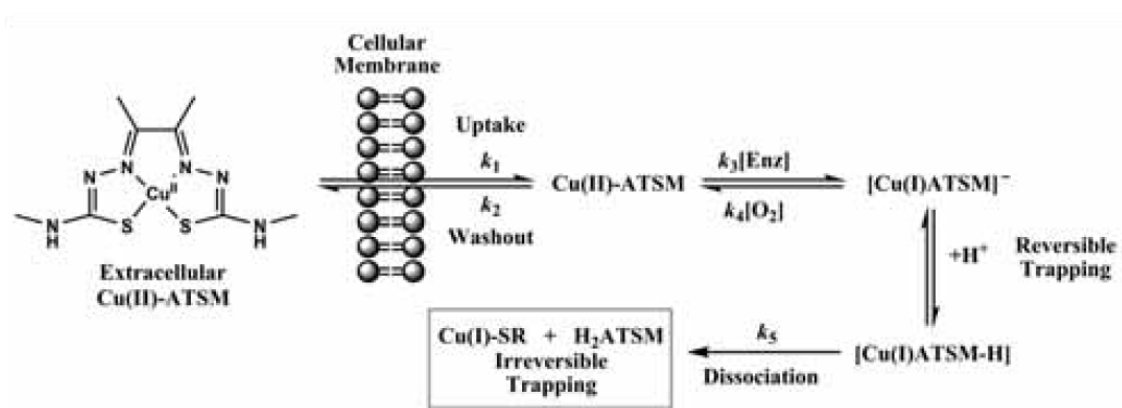


Figure 43 : Mécanisme d'action impliqué dans l'absorption et la rétention sélective du Cu-ATSM en conditions hypoxiques

k₁ : constante d'absorption ($9,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) ; k₂ : constante d'élimination ($2,9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) ; k₃ : réduction intracellulaire ; k₄ : réoxydation ; k₅ : dissociation des protons (Holland, et al., 2009).

- **^{99m}Tc-HL91** : Il a été démontré, par imagerie TEMP, une accumulation spécifique du traceur ^{99m}Tc-HL91 au niveau des cellules et tumeurs hypoxiques (Cook, et al., 1998, Lee, et al., 2008, Tatsumi, et al., 1999), mais le mécanisme responsable est encore peu connu. Toutefois, l'absorption de ^{99m}Tc-HL91 est fortement corrélée à l'expression de GLUT1 par les cellules cancéreuses viables (Yutani, et al., 1999).

Imagerie de l'expression d'Anhydrase Carbonique 9

L'Anhydrase Carbonique 9 dont la concentration est plus élevée dans les cellules de nature hypoxique est une protéine transmembranaire impliquée dans la régulation de l'équilibre acido-basique de la tumeur.

A l'heure actuelle, il existe une sonde fluorescente commerciale, (HypoxiSenseTM, Perkin Elmer) qui détecte spécifiquement l'expression d'Anhydrase Carbonique 9 à la surface de cellules tumorales hypoxiques.

Par ailleurs, des fragments d'immunoglobuline marqués à l'¹¹¹In et un anticorps monoclonal marqué à l'¹²⁵I ou à un fluorochrome, ciblant spécifiquement l'anhydrase carbonique 9, ont permis de détecter la présence d'hypoxie au sein de tumeur de carcinome colorectal par TEMP, TEP et fluorescence respectivement (Carlin, et al., 2010, Chrastina, et al., 2003, Tafreshi, et al., 2012)

1.2.3.3.4. Imagerie de l'hypoxie en optoacoustique

Comme décrit précédemment (paragraphe 1.1.2.3), les modifications de l'absorption optique mesurée en optoacoustique sont fonction des propriétés optiques de nombreux chromophores endogènes tels l'oxy- (HbO₂) et la désoxy-hémoglobine (Hb). L'utilisation de deux longueurs d'ondes dans le proche infrarouge va permettre de distinguer Hb de HbO₂ et ainsi de remonter à la SO₂. L'optoacoustique a donc été mise en œuvre chez le rat sain afin de détecter différentes conditions d'oxygénation (Wang, et al., 2006) et lors de tumeurs cérébrales chez le rat (Lungu, et al., 2007).

L'imagerie de l'hypoxie, notamment avec le F-MISO reste une imagerie à faible contraste. Dans tous les cas, il est important de considérer la pharmacocinétique du traceur afin de déterminer le meilleur moment permettant de détecter et quantifier l'hypoxie.

Le développement de nouvelles sondes ainsi que l'utilisation d'autres modalités d'imagerie telles que la TEMP et la fluorescence devraient contribuer à l'amélioration de la spécificité et du contraste des images.

Chapitre 2

Développement de modèles animaux

2. Développement de modèles animaux

Le cancer est une pathologie dont l'origine se trouve dans une prolifération anormale et incontrôlée de cellules. C'est une maladie extrêmement complexe de par la grande variété des anomalies génétiques impliquées et du fait que les conséquences de cette prolifération anarchique peuvent se retrouver au sein de n'importe quel tissu ou organe. Il est donc impossible qu'un seul modèle animal puisse représenter l'ensemble des cancers tant cette pathologie est multiple.

L'un des objectifs de cette thèse a été la mise en place de modèles orthotopiques les plus représentatifs possibles de situations cliniques, et pour lesquels la communauté scientifique a un réel besoin d'outils lui permettant de comprendre les mécanismes à l'origine de la pathologie et d'évaluer les effets de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons retenus deux situations parmi les plus meurtrières en France et qui font l'objet de nombreux développements thérapeutiques : le cancer colorectal et celui du pancréas.

2.1. Intérêt des modèles animaux et limites

L'utilisation de modèles animaux, plus particulièrement murins, pour le développement de molécules anticancéreuses a débuté dans les années 1950 à l'Institut National américain du Cancer sur un modèle de leucémie L1210 (Goldin, et al., 1961). C'est au sein de ce même institut qu'a été validée à la fin des années 1960 la possibilité d'induire des tumeurs d'origine humaine chez des souris immunodéprimées (Rygaard and Povlsen, 1969). Les modèles animaux sont alors devenus un outil incontournable pour l'étude de la biologie du cancer, même si leur pertinence est souvent remise en cause. On les classe en général dans 3 catégories : les modèles transgéniques, syngéniques et xénogéniques.

Les modèles transgéniques

Les modèles transgéniques sont obtenus par transgénèse classique (insertion d'un transgène de manière aléatoire dans le génome) ou ciblée (recombinaison homologue) dans le locus du gène impliqué, ce qui permet une invalidation ou un gain de fonction.

De nombreux modèles de souris transgéniques capables de reproduire différents types de cancers ont été développés. Ces modèles immunocompétents permettent de mimer les caractéristiques génétiques et biologiques des tumeurs malignes humaines. Prenons l'exemple d'un modèle transgénique de cancer du poumon chez la souris. Ce modèle, pour lequel le transgène Kras a été muté, entraîne l'apparition spontanée de tumeurs pulmonaires (Engelman, et al., 2008). Ce modèle est considéré comme le plus pertinent pour représenter le carcinome bronchioalvéolaire humain pour lequel le gène Ras est très souvent muté (20-30% des cancers du poumon) (Dardon, 2009).

Les modèles transgéniques sont donc considérés comme d'excellents systèmes expérimentaux. Ils permettent une meilleure compréhension de la biologie du cancer *in vivo* et sont de plus en plus utilisés pour les essais précliniques. Cependant il faut souligner deux limites majeures : d'une part leur grande variabilité interindividuelle (cinétique de croissance et localisation des foyers différentes), qui rend difficile la mise en œuvre de lots d'animaux homogènes (notamment pour les études d'efficacité des médicaments), et d'autre part leur coût relativement élevé.

Les modèles syngéniques

Les modèles syngéniques sont établis par induction chimique, radiations ou greffe de cellules ou fragments tumoraux d'origine murine.

L'avantage des modèles syngéniques est le maintien d'un système immunitaire intact permettant ainsi d'étudier les interactions hôte/tumeur. Cependant les tumeurs murines ne présentent pas les mêmes caractéristiques que les tumeurs humaines. Cet aspect est à l'origine de problèmes lors de l'évaluation de nouveaux médicaments car la cible peut ne pas être reconnue (situation classique des anticorps monoclonaux thérapeutiques), avoir une distribution tissulaire ou une fonctionnalité différente de la cible humaine.

D'autre part, en ce qui concerne les modèles induits chimiquement ou par radiations, il faut prendre en compte le temps de développement des tumeurs, qui peut parfois être très long, ce qui conduit à l'utilisation d'animaux âgés chez qui des tumeurs spontanées et des altérations des fonctions biologiques peuvent survenir et provoquer un certain nombre de biais.

Parmi les modèles syngéniques les plus utilisés, on peut citer le modèle « historique » de mélanome B16, tumeur spontanée obtenue chez la souris consanguine C57BL/6 (Geran, et al.,

1972), le carcinome pulmonaire de Lewis (LL2) (Chen, et al., 2007), ou encore le modèle de lymphome non hodgkinien à cellules EL4 (Dayde, et al., 2009) tous deux également dans la souris C57BL/6.

Les modèles xénogéniques

Les modèles xénogéniques sont obtenus suite à une greffe de tumeur d'origine humaine dans des souris immunodéficientes.

Ces modèles qui utilisent des lignées cellulaires prélevées sur des patients atteints de cancer sont largement utilisés dans les essais précliniques, mais nécessitent de mettre en œuvre des souris immunodéprimées pour éviter les réactions immunitaires conduisant à un rejet de la greffe. De nombreuses souches de souris sont maintenant disponibles, avec des niveaux d'immunodéficience variables : les souris « nues » sont dépourvues de lymphocytes T, les SCID de lymphocytes T et B et enfin les SCID beige de lymphocytes T, B et cellules NK. Toutefois, le fait que la tumeur se développe en présence d'un stroma murin dans un microenvironnement absolument différent de celui rencontré chez l'homme constitue l'un des inconvénients majeurs de ces modèles.

Excepté pour les modèles transgéniques, l'obtention de tumeurs pour les modèles syngéniques et les modèles xénogéniques nécessite une greffe de cellules ou de fragments tumoraux. Deux méthodes sont possibles : les greffes sous cutanées et les greffes orthotopiques.

2.1.1. Greffes sous cutanées

Le modèle historique, mais aussi le plus simple et le plus rapide à mettre en œuvre est le modèle sous cutané, ou modèle ectopique. Toutefois, celui-ci est peu représentatif de la pathologie humaine car il est évident qu'on ne peut pas étudier de la même façon des cancers aussi différents que des cancers mammaires, coliques ou pulmonaires, greffés sous la peau.

Les arguments en défaveur de ce type de modèle pour les études d'efficacité sont donc nombreux. En effet, les tumeurs localisées en sous-cutané ne métastasent que très rarement et

sont généralement situées loin du site d'origine de la tumeur. Par ailleurs, ces tumeurs se développent localement en s'entourant parfois d'une capsule fibreuse (Killion, et al., 1998) et certains travaux ont décrit que la sensibilité à la chimiothérapie des tumeurs ainsi localisées pouvait être modifiée. D'autre part, une étude a montré que des cellules de cancer colorectal injectées en sous cutané sont plus sensibles à la chimiothérapie (doxorubicine) que lorsqu'elles sont induites au niveau du caecum (Wilmanns, et al., 1993).

Lorsque le traitement débute, l'animal est normalement moins affaibli par la présence de la tumeur primaire que si celle-ci était située en orthotopique. Il peut donc mieux tolérer de fortes doses d'agent antitumoral, ce qui peut sembler favoriser l'activité de la molécule. Par ailleurs, dans ces modèles, seul le paramètre d'inhibition de la croissance tumorale est utilisé pour quantifier l'activité des produits testés puisque l'effet sur le développement de métastases ne peut être abordé.

Ce modèle dont l'évolution tumorale peut être suivie simplement par mesure du volume au pied à coulisse s'est malgré tout largement imposé dans le monde entier pour les études de screening ou de toxicité d'une nouvelle molécule. Toutefois il est apparu rapidement évident que dans le cas d'études d'efficacité (en particulier si l'on s'intéresse à l'inhibition de la dissémination métastatique), d'autres modèles devaient être envisagés.

2.1.2. Greffes orthotopiques

Il s'agit d'un modèle où les cellules tumorales sont greffées au niveau de leur organe d'origine. Il permet d'obtenir chez la souris une tumeur tendant à conserver les caractéristiques biologiques de la tumeur originelle à se développer sur le plan loco-régional et à distance de façon analogue à la maladie humaine.

Ce modèle présente plusieurs avantages, dont notamment celui d'améliorer la prédictivité de l'efficacité d'un composé. Plusieurs équipes ont ainsi comparé le mode de greffe orthotopique à celui de la greffe sous-cutanée et ont montré une réponse à la chimiothérapie plus cohérente avec les résultats cliniques quand les tumeurs sont greffées sur leur site d'origine (Fidler, 1991). De plus, des différences significatives ont été démontrées au niveau de la vascularisation, notamment dans les tumeurs orthotopiques de prostate, où il a été obtenu une extravasation vasculaire supérieure par rapport aux tumeurs sous-cutanées (Zhou, et al., 2004). La perméabilité vasculaire est augmentée pour les tumeurs orthotopiques et du

point de vue anatomique il a été montré que les diamètres des vaisseaux constituant une tumeur orthotopique étaient plus petits modifiant ainsi la biodisponibilité de certaines molécules (Fukumura, et al., 1997).

Enfin, le principal argument en faveur des modèles orthotopiques est leur capacité à mieux représenter la pathologie humaine notamment du point de vu de la dissémination métastatique. Les métastases sont la cause majeure de mortalité chez les sujets atteints de cancer et présentent la situation la plus difficile à gérer pour les thérapies antitumorales. Il s'agit d'un processus séquentiel dont les principales étapes comprennent le détachement de cellules cancéreuses de la tumeur primaire et l'invasion du tissu de l'hôte, leur pénétration et leur transport dans la circulation durant lequel elles interagissent avec les composants sanguins, puis leur adhésion à la paroi vasculaire de l'organe cible, leur extravasation et leur prolifération. Un cancer disséminé est souvent résistant aux thérapies anticancéreuses actuelles parce que le processus métastatique est détecté tardivement.

Toutefois, malgré l'intérêt des modèles orthotopiques et leur contribution à une meilleure compréhension de la pathologie cancéreuse et à une meilleure prédictivité lors de l'évaluation de molécules anticancéreuses se pose toujours la question de la pertinence selon la problématique étudiée. En effet il est nécessaire, pour une étude donnée, de mener une réflexion précise portant sur les caractéristiques de la pathologie et sur les paramètres à étudier afin de ne pas mettre en œuvre inutilement ce type de modèle bien plus complexe que le modèle ectopique.

2.2. Le modèle orthotopique de carcinome colorectal HCT116-luc2

Cette phase de mon travail de thèse s'inscrivait donc dans le cadre de la mise au point de modèles orthotopiques murins les plus représentatifs de situations cliniques rencontrées chez l'homme, dans le cas du cancer du colon et du pancréas.

Comme nous le verrons, la contribution de l'imagerie a été double : outil permettant de valider la pertinence du modèle (imagerie de la tumeur primaire et des métastases, données cinétiques...) et dans un second temps, une fois le modèle obtenu, mise en œuvre pour évaluer *in vivo*, par imagerie, l'efficacité de nouvelles thérapeutiques.

2.2.1. Etude bibliographique

2.2.1.1. Le cancer du colon

La France fait partie des pays ayant une incidence élevée de cancer du côlon-rectum. Le vieillissement de la population, l'amélioration des techniques de dépistage, mais aussi des modifications du mode de vie (apports caloriques, sédentarité...) ont probablement favorisé une augmentation de l'incidence à partir des années 80. En 2010, ce cancer se situe en termes de fréquence au troisième rang de l'ensemble des cancers incidents, tous sexes confondus (source INCa, 2010)

C'est un cancer de pronostic intermédiaire avec une survie relative à 5 ans égale à 56 %.

Dans la majorité des cas, les cancers du côlon se développent à partir d'une tumeur bénigne ou adénome. Ceux-ci sont très fréquents et restent généralement sans gravité mais 2 à 3 % d'entre eux finissent par se transformer en cancer ou adénocarcinome. Cette transformation est lente, et prend en moyenne une dizaine d'années.

2.2.1.2. Les traitements

Un cancer peut se développer dans toutes les portions du côlon.

La paroi du côlon est constituée de quatre couches différentes (figure 44):

- la muqueuse (couche la plus interne)
- la sous-muqueuse
- la musculuse (deux couches de muscles)
- la séreuse (couche externe) qui constitue une partie du péritoine

Le choix et la fréquence des traitements dépendent notamment du degré d'extension du cancer au moment du diagnostic selon la profondeur de la tumeur dans la paroi du côlon, l'atteinte des ganglions lymphatiques et la présence de métastases à l'examen anatomopathologique des prélèvements chirurgicaux.

Ces trois critères permettent de déterminer le stade du cancer, c'est-à-dire son degré d'extension. Il existe cinq stades différents, numérotés de 0 à IV (figure 44):

- les stades 0, I et II : foyers limités au côlon

- le stade III : atteinte d'un ou plusieurs ganglions proches du côlon
- le stade IV : présence de métastases.

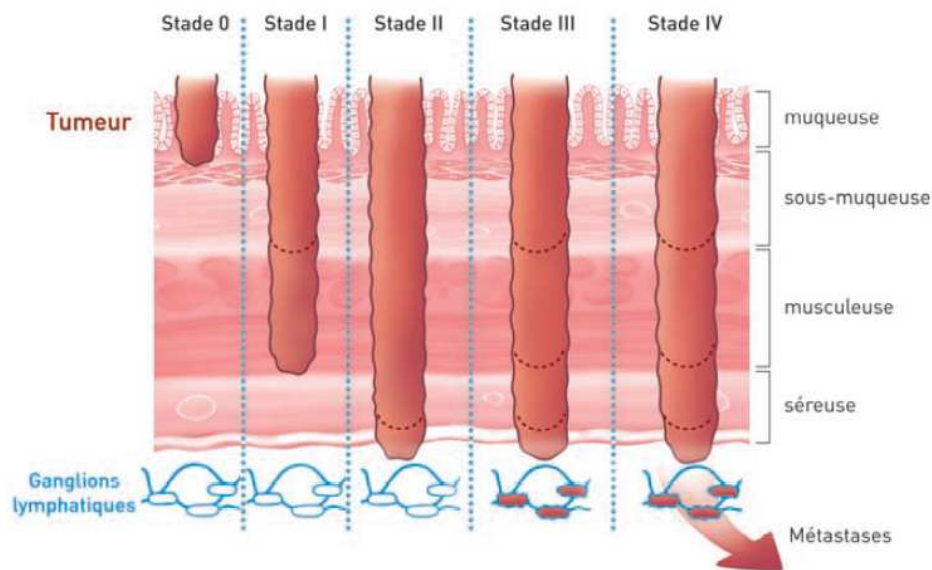


Figure 44 : Les stades du cancer colorectal

(Source e-cancer)

Neuf molécules disposent d'une AMM et sont actuellement utilisées dans le traitement du cancer du côlon (tableau 5).

Chimiothérapie classique	Thérapie ciblée : anticorps monoclonaux
5-fluorouracile (5FU)	Bevacizumab (Avastin®)
Capécitabine, 5FU en forme orale	Cetuximab (Erbix®)
Tégafur uracile (UFT), dérivé du 5FU	Penitumumab (Vectibix®)
Oxaliplatine	
Irinotécan	
Raltitrexed	

Tableau 5 : Les traitements utilisés en clinique pour le traitement du cancer du colon

(Source : INCa)

Le traitement de référence du cancer colorectal a longtemps été le 5-Fluorouracile. Avec le développement de nouveaux agents tels que la capécitabine, l'irinotécan, l'oxaliplatine et l'avènement d'un certain nombre de thérapies plus ciblées, les traitements disponibles pour

les patients se sont élargis. Cela a conduit à une amélioration significative de la survie des patients (Moiel and Thompson, 2011, Shitara, et al., 2011).

2.2.1.2.1. Les chimiothérapies

Le 5-Fluorouracil (5-FU)

Cet anticancéreux de la classe des antimétabolites antipyrimidine est indiqué dans les adénocarcinomes digestifs évolués.

L'uracile intervient lors de la division cellulaire. C'est un précurseur *via* la thymidilate-synthétase de la thymidine qui entre dans la composition de l'ADN. La formule chimique du 5-FU permet de comprendre le mécanisme de substitution de l'uracile dans les désoxyribonucléotides. Le 5-fluorouracile et ses analogues, Tegafur et Capecitabine sont représentés dans la figure 45.

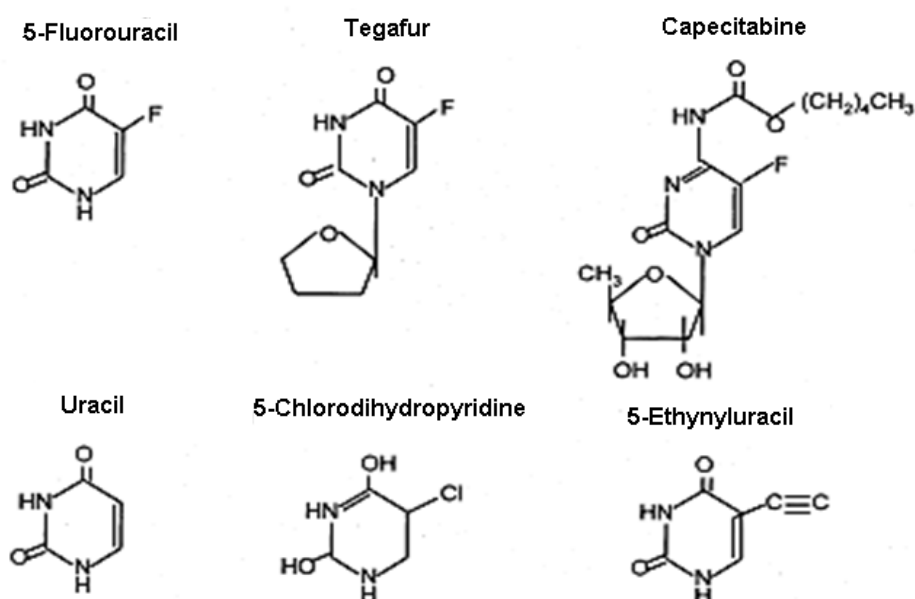


Figure 45 : Formules chimiques du 5-FU et de ses analogues

(Kohne and Peters, 2000)

Le métabolisme du 5-FU implique une réduction en 5-fluorodéoxyuridine 5' monophosphate (FdUMP) qui se lie à la thymidilate synthétase, et bloque la méthylation de l'uracile en thymine. D'autre part, le 5-FU est phosphorylé en triphosphate (FUTP) et incorporé à la place de l'uracile dans les ARNs (figure 46).

Après administration, le 5-FU est rapidement catabolisé par une enzyme limitante, la dihydropyrimidine deshydrogénase (DPD), très active dans le foie et seulement 5 à 10 % de la drogue est métabolisée (Kohne and Peters, 2000).

Trois métabolites actifs dérivés du 5-FU agissent :

- 5F-dTP (fluoro-uridine triphosphate) s'incorpore dans l'ARN et inhibe sa formation ainsi que son fonctionnement.
- 5F-dUMP (5 fluoro-désoxyuridine monophosphate) se lie à la thymidilate synthétase et inhibe la formation de la déoxythymidine triphosphate qui est un précurseur nécessaire de l'ADN.
- FdUTP est incorporé dans l'ADN et inhibe l'élongation de la chaîne de l'ADN.

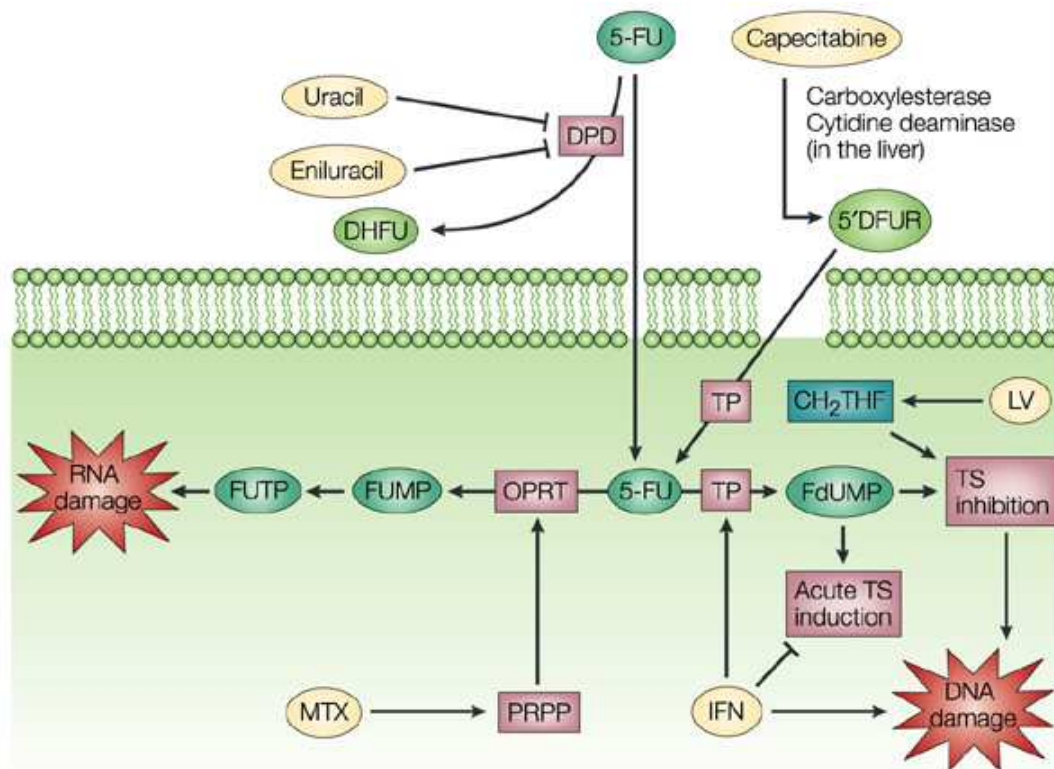


Figure 46 : Métabolisme du 5-Fluorouracile

(Longley, et al., 2003)

Les fluoropyrimidines orales peuvent être divisées en deux catégories : celles administrées en combinaison avec un inhibiteur de la DPD et celles administrées sans.

La capécitabine (Xeloda®) et le Tegafur-Uracile (UFT) sont des prodrogues qui après administration par voie orale sont métabolisées dans l'organisme en 5-FU. L'activation de la capécitabine en 5-FU comporte 3 étapes enzymatiques et celle du Téga fur une seule.

Après administration orale, la capécitabine est métabolisée dans le foie par la carboxyle estérase en 5'-desoxy-5-fluorocytidine et par la cytidine désaminase en 5'-desoxy-5-fluorouridine. La dernière étape fait intervenir la pyrimidine phosphorylase, enzyme présente en plus forte concentration dans la tumeur que dans les tissus sains, ce qui permet d'augmenter la sélectivité vis-à-vis de la tumeur (Miwa, et al., 1998).

Le Téga fur sera métabolisé au niveau du foie par un cytochrome P450, le CYP2A6 en hydroxytéga fur qui est instable et se décompose spontanément en 5-FU (Cao, et al., 1995, Kohne and Peters, 2000).

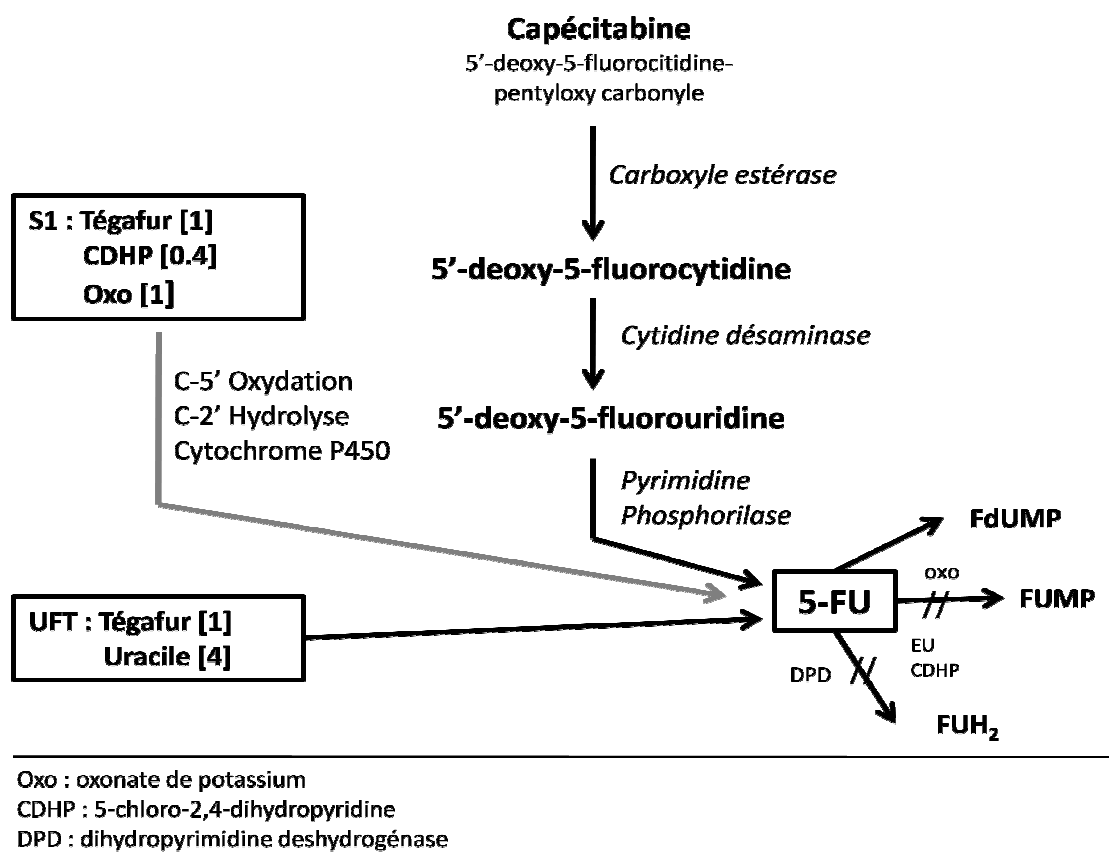


Figure 47 : Prodrogues du 5-Fluorouracile.

Suite à l'administration orale, la capécitabine est métabolisée dans le foie par la carboxyle estérase en 5' desoxy-5-fluorocytine et par la cytidine désaminase en 5'-desoxy-5-fluorouridine. EU = 5-ethynyluracile ; FdUMP = 5-fluoro-2'-desoxyuridine-5'-triphosphate ; FUH₂ = fluoro-5,6-dihydrouracile ; FUMP = 5 fluorouridine-5' monophosphate.
(d'après Kohne, 2000)

Le 5-FU est généralement utilisé en bi ou trithérapie. Il est souvent associé à de l'acide folinique, ce qui renforce la sensibilité de la thymidylate synthétase à l'action du 5-FU. Des associations à l'Irinotécan ou à l'oxaliplatine sont aussi possibles.

L'Oxaliplatine (Eloxatine®)

En thérapeutique, le platine n'est pas utilisé sous forme élémentaire mais sous forme de complexes organométalliques. Dans la famille des sels de platine, le cis-platine a été la première molécule pour laquelle une activité antitumorale a été démontrée. Depuis, de nouveaux complexes, l'oxaliplatine et le carboplatine, ont été développés puis commercialisés (Cepeda, et al., 2007).

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'oxaliplatine, souvent utilisé en bithérapie avec le 5-FU dans le cancer colorectal.

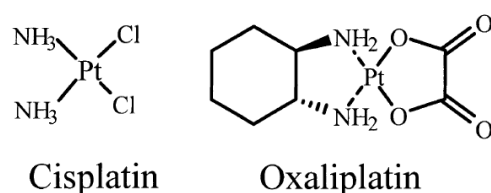


Figure 48 : Structure chimique du Cis-platine et de l'Oxaliplatine

L'oxaliplatine est un analogue de troisième génération dans lequel un ligand, le 1,2-diaminocyclohexane, se fixe aux groupements amines du cis-platine (Faivre, et al., 2003).

L'oxaliplatine interagit principalement au niveau de l'ADN, induisant des lésions primaires où des adduits bloquent la réplication de l'ADN et sa transcription en ARN (Carrato, et al., 2002). Le type le plus fréquent d'adduits est représenté par les ponts intrabrin, qui établissent des liaisons covalentes irréversibles entre deux résidus guanines. Les autres types d'adduits sont les ponts interbrins et les liaisons aux protéines satellites de l'ADN (Raymond, et al., 2001).

L'Irinotécan (Camptosar®)

L'irinotécan (CPT11 ou 7-éthyl-10-[4-(1-pipéridino)-1-pipéridino]-carbonyloxy-camptothécine) est un dérivé hydrosoluble semi-synthétique de la camptothécine. C'est un inhibiteur spécifique de l'ADN topoisomérase I. L'amélioration de l'hydrophilie par rapport à

la camptothécine a été obtenue grâce à une substitution en position 10 d'un groupement hydroxyle. Par ailleurs, une substitution d'un groupement éthyle en position 7 a permis d'augmenter son action inhibitrice sur la topo-isomérase I (Kunimoto, et al., 1987).

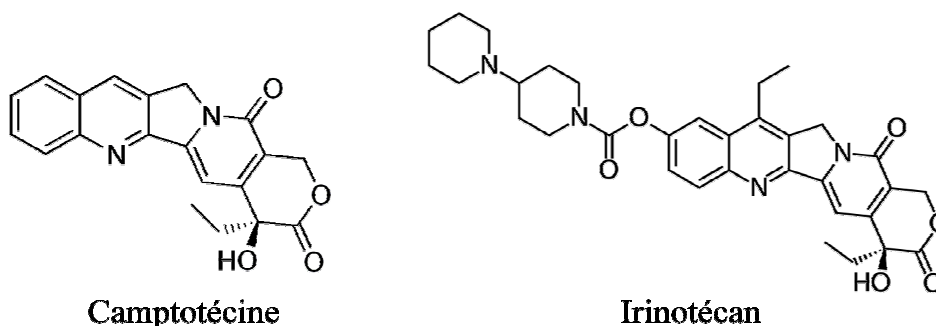


Figure 49 : Formule chimique de la camptothécine et de l'irinotécan

L'irinotécan et son métabolite actif, le SN38 provoquent des cassures simple brin de l'ADN, empêchant sa réplication, la synthèse d'ARN et donc la division cellulaire (Kawato, et al., 1991).

Le Raltitrexed (Tomudex®)

Le raltitrexed est un analogue de l'acide folique, doté d'une puissante activité inhibitrice à l'égard de la thymidylate-synthétase.

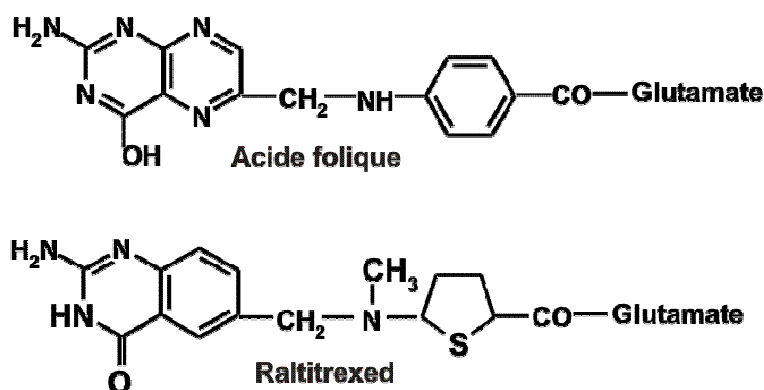


Figure 50 : Formule chimique du raltitrexed et de l'acide folique

Contrairement au 5-FU, le raltitrexed agit par inhibition directe et spécifique de la thymidylate-synthétase qui est une enzyme clé dans la synthèse *de novo* de la thymidine triphosphate (TTP), un nucléotide nécessaire à la synthèse de l'ADN. L'inhibition de la thymidylate-synthétase va conduire à la fragmentation de l'ADN et donc à l'apoptose.

Le raltitrexed va entrer dans les cellules *via* le transporteur de l'acide folique où il va subir une polyglutamination par la folyl-polyglutamate-synthétase. Les formes polyglutaminées du raltitrexed sont retenues dans la cellule et contribuent à prolonger l'effet inhibiteur de la thymidylate-synthétase (Gunasekara and Faulds, 1998).

2.2.1.2.2. Les thérapies ciblées par anticorps monoclonaux

Afin d'améliorer la spécificité et l'efficacité des traitements mais également de diminuer les effets secondaires parfois très importants des traitements actuels, de nouvelles thérapies ciblées ont été développées. Parmi celles-ci, on retrouve des inhibiteurs spécifiques des récepteurs présents au niveau des cellules tumorales et en particulier des anticorps monoclonaux. La figure 51 représente les principales thérapies ciblées utilisées dans le traitement des cancers.

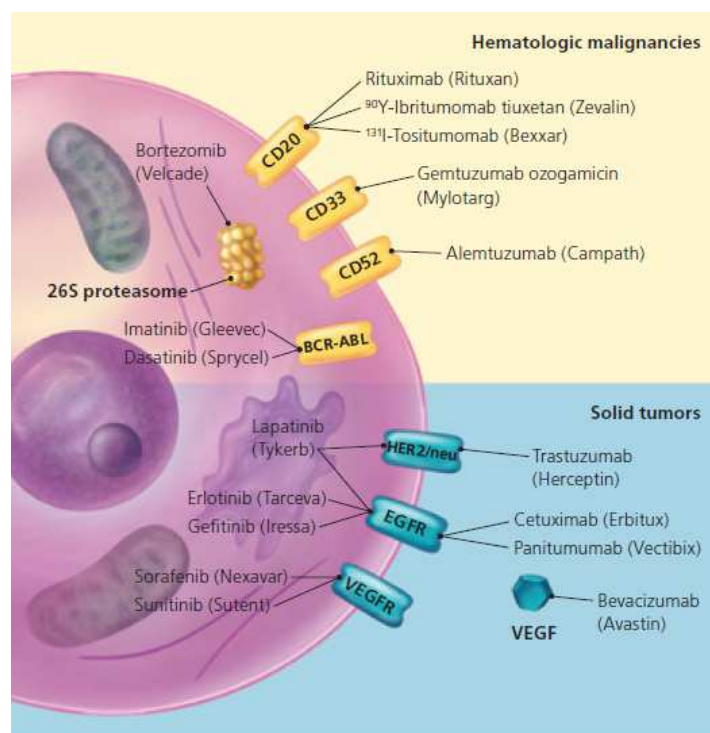


Figure 51 : Mécanismes des principales thérapies ciblées
(Gerber, 2008)

Bevacizumab (Avastin®)

Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal de type IgG1 recombinant qui se fixe au VEGF libre circulant empêchant ainsi sa fixation sur son récepteur. Il est aussi appelé « VEGF trap ». Son mécanisme d'action est basé sur l'inhibition de la liaison entre le VEGF et ses récepteurs (Flt-1 et KDR) présents à la surface des cellules endothéliales constituant les néovaisseaux des tumeurs (Muhsin, et al., 2004).

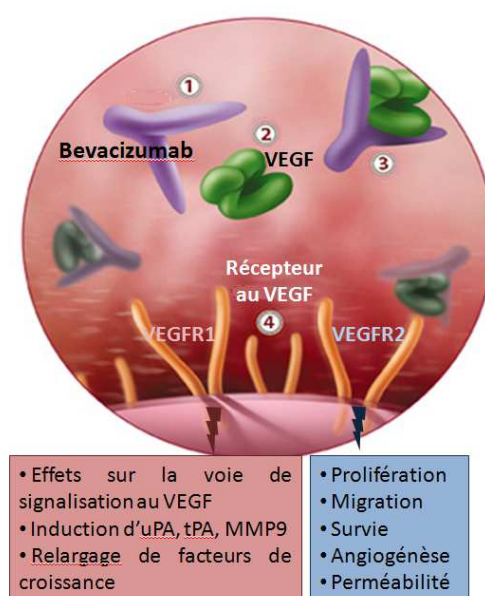


Figure 52 : Mode d'action du Bevacizumab
(Muhsin, 2004)

Cetuximab (Erbix®)

Le Cetuximab ou IMC-C225 est un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 se liant spécifiquement au domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), présent à la fois sur les cellules tumorales et saines. Le Cetuximab entre en compétition avec les ligands naturels de l'EGFR. Cette liaison est cinq à dix fois plus affine que celle avec les ligands naturels de l'EGFR (l'EGF et le TGF α).

Le Cetuximab déclenche l'internalisation et la diminution de l'expression de l'EGFR. Il inhibe la phosphorylation des tyrosines kinases du récepteur et empêche ainsi la transduction du signal. Ceci conduit à l'inhibition de la croissance cellulaire et à l'activation de l'apoptose. A cela s'associent une diminution des métallo-protéinases de la matrice extracellulaire et une diminution de la vascularisation (Mendelsohn and Baselga, 2000, Waksal, 1999).

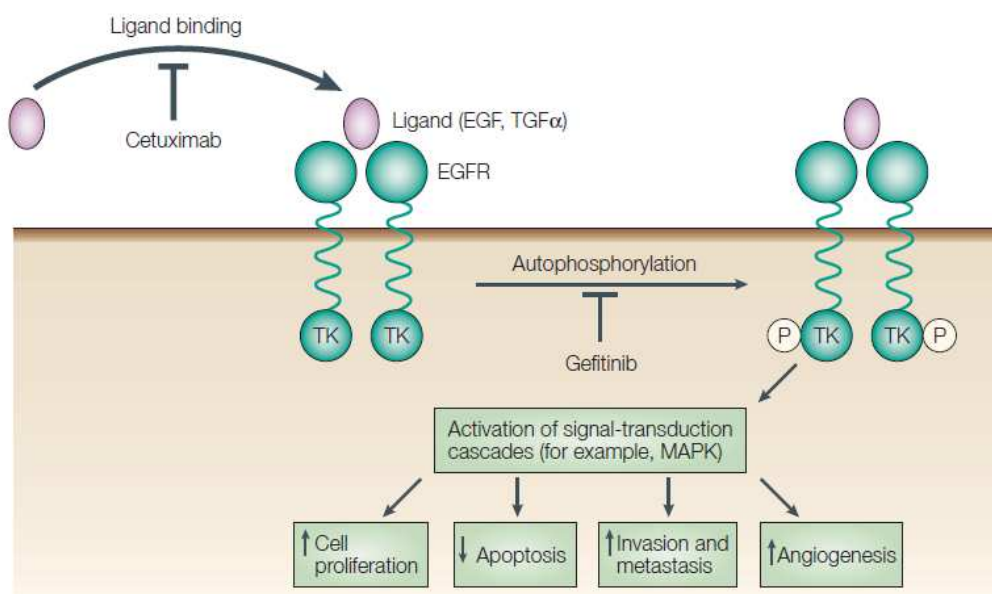


Figure 53 : Mode d'action du Cetuximab
(Graham, et al., 2004)

2.2.2. Matériels et méthodes

Afin d'obtenir notre modèle orthotopique de carcinome colorectal, deux stratégies étaient possibles : l'injection de cellules ou la greffe de fragment tumoraux au niveau du caecum (Hoffman, 1999). Les deux méthodes ont été évaluées. L'injection de cellules ne permettant pas d'obtenir des lots d'animaux homogènes en termes de prise de greffe par suite de fuites dans la cavité abdominale lors de l'injection des cellules, nous avons retenu pour notre travail la méthode de greffe de fragments.

2.2.2.1. Les cellules HCT116-luc2

Les cellules utilisées dans notre modèle sont des cellules HCT116 provenant d'un adénocarcinome colorectal humain.

Comme déjà évoqué précédemment, l'un des principaux challenges dans le traitement du cancer est de trouver de nouvelles thérapies pour lesquelles les patients ne seront pas résistants. Dans le cas des cancers colorectaux, la mutation somatique de K-Ras est l'une des

principales causes de résistance aux traitements anti-EGFR tels que le cetuximab, et le panitumumab (Lamoril, et al., 2009).

L'utilisation de la lignée cellulaire HCT116 qui possède une mutation au niveau du codon 13 du proto-oncogène Ras constitue ainsi un outil de choix pour l'évaluation de nouvelles thérapies pour la population des patients possédant cette mutation.

Afin de valider le modèle, la stratégie d'un suivi par imagerie de bioluminescence a été retenue. Simple de mise en œuvre, de faible coût, permettant d'imager un nombre relativement important d'animaux, cette imagerie qui s'intéresse à la prolifération tumorale est utilisée en routine pour la recherche en cancérologie expérimentale.

Pour cela, l'utilisation de cellules exprimant le gène de la luciférase était indispensable. La lignée cellulaire HCT116-luc2 (Caliper Lifes Science) exprime, de manière stable, le gène de la luciférase de luciole (luc2). Cette lignée cellulaire a été établie par transduction lentivirale avec le gène de la luciférase 2 (pGL4 luc2 Lentivirus) sous contrôle du promoteur humain à l'ubiquitin C. L'intensité de bioluminescence *in vitro* de ces cellules est d'environ 1600 photons/sec/cellule.

Les cellules HCT116-luc2 ont été cultivées en flasque de 75 cm² dans du milieu MEM (Gibco) supplémenté avec du SVF (10%) et de la L-Glutamine (5mM) puis incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

2.2.2.2. Animaux et conditions d'hébergement

Les cellules étant d'origine humaine, l'utilisation de souris immunodéprimées était nécessaire. Pour cela nous avons travaillé avec des souris Swiss Nude mâles âgées de 6 semaines (Charles River, France).

Les animaux ont été hébergés à une température de 20 ± 2°C avec un cycle lumière-obscurité de 12/12 heures, en portoir ventilé, dans des cages de 484 cm² équipées de couvercles filtrants (Filtre HEPA) (Allentown). Durant toute l'expérience, les souris avaient libre accès à la nourriture (Rongeurs Reproduction RM3 autoclavable bouchon végétal, SDS) et à l'eau.

2.2.2.3. Induction tumorale

Les étapes qui ont été mises en œuvre pour l'obtention des tumeurs orthotopiques HCT116-luc2 sont illustrées par la figure 54.

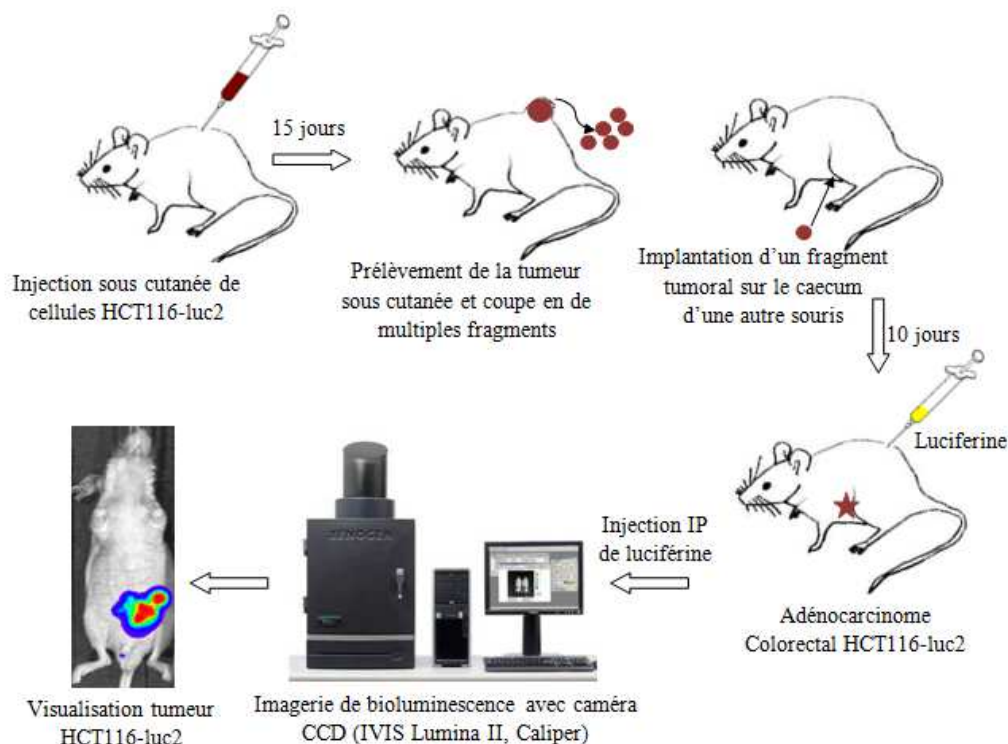


Figure 54 : Mise en place du modèle de carcinome colorectal par greffe de fragment

Une injection de 2 millions de cellules HCT116-luc2 en phase exponentielle de croissance a été réalisée sous un volume de 100 μ l, en sous cutané et au niveau du flanc. Au bout de 15 jours post-induction une tumeur sous cutanée d'environ 200 mm^3 (permettant d'induire 5 animaux) était obtenue.

Ces tumeurs sont ensuite prélevées puis découpées en fragments afin d'être greffées au niveau du caecum d'un nouvel animal. Pour cela, les souris receveuses sont anesthésiées chimiquement par injection i.p. (10 ml/kg) d'un mélange de kétamine (100 mg/ml) (IMALGENE®, Covely) et de xylazine (10 mg/ml) (ROMPUN®, Covely). Une incision d'environ 1 cm est réalisée au niveau de l'abdomen puis le caecum est extériorisé. Par des techniques de microchirurgie, les fragments tumoraux sont fixés sur le feuillet pariétal de la membrane séreuse du caecum à l'aide de fil résorbable (Vicryl 5-0). Le caecum est remis à sa place au niveau de la cavité péritonéale puis l'abdomen est refermé par des points de sutures (fil Vicryl 5-0).

2.2.2.4. Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence

L'imagerie de bioluminescence va permettre de réaliser un suivi de l'évolution tumorale en temps réel et de manière non invasive. Comme décrit dans le chapitre 1, la réaction de bioluminescence est une réaction enzymatique nécessitant une enzyme, la luciférase (exprimée dans les cellules tumorales luc) et un substrat, la luciférine.

Pour toutes les études réalisées au cours de cette thèse, la luciférine utilisée est une luciférine de luciole dont la bande spectrale varie de 510 à 650 nm avec un pic d'émission à 562 nm.

Le système d'acquisition est composé d'une chambre étanche à la lumière et d'une caméra CCD refroidie à -90°C (IVIS Lumina II, Caliper Life Sciences).

Acquisition des images

Les souris sont injectées en i.p. avec de la luciférine (Proméga) à la dose de 100 mg/kg. Cinq minutes après injection de la luciférine, les animaux sont anesthésiés pour être imagés. Pour cela, ils sont maintenus sous anesthésie (2% Isoflurane dans l'air) durant le temps de l'examen (1 à 5 minutes). Les acquisitions sont réalisées au binning médium (4x4), durant un temps variable dépendant de l'intensité du signal.

Afin de quantifier les images obtenues, des régions d'intérêts ont été tracées, englobant la totalité de l'animal (tumeur primaire + métastases) et l'intensité de bioluminescence de ces régions d'intérêt a été mesurée en photons/secondes (p/s) grâce au logiciel d'acquisition et de traitement d'image LivingImage (Caliper, version 4.2).

2.2.2.5. Traitement au 5-fluorouracile

Afin de valider la démarche d'imagerie de bioluminescence pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques sur la prolifération tumorale et la dissémination métastatique, le 5-fluorouracile, chef de file des chimiothérapies du cancer du colon et agent de référence a été utilisé.

Trois groupes d'animaux (n=7) ont été mis en œuvre :

- Groupe 1 : groupe contrôle (eau pour préparation injectable, eau ppi)
- Groupe 2 : 5-FU à la dose de 20 mg/kg
- Groupe 3 : 5-FU à la dose de 60 mg/kg

Dix jours après induction orthotopique des tumeurs, une randomisation, sur le critère de l'intensité de bioluminescence a été réalisée afin de répartir les animaux de manière homogène dans chaque groupe.

Le 5-fluorouracile (Sigma) ou son véhicule (eau ppi) ont alors été administrés par voie intra péritonéale sous un volume de 10 ml/kg à raison de 3 fois par semaine, durant 5 semaines. Le schéma thérapeutique ainsi que les doses de 5-fluorouracile ont été choisis à partir des données retrouvées dans la littérature (Gil-Ad, et al., 2008).

Afin de suivre leur état général, un suivi pondéral hebdomadaire des animaux a également été réalisé jusqu'au jour de l'euthanasie. Enfin l'imagerie de bioluminescence a été réalisée à 6 occasions, avant le début du traitement puis une fois par semaine durant toute la période de traitement (figure 55).

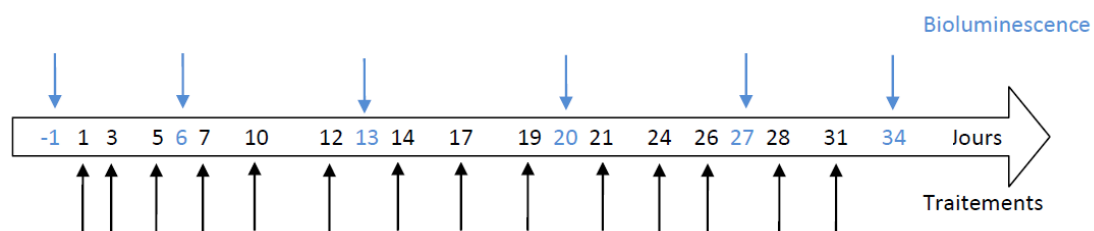


Figure 55 : Schéma expérimental du traitement au 5-FU

2.2.2.6. Nécropsie

Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale suivie d'une exsanguination. Les tumeurs ainsi que les organes présentant des métastases ont été prélevés le plus rapidement possible puis imagés immédiatement par bioluminescence. Les tumeurs ont été conservées en formol 10%.

2.2.3. Résultats

2.2.3.1. Mise au point du modèle

Le volume des tumeurs sous cutanée a été déterminé par mesure au pied à coulisse, il est de 200 mm³ 15 jours après injection des cellules. Les greffes orthotopiques de fragments, ont montré une prise très rapide, avec dès le 10^e jour post induction un envahissement de la cavité péritonéale chez certains animaux. Afin de limiter cette carcinose péritonéale, la partie du caecum présentant le fragment tumoral a été déposée du côté interne de la cavité intestinale afin d'éviter tout contact avec le péritoine. Cette précaution a permis de limiter le nombre d'animaux présentant une carcinose péritonéale à des temps précoces.

L'évolution tumorale a été suivie par bioluminescence (figure 56).

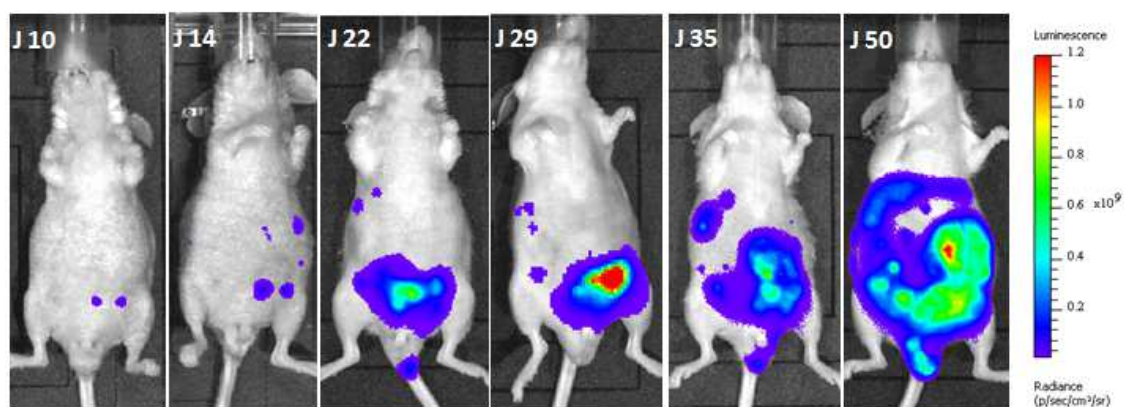


Figure 56 : Prolifération tumorale après greffe de fragment HCT 116-luc sur le caecum

La croissance tumorale est très rapide, 50 jours après la greffe orthotopique, les animaux présentent un envahissement de la cavité péritonéale avec de nombreuses métastases à distance et doivent être euthanasiés. Ainsi, pour la suite de notre travail, le suivi des animaux témoins n'excédera pas 50 jours post-induction.

2.2.3.2. Evaluation de la toxicité du 5-fluorouracile

La dose létale 50 du 5-fluorouracile étant de 117 mg/kg par voie intra-péritonéale (Wang and Chen, 1995), nous avons choisi 2 doses candidates intermédiaires pour notre étude d'efficacité : 20 et 60 mg/kg.

Dans le groupe contrôle et le groupe traité à la dose de 20 mg/kg, aucune mortalité n'est survenue alors que dans le groupe à la dose de 60 mg/kg, 5 souris sont mortes au cours de l'étude. A cette dernière dose, des signes de toxicité sont apparus environ 3 semaines après le début du traitement, les signes les plus prononcés étant une perte de poids de plus de 20%, une desquamation ainsi que l'apparition de diarrhée. La dose de 20 mg/kg semble donc être mieux tolérée puisque aucun signe clinique de toxicité n'a été observé.

2.2.3.3. Effet du 5-fluorouracile sur l'évolution tumorale

Les animaux ont été randomisés sur la base de la bioluminescence, à J1, soit le premier jour de traitement. Les moyennes de bioluminescence de chaque groupe sont présentées figure 57.

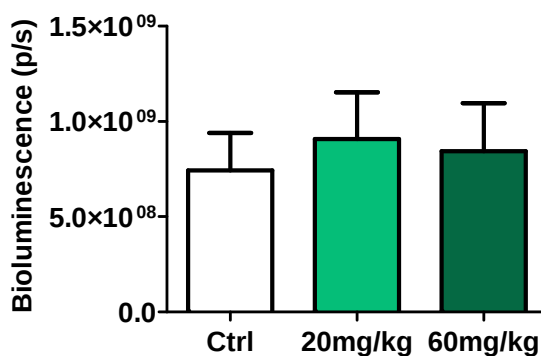


Figure 57 : Bioluminescence à J1, avant traitement au 5-FU

Les figures 58 à 60 montrent l'évolution tumorale chez un animal représentatif de chacun des 3 groupes, obtenue par imagerie de bioluminescence.

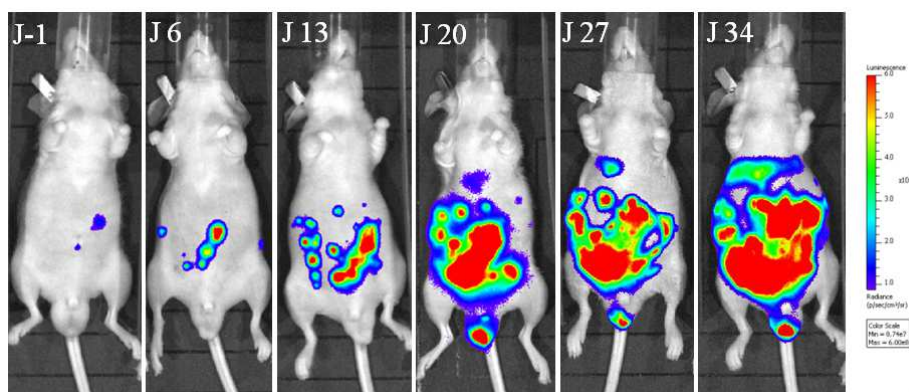


Figure 58 : Prolifération tumorale chez une souris témoin

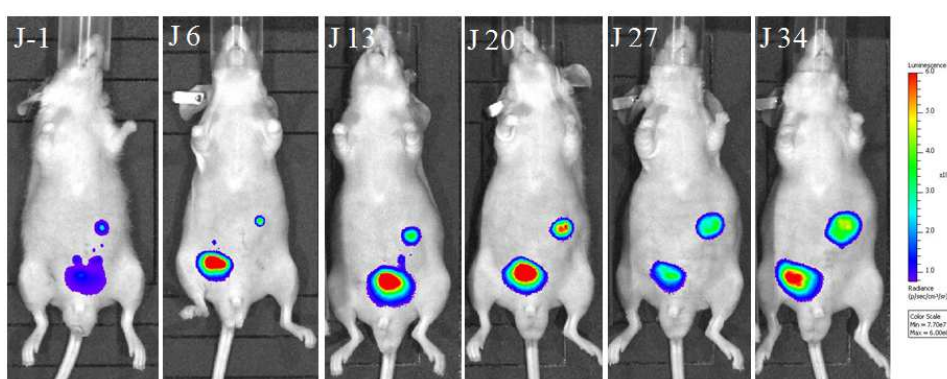


Figure 59 : Prolifération tumorale chez une souris traitée au 5-FU à 20 mg/kg

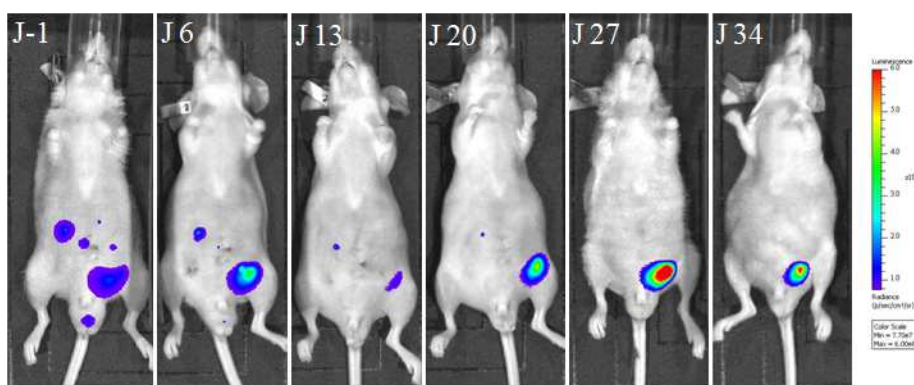


Figure 60 : Prolifération tumorale chez une souris traitée au 5-FU à 60 mg/kg

Les images de bioluminescence montrent un impact significatif du traitement sur la croissance de la tumeur primaire et sur l'inhibition de la dissémination métastatique.

Après quantification de l'intensité mesurée dans la souris corps entier, nous avons obtenu les résultats présentés figure 61.

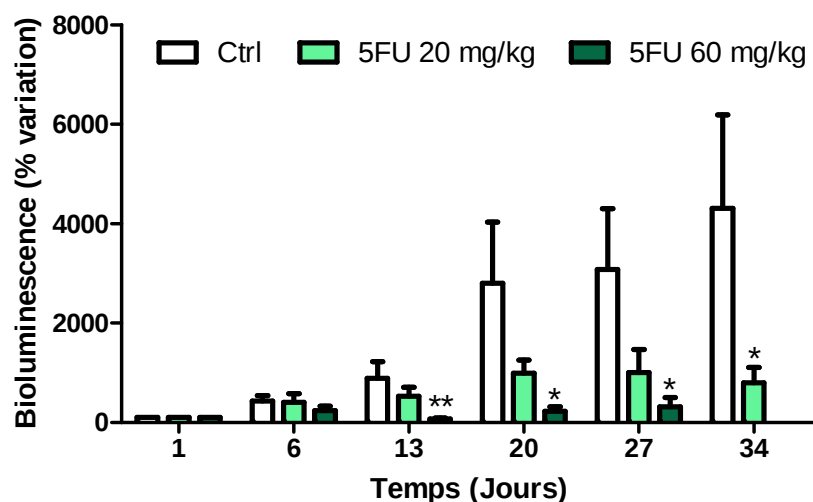


Figure 61 : Effet du 5-FU sur la croissance tumorale

Les résultats présentés en pourcentage de variation par rapport à l'intensité de bioluminescence mesurée avant traitement (J1), correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=7).

* : $p < 0,05$, ** : $p < 0.01$ en comparaison au groupe contrôle (Analyse de variance).

Les résultats montrent qu'un traitement au 5-FU aussi bien à la dose de 20 mg/kg qu'à la dose de 60 mg/kg, induit une réduction significative de la croissance tumorale (dès le 13^e jour pour le groupe à 60 mg/kg et à partir du 34^e jour pour le groupe à 20 mg/kg).

La résolution spatiale de la bioluminescence *in vivo* ne permettant pas d'identifier précisément les structures envahies par des métastases, nous avons réalisé dans les 5 minutes suivant l'autopsie (J34) une imagerie de bioluminescence *ex vivo* qui, associée à l'observation macroscopique, a ainsi permis de confirmer la localisation des métastases (figure 62).

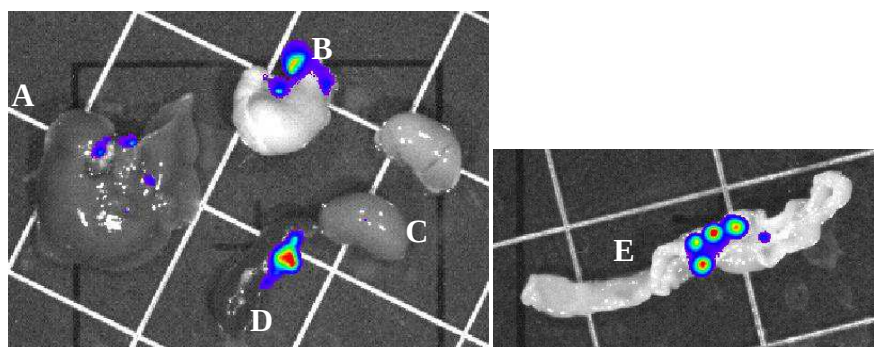


Figure 62 : Bioluminescence *ex vivo* des organes présentant des nodules

A : foie, B : estomac, C : reins, D : rate et E : intestins

Grâce à cette imagerie de bioluminescence *ex vivo* (qui est uniquement qualitative car l'animal est mort, donc plus de production d'O₂ et d'ATP possible), il a été observé pour de

nombreux animaux du groupe contrôle la présence de nodules sur l'intestin (85%) ainsi que de tumeurs au niveau du péritoine (70%). Des métastases à distance au niveau du foie (28%), de la rate (28%), de l'estomac (28%) et des reins (14%) ont également été observées. Dans les groupes traités au 5-FU, aucune métastase à distance n'a été détectée.

2.2.4. Discussion

Ce travail a abouti à la mise au point d'un modèle murin orthotopique de carcinome colorectal, représentatif de la pathologie cancéreuse chez l'homme (présence de métastases notamment après dissémination par voie sanguine), et bioluminescent donc exploitable pour évaluer par imagerie *in vivo* l'effet de nouvelles thérapies où les processus affectant le microenvironnement sont impliqués dans la métastase.

Méthode d'induction tumorale choisie. La méthode par greffe de fragments présente l'avantage de permettre l'obtention de groupes d'animaux homogènes dont le taux de prise de greffe est de 90 %, contrairement au modèle par injection de cellules où le taux de prise n'est que de 60-70%. Ces résultats observés lors de la mise au point du modèle sont confortés par ceux décrits dans la bibliographie qui préconisent l'implantation de fragments tissulaires intacts plutôt que l'administration d'une suspension cellulaire pour améliorer le taux de prise de greffe ainsi que le potentiel métastatique (Hoffman, 1999). Cependant cette méthodologie possède certains inconvénients : d'une part, il est nécessaire de générer des fragments tumoraux dans une souris « hôte » ce qui augmente de 15 jours le temps nécessaire à l'obtention du modèle orthotopique ainsi que le nombre d'animaux utilisé. D'autre part, la croissance tumorale conduit à l'envahissement plus rapide du péritoine (70% des animaux) dû au contact du fragment (au dessus du caecum) avec le plan sous cutané.

Développement tumoral et prolifération métastatique. Les nombreux sites de métastases observées pour ce modèle orthotopique HCT 116 (foie, rate, estomac, reins) correspondent à ceux observés lors d'un carcinome colorectal chez l'homme. En effet, les principaux sites de métastases dans le cancer colorectal sont les ganglions lymphatiques régionaux (50-70%) et le foie (35-50%), d'autres sites comme les poumons (21%) ainsi que le péritoine (15%) ayant également été observés (Gubitosi, et al., 2009).

Les cellules HCT116 ont montré un taux de prise de greffe important en comparaison à d'autres lignées de cancer colorectal. K. Flatmark et al. ont comparé 12 lignées de cellules de cancer colorectal. Parmi les douze lignées, six (KM20L2, HCT116, HCT15, SW480, SW620 and Colo320DM) présentent un taux de prise de greffe élevé, proche de 100% accompagné d'une carcinose péritonéale importante. Seules deux lignées cellulaires permettent de générer facilement des métastases au niveau des ganglions lymphatiques, les cellules HT29 et HCC2998 (Flatmark, et al., 2004). D'autres équipes et en particulier celle de N. Guilbaud ont cherché à confronter les lignées cellulaires de cancers colorectaux disponibles. Ils ont ainsi montré que le modèle HT29 qui permet d'obtenir des métastases ganglionnaires chez 100 % des animaux se disséminait par voie lymphatique alors que le modèle HCT116 dont les métastases sont principalement retrouvées au niveau hépatiques et pulmonaires se disséminait plutôt par voie sanguine (Guilbaud, et al., 2001). Ainsi, les cellules utilisées dans notre modèle permettent une prise de greffe importante et très rapide en comparaison à d'autres modèles et les métastases sont retrouvées au niveau de sites variés. Toutefois, ce modèle ne permet pas d'obtenir des métastases au niveau des ganglions lymphatiques, qui représentent un site important de métastases chez l'homme, ce qui peut constituer une limite pour certaines évaluations thérapeutiques.

Dans le cadre de la validation du modèle vis-à-vis d'un traitement de référence, nous avons obtenu un effet significatif du 5-FU à la fois sur l'inhibition de la prolifération tumorale et sur la dissémination métastatique. Les effets obtenus sont en accord avec ceux décrits dans la bibliographie (Gil-Ad, et al., 2008, Jin, et al., 2009) qui démontrent lors d'un traitement au 5-FU à la dose de 20 mg/kg (3 injections par semaines durant 5 semaines) des effets sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les conditions expérimentales adoptées dans notre modèle de cancer colorectal chez la souris immunodéficiente sont pertinentes pour l'évaluation de l'activité antitumorale de nouvelles molécules et en particulier de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées au traitement des patients présentant des mutations au niveau du proto-oncogène Ras. Ce modèle a d'ailleurs été utilisé pour l'évaluation d'une nouvelle molécule capable de sensibiliser les cellules aux chimio- et radiothérapies. C'est une protéine inhibitrice des kinases Raf, RKIP (Raf kinase inhibitory protein), qui entraîne une inhibition des voies de signalisation Raf-MEK-ERK, NF κ B et une activation de la voie GSK3 β . Cette molécule pourrait permettre de limiter la résistance des patients K-Ras muté au traitement anti-EGFR (Al-Mulla, et al., 2012).

Choix de la stratégie d'imagerie de bioluminescence. Ce modèle, dont l'évolution tumorale peut être suivie par imagerie de bioluminescence, permet d'évaluer *in vivo*, de manière longitudinale et non invasive l'efficacité de traitements anticancéreux. D'autres modalités d'imageries telles que l'IRM et la fluorescence auraient pu être envisagées. L'avantage de ces modalités par rapport à la bioluminescence est qu'elles sont plus facilement transposables à l'homme. L'IRM avec injection d'agents de contraste a ainsi permis de visualiser l'effet d'un traitement sur le volume sanguin et la densité de la microvascularisation (Bhattacharya, et al., 2011) dans un modèle de carcinome colorectal GEO et la fluorescence a montré son intérêt pour suivre l'évolution tumorale (Jin, et al., 2011) ainsi que le ciblage spécifique de la vascularisation des tissus de carcinome colorectal (cellules Colon 26) (Li, et al., 2010). Toutefois, les temps d'acquisition nécessaires à l'IRM assez longs et le manque de sensibilité de la fluorescence pour la détection des foyers profonds, nous ont conduits à choisir la bioluminescence, relativement rapide, simple à mettre en œuvre pour explorer 3 à 5 animaux simultanément à faible coût et permettant de détecter correctement les métastases présentes au niveau de foyers plus profonds. Cependant, à un stade avancé du cancer, compte tenu de la résolution des systèmes d'imagerie de bioluminescence, il devient difficile de visualiser individuellement les métastases. Pour la plupart des études, le dénombrement de ces métastases n'est pas impératif si l'on considère la bioluminescence comme biomarqueur quantitatif de la prolifération tumorale. Il convient alors d'évaluer l'activité lumineuse totale émise par les seules métastases en s'affranchissant de la bioluminescence de la tumeur primaire. Cependant, afin d'améliorer la résolution spatiale de la bioluminescence, une correction de la diffusion tissulaire par analyse spectrale a été validée au laboratoire (Akkoul, et al., 2008, Pesnel, et al., 2011), permettant de séparer et de distinguer des foyers très proches, et cette méthode pourrait alors être appliquée à ce modèle de carcinome colorectal à cellules HCT116-luc.

2.3. Modèle orthotopique de carcinome pancréatique MIA Paca2-luc

Le deuxième aspect de notre travail a consisté à développer un modèle de carcinome pancréatique, selon une démarche et des enjeux relativement proches de ceux décrits pour le carcinome colorectal dans le précédent chapitre.

La pertinence d'un modèle nécessite une physiopathologie représentative de celle observée chez l'homme et certaines caractéristiques ne sont pas toujours compatibles avec certaines modalités d'imagerie. Cette étude a donc consisté en la mise en place du modèle mais surtout à caractériser sa physiopathologie afin de déterminer les limites permettant une évaluation précise de l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2.3.1. Etude bibliographique

2.3.1.1. Le cancer du pancréas

Avec 10 140 nouveaux cas estimés de cancer du pancréas en France en 2010, ce cancer est situé au 9^e rang de l'ensemble des cancers incidents, tous sexes confondus. C'est un cancer de mauvais pronostic avec une survie relative à 5 ans égale à 6 % (INCa, 2010). S'il est relativement rare pour l'instant, le cancer du pancréas est aussi l'un des plus redoutables et comme son incidence semble augmenter significativement avec l'augmentation du nombre de cas de diabète, de nombreux développements thérapeutiques sont nécessaires.

Le pancréas se compose d'une partie "exocrine", produisant des enzymes nécessaires à la digestion, et d'une partie "endocrine", fabriquant diverses hormones dont l'insuline.

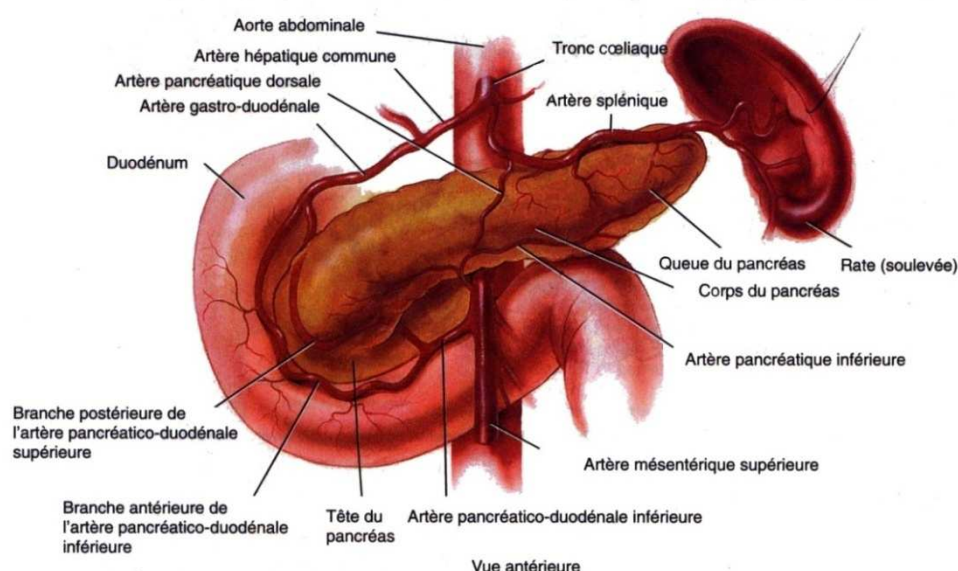


Figure 63 : Anatomie du pancréas chez l'homme

(Source : Chevrier G, <http://bio.m2osw.com>)

Dans la grande majorité des cas (environ 95 % des patients), les cancers du pancréas touchent la partie exocrine ou partie ductale, et correspondent à des adénocarcinomes. Dans environ 5 % des cas, le cancer atteint la partie endocrine de la glande : on parle alors de tumeur neuro-endocrine ou de carcinome endocrine du pancréas.

2.3.1.2. Les traitements de référence

Compte tenu de la gravité du pronostic, un traitement agressif peut être envisagé chez les patients en bon état général et pour lesquels un traitement chirurgical est possible. Les molécules utilisées sont essentiellement la gemcitabine et la doxorubicine et dans une moindre mesure, le 5-FU, le cisplatine et l'oxaliplatine. Dans les maladies métastatiques, l'effet palliatif est démontré pour la gemcitabine utilisée seule ou en combinaison avec le cisplatine (GEMCIS) ou l'oxaliplatine (GEMOX) et la combinaison 5-FU/cisplatine (Meriggi and Zaniboni, 2010, Stemmler, et al., 2011).

Des anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés (bevacizumab, cetuximab), en association avec la gemcitabine et de nouvelles formulations, notamment des nanoparticules sont de plus en plus employées dans le cas de cancer du pancréas afin d'améliorer la biodisponibilité des traitements et de diminuer la toxicité.

La Gemcitabine

La gemcitabine, analogue nucléosidique de la déoxycytidine, est une prodrogue qui nécessite une internalisation et une phosphorylation intracellulaire afin d'être active. C'est un antimétabolite spécifique de la phase S (phase de synthèse) du cycle cellulaire.

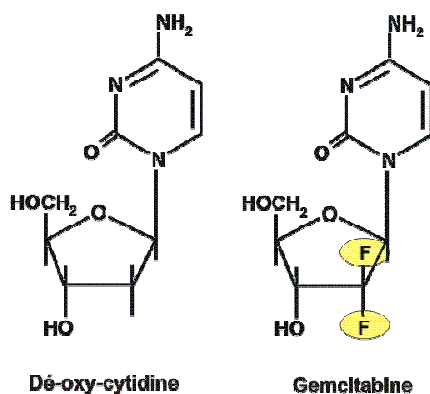


Figure 64 : Formule chimique de la gemcitabine et de son analogue nucléosidique, la déoxycytidine

Le mécanisme d'action de la gemcitabine est présenté figure 65.

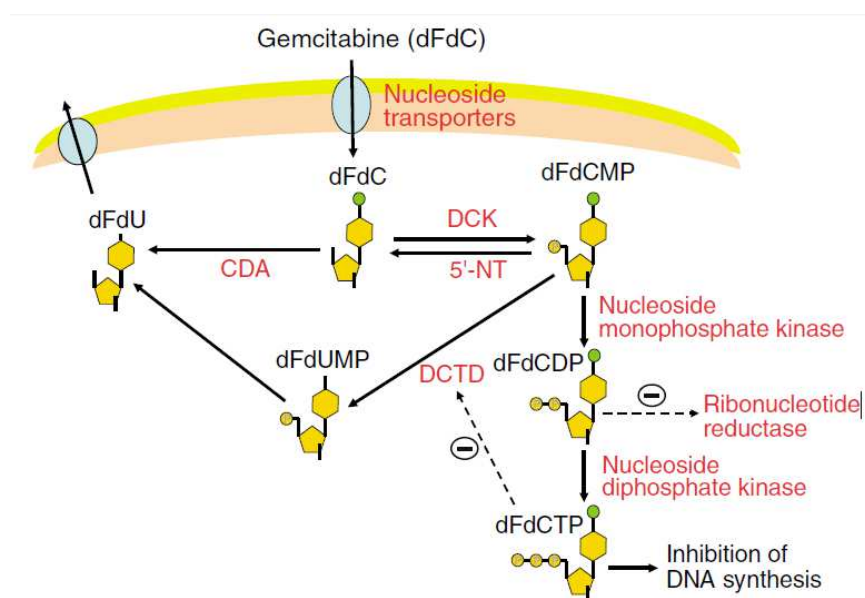


Figure 65 : Métabolisme et mécanisme cellulaire de la Gemcitabine

(Ueno, et al., 2007)

La gemcitabine est internalisée dans le milieu intracellulaire *via* des transporteurs nucléosidiques où elle est phosphorylée en gemcitabine monophosphate (dFdCMP) par la

déoxycytidine kinase (DCK). Le dFdCMP est ensuite phosphorylé en gemcitabine diphosphate (dFdCDP) puis en gemcitabine triphosphate (dFdCTP) par un nucléoside monophosphate (UMP/CMP).

La gemcitabine exerce ses effets cytotoxiques en inhibant la synthèse d'ADN, par incorporation de sa forme active, dFdCTP, au sein du brin d'ADN. Le dFdCDP inhibe fortement la ribonucléotide réductase, entraînant une diminution des désoxyribonucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN. Le dFdCTP supprime l'inactivation de la dFdCMP par inhibition de la déoxycytidine monophosphate désaminase (DCTD).

D'autre part, plus de 90% de la gemcitabine administrée est métabolisée puis inactivée par la cytidine désaminase (CDA) en 2'-deoxy-2', 2'-difluorouridine (dFdU). Les métabolites phosphorylés de la gemcitabine sont alors réduits par la 5'-nucleotidase (5'-NT) cellulaire, et le dFdCMP est converti puis inactivé en 2'-deoxy-2', 2'-difluorouridine monophosphate (dFdUMP) (Ueno, et al., 2007).

La vectorisation de molécules

La pharmacie galénique moderne développe des systèmes d'administration colloïdaux susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire et/ou intracellulaire tout en protégeant le principe actif de la dégradation par les enzymes. La vectorisation des médicaments correspond au transport de molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique. Pour cela, la mise au point de systèmes particuliers nanométriques (nanoparticules, liposomes...) a été réalisée. Après administration intravasculaire, ces nanoparticules sont opsonisées, c'est-à-dire reconnues via leurs protéines extra-membranaires par les macrophages du foie et de la rate (Xiao, et al., 2011). L'intérêt de ces nanoparticules réside dans leur biodistribution particulière, leur structure qui permet d'envisager le ciblage spécifique de cancer (particules fonctionnalisées) ainsi que la diminution de la toxicité de certaines molécules anticancéreuses (Vrignaud, et al., 2011).

Dans le cas du cancer du pancréas, plusieurs médicaments anticancéreux ont été vectorisés dans des nanostructures et parmi eux on trouve la doxorubicine et la gemcitabine.

La doxorubicine a été vectorisée dans le but d'améliorer son index thérapeutique et de diminuer sa toxicité cardiaque grâce à l'augmentation de sa concentration hépatique (Duggan and Keating, 2011). La nanovectorisation permet d'encapsuler des molécules biologiquement actives pour les rendre « invisibles » vis-à-vis de certains mécanismes développés par les cellules cancéreuses et notamment le phénomène de résistance multidroge (MDR), rendant

de nombreux traitements anticancéreux inefficaces. L'encapsulation de la doxorubicine a permis de contourner ce mécanisme de résistance, en empêchant la reconnaissance de la chimiothérapie par les protéines d'efflux (Pgp, MRP,...). Sous cette forme, la doxorubicine ne peut être expulsée en dehors des cellules cancéreuses qui redeviennent alors sensibles à la chimiothérapie (Treupel, et al., 1991).

La gemcitabine, comme décrit précédemment, est rapidement métabolisée puis inactivée par désamination, ce qui résulte en une demi-vie plasmatique très courte (Reddy and Couvreur, 2008). Des liposomes squalénisés ont été employés pour encapsuler la gemcitabine et ainsi modifier sa pharmacocinétique et sa biodistribution, dans le but d'augmenter sa concentration au niveau de la tumeur. Des études ont ainsi démontré une amélioration de l'activité antitumorale pour la forme liposomale de la gemcitabine (Pili, et al., 2010).

L'utilisation thérapeutique de nanovecteurs est un axe en plein développement. Les recherches actuelles visent notamment à découvrir de nouveaux matériaux, toujours dépourvus de toxicité, mais dont la capacité de stockage serait accrue afin de diminuer la quantité de nanovecteurs injectée dans l'organisme sans affecter l'efficacité optimale du médicament (Horcajada, et al., 2010). Il est donc crucial de disposer de modèles animaux pour l'évaluation de ces nouvelles stratégies thérapeutiques de la nanomédecine.

2.3.2. Matériels et méthodes

2.3.2.1. Les cellules MIA PaCa2

La lignée cellulaire MIA PaCa-2 a été établie par A.Yunis et al. en 1975 (Yunis, et al., 1977), à partir de tissu tumoral pancréatique prélevé chez un homme caucasien de 65 ans. Cette lignée cellulaire a été choisie car elle permet d'obtenir un modèle d'adénocarcinome ductal, cancer du pancréas ayant l'incidence la plus élevée chez l'homme.

Les cellules MIA PaCa2 ont été cultivées dans des flasques de 75 cm³ dans du milieu DMEM supplémenté par du SVF (10 %) (Gibco), du sérum de cheval (2,5%) (Gibco), et de la L-Glutamine (5mM) (Gibco) et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

2.3.2.1.1. Transduction des cellules MIA PaCa2-luc

Les cellules MIA PaCa2 provenant de l'ATCC sont initialement non bioluminescentes, il était donc nécessaire de les modifier afin qu'elles expriment le gène de la luciférase. Pour cela, une transduction lentivirale a été réalisée au sein de l'unité Inserm U957 de Nantes par V. Trichet, selon la méthode décrite par Rousseau et al., (Rousseau, et al., 2010) (figure 66).

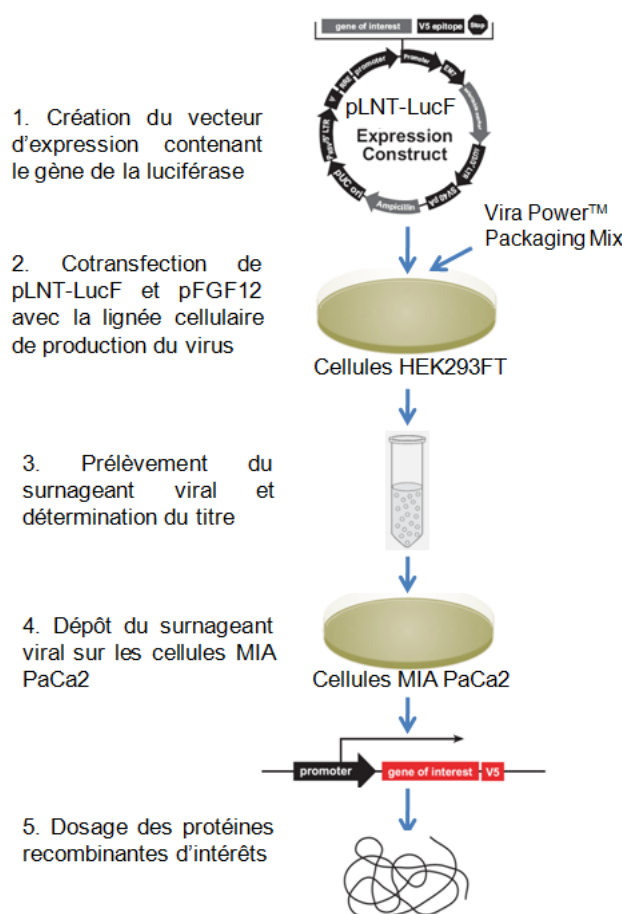


Figure 66 : Méthode de transduction des cellules MIA PaCa2

(Source : Invitrogen™, ViraPower™ Lentiviral Expression Systems User Manual, 2010)

La production de particules lentivirales codant pour le gène de la luciférase nécessite l'utilisation du « ViraPower™ Lentiviral Expression System » (Invitrogen). Pour cela, des cellules HEK293FT (exprimant de façon stable et constitutive l'antigène T du virus SV40) sont incubés en présence de 3 mg d'une solution Vira Power™ (Invitrogen), 9 mg de pLNT-LucF et 0,9 mg de pFG12 codant pour l'EGFP (enhanced green fluorescent protein). Après 48h d'incubation à 37°C, le surnageant contenant les particules lentivirales a été collecté puis concentré 60 fois par ultrafiltration. Afin de transduire de façon stable les cellules

d'adénocarcinome pancréatique, 10 000 cellules MIA Paca2 ont étéensemencées dans chaque puits d'une plaque 96 puits avec 100 µl de milieu de culture puis mise en présence de la suspension de particules lentivirales produite (250 particules virales par cellules) après 24h d'incubation. Après amplification des cellules, le taux d'expression de l'EGFP a été quantifié par cytométrie en flux et l'activité luciférase mesurée par spectrophotométrie.

2.3.2.1.2. Impact de la transduction sur les cellules MIA PaCa2

Afin de s'assurer de l'absence d'impact de la transduction sur les caractéristiques biologiques des cellules MIA PaCa, un certain nombre de tests ont été réalisés.

Impact de la transduction sur la croissance cellulaire

2.10^5 cellules ont étéensemencées dans des flasques de 25 cm², dans 7 ml de milieu DMEM supplémenté par du SVF (10 %), du sérum de cheval (2,5%), et de la L-Glutamine (5mM) (Gibco) et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

Un comptage des cellules MIA PaCa2 sur cellule de Malassez a été réalisé à 24h, 48h, 72h et 96h (n=3).

Impact de la transduction sur la sensibilité des cellules à la gemcitabine

Pour déterminer la CI50, les cellules (MIA PaCa2 et MIA PaCa2-luc) ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à la concentration de 5000 cellules/puits puis incubées à 37°C sous 5% de CO₂. 24h après ensemencement, la gemcitabine a été ajoutée à des concentrations allant de 2 nM à 200 nM (6 puits/condition).

Un test de viabilité MTT a été réalisé 24h après traitement des cellules. Ce test s'appuie sur le fait que les cellules vivantes sont capables de réduire le sel de tétrazolium en cristaux de formazan bleus *via* la succinate déshydrogénase mitochondriale. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes dans le milieu. Pour cela, une solution de MTT est préparée à la concentration de 5mg/ml dans du PBS 1X puis diluée dans du milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 mg/ml. Après 2h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, 100 µl de tampon de lyse (80% isopropanol, 10% Triton X100, 10% HCl 1N) ont été ajoutés dans

chaque puits afin de solubiliser les cristaux de formazan formés. L'absorbance a été mesurée à 562 nm grâce à un lecteur de microplaque (Biokinetics Reader ; INEM Orléans). Des puits sans cellule, contenant uniquement le milieu de culture et du MTT ont servi à soustraire le bruit de fond au signal. Les résultats obtenus ont été calculés à partir de n=3 expériences indépendantes et sont présentés en pourcentages par rapport au contrôle.

Détermination de la concentration inhibitrice 50 de la gemcitabine par bioluminescence

Afin de déterminer l'IC₅₀ de la gemcitabine *in vitro* sur les cellules MIA PaCa2 luc, celles-ci ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à la densité de 50 000 cellules par puits sous un volume de 500 µl. Après 24h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, différentes concentrations de gemcitabine allant de 2 nM à 100 nM ont été déposées sur les cellules. Après une nouvelle incubation de 24h en présence de gemcitabine, les cellules ont été imagées en bioluminescence 5 minutes après ajout de 15 µg de luciférine dans chaque puits (figure 67).

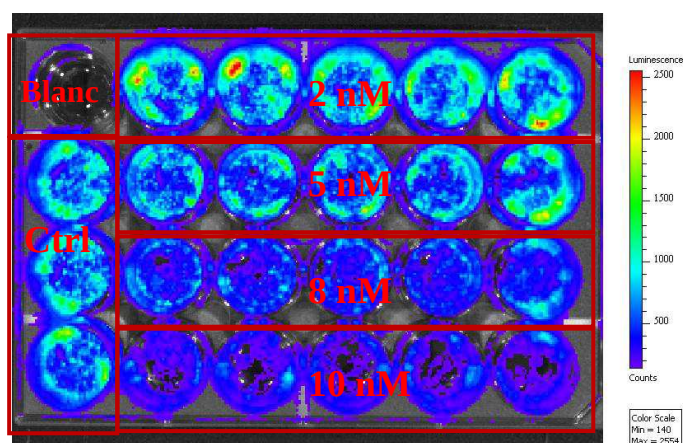


Figure 67 : Plaque 24 puits imagée par bioluminescence 24h après traitement à la gemcitabine

Un puits sans cellule, contenant uniquement le milieu de culture et la luciférine (blanc) a servi à soustraire le bruit de fond au signal. Les résultats obtenus ont été calculés à partir de n=3 expériences indépendantes et sont présentés en pourcentages par rapport au contrôle.

2.3.2.2. Animaux et induction orthotopique des cellules MIA PaCa2-luc

Les cellules MIA PaCa2 étant des cellules d'origine humaine, nous avons utilisé des souris immunodéficientes Swiss nude femelles âgées de 5 semaines (Charles River, France). Les animaux ont été hébergés dans les mêmes conditions que celles décrites paragraphe 2.2.2.2.

La difficulté de ce modèle réside dans l'injection des cellules au niveau du pancréas de l'animal. En effet, chez la souris, contrairement à l'homme, le pancréas est un organe diffus (figure 68) et il est nécessaire de connaître sa structure anatomique afin de déterminer le site le plus propice à l'injection des cellules tumorales.

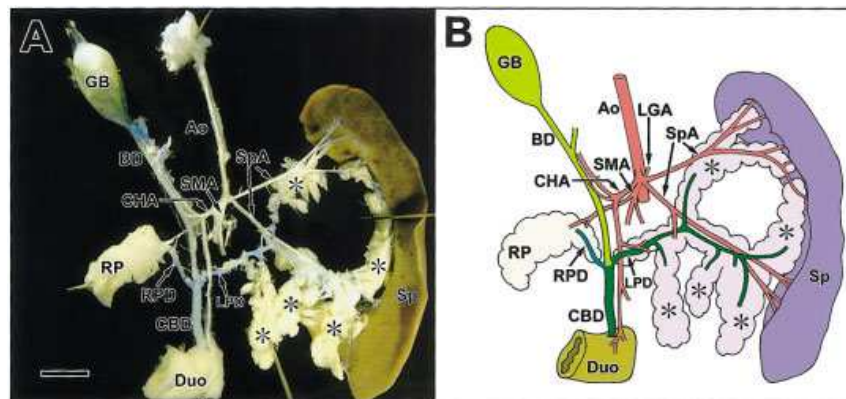


Figure 68 : Photographie (A) et schéma (B) indiquant les vaisseaux irriguant le pancréas de souris

Les vaisseaux alimentant le lobe droit proviennent de l'artère mésentérique supérieure (SMA), et ceux alimentant le lobe gauche de l'artère splénique (SpA). Le canal pancréatique ne se déverse pas directement dans le duodénum, mais dans le cholédoque (CBD). Ao : aorte ; BD : voies biliaires ; CHA : artère hépatique commune ; Duo : duodénum ; GB : vésicule biliaire ; LPD : canal pancréatique gauche ; RP : lobe droit du pancréas ; RPD : canal pancréatique droit ; Sp : rate (Yi, et al., 2003).

Selon la méthode décrite par l'équipe de Kim dans Nature Protocols (Kim, et al., 2009), l'animal maintenu sous anesthésie gazeuse (Isoflurane 2% dans l'air) était placé en décubitus latéral droit et une incision, parallèle à l'ombre de la rate, d'environ 6 mm, a été pratiquée (figure 69 A). Le pancréas ainsi que la rate ont été externalisés puis 2.10^6 cellules MIA PaCa2 sous un volume de 50 μ l ont été injectées au niveau de la tête du pancréas à l'aide d'un micromanipulateur, sous une loupe binoculaire, afin d'améliorer la reproductibilité du site

d'implantation et de prévenir la fuite de la suspension cellulaire. Une fois l'injection réalisée, l'aiguille était maintenue en place durant 30s afin de limiter la fuite des cellules. Cette précaution permet d'observer une petite poche remplie de liquide (Figure 69C), représentative de la qualité de l'injection.

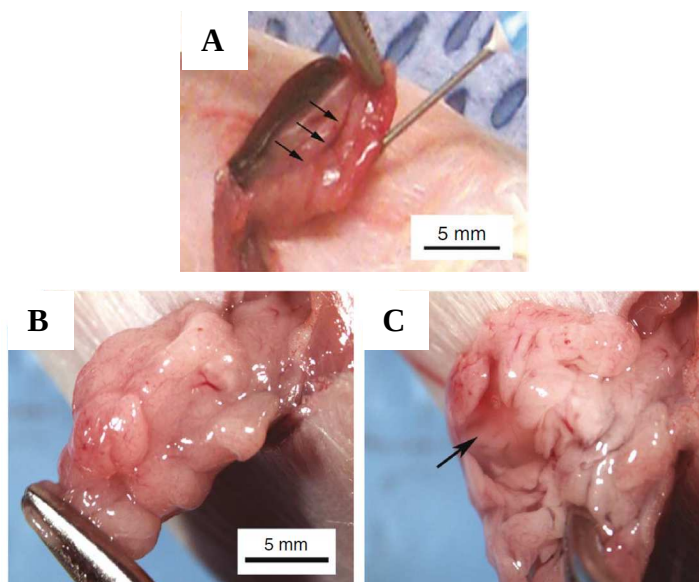


Figure 69 : Injection de cellules au niveau du pancréas

A : injection au niveau de la tête du pancréas, parallèlement à la rate ; B : aspect du pancréas avant injection ; C : aspect du pancréas après injection, apparition d'une poche remplie de liquide (Kim, 2009)

Le pancréas ainsi que la rate étaient ensuite remis à leur position d'origine puis le plan musculaire ainsi que le plan cutané refermés à l'aide de points de sutures.

Un suivi post opératoire était réalisé durant les 5 jours suivant l'acte chirurgical. Aucune mortalité post-opératoire n'a été observée (n = 40 animaux).

2.3.2.3. Traitement à la Gemcitabine

La dose létale 50 (DL50) de la gemcitabine par voie intraveineuse chez la souris étant de 500 mg/kg, deux doses (100 mg/kg et 200 mg/kg) ont été testées dans notre modèle orthotopique de carcinome pancréatique afin de déterminer la dose la plus efficace avec une tolérance satisfaisante.

La procédure expérimentale est la suivante : quatre jours après induction des tumeurs primaires, les animaux ont été randomisés selon l'intensité de bioluminescence en 3 groupes de 10 animaux :

- Groupe contrôle (CTRL),
- Groupe traité à la gemcitabine à la dose de 100 mg/kg (GEM 100 mg/kg)
- Groupe traité à la dose de 200 mg/kg (GEM 200 mg/kg).

Les animaux ont ensuite reçu 4 injections de gemcitabine espacées de 4-5 jours selon le schéma thérapeutique décrit ci-dessous. Les animaux du groupe contrôle ont reçu une solution de NaCl 0,9 % sous un volume de 10 ml/kg, les animaux des groupes traités ont reçu de la gemcitabine à la dose de 100 et 200 mg/kg, dissoute dans du NaCl 0,9% et sous un volume de 10 ml/kg.

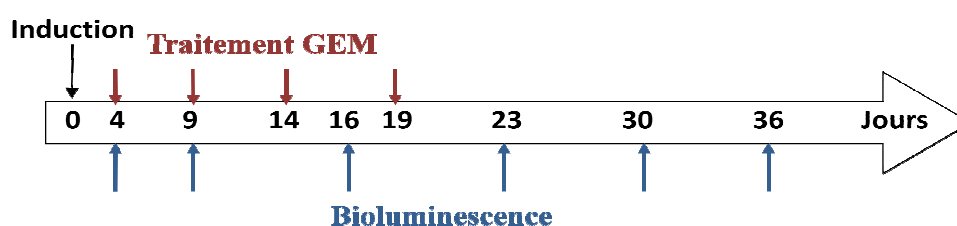


Figure 70 : Schéma thérapeutique

L'évolution tumorale a été suivie par imagerie de bioluminescence à raison d'une séance d'imagerie par semaine.

2.3.2.4. Imagerie de bioluminescence

Les paramètres utilisés pour réaliser l'imagerie de bioluminescence sont les mêmes que ceux décrits paragraphe 2.2.2.4.

L'imagerie de bioluminescence étant disponible en 2D exclusivement, les problèmes dus à l'absorption des photons par les tissus (rate, peau,...), variable d'un animal à l'autre ainsi qu'au cours du temps, et la localisation en profondeur du pancréas nous ont obligé à imager les souris en faces antérieure et latérale. Les résultats de bioluminescence sont présentés en photons/secondes. Pour les études d'évaluation, les résultats présentés correspondent à la

somme de la bioluminescence corps entier des 2 faces (latérale + antérieure) et ont été exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport au premier temps de bioluminescence (J3, avant traitement à la gemcitabine), chaque animal étant ainsi son propre témoin.

2.3.2.5. Imagerie de fluorescence de l'expression des intégrines : mime RGD-Cy5.5

2 nmoles d'une sonde moléculaire des intégrines correspondant à un mime RGD couplé à un fluorochrome, la Cyanine 5.5 (Servier) (λ_{ex} : 675 nm, λ_{em} : 694 nm), ont été injectées à l'animal 24 h avant imagerie de fluorescence, afin d'éliminer la contribution de la sonde circulante dans le signal non spécifique et d'obtenir un rapport signal/bruit optimal au niveau de la tumeur.

L'imagerie de fluorescence a été réalisée par réflectance au binning medium. Les filtres d'émission et d'excitation utilisés étaient respectivement de 675 nm et 720 nm. Les images ont été analysées grâce au logiciel Living Image (version 4.2, Caliper Life Science).

2.3.2.6. Imagerie de l'hypoxie : ^{64}Cu -ATSM

Le marquage de l'ATSM (diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) par le cuivre a été réalisé de la façon suivante : le cuivre, initialement sous forme $^{64}\text{CuCl}_2$ et à pH1 (I. DaSilva, CEMTHI-Cyclotron, CNRS Orléans) a été neutralisé volume à volume avec du tampon acétate de sodium 1M à pH 5,5. Après neutralisation, 0,4 μg d'ATSM (ABX) dissous dans 100 μl de DMSO ont été ajoutés à la solution d'acétate de cuivre. Cette solution a ensuite été purifiée sur colonne C-18 SepPak Light (Waters), prétraitée avec 5 ml d'éthanol et 2 ml d'eau. La radioactivité des fractions recueillies a été comptée à l'aide d'un activimètre gamma (Capintec CRC 15R). Les fractions présentant la radioactivité la plus importante étaient conservées afin d'être caractérisées par chromatographie sur couche mince (CCM). Pour réaliser la CCM, 5 μl des fractions retenues ont été déposés sur gel de silice, puis une élution a été réalisée avec 10 mmol.L^{-1} de DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) dissous dans de l'eau, afin de séparer le ^{64}Cu libre du ^{64}Cu lié. Le gel de silice a ensuite été placé sur un film radiosensible (film phosphorescent Packard) pendant 30 secondes à l'abri de la lumière puis lu avec un système dédié (CycloneTM, Perkin Elmer).

Après injection d'environ 5,5 MBq par voie intraveineuse sous un volume de 200 µl, une imagerie par tomographie d'émission de positons (TEP) a été réalisée à différents temps post-injection (10 min, 1h, 3h et 5h).

2.3.2.7. Imagerie par Tomographie d'Emission de positons

Les acquisitions TEP (eXplore Vista DR, GE) ont été réalisées en mode statique, dans une fenêtre spectrale de 250 à 700 keV avec une durée d'acquisition de 20 minutes par champs de vue. Les images ont été reconstruites grâce à un algorithme de reconstruction (3D-OSEM) puis analysées et quantifiées grâce au logiciel Explore Vista (version 4.7, GE). Les résultats ont été exprimés en Bq/cm².

2.3.2.8. Euthanasie et nécropsie

Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale suivie d'une exsanguination. Les tumeurs ainsi que les organes présentant des métastases ont été prélevés puis imagés par bioluminescence *ex vivo*. Le volume ainsi que la masse tumorale ont été mesurés. Les tumeurs ont été sectionnées en deux, une moitié a été conservée en formol 10% et l'autre moitié incluse dans un milieu d'enrobage cryogénique (OCTTM) puis congelée dans l'azote et conservée à -80°C.

2.3.2.9. Histologie conventionnelle : coloration Hématoxiline Eosine Safran

Afin de signer la présence de stroma plutôt que de tissu tumoral, une coloration Hématoxiline Eosine-Safran (HES) a été réalisée sur coupes de tumeur (prélevée à J48), préalablement fixées dans du formol 10% et incluses en paraffine. Par cette technique, le safran colore le collagène et donc le stroma en jaune.

2.3.2.10. Expression de la luciférase : immunomarquage anti-luciférase

Afin de vérifier que les cellules expriment toujours la luciférase, un immunomarquage sur coupe de tumeur avec un anticorps anti-luciférase a été réalisé.

Les tumeurs ont été prélevées lors de la nécropsie (J48), puis incluses dans un milieu d'enrobage cryogénique (OCTTM), congelées dans l'azote et enfin coupées au cryotome (LEICA LM1900) pour obtenir des sections de 10 µm.

Avant de déposer l'anticorps primaire, les cellules ont été perméabilisées et les sites non spécifiques saturés avec du PBS + SVF 5% + Triton X100 0,1% pendant 1h. L'anticorps primaire anti-luciférase (IgG de lapin) (Abcam) dilué au 1/100^e a été déposé sur les lames puis après une nuit d'incubation, l'anticorps secondaire (IgG de chèvre) (Abcam), anti-IgG lapin marqué au TRITC (λ_{ex} : 541 nm, λ_{em} : 572 nm) et dilué au 1/400^e a été ajouté. Enfin, les noyaux ont été marqués au DAPI (Abcam).

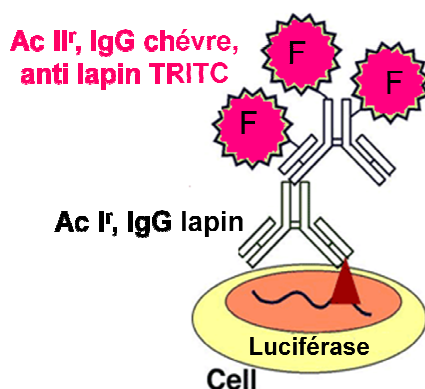


Figure 71 : Principe de l'immunomarquage avec l'anticorps anti-luciférase

Les lames ont été visualisées au microscope confocal à fluorescence (ZEISS LSM 510) équipé du logiciel Axiovision (CARL, ZEISS SAS, Le Pecq, France) au Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301 (David Gosset).

2.3.2.11. Caractérisation histochimique de l'hypoxie par marquage au pimonidazole

Une heure avant euthanasie, les souris ont reçu une injection de pimonidazole (Hypoxyprobe™) par voie intrapéritonéale à la dose de 120 mg/kg. La tumeur a été prélevée puis des coupes de 10 µm ont été réalisées au cryotome (LEICA LM1900) afin de permettre un immunomarquage avec un anticorps primaire anti-pimonidazole.

Le principe du pimonidazole est le suivant : en situation d'hypoxie, le pimonidazole produit des adduits (Arteel, et al., 1998) qui sont reconnus par l'anticorps primaire anti-pimonidazole (figure 72).

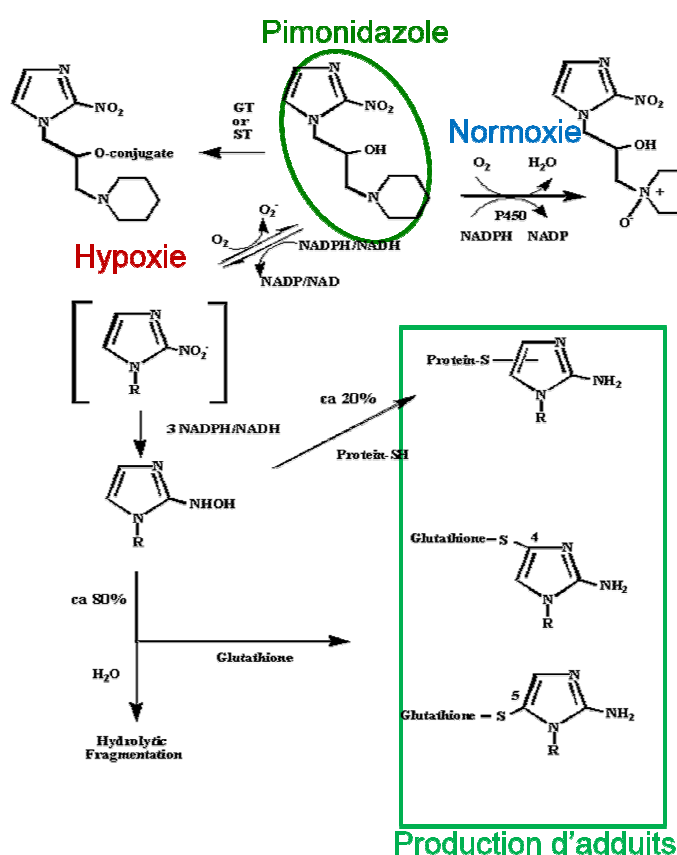


Figure 72 : Transformation du pimonidazole en situation hypoxique ou normoxique
(d'après Arteel, et al., 1998)

Avant de déposer l'anticorps primaire, il a été nécessaire de saturer les sites non spécifiques avec du SVF 5%. L'anticorps primaire anti-pimonidazole (IgG1 de souris à la concentration de 7 µg/ml) (Hypoxyprobe™) a été déposé. Après une nuit d'incubation, l'anticorps secondaire, anti-IgG de souris (IgG de chèvre) marqué avec du FITC (λ_{ex} : 488, λ_{em} : 530) (Abcam) a été ajouté. Enfin, les noyaux ont été marqués au DAPI (Abcam).

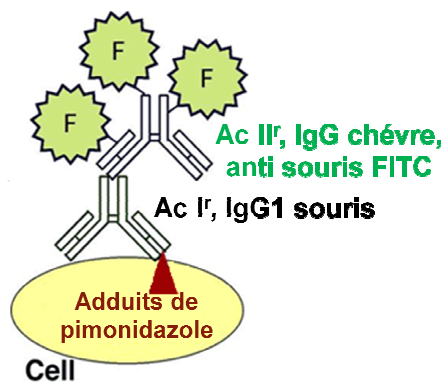


Figure 73 : Principe de l'immunomarquage avec l'anticorps anti-pimonidazole

Les lames ont été visualisées au microscope confocal à fluorescence (ZEISS LSM 510) équipé du logiciel Axiovision (CARL, ZEISS SAS, Le Pecq, France) au CBM.

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Impact de la transduction sur les cellules MIA PaCa2

2.3.3.1.1. Vérification de la transduction des cellules MIA PaCa2

D'une part, l'expression de l'EGFP a été visualisée au microscope et d'autre part l'activité luciférase des cellules MIA PaCa2-luc a été mesurée par spectrophotométrie par V. Trichet (figure 74).

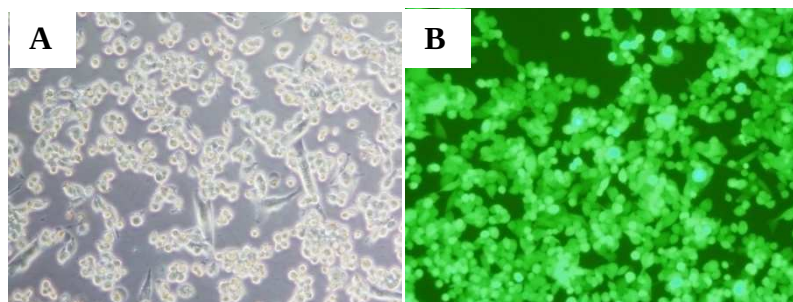


Figure 74 : Cellules MIA PaCa2-luc visualisées au microscope
A/ lumière visible ; B/ épiluminescence

Les cellules visualisées au microscope expriment quasiment toute l'EGFP indiquant ainsi une modification homogène des cellules.

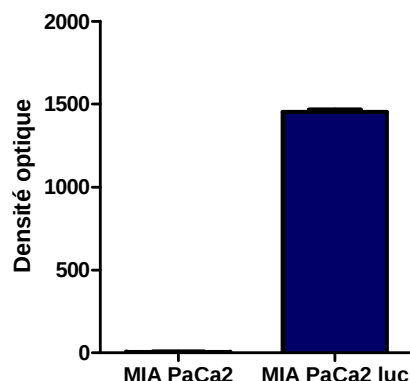


Figure 75 : Mesure de l'activité de la luciférase par spectrophotométrie

Par spectroscopie, la mesure de la densité optique pour 70 000 cellules met en évidence une augmentation de l'activité luciférase (DO de 1458) de 250 fois pour les cellules transduites (MIA PaCa2-luc) par rapport aux cellules parentales (MIA PaCa2) (figure 75).

2.3.3.1.2. Impact de la transduction sur la croissance cellulaire *in vitro*

Afin de s'assurer de l'absence d'impact de la transduction sur les cellules MIA PaCa2, un suivi de la croissance des cellules *in vitro* a été réalisé durant 96h (temps maximal avant confluence) (figure 76).

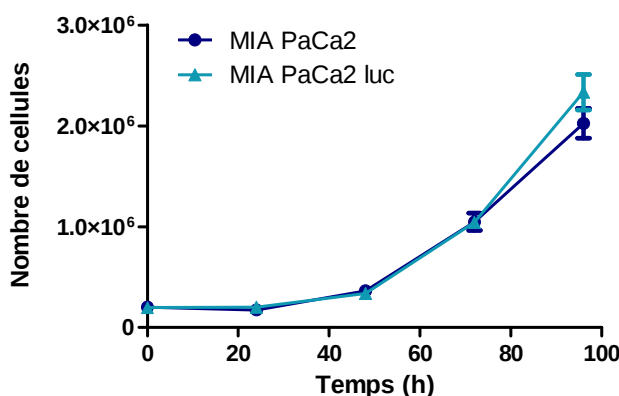


Figure 76 : Comparaison de la croissance des cellules MIA PaCa2 transduites ou non par le gène de la luciférase

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

La croissance des cellules MIA PaCa2 est identique, que les cellules aient été transduites ou non par le gène de la luciférase.

2.3.3.1.3. Impact de la transduction sur la sensibilité vis-à-vis d'une chimiothérapie *in vitro*

De la même façon, il était nécessaire de s'assurer que la transduction des cellules n'avait pas d'impact sur la réponse des cellules à un traitement. La concentration inhibitrice 50 (CI50) de la gemcitabine a ainsi été déterminée pour les deux lignées cellulaires, MIA PaCa2 et MIA PaCa2-luc. Les résultats sont présentés figure 77.

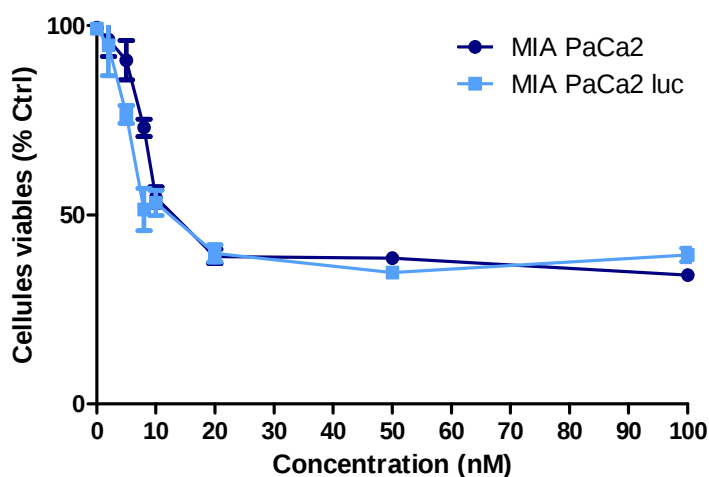


Figure 77 : Viabilité cellulaire en fonction de la concentration de gemcitabine

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

La concentration inhibitrice 50 de la gemcitabine a été déterminée pour les deux lignées selon la méthode de Hill Slope. Elle est de 8 nM pour les cellules non transfectées (MIA Paca2) et de 6 nM pour les cellules transfectées (MIA PaCa2 luc). Cette différence n'est pas significative (Test t de Student).

Ces résultats montrent que la transduction ne modifie pas la réponse des cellules à un traitement par la gemcitabine. Les cellules MIA PaCa2-luc peuvent ainsi être utilisées pour des études *in vivo*.

2.3.3.1.4. Impact de la transduction des cellules MIA PaCa2 sur la croissance tumorale *in vivo*

Pour étudier l'impact de la transduction sur la croissance tumorale *in vivo*, deux groupes de 6 animaux, un groupe MIA PaCa2 et un groupe MIA PaCa2-luc, ont été induits dans les conditions décrites dans la partie matériels et méthodes. Trente six jours après induction des tumeurs, les animaux ont été euthanasiés et les tumeurs primaires prélevées afin d'être mesurées au pied à coulisse et pesées. Le graphique suivant montre la moyenne des volumes tumoraux mesurés dans les deux groupes.

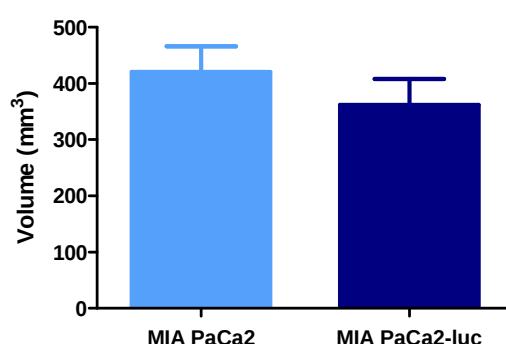


Figure 78 : Volume tumoral des souris à J36

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=7).

Nous n'avons pas observé de différence significative du volume tumoral entre les deux groupes à J36 (Test t de Student). La transduction des cellules MIA PaCa2 par le gène de la luciférase n'a pas d'impact sur la croissance tumorale *in vivo*.

2.3.3.2. Croissance tumorale après induction orthotopique des cellules MIA PaCa2-luc

2.3.3.2.1. Contrôle de la prise de greffe

Compte tenu du stress opératoire, nous avons choisi de ne pas administrer la luciférine trop tôt après injection des cellules. Le premier examen d'imagerie, réalisé 3 jours après induction tumorale montre une positivité des animaux en bioluminescence de 100% (n= 30 animaux).

Cette positivité nous a permis de quantifier l'intensité de bioluminescence de chaque tumeur et de randomiser les souris selon ce critère avant de commencer les traitements.

Afin de valider notre choix de quantifier les résultats en réalisant la somme des 2 faces imagées (latérale et antérieure), nous avons comparé les valeurs de bioluminescence obtenues lors la quantification de la tumeur primaire uniquement sur la face latérale (permettant la meilleure observation du pancréas) aux valeurs obtenues en additionnant les 2 faces (figure 79).

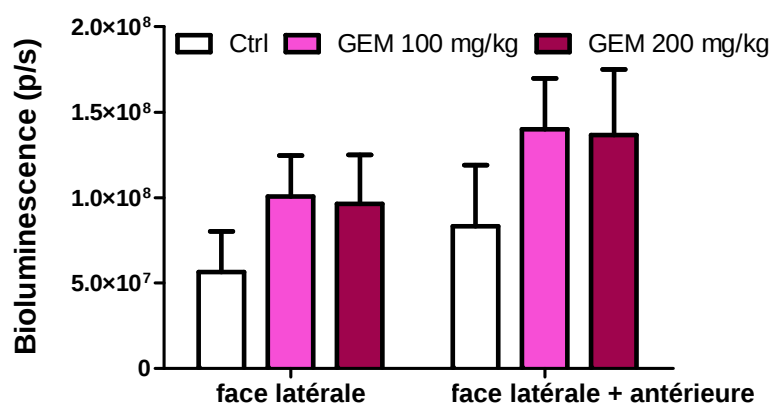


Figure 79 : Bioluminescence à J3, avant traitement à la gemcitabine.

Bioluminescence de face latérale uniquement comparée aux valeurs de bioluminescence de la somme des 2 faces (antérieure + latérale). Les résultats sont exprimés en moyenne ($\pm$ SEM).

Ainsi, les profils obtenus sont similaires que les valeurs soient déterminées à partir de la face latérale seule ou additionnée à la face antérieure. Cette méthode de calcul (somme des 2 faces) n'impacte pas la randomisation des animaux et permettra pour la suite de l'étude de ne pas passer à côté de signaux importants provenant soit de la tumeur primaire soit de métastases à distance ayant évolué face antérieure de l'animal.

Cette méthode de calcul permet d'augmenter la sensibilité en améliorant la détection du signal qui peut, selon l'évolution tumorale et le positionnement du pancréas, être atténuée par les tissus ou la rate sur l'une ou l'autre des faces imagées.

2.3.3.2.2. Evaluation de la croissance tumorale au cours du temps

Le suivi de la croissance tumorale a été réalisé par bioluminescence, dès le troisième jour post induction puis une fois par semaine jusqu'à la fin de l'étude. Nous pouvons observer, sur la figure 80, que l'évolution de la tumeur primaire se fait sur un seul et unique site et qu'aucune métastase n'est détectée 36 jours post induction.

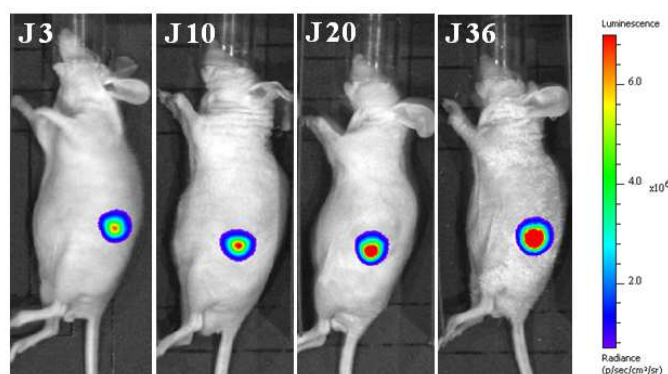


Figure 80 : Suivi de l'évolution de la tumeur primaire par bioluminescence

Afin de détecter une éventuelle dissémination métastatique, un suivi par bioluminescence a été réalisé jusque 50 jours post induction tumorale. Après cette date, certaines souris présentaient de nombreux foyers localisés principalement dans la cavité abdominale (figure 81). Afin de confirmer la localisation des métastases, une autopsie a été réalisée le dernier jour de l'étude. L'observation macroscopique a été confrontée à la bioluminescence *ex vivo*. Comme le montre la figure 81, les animaux présentaient en général des nodules sur l'intestin, le péritoine, le foie, le diaphragme, la rate ainsi que des métastases au niveau des reins.

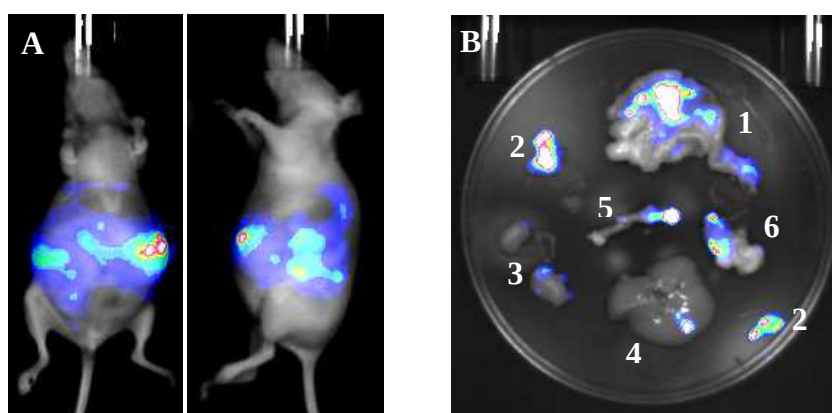


Figure 81 : Localisation des métastases *in vivo* et *ex vivo* à J50

A : Bioluminescence in vivo, face antérieure et latérale gauche. B : Bioluminescence ex vivo (1 : intestins, 2 : péritoine, 3: reins, 4 : foie, 5 : colon/rectum, 6 : diaphragme)

A l'occasion de ce suivi sur des temps plus longs, au-delà de 40 jours après induction des tumeurs, une diminution voire une disparition complète du signal de bioluminescence de la tumeur primaire a été observée pour environ 30% des animaux (figure 82).

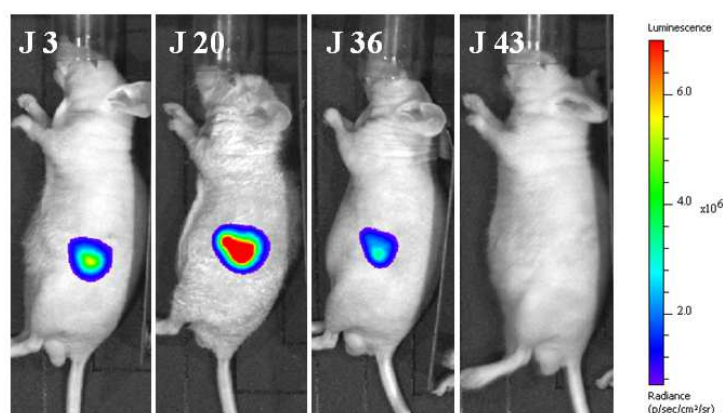


Figure 82 : Perte du signal de bioluminescence chez des animaux du groupe contrôle

Afin de comprendre l'origine de cette perte de signal, plusieurs paramètres ont été explorés.

2.3.3.3. Détermination de l'origine de la perte du signal de bioluminescence

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la perte de signal de bioluminescence observée 40 jours après induction des tumeurs. Les 3 hypothèses que nous avons retenues sont : une perte de l'expression de la luciférase, le développement de tissu stromal en quantité importante ou la présence de régions hypoxiques.

Avant de tester ces hypothèses, nous nous sommes assurés, *via* une autre modalité d'imagerie indépendante du métabolisme énergétique cellulaire, de la persistance d'une activité tumorale au sein de l'animal.

2.3.3.3.1. Expression des intégrines

Afin de s'assurer que la perte de la bioluminescence n'était pas due à une régression spontanée de la tumeur, une autre modalité d'imagerie par fluorescence dans le proche infrarouge, basée sur le ciblage des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ par un mime RGD (Arg-Gly-Asp) a été mise en œuvre (Cf. principe chapitre 1).

Nous avons confronté les résultats de l'imagerie de fluorescence et ceux de l'imagerie de bioluminescence après injection de luciférine. La figure ci-dessous présente les résultats obtenus.

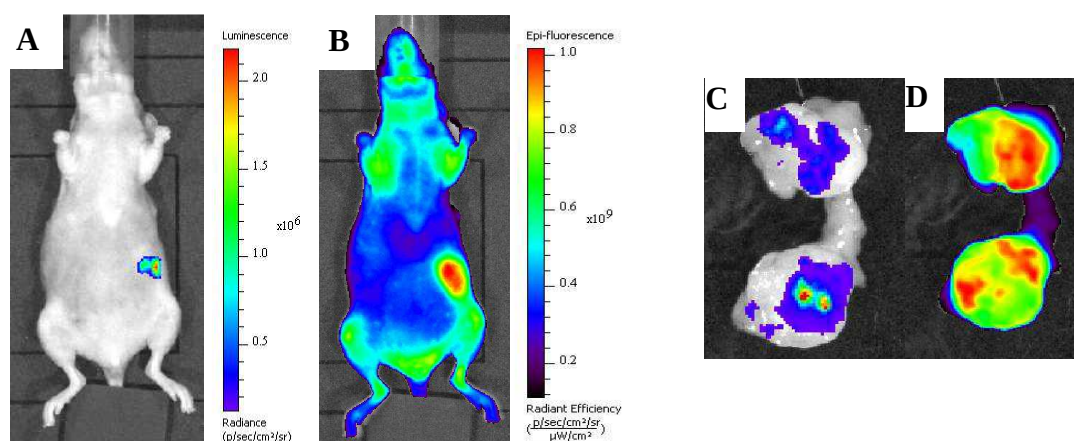


Figure 83 : Imagerie de bioluminescence et de fluorescence d'une souris greffée en orthotopique par des cellules MIA PaCa2-luc (J43)

A et B Imagerie corps entier, sur la face antérieure de la souris anesthésiée (A : bioluminescence, B : fluorescence), C et D, imagerie ex vivo de la tumeur primaire, coupée en deux (C : bioluminescence, D : fluorescence).

En bioluminescence les images que nous avons obtenues ne permettent pas de visualiser la globalité de la tumeur ce qui semble être confirmé par les données ex-vivo pour lesquelles la bioluminescence au sein de la tumeur se distribue de façon hétérogène.

Par imagerie de fluorescence, dont l'avantage est d'être spécifique et indépendante du métabolisme cellulaire, le signal est retrouvé de façon plus homogène dans la totalité de la tumeur primaire, confirmant la présence des intégrines et donc des cellules des néovaisseaux tumoraux MIA PaCa2-luc.

2.3.3.3.2. Présence de stroma tumoral

Le stroma est un tissu conjonctif néoformé, non tumoral, permettant le soutien et la nutrition des cellules tumorales. Il est en remaniement constant, puisqu'il suit la croissance tumorale. Le stroma est principalement constitué de cellules conjonctives normales, de fibres collagènes et élastiques et de vaisseaux sanguins et lymphatiques.

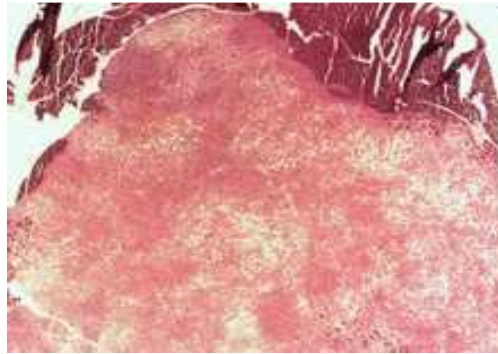


Figure 84 : Coloration HES d'une coupe de tumeur MIA PaCa2-luc

L'absence de coloration jaune indique que le stroma n'est pas suffisamment abondant au sein du prélèvement pour expliquer une inhibition du signal de bioluminescence.

2.3.3.3.3. Expression du gène de la luciférase

Afin de vérifier que les cellules expriment toujours la luciférase, un immunomarquage sur coupe de tumeur avec un anticorps anti-luciférase a été réalisé.

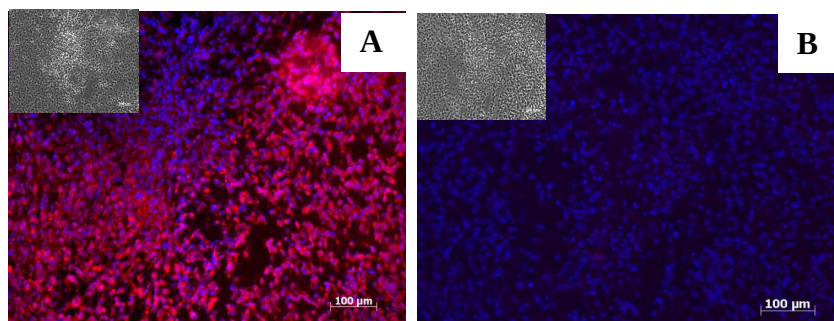


Figure 85 : Immunomarquage avec anticorps anti-luciférase

DAPI : noyaux ; Rouge (TRITC) : luciférase. A : Marquage avec anticorps anti-luciférase et anticorps secondaire ; B : témoin négatif, pas d'anticorps primaire.

Comme montré figure 85A, la majorité des cellules présentent une coloration rouge signe d'un marquage par l'anticorps anti-luciférase. Il n'y a donc pas de perte d'expression de la luciférase au niveau des coupes de tumeurs analysées.

2.3.3.3.4. Caractérisation du statut hypoxique des tumeurs

La dernière hypothèse étudiée permettant d'expliquer la perte de bioluminescence est la présence de zones hypoxiques au sein de la tumeur. Afin de confirmer cette hypothèse, deux stratégies ont été retenues :

- *in vivo* par injection d'ATSM marqué au Cuivre 64
- *in vitro* par immunomarquage au pimonidazole

Imagerie au ^{64}Cu -ATSM

- **Sélection des animaux**

Pour cette partie du travail, les animaux mis en œuvre ont été greffés en sous-cutané (2 millions de cellules injectées au niveau du flanc gauche). En effet, la localisation pancréatique n'est malheureusement pas des plus compatibles avec une imagerie TEP du ^{64}Cu -ATSM (Cf Principe Chapitre 1) dont la distribution hépatique « naturelle » limite les possibilités d'étude des organes placés dans le proche environnement du foie.

Avant de réaliser l'imagerie TEP de l'hypoxie une imagerie de bioluminescence a permis de sélectionner les animaux pertinents pour cet examen.

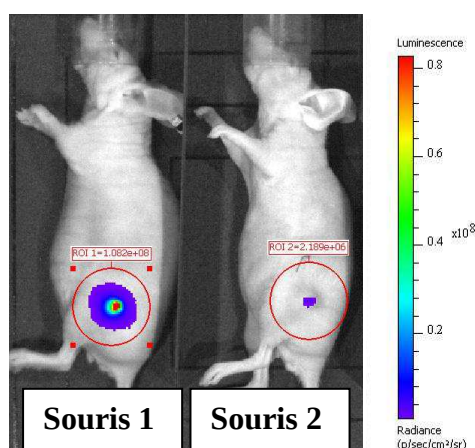


Figure 86 : Imagerie de bioluminescence de souris porteuses de tumeurs sous cutanées MIA PaCa2-luc (J43)

Sur la figure 86, on observe que pour des souris porteuses de tumeurs de volumes similaires (22 cm^3 pour la souris 1 et 26 cm^3 pour la souris 2), l'intensité de bioluminescence est très différente (2 logs d'écart entre souris 1 et 2), ce qui fait de ces 2 animaux de bons candidats à l'imagerie TEP ^{64}Cu -ATSM et devrait nous permettre d'obtenir des taux de fixation du traceur différents dans ces 2 individus.

- **Contrôle qualité du marquage**

Après marquage de l'ATSM au ^{64}Cu , un contrôle qualité par CCM a été réalisé afin de déterminer les fractions présentant la plus forte concentration de ^{64}Cu -ATSM dans l'éluât post purification.

La chromatographie a été visualisée par autoradiographie (figure 87).

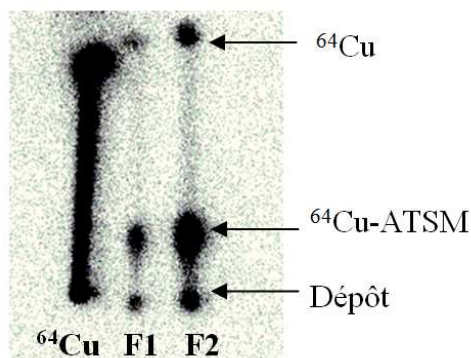


Figure 87 : Autoradiographie de la chromatographie sur couche mince

Elution réalisée avec de l'EDTA 10 mmol.L^{-1} . ^{64}Cu : ^{64}Cu libre, F1 : Fraction marquée 1, F2 : Fraction marquée 2.

La CCM éluée avec 10 mmol.L⁻¹ d'EDTA a permis de séparer correctement la fraction libre de la fraction liée. Les fractions F1 et F2 présentant la plus forte radioactivité contiennent bien du ⁶⁴Cu-ATSM en forte proportion (64% dans F1 et 80% dans F2). La fraction F2 a été retenue pour l'injection *in vivo* puis diluée dans du NaCl 0.9% afin d'obtenir une activité volumique de 37 MBq/ml.

- **Imagerie TEP**

Après injection d'environ 5,5 MBq par voie intraveineuse, une imagerie par tomographie d'émission de positons (TEP) a été réalisée à différentes occasions (10 min, 1h, 3h et 5h) afin de déterminer le temps optimal permettant d'avoir le meilleur rapport signal sur bruit.

A l'analyse des résultats, c'est le temps 3h qui permet une visualisation correcte de la zone hypoxique (figure 88).

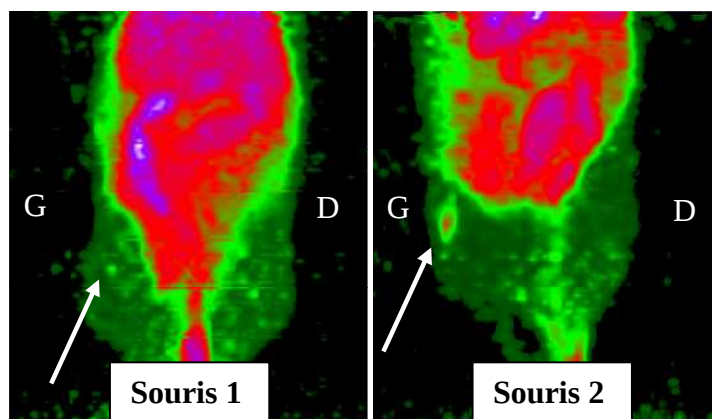


Figure 88 : Imagerie TEP, 3h après injection de ⁶⁴Cu-ATSM

Un seul champ de vue représentant la partie inférieure de la souris (du foie en haut, à la queue en bas).

A partir des images obtenues 3h après injection intraveineuse de ⁶⁴Cu-ATSM, aucun foyer significatif n'est visible pour la souris 1 alors qu'on retrouve une zone de fixation au niveau du flanc gauche pour la souris 2. Si l'on confronte ces résultats à ceux obtenus lors de l'imagerie de bioluminescence décrite figure 86, l'examen TEP concorde avec la présence de zones hypoxiques dans la tumeur de la souris 2 dont l'intensité du signal de bioluminescence était très faible.

Afin de comparer l'activité mesurée au niveau de la tumeur à l'activité du tissu sain, deux zones d'intérêt de même volume ont été tracées : l'une au niveau de la tumeur située sur la cuisse gauche et l'autre au niveau controlatéral (cuisse droite). Cela nous a permis de déterminer dans ces régions l'activité en Bq/cm³ et en pourcentage de la dose injectée.

Les valeurs des activités mesurées et corrigées de la décroissance du ⁶⁴Cu sont donc les suivantes :

	Souris 1		Souris 2	
	Activité injectée : 4,76 MBq		Activité injectée : 5,45 MBq	
	Tumeur (G)	Muscle (D)	Tumeur (G)	Muscle (D)
Activité mesurée en Bq/cm ³	15640 Bq/cm ³	9707 Bq/cm ³	50298 Bq/cm ³	13164 Bq/cm ³
Pourcentage de la dose injectée (DI)	0,33 % DI	0,20 % DI	0,92% DI	0,24% DI

Tableau 6 : Activités mesurées au niveau des régions tumorales et témoins, corrigées de la décroissance du ⁶⁴Cu

Pour la souris 1, présentant le signal de bioluminescence le plus important, 0,33 % de la dose de ⁶⁴Cu-ATSM est retrouvé au niveau de la tumeur, soit 1,6 fois plus de signal que dans le muscle. Pour la souris 2, 0,92% de la dose injectée est retrouvé au niveau de la tumeur soit 4 fois plus que dans le muscle. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans la bibliographie où l'on retrouve dans le cas de tumeurs hypoxiques des ratios tumeur/muscle variant de 2,3 à 5,3 selon le type tumoral (Yuan, et al., 2006) et confirment que la faible intensité du signal de bioluminescence de la souris 2 est bien liée à la présence de plages d'hypoxie dans la tumeur.

Immunomarquage avec anticorps anti-pimonidazole

Afin de confirmer les résultats obtenus par TEP au ⁶⁴Cu-ATSM, un immunomarquage avec un anticorps anti-pimonidazole a été réalisé (figure 89).

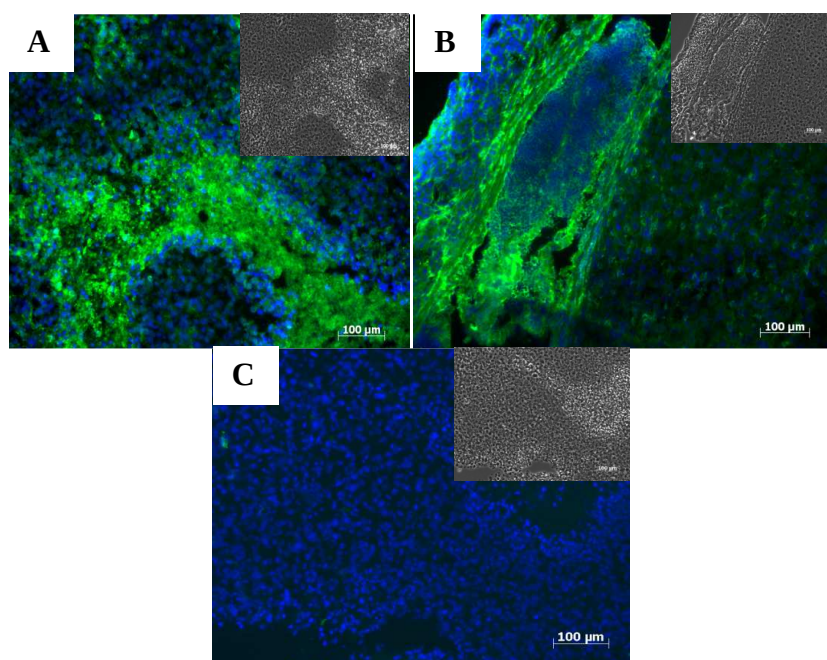


Figure 89 : Visualisation de zones hypoxiques sur coupe de tumeur

FITC (vert), adduits de pimonidazole caractéristiques des zones hypoxiques. Dapi (bleu), noyaux.

A et B : Marquage avec anticorps anti-pimonidazole et anticorps secondaire (A : Centre de la tumeur. B : Périphérie de la tumeur) ; C : témoin négatif, pas d'anticorps primaire.

Le marquage vert (FITC) est retrouvée aussi bien au centre de la tumeur qu'en périphérie, confirmant la présence de multiples zones hypoxiques au sein de la tumeur.

Ces résultats obtenus par immunomarquage au pimonidazole permettent de confirmer les résultats obtenus *in vivo* après injection de ^{64}Cu -ATSM et révèlent la présence de zones hypoxiques au sein des tumeurs MIA PaCa2-luc. Les résultats *in vivo*, obtenus sur un effectif très restreint nécessiteraient d'être confirmés avec des lots d'animaux plus importants. Mais les contraintes de la TEP (limite de l'activité de ^{64}Cu pouvant être utilisée au sein du CIPA (260 MBq) et chimie du marquage), ne permettent toutefois pas de réaliser des études sur des effectifs très élevés.

2.3.3.4. Etude d'efficacité avec un traitement de référence, la Gemcitabine

2.3.3.4.1. Détermination de la concentration inhibitrice 50 (CI50) de la gemcitabine *in vitro* par bioluminescence

Une courbe de survie représentant le pourcentage de cellules viables en fonction de la concentration en gemcitabine a été tracée en mesurant l'intensité de bioluminescence présente dans chaque puits (celle-ci étant proportionnelle au nombre de cellules présentes) (figure 90).

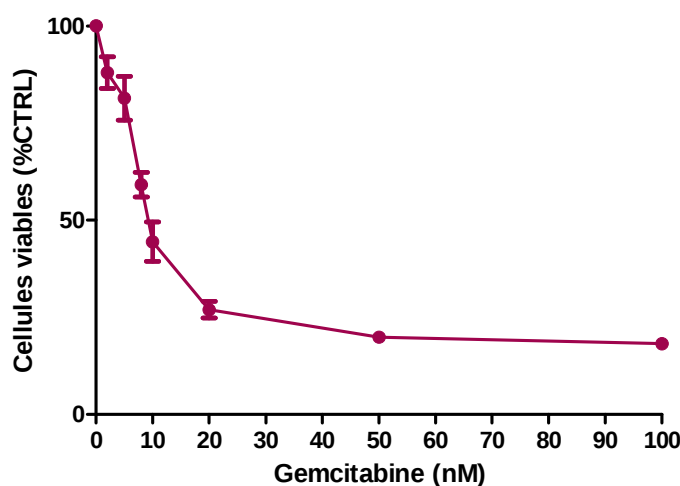


Figure 90 : Courbe de survie après traitement à la gemcitabine

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

La concentration inhibitrice 50 (CI50) de la gemcitabine déterminée à partir de la méthode de Hill Slope est de 7 nM.

2.3.3.4.2. Effet de la gemcitabine sur la croissance tumorale

Compte tenu des problèmes d'hypoxie rencontrés au-delà de 40 jours, rendant l'imagerie de bioluminescence non pertinente pour la quantification de la tumeur primaire, nous avons choisi de limiter notre étude à 36 jours post induction.

Les animaux étaient greffés en orthotopique et répartis en 3 lots recevant du NaCl 0.9%, la gemcitabine à 100mg/kg ou à 200mg/kg, cette répartition ayant été faite sur la base de l'intensité de bioluminescence mesurée à J4 (figure 91 à droite).

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants (figure 91).

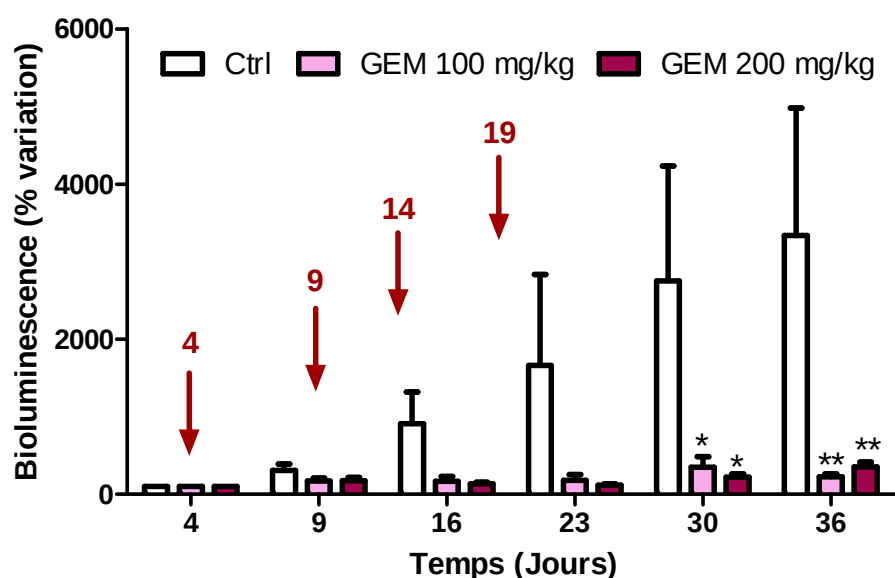


Figure 91 : Evolution tumorale après traitement à la gemcitabine

Les flèches indiquent les traitements à la gemcitabine (GEM).

Les résultats présentés en pourcentage de variation par rapport à l'intensité de bioluminescence mesurée avant traitement (J4), correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=10).

** : $p < 0.5$; ** : $p < 0.01$ (ANOVA suivie d'un post test Bonferroni)*

Une inhibition de la croissance tumorale pour les souris traitées à la gemcitabine, aussi bien à la dose de 100 mg/kg qu'à la dose de 200 mg/kg est observée dès le 16^e jour, soit 11 jours après avoir reçu le premier traitement avec une diminution de l'intensité de bioluminescence de 79% pour le groupe GEM 100 mg/kg et de 82% pour le groupe GEM 200 mg/kg par rapport au groupe contrôle. Cette inhibition se poursuit jusqu'à J23, soit 4 jours après le dernier traitement (à J19). Ensuite, les tumeurs commencent de nouveau à croître mais de façon beaucoup plus lente que pour le groupe contrôle.

Le dernier jour d'étude (J36), une diminution de la bioluminescence d'environ 90 % pour les deux groupes traités est observée par rapport au groupe contrôle. Le volume ainsi que la masse tumorale ont été mesurés. Les moyennes de ces mesures sont présentées dans les graphiques ci-dessous.

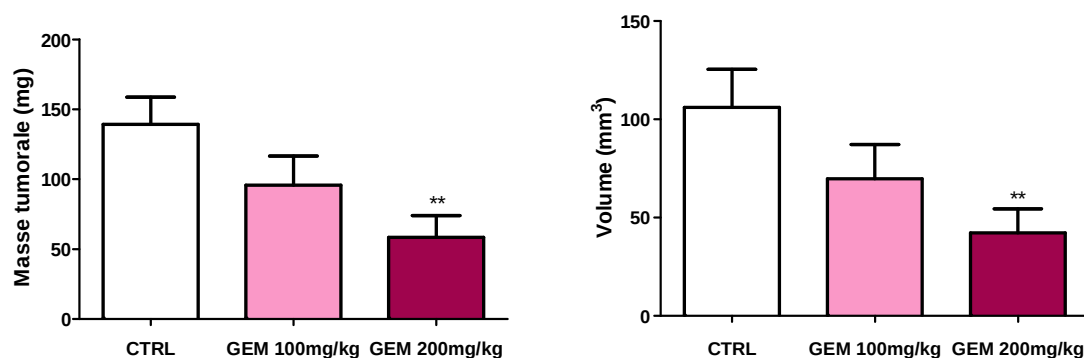


Figure 92 : Volume et masse de la tumeur primaire le jour de l'autopsie (J36)

GEM : Gemcitabine

*Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=10). **: $p < 0.01$ (Test de Mann Whitney)*

On observe une bonne concordance entre volume et masse tumorale, sans aucune différence statistiquement significative entre le groupe contrôle et le groupe GEM 100 mg/kg. Entre les groupes CTRL et GEM 200 mg/kg, la différence est statistiquement significative ($p=0,003$) avec une diminution du volume de 60 % et une diminution de la masse tumorale de 58 % par rapport au groupe contrôle.

2.3.4. Discussion

La transduction des cellules MIA PaCa2 par le gène de la luciférase n'ayant pas eu d'impact sur la croissance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* ni sur la sensibilité des cellules à la gemcitabine, les cellules MIA PaCa2-luc ont ainsi pu être utilisées pour le suivi de l'évolution tumorale du modèle orthotopique d'adénocarcinome pancréatique par imagerie de bioluminescence.

La caractérisation du modèle a conduit à déterminer ses avantages et ses limites. Celui-ci présente une évolution tumorale assez lente qui peut présenter certains avantages : par exemple, les souris du lot contrôle n'ont pas besoin d'être euthanasiées en cours d'étude à cause de tumeurs atteignant le point limite.

Des études ont comparé les phénotypes de 11 lignées de cellules d'adénocarcinomes pancréatiques différentes (AsPC-1, BxPC-3, Capan-1 et 2, MIA PaCa2, PANC-1) (Deer, et al., 2010) sur des critères ayant une influence sur la croissance tumorale et le potentiel métastatique. Il a été montré que l'adhésion des cellules MIA PaCa2 à la matrice

extracellulaire était plus faible que pour les autres lignées et que le potentiel de migration et d'invasion cellulaire des cellules MIA PaCa2, était intermédiaire, ces cellules étant moins invasives que les cellules BxPC-3 mais plus que les PANC-1 (Takada, et al., 2002). Enfin, la tumorigénicité des tumeurs MIA PaCa2 semblent plus importante que pour les autres lignées. La formation des tumeurs MIA PaCa2 est plus rapide que pour les tumeurs PANC-1 (Freeman, et al., 1995), le volume tumoral plus grand (Katayama, et al., 2003) et le taux de prise de greffe de 100 % (Eibl and Reber, 2005). Compte tenu de ces observations, les cellules MIA PaCa2 sont un modèle de choix pour l'évaluation de l'évolution de la tumeur primaire mais pour l'étude de la dissémination métastatique, d'autres lignées telles que Capan-1 semblent plus pertinentes.

En tenant compte des limites du modèle une étude de validation *via* un traitement de référence par la gemcitabine, a été réalisée dans le but d'évaluer l'effet sur l'évolution de la tumeur primaire.

Après détermination de la concentration inhibitrice 50 (CI50) de la gemcitabine *in vitro* (7 nM) et confirmation de la concordance avec les données bibliographiques qui rapportent une IC50 de la gemcitabine sur cellules MIA PaCa2, d'environ 10 nM (Bornmann, et al., 2008, Giovannetti, et al., 2004, Zagon, et al., 2005), la gemcitabine a été administrée à l'animal.

Les effets obtenus *in vivo* sur l'inhibition de la croissance tumorale sont plus significatifs pour la dose de 200 mg/kg et corrélient avec ceux obtenus dans la bibliographie qui montrent lors d'un traitement à la dose de 150 mg/kg (deux fois par semaine) une amélioration de la survie accompagnée d'une inhibition de la prolifération tumorale (Katz, et al., 2003). Compte tenu de la bonne tolérance de la gemcitabine à 200 mg/kg (pas de perte de poids, aucune desquamation ni prostration), celle-ci pourra être utilisée comme molécule de référence pour l'évaluation par bioluminescence de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ainsi, malgré la différence anatomique importante du pancréas de souris par rapport à celui de l'homme, le modèle de carcinome pancréatique développé au cours de cette thèse présente des caractéristiques physiopathologiques similaires à celles observées lors du cancer du pancréas. D'une part les sites de colonisation des métastases (intestins, péritoine, reins, foie, colon/rectum, diaphragme) sont semblables à ceux observés chez l'homme lors d'un adénocarcinome pancréatique (Saif, et al., 2011). D'autre part, le caractère hypoxique, cause de mauvais pronostic (Koong, et al., 2000) et à l'origine de la résistance à de nombreux

traitements (Blouw, et al., 2003) est bien présent dans les tumeurs MIA PaCa2 murines. Toutefois, ces caractéristiques physiopathologiques ne sont pas retrouvées aux temps précoces mais à des stades plus tardifs. Dans ce cas, l'imagerie de bioluminescence n'étant plus pertinente pour la quantification des effets sur la croissance de la tumeur primaire, d'autres modalités d'imagerie, comme l'imagerie de l'expression des intégrines en fluorescence 3D ou en TEP peuvent être mis en œuvre. Dans tous les cas, la mesure du volume tumoral en fin d'étude permet de confirmer les résultats.

Ce modèle est opérationnel pour l'évaluation de nouvelles formulations telles que les nanoparticules et de stratégies innovantes telles que les plasmas froids fibrés que nous développerons dans le chapitre suivant. Toutefois, selon le but recherché, il est nécessaire d'adapter le schéma expérimental. Dans le cas d'études d'efficacité nécessitant une quantification précise et répétée de l'évolution tumorale par bioluminescence et plus particulièrement de la croissance de la tumeur primaire, nous préconisons de mener les études dans le délai de 40 jours maximum. Si les études doivent être poursuivies sur des temps plus long afin de déterminer un effet sur la dissémination métastatique ou sur la résistance aux traitements due au caractère hypoxique, dans ce cas seules les métastases peuvent être quantifiées par bioluminescence et d'autres modalités d'imagerie doivent être envisagées afin de quantifier la tumeur primaire.

Chapitre 3

Développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique, le plasma gun

3. Développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique : le plasma gun

Les études présentées dans ce chapitre ont été réalisées dans le cadre du projet « PLASMED » financé par la Région Centre, en collaboration avec le GREMI (Groupe de Recherches sur l'Energétique des Milieux Ionisés) UMR7344, CNRS/Université d'Orléans.

Le but de ce travail a été 1/ d'évaluer les effets d'une nouvelle thérapie par plasma froid fibré appelé aussi « plasma gun », sur la croissance des cellules tumorales d'adénocarcinome pancréatique MIA PaCa2-luc *in vitro* et *in vivo* et 2/ d'optimiser le protocole de traitement afin d'améliorer l'effet antitumoral.

Le modèle d'adénocarcinome pancréatique a été choisi pour ces études car il existe aujourd'hui peu de traitements efficaces pour ce type de cancer chez l'homme. Grâce à cette nouvelle stratégie thérapeutique la possibilité de réaliser des traitements locaux pourrait montrer tout son potentiel pour le traitement des marges de résection de la tumeur primaire ou dans le cas des localisations inopérables comme c'est en particulier le cas au niveau des canaux biliaires et pancréatiques.

3.1. Etude bibliographique

3.1.1. Le plasma

Le plasma, tout comme le solide, le liquide, ou le gaz, constitue un état de la matière. Il n'est observable sur Terre qu'à très haute température, quand l'énergie est telle qu'elle réussit à arracher des électrons aux atomes. Le terme plasma, appelé aussi « quatrième état de la matière », a été utilisé en physique pour la première fois par le physicien américain Irving Langmuir en 1928 par analogie avec le plasma sanguin (Tonks and Langmuir, 1929).

A l'état solide, les atomes constituent un réseau rigide. Lorsqu'une molécule est excitée par la chaleur, les atomes s'éloignent les uns des autres, permettant le changement de forme physique, et ainsi le passage à l'état liquide. Si l'on augmente encore la température, on arrive à l'état gazeux : les atomes se déplacent alors librement, indépendamment les uns des autres. Enfin, quand on arrive à de très hautes températures, les atomes gazeux s'ionisent

pour se transformer en ions libres. Les ions et les électrons se déplacent indépendamment formant un mélange globalement neutre, le plasma (figure 93).

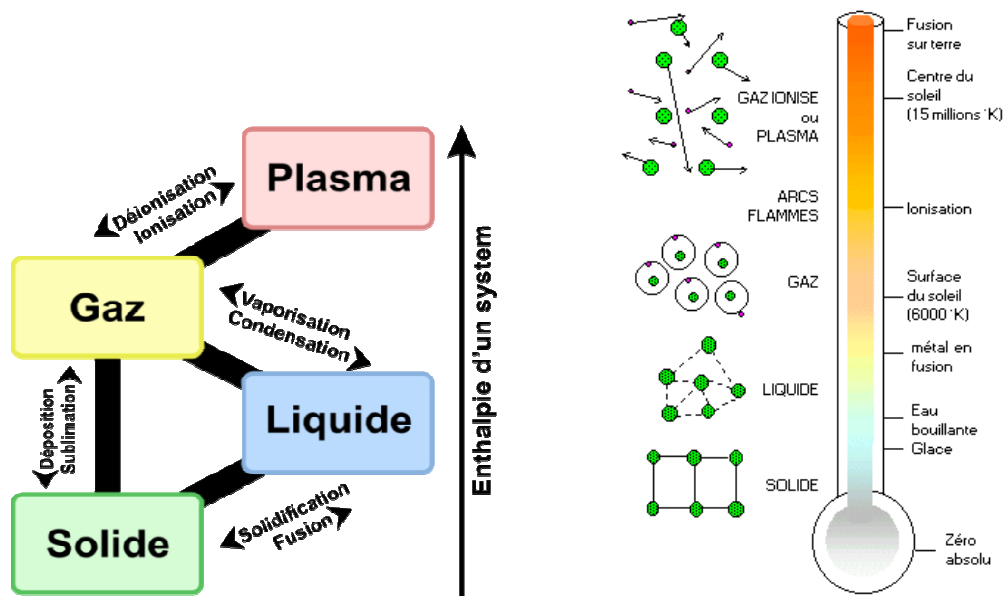


Figure 93 : le plasma, 4^e état de la matière

(Source : CEA, 2001)

3.1.1.1. Les différentes formes de plasma

Cet état de la matière n'est pas anecdotique puisque 99% de la matière connue de l'Univers se trouve sous forme de plasma. Par exemple, le soleil est composé à 100% de plasma, tout comme les étoiles, les nébuleuses gazeuses... Sur terre, des phénomènes comme les éclairs ou les aurores boréales sont des émissions lumineuses de plasma, mais dans ces deux cas, ce n'est pas la chaleur qui crée le plasma mais l'électricité ou le bombardement par des particules solaires.

Deux catégories de plasmas sont définies, les plasmas naturels et les plasmas créés par l'homme. Les plasmas sont produits dans une gamme de pression très importante et sont alors caractérisés en fonction de la température et de la densité des électrons.

Les plasmas industriels, créés par l'homme, sont générés en faisant passer un courant électrique à travers un gaz. Ces plasmas se développent de plus en plus et leurs champs d'applications s'étendent à des domaines relativement larges.

Ainsi dans la vie courante les tubes à décharges (néons), les écrans de télévision qui renferment des petites cellules de gaz ionisés émettant chacune dans les 3 couleurs de base (rouge, vert et bleu) contiennent des plasmas.

Dans le domaine industriel, les plasmas sont utilisés pour graver ou décaper des surfaces et trouvent des applications dans le traitement des déchets, la stérilisation des surfaces, l'amélioration des processus de combustion (notamment pour l'aérospatiale et l'automobile) et très largement en micro-électronique où le plasma joue aujourd'hui un rôle crucial puisqu'il intervient dans de nombreuses étapes des procédés de fabrication des semi-conducteurs.

Dans le domaine biomédical, l'utilisation des plasmas est de plus en plus décrite, ces applications feront l'objet de la partie 3.1.2.

On classe en général les plasmas en deux catégories : les plasmas chauds (plasmas thermiques) et les plasmas froids (plasmas non thermiques).

- **Les plasmas chauds** : les températures de ces plasmas sont supérieures à 3000°C. Ce sont des gaz fortement ionisés, dans lesquels les électrons, les atomes et les ions sont à la même température. Dans ces plasmas les électrons, mais aussi les ions sont assez énergétiques pour influencer le comportement du plasma (utilisations dans la dépollution, traitement des déchets, décharges d'arc pour la soudure, combustion...).
- **Les plasmas froids** : Les plasmas froids utilisés dans le domaine biomédical et appliqués chez l'homme sont à des températures proches de la température corporelle (entre 20°C et 50°C). Seuls les électrons acquièrent assez d'énergie pour effectuer des réactions (applications à la dépollution, traitement de surfaces, domaine biomédical...).

Par la suite, nous aborderons uniquement la mise en œuvre des plasmas froids dans le domaine biomédical.

3.1.1.2. Le plasma froid

Les plasmas sont des gaz constitués de molécules et d'atomes neutres (majoritaires), d'ions (négatifs et positifs), d'électrons, d'espèces radicalaires (chimiquement très actives), d'espèces excitées, de photons et de champs électriques transitoires.

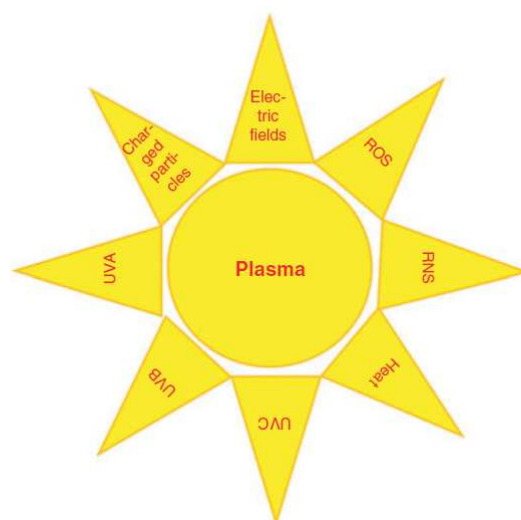


Figure 94 : Composition du plasma

ROS, espèces réactives de l'oxygène (O_2 , OH , H_2O_2 , O_3) ; RNS espèces réactives de l'azote (NO , NO_2) (Heinlin, et al., 2010).

Les électrons sont des particules très légères qui peuvent être accélérées par les champs électriques et magnétiques. Ces électrons ont une masse 2000 fois plus faible que les ions, ils ont donc moins d'inertie et sont plus réactifs et plus rapides que les particules plus lourdes (figure 95).

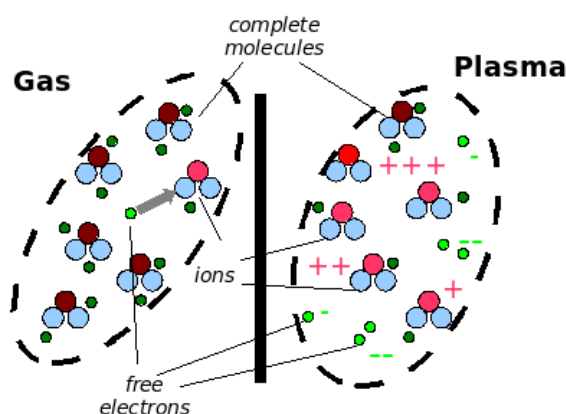


Figure 95 : Comparaison entre gaz et plasma

(Lagouge M, 2006)

Dans le plasma, les ions et les particules neutres possèdent une grande énergie interne et se caractérisent par une haute instabilité. Le retour à un état plus stable de moindre énergie peut se faire soit en émettant un photon, soit en transmettant une partie de l'énergie de la collision à une autre particule ou surface. Les photons émis lorsque les composés activés retournent à un niveau de moindre énergie, peuvent eux-mêmes induire des réactions chimiques (photons UV) et sont responsables de la luminosité du plasma.

Les plasmas générés par l'homme sont le plus souvent issus d'un gaz ou d'un mélange de gaz soumis à un champ électrique qui peut être généré soit en courant continu, soit en courant alternatif. La zone où les gaz sont soumis au champ électrique est appelée zone de « décharge-électrique », le flux gazeux issu de ce mélange se trouvant dans la zone « de post-décharge ».

D'autre part, les plasmas froids peuvent être utilisés soit à la pression atmosphérique soit à basse pression.

- **Plasma basse pression** : ils sont générés dans le vide et sont principalement utilisés dans les domaines de la stérilisation et de la décontamination.
- **Plasma à pression atmosphérique** : ils sont plus simples d'utilisation (inutile de faire le vide) et sont actuellement en plein développement.

On peut les classer eux-mêmes en 3 catégories :

- **Plasmas directs** : on parle de plasma direct quand le tissu traité représente l'une des électrodes du plasma. De nombreux atomes actifs non chargés ainsi que des molécules, des rayons UV, des électrons vont agir sur et à travers les tissus (Fridman, et al., 2008). Pour ce type de plasma, l'échantillon et le plasma doivent être maintenus à proximité (distance entre 1 et 3 mm). La technologie la plus utilisée est la source de plasma par décharge à barrière diélectrique (DBD) (Fridman, et al., 2007).
- **Plasmas indirects** : les plasmas indirects sont produits entre deux électrodes puis transportés au niveau de la zone à traiter à travers un flux de gaz. Le corps n'intervient pas comme électrode (Shimizu, et al., 2008, Sladek and Stoffels, 2005).
- **Plasmas hybrides** : les plasmas hybrides sont une combinaison des plasmas directs et des plasmas indirects auxquels on ajoute une électrode reliée à la terre, à travers laquelle le courant passe.

3.1.1.3. Plasma fibré : plasma gun

Au sein du GREMI, un modèle innovant de plasma froid fibré, appelé « plasma gun » est développé depuis quelques années. Sa température est proche de la température corporelle ce qui est essentiel pour traiter des tissus vivants tels que les tumeurs par exemple.

Il s'agit d'un plasma froid fibré direct, créé à pression atmosphérique et hors équilibre thermodynamique (figure 96).

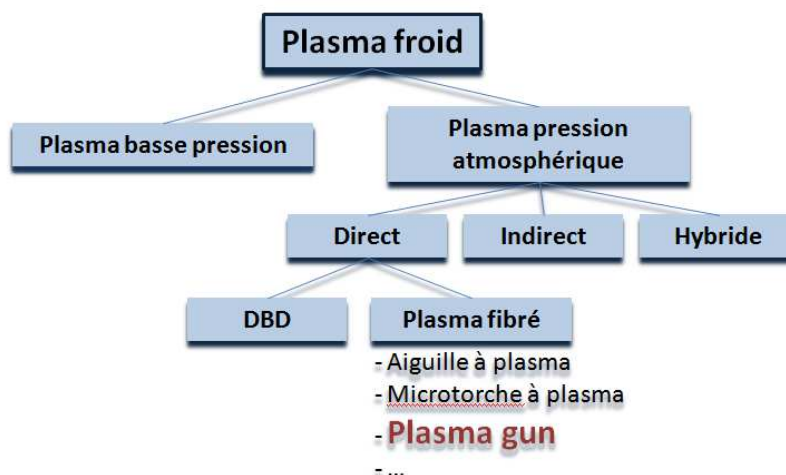


Figure 96 : Place du plasma gun parmi les différents plasmas froids

De par son fonctionnement à la pression atmosphérique, le plasma gun offre de nombreux avantages et permet une application simple et directe sur l'échantillon.

Ce plasma étant fibré, c'est-à-dire créé dans un capillaire, il permet de réaliser des traitements ciblés et adaptés à la surface à traiter. Par exemple, pour le traitement de tumeurs pulmonaires, un capillaire peut être utilisé (1 mm de diamètre) alors que pour le traitement de tumeurs sous cutanées, des capillaires plus gros adaptés au volume tumoral à traiter sont disponibles (3-5 mm).

D'autre part, ce plasma est généré à partir de décharges d'impulsions très courtes, de l'ordre de la microseconde, lui permettant de rester hors équilibre thermodynamique. Cet état fait que les différentes espèces présentes (électrons, ions, atomes ou molécules neutres) ayant des énergies très différentes vont pouvoir se conjuguer au milieu ionisé et entraîner la formation continue d'espèces fortement réactives qui seront retrouvées en sortie du tube et au niveau de la zone traitée.

3.1.2. Applications biomédicales des plasmas froids

Actuellement, la recherche en biologie se concentre principalement sur les effets des plasmas froids afin d'obtenir une action sans dommage grâce à la mise en œuvre de

températures peu importantes, et à traiter de façon homogène des surfaces avec une pénétration possible dans des cavités et des fissures à l'échelle micrométrique.

Une des premières applications biomédicales des plasmas froids à basse pression a été la désinfection de surfaces. En effet, ces plasmas ont démontré une efficacité dans la désinfection et la stérilisation de tissus vivants par inactivation en quelques secondes de bactéries, de virus, de champignons et de spores et divers agents pathogènes. Cette technique est aujourd'hui utilisée en routine dans les hôpitaux pour la désinfection des outils chirurgicaux (Mrad, et al., 2011).

L'utilisation des plasmas froids dans le domaine biomédical est en constante évolution et touche de plus en plus de spécialités. Les principaux domaines d'intérêt sont la stérilisation de surfaces vivantes ou non ainsi que la dermatologie avec des effets sur la cicatrisation et la coagulation (Kalghatgi, et al., 2007). De nouveaux champs d'applications apparaissent tels que leur utilisation thérapeutique potentielle en cancérologie, domaine auquel nous allons nous intéresser plus particulièrement (Fridman, et al., 2008).

3.1.2.1. Utilisation des plasmas froids pour la stérilisation

Les premiers travaux relatant l'utilisation des plasmas en tant qu'agents de stérilisation ont été publiés par Menaschi en 1968 (Ashman 1972 ; Menaschi, 1968). Il utilisait des champs électriques pulsés (1-100 MHz) pour activer un mélange gazeux à base d'argon à pression atmosphérique.

Pour la stérilisation par plasma, deux procédés sont possibles : soit l'utilisation du plasma lui-même, au niveau de la zone de « décharge », soit le flux de gaz issu du plasma, au niveau de la zone de post-décharge (méthode la plus utilisée). Ce mode de stérilisation est principalement réalisé à basse pression.

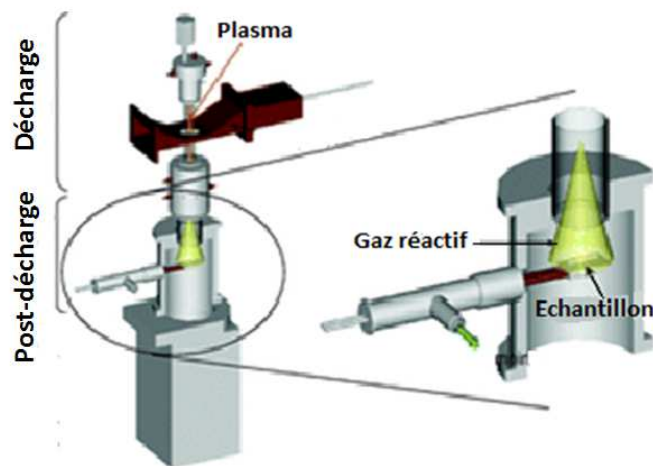


Figure 97 : Zone de décharges et de post-décharges au niveau d'un système de stérilisation par plasma

(Ruelle, et al., 2007)

La zone de post-décharge, contrairement à la zone de décharge, ne contient pas de particules chargées mais des atomes, des molécules et des radicaux. Sachant que lors de la stérilisation par plasma seules les espèces neutres sont actives pour décontaminer (Pointu, et al., 2005), il n'est donc pas nécessaire de travailler dans la zone de décharge. En outre, la zone post-décharge a une température proche de la température ambiante ($< 50^{\circ}\text{C}$), et l'absence de particules chargées limite les altérations des surfaces à traiter.

Il est ainsi possible de stériliser des matériaux thermosensibles.

Différents modes d'action et espèces actives ont été décrits pour expliquer l'effet stérilisant de ces plasmas :

- **Le gaz ou le mélange de gaz** : des études ont ainsi démontré que certains gaz comme le CO_2 étaient plus actifs que d'autres tels que l'argon, pour inactiver les bactéries (Boucher, 1985). La plupart des espèces créées (O_2 , N_2 , H_2 , halogénés, N_2O , H_2O , H_2O_2 , CO_2 , SO_2 , aldéhydes) sont efficaces pour la stérilisation par application de plasma (Ratner, et al., 1990).
- **Les espèces neutres** : retrouvées dans la zone de post-décharge, elles varient selon les gaz utilisés. Ces espèces, du fait de leur grande réactivité, peuvent se combiner aux atomes et arracher des électrons. Ce mécanisme permettrait d'interagir avec les acides nucléiques et les membranes cellulaires conduisant à la lyse bactérienne.

De plus il a été démontré que l'oxygène atomique jouait un rôle comme espèce active stérilisante (Fridman, et al., 2007).

- **Le rayonnement ultraviolet** complète l'action des espèces neutres et améliore l'effet bactéricide en détériorant les parois bactériennes. Deux mécanismes principaux sont responsables des dommages cellulaires induits par les UV au niveau moléculaire : les effets directs basés sur l'énergie d'absorption des UV par les macromolécules cellulaires, et indirects tels que les altérations de l'ADN, des protéines et des lipides causés par le stress oxydant induit par les UV (Heinlin, et al., 2010).

Molécules neutres et UV ont donc une action synergique à l'origine de l'efficacité de la stérilisation par les plasmas froids.

L'utilisation de stérilisateur à plasma à basse pression pour les matériaux est opérationnelle puisque deux procédés sont déjà commercialisés en France, Plazlyte® (Laboratoire 3M) et Sterrad® (Laboratoire Johnson et Johnson Médical).

La stérilisation par plasma à pression atmosphérique de surfaces biologiques telles que la peau est en développement et des appareils de décontamination des mains sont déjà existants (Heinlin, et al., 2011).

3.1.2.2. Effet des plasmas sur la coagulation

Pendant plusieurs années, les plasmas chauds à haute température ont été utilisés en chirurgie, notamment pour la cautérisation. Dans ces conditions, l'utilisation de plasma d'argon a été bien documentée (Bergler, et al., 2001, Grund, et al., 1994, Sumiyama, et al., 2006) et il est désormais très utilisé pour assurer l'hémostase sur des zones de résections très hémorragiques en particulier au niveau du foie, de la rate et du rein.

Dans les nouvelles applications, la coagulation du sang peut être obtenue à partir de plasmas froids, afin d'éviter les effets dus à la température tels que l'adhésion et la dilatation des tissus traité, les risques de contaminations bactériennes associés (Clément, 2009 ;

Kalghatgi, et al., 2007) et le risque de brûlure des tissus adjacents pour les interventions sous cœlioscopie qui deviennent de plus en plus fréquentes.

Ainsi, une activation des mécanismes de coagulation suite à un traitement par plasma froid a été décrite par l'équipe d'A. Fridman sur un modèle animal de souris SKH1, chez qui la veine saphène avait été sectionnée. Après 15s de traitement au plasma, la coagulation était effective (Fridman, et al., 2008).

Afin d'expliquer l'effet des plasmas sur la coagulation, plusieurs mécanismes ont été proposés. Ainsi, il a été montré qu'un traitement au plasma pouvait modifier considérablement les concentrations en protéines et en facteurs de coagulation, le pH, ainsi que la force ionique du plasma sanguin (Fridman, et al., 2008). Ceci pourrait expliquer l'activation et l'agrégation plaquettaire accompagnée d'une formation de fibrine qui ont été observées.

L'amélioration des connaissances des mécanismes à l'origine des effets des plasmas froids sur la coagulation associée à leur faible nocivité ouvre donc des perspectives très intéressantes pour des applications cliniques en routine.

3.1.2.3. Effets des plasmas sur la cicatrisation

Les bactéries sont souvent cause d'aggravation des lésions cutanées suite à des surinfections. L'affection la plus commune est l'ulcère chronique des membres inférieurs avec une prévalence de 1% dans les pays développés (Etufugh and Phillips, 2007). Les plaies infectées représentent un réservoir pour les souches de bactéries multi-résistantes.

Les traitements standards des plaies infectées consistent en une antibiothérapie dont l'efficacité peut être limitée par l'apparition de résistances bactériennes et de réactions allergiques au niveau cutané. Dans ce cas, l'application aisée et sans contact des plasmas au niveau des plaies, à une température très proche de la température corporelle permet de traiter des infections et d'éliminer les bactéries, sans observer les effets secondaires d'une antibiothérapie.

In vitro, des résultats ont montré qu'un traitement par plasma froid pouvait favoriser la cicatrisation en réduisant la charge bactérienne mais aussi en influençant directement le comportement biologique des cellules du derme et de l'épiderme (Kalghatgi, 2009). Compte

tenu de ces résultats encourageants, de nombreux essais ont été réalisés *in vivo* chez l'animal et l'homme. Parmi eux des études de phase I et de phase II ont montré qu'un traitement par plasma d'argon (MicroPlaSter) de 2 à 5 minutes sur des plaies préalablement nettoyées conduisait à une réduction significative du nombre de bactéries, dont des bactéries multi-résistantes, et améliorait la cicatrisation (Heinlin, et al., 2011).

Les avancées faites dans la régénération cellulaire montrent que l'oxyde nitrique (NO) (qui peut être généré par le plasma) joue un rôle très important dans la cicatrisation (Shekhter, et al., 1998). Les mécanismes d'action possibles du NO pour favoriser la cicatrisation sont, entre autres, une vasodilatation ainsi qu'une normalisation de la vascularisation, des effets bactéricides directs (dus à la formation de peroxynitrites), une stimulation de la phagocytose bactérienne, une inhibition des radicaux libres de l'oxygène, une amélioration de la conduction de l'influx nerveux, une régulation de l'immunodéficience, une stimulation des fibroblastes et de la vascularisation par sécrétion de cytokines, une augmentation de la synthèse de collagène et de la prolifération des kératinocytes (Shekhter, et al., 1998, Shekhter, et al., 2005).

L'étude réalisée chez des patients diabétiques a montré, après traitement de lésions nécrotiques et purulentes par système appelé « Plazon », enrichi en NO, une réduction de la réaction inflammatoire et de la douleur ainsi qu'une diminution du taux d'amputation des patients traités (Shulutko, et al., 2004).

Compte tenu des résultats très prometteurs observés dans la cicatrisation et la stérilisation et des mécanismes mis en jeu au niveau cellulaire lors d'un traitement au plasma froid, quelques équipes ont essayé de tester cette nouvelle technologie en tant que stratégie anticancéreuse.

3.1.2.4. Utilisations des plasmas froid dans le domaine de la cancérologie

L'intérêt des chercheurs concernant le potentiel des plasmas froids dans le domaine de la cancérologie est très récent. Les premiers essais ont été réalisés *in vitro* sur une lignée de cellules de mélanome A2058 (Fridman, et al., 2007). Après traitement avec une source de plasma à barrière diélectrique (DBD), à des doses suffisamment faibles pour ne pas entraîner de lyse cellulaire immédiate, une induction de l'apoptose des cellules de mélanome a été rapportée.

Les premiers effets anti-tumoraux *in vivo* des plasmas froids ont été démontrés au sein du laboratoire par M. Vandamme sur un modèle de glioblastome U87 induit en sous cutané chez des souris swiss nude (Vandamme, et al., 2010). Afin d'évaluer l'efficacité du traitement, les animaux ont été suivis par imagerie de bioluminescence et le volume tumoral mesuré au pied à coulisse. Le traitement au plasma froid a été réalisé durant 5 jours consécutifs avec une source de plasma à barrière diélectrique (DBD) délivrant au niveau de la peau de la souris 0,75 W à 200Hz. Les résultats ont montré une diminution de 56% du volume tumoral des souris traitées par rapport au groupe contrôle. Cet effet était associé à une diminution de l'intensité du signal de bioluminescence et à une augmentation de 60% de la durée de vie des animaux traités.

Compte tenu de ces effets, les mécanismes d'action impliqués ont été étudiés *in vitro* sur deux lignées cellulaires (glioblastome U87 et carcinome colorectal HCT-116). Les résultats ont montré que le traitement par DBD induisait la production d'une quantité importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) produisant des dommages au niveau de l'ADN, des arrêts au niveau du cycle cellulaire et conduisant à l'apoptose des cellules tumorales. *In vivo*, les résultats publiés en 2010 ont été confirmés pour la lignée de glioblastome U87 et des effets similaires induisant une réduction du volume tumoral ont été observés pour les tumeurs HCT-116. L'induction de l'apoptose ainsi qu'un blocage des cellules en phase S ont aussi été démontrés *in vivo* (Vandamme, et al., 2011). Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* avec les plasmas froids s'apparentent à ceux observés lors d'une radiothérapie. En effet, lors d'un traitement par radiothérapie, une altération de l'ADN par les radicaux libres générés lors des rayonnements conduit notamment à des ruptures de chaînes et des blocages en phase S (Bernhard, et al., 1995).

Depuis peu, de nouvelles études ont été réalisées par d'autres équipes dans le monde, et des effets similaires ont été rapportés *in vitro* et *in vivo* pour des modèles de tumeurs sous cutanées de cancer de la vessie (SCaBER) et de mélanome B16 (Keidar, et al., 2011). Ces résultats ont montré *in vitro* que le traitement par plasma froid éliminait sélectivement les cellules tumorales sans endommager les cellules saines et *in vivo* que le traitement permettait de réduire de façon significative le volume tumoral.

3.1.3. Intérêt du plasma gun en cancérologie par rapport à d'autres modalités thérapeutiques locorégionales

Le traitement local des tumeurs se développe depuis quelques années dans le but de limiter les effets secondaires observés lors des traitements par radiothérapie et chimiothérapie et de potentialiser les effets des traitements. Dans cette partie, deux thérapies aujourd'hui utilisées en clinique vont être abordées et comparées au plasma froid, la photothérapie dynamique et la radiofréquence.

3.1.3.1. Photothérapie dynamique

Au début du 20^e siècle, Raab fut le premier à observer la sensibilisation de tissus vivants suite à une irradiation lumineuse. Le terme de photothérapie dynamique (PTD) est apparu quelques années plus tard, en 1904 avec les premiers essais thérapeutiques réalisés par le dermatologue Albert Jesionek pour traiter des cancers cutanés. Par la suite, de nombreux essais vont se succéder avec une étude démontrant que des souris devenaient sensibles à une injection d'hématoporphyrine lorsqu'elles étaient exposées à la lumière (Hausmann, 1911). Tous ces travaux sont à l'origine de l'utilisation de la photothérapie dynamique (PTD), utilisée aujourd'hui en routine en cancérologie pour le traitement ciblé des cancers pulmonaires, œsophagiens, coliques, du tractus uro-génital, de l'œil, du cerveau, et de la peau.

Le principe de la PTD dans le traitement des cancers est basé sur l'utilisation de photosensibilisateurs, tels que des porphyrines, qui deviennent toxiques suite à une irradiation lumineuse. La sélectivité de la PTD repose sur le fait que les photosensibilisants se concentrent naturellement dans les tumeurs cancéreuses, du fait de leur état métabolique ou prolifératif, et très peu au niveau des tissus sains. Ainsi ces molécules, inactives à l'obscurité peuvent devenir très toxiques suite à une excitation lumineuse et en présence d'oxygène (figure 98).

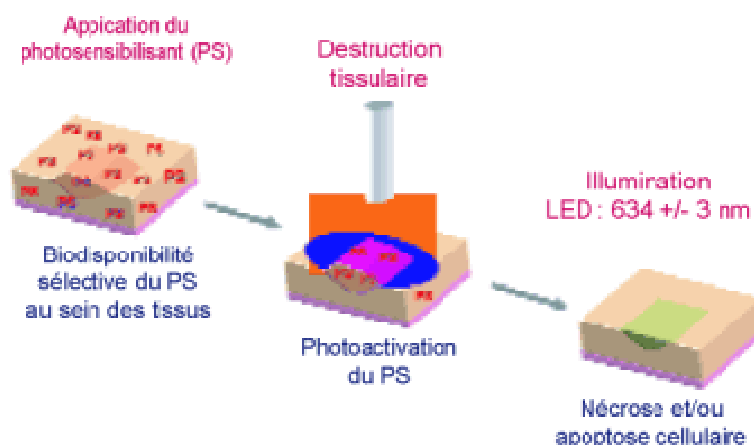


Figure 98 : Principe de la photothérapie dynamique

Le photosensibilisant s'accumule sélectivement dans la lésion afin d'entraîner la mort cellulaire après illumination à une longueur d'onde spécifique (Salomon, 2005).

3.1.3.1.1. Importance de la source lumineuse

La longueur d'onde de la source lumineuse doit être adaptée au spectre d'absorption de la substance photosensibilisante et avoir une pénétration tissulaire suffisante pour atteindre sa cible. Ainsi, le choix de la source lumineuse utilisée en PTD se fait selon deux paramètres : les pics d'absorption de la molécule photosensibilisante et la pénétration dans le tissu (figure 99).

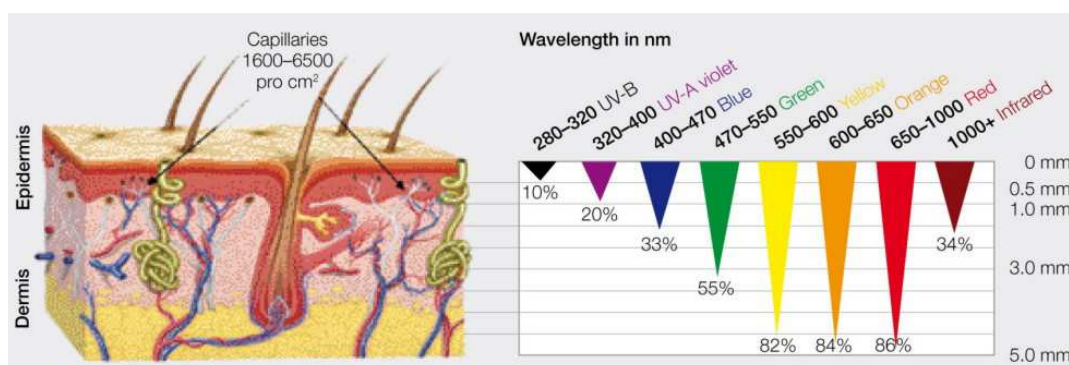


Figure 99 : Relation entre longueur d'onde et pénétration tissulaire

(Source : <http://www.colourlight.ch>).

Selon la longueur d'onde utilisée la pénétration tissulaire est effectivement très différente ; par exemple, une longueur d'onde de 630 nm pénètre de 5-8 mm à travers la peau alors que des longueurs d'onde comprise entre 700 et 800 nm peuvent aller jusqu'à environ 2 cm de

profondeur (86% de la lumière est retrouvée à 5 mm de profondeur pour des longueurs d'onde allant de 650 à 1000 nm). La source lumineuse joue donc un rôle très important et doit être choisie en fonction de la localisation et de la profondeur de la tumeur à traiter.

3.1.3.1.2. Les principaux photosensibilisants utilisés

Dans le domaine de la photothérapie dynamique, les photosensibilisants les plus utilisés sont les porphyrines et leurs précurseurs.

La première molécule à avoir été développée est l'hématoporphyrine (Diamond, et al., 1972) aujourd'hui commercialisée sous le nom de Photofrin[®]. Son utilisation en clinique a été autorisée en France en 1996 pour le traitement des cancers du poumon et de l'œsophage. Le spectre d'absorption des porphyrines présente plusieurs pics, dont un situé aux alentours de 630 nm (figure 99) qui pénètre bien les tissus.

L'acide γ -aminolévulinique, précurseur des porphyrines a également été développé et est principalement utilisé en local où il entraîne une accumulation dans les tissus de protoporphyrine de type IX afin de générer l'effet photosensibilisant (Kennedy and Pottier, 1992). Enfin, un dérivé méthyle ester de l'acide γ -aminolévulinique (Metvixia[®]) a été développé. Il offre une meilleure sélectivité et une meilleure pénétration (Peng, et al., 2001) et a obtenu une AMM en France.

3.1.3.1.3. Mécanisme d'action de la photothérapie dynamique

La molécule photosensibilisante, qui doit être stable et non toxique va être activée par un rayonnement approprié et induire des réactions photochimiques avec l'oxygène comme accepteur d'énergie. L'oxygène joue un rôle très important, puisqu'il doit être présent en quantité suffisante pour déclencher la réaction phototoxique et rendre la PTD efficace. La présence d'oxygène va permettre de réaliser la réaction de photo-oxydation et entraîner la production d'espèces réactives de l'oxygène (oxygène singulet, radicaux hydroxyles) qui vont conduire à l'altération et à la mort des cellules.

Le mécanisme d'action sur les tumeurs est présenté figure 100. Le photosensibilisant absorbe la lumière et déplace l'un de ses électrons vers un état excité. L'électron excité va

changer de spin et rejoindre l'état triplet. Le photosensibilisant à l'état triplet transfère de l'énergie à l'oxygène alors à l'état fondamental ($^3\text{O}_2$) et qui devient de l'oxygène singulet à l'état excité ($^1\text{O}_2$). La toxicité de l'oxygène singulet va alors entraîner l'élimination des cellules tumorales par induction de nécrose et/ou d'apoptose, et causer la destruction de la vascularisation tumorale suite à la mise en place d'une réponse inflammatoire aiguë attirant les leucocytes, les cellules dendritiques et les neutrophiles sur le site ciblé (Castano, et al., 2006).

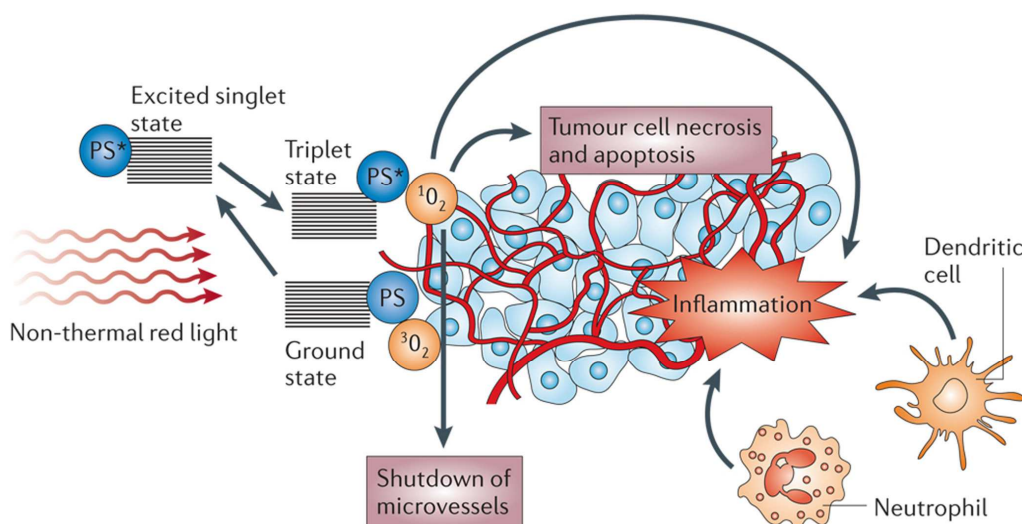


Figure 100 : Mécanisme d'action de la photothérapie dynamique sur les tumeurs
(Castano, 2006)

Aujourd'hui, il est admis que l'oxygène singulet est l'agent toxique principal en PTD.

L'ensemble des processus mis en jeu lors de la PTD provoque l'inactivation de nombreux constituants cellulaires. Les mitochondries semblent être une cible essentielle de la PTD, mais d'autres composants cellulaires tels que les membranes, les lysosomes et le noyau seraient également impliqués.

3.1.3.1.4. Effets secondaires de la photothérapie dynamique

Le principal effet secondaire observé lors d'un traitement par PTD est la photosensibilité suite à l'injection par voie intraveineuse du produit, imposant au patient une photoprotection stricte. Afin de pallier cet effet, une administration locale des substances photosensibilisantes est privilégiée mais des mesures de protection doivent toutefois être appliquées si les zones traitées sont trop importantes.

Des signes généraux tels que fièvre, nausée, céphalée et vertiges ont été décrits mais sont très rares. Enfin, lors de l'illumination, des douleurs peuvent intervenir selon les individus.

3.1.3.2. Traitement des tumeurs par radiofréquence

La radiofréquence est une technique peu invasive et rapide permettant, grâce à l'application de moyens physiques au centre de la lésion, de supprimer la tumeur. Cette technique, principalement utilisée en clinique pour le traitement de tumeurs pulmonaires (Nishida, et al., 2002), hépatiques (van Vledder, et al., 2011) et rénales (Karam, et al., 2011), a démontré une efficacité certaine.

3.1.3.2.1. Principe du traitement localisé par radiofréquences

Les radiofréquences sont des rayonnements électromagnétiques non ionisants, mettant en œuvre pour l'ablation des tumeurs, des ondes d'une fréquence allant de 400 à 500 kHz.

Au niveau tissulaire, l'agitation ionique entraînée par le courant de radiofréquence va provoquer une augmentation de température de 50 à 100°C. Cette augmentation de température va conduire à une coagulation suivie d'une nécrose tissulaire (Zlotta, et al., 1997).

La température étant très importante, au-delà de 60°C, la mort cellulaire est immédiate (Chong, 2001). Pour des températures supérieures à 150 °C, les tissus vont entrer en ébullition et brûler, conduisant à une efficacité moindre du traitement. Il est donc nécessaire de maintenir la température de traitement inférieure à 100°C (Goldberg, et al., 2000).

Le principe de la radiofréquence est le suivant : une électrode positionnée par voie percutanée ou chirurgicale permet d'appliquer directement au niveau de la tumeur le courant de radiofréquence (figure 101).

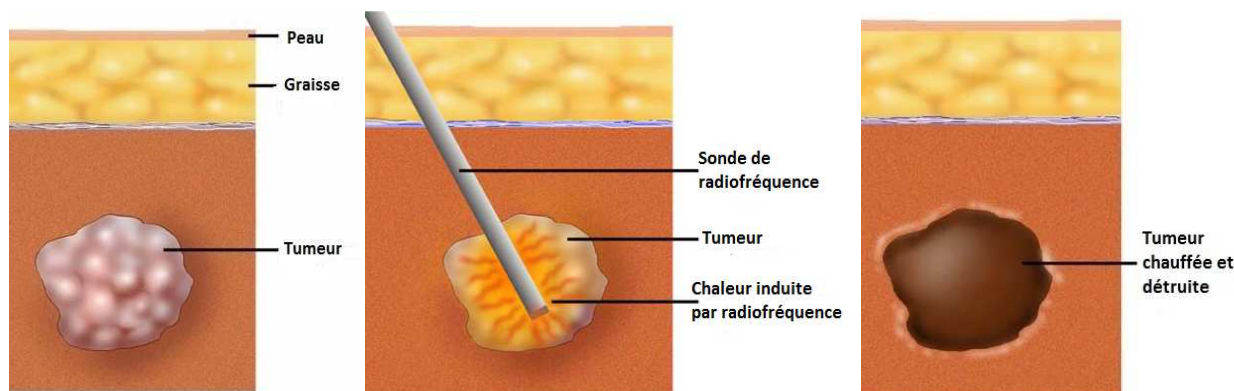


Figure 101 : Principe du traitement local des tumeurs par radiofréquence

(d'après la Société de radiologie interventionnelle © 2004, www.SIRweb.org)

L'électrode est placée dans la tumeur grâce à des techniques d'imagerie telles que l'échographie, la tomodensitométrie ou l'imagerie par résonance magnétique. Un courant électrique passe à travers l'électrode afin de chauffer la tumeur pour l'éliminer. La chaleur provoquée permet en outre de cautériser les vaisseaux sanguins irriguant la tumeur.

Afin d'augmenter l'efficacité de la radiofréquence pour le traitement des tumeurs, de nouvelles stratégies ont été décrites, comme par exemple l'injection de sérum physiologique (améliore la conductivité), la diminution du débit sanguin ou l'administration d'un traitement antiangiogénique en complément de la radiofréquence (Lui, et al., 2003).

3.1.3.2.2. Effets secondaires du traitement par radiofréquence

L'ablation des tumeurs par radiofréquence est un traitement peu invasif qui ne nécessite pas une hospitalisation des patients qui peuvent reprendre leurs activités quelques jours après l'intervention. Toutefois cette technique présente quelques inconvénients.

L'ablation par radiofréquence peut entraîner des douleurs ainsi qu'une inflammation des sites à proximité de la zone traitée. Par ailleurs, selon le site de traitement, les effets secondaires peuvent être plus ou moins graves. Dans le cas de tumeurs hépatiques, peu d'effets secondaires graves ont été rapportés. Il s'agit principalement de cas d'hémorragie suite à la rupture de la tumeur, des cas d'insuffisance hépatique ainsi que quelques cas de perforation intestinale et d'abcès intra-hépatiques (Livraghi, et al., 2003). Pour le traitement des tumeurs rénales, quelques cas de complications ont été décrits, avec une atteinte des voies excrétrices (Warlick, et al., 2005) et un risque d'hypertension artérielle réno-vasculaire

(Mejean, et al., 2006). Les situations les plus graves ont été rapportées lors du traitement de tumeurs pulmonaires avec des cas de détresse respiratoire aigüe, de pleurésie et principalement de pneumothorax (Gadaleta, et al., 2006, Lee, et al., 2004).

Compte tenu des multiples contraintes et effets secondaires observés suite aux traitements par photothérapie dynamique ou radiofréquence, le développement d'une nouvelle thérapie ciblée pourrait présenter un réel intérêt pour la prise en charge des patients pour lesquels la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie ne permettent pas d'offrir une solution radicale.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Le plasma gun

Dans le cadre de notre travail, le plasma froid utilisé est généré à partir d'une source de décharge à barrière diélectrique (DBD) en appliquant une impulsion microseconde de 13 kV dans un gaz (hélium ou néon). Le plasma fibré, c'est-à-dire créé à l'intérieur d'un tube capillaire permet de réaliser des traitements ciblés et est appelé « Plasma Gun » (figure 102).

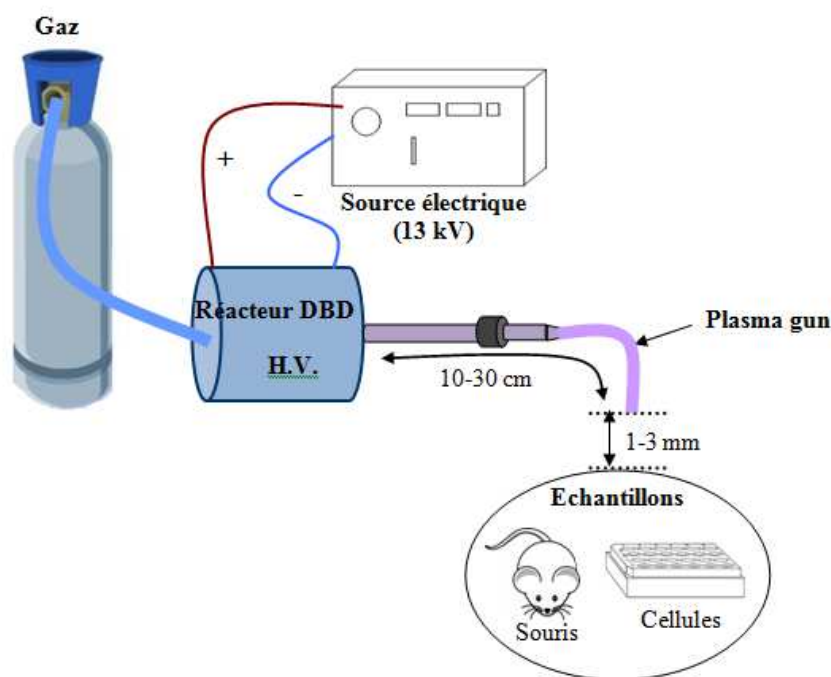


Figure 102 : Schéma du dispositif expérimental

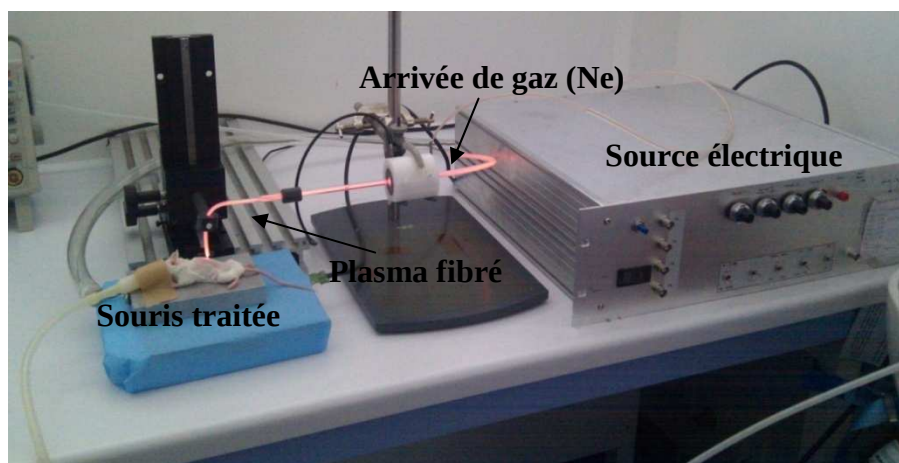


Figure 103 : Photographie du dispositif expérimental

Le jet de plasma présent à l'extrémité du capillaire (figure 104) est appliqué à une distance de 2 mm de l'échantillon (souris ou cellules), entraînant un transfert des espèces du plasma vers l'air.



Figure 104 : Jet de plasma dans l'air

Les deux gaz utilisés lors de nos études étaient l'hélium ou le néon. Selon le type de gaz utilisé, la couleur du plasma est différente car les espèces produites ainsi que les photons sont différents. Ainsi, un plasma créé dans du néon sera de couleur plutôt orangée alors qu'un plasma créé dans de l'hélium sera violet (figure 105).



Figure 105 : plasma gun

A : plasma généré avec du Néon ; B : plasma généré avec de l'Hélium

3.2.2. Conditions de culture des cellules MIA PaCa2-luc

Afin de réaliser les tests *in vitro*, les cellules MIA PaCa2-luc ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 50 000 cellules par puits sous un volume de 500 μ l de milieu puis incubées durant 24h à 37°C sous 5% de CO₂ avant d'être traitées au plasma gun ou à la gemcitabine.

3.2.3. Induction tumorale et animaux

Les cellules MIA PaCa2 étant des cellules d'origine humaine, nous avons utilisé des souris immunodéficientes Swiss nude femelles âgées de 5 semaines (Charles River, France).

Afin d'obtenir des tumeurs orthotopiques de carcinome pancréatique, la méthode consistant à injecter des cellules au niveau du pancréas, décrite paragraphe 2.3.2.2. a été mise en œuvre.

3.2.4. Traitement au plasma gun

3.2.4.1. Traitement *in vitro*

Les cellules ont été traitées en présence du milieu de culture à une distance de 2 mm au dessus de la surface du milieu (figure 106). Les paramètres utilisés pour créer le plasma gun

étaient les suivants : tension de 13 kV, fréquences de 200 Hz ou 2 kHz et flux de gaz variant de 170 ml/min à 480 ml/min pour l'hélium et de 150 ml/min à 200 ml/min pour le néon.

La différence entre les flux d'hélium et de néon s'explique par le fait qu'ils ne se mélangent pas de la même façon avec l'air. Nous avons donc choisi des flux de gaz permettant d'obtenir un jet de plasma d'apparence de diamètre et d'intensité lumineuse similaires.

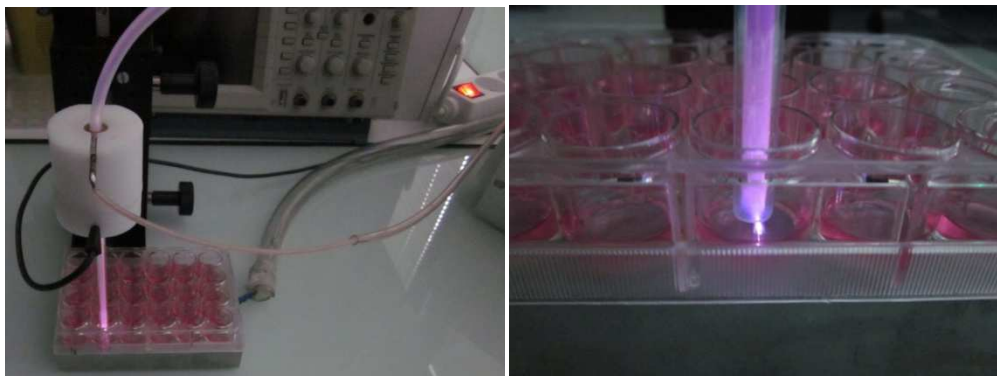


Figure 106 : Traitement *in vitro* des cellules en plaque 24 puits

Après le traitement, les cellules ont été incubées à nouveau durant 24 h à 37°C sous 5% de CO₂ avant d'être imagées par bioluminescence.

3.2.4.2. Traitement *in vivo*

Avant de commencer le premier traitement (4 jours post-induction), les animaux ont été randomisés en 3 groupes de 8 animaux sur le critère de l'intensité de bioluminescence.

- Groupe contrôle, traité uniquement avec le flux de gaz hélium à 340 ml/min (Ctrl)
- Groupe traité au plasma gun généré dans l'hélium (Plasma He)
- Groupe traité au plasma gun généré dans le néon (Plasma Ne)

Les animaux ont subi 3 séances de traitements de 10 min au plasma gun espacés de 10 jours. Afin de suivre l'évolution tumorale, une imagerie de bioluminescence a été réalisée une fois par semaine jusqu'au 36^e jour post induction (figure 107). Le protocole expérimental a

été conduit selon les recommandations du Comité Local d’Ethique pour le soin et l’expérimentation animale et selon la Directive Européenne 86/609/EEC.

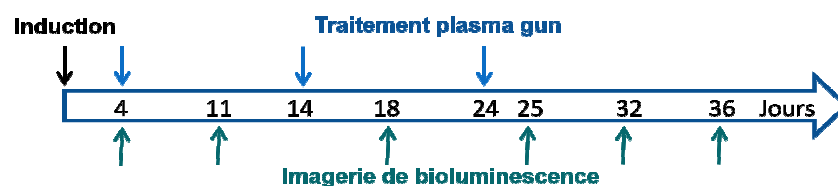


Figure 107 : Schéma thérapeutique du traitement au plasma gun hélium ou néon

La procédure de traitement au plasma gun était la suivante : les animaux ont été anesthésiés à l’isoflurane (2,5% dans l’air). Une petite incision au niveau du flanc gauche a été réalisée afin d’externaliser le pancréas et la tumeur primaire. Les animaux ont été transférés sur une plaque de masse chauffée à 37°C et la tumeur primaire a été soumise soit au flux de gaz (groupe Ctrl négatif) soit au plasma gun hélium ou néon. Le traitement a été réalisé à une distance de 2 mm de la tumeur primaire (figure 108).

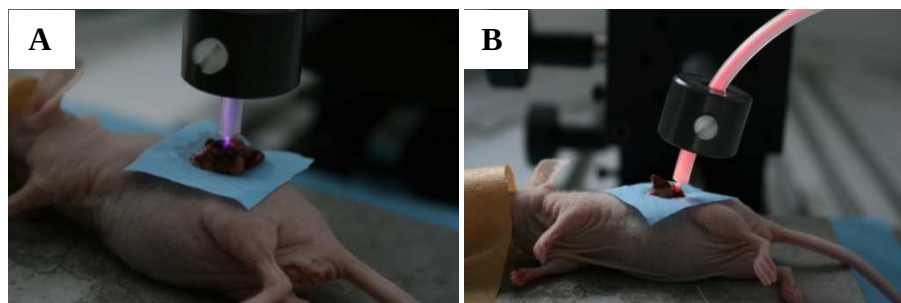


Figure 108 : Traitement de la tumeur primaire au niveau du pancréas

A : Plasma hélium, B : plasma néon.

Les paramètres utilisés pour créer le plasma gun étaient les suivants : tension de 13 kV, fréquence de 2 kHz et flux de gaz de 340 ml/min pour l’hélium et 140 ml/min pour le néon.

Après 10 minutes de traitement, le pancréas était replacé dans sa position initiale et les plans musculaires et cutanés recousus avec du fil Vicryl 5-0.

3.2.5. Traitement par bithérapie plasma gun/gemcitabine

Afin d'améliorer les effets du plasma gun, nous avons choisi de l'associer à une chimiothérapie. Compte tenu des effets radiosensibilisants de la gemcitabine, en particulier sur les cellules de cancers pancréatiques (Lawrence, et al., 1996), et de la similitude des effets des plasmas froids avec la radiothérapie, nous avons décidé d'associer en bithérapie le plasma gun et la gemcitabine.

3.2.5.1. Traitement *in vitro*

La concentration inhibitrice 50 (IC50) de la gemcitabine étant de 7 nM, valeur préalablement déterminée dans le Chapitre 2 (paragraphe 2.3.3.4.1), une concentration de 5 nM, inférieure à l'IC50, a été choisie pour le traitement en bithérapie avec le plasma gun.

Ainsi, afin de tester l'effet d'une association plasma gun/gemcitabine, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 50 000 cellules/puits. Après 24 h d'incubation à 37°C sous 5 % de CO₂, la gemcitabine a été ajoutée dans le milieu de culture à la concentration de 5 nM. Les cellules ont à nouveau été incubées durant 24 h avant d'être traitées au plasma gun hélium à 2 kHz avec un débit de gaz de 480 ml/min.

3.2.5.2. Traitement *in vivo*

En tenant compte des résultats obtenus précédemment lors des traitements à la gemcitabine (Chapitre 2, paragraphe 2.3.3.4.2), la dose choisie pour le traitement en bithérapie est celle ayant permis d'obtenir le meilleur effet inhibiteur de la croissance tumorale, c'est-à-dire 200 mg/kg.

Après induction orthotopique de cellules MIA PaCa2-luc, les animaux ont été randomisés sur le critère de l'intensité de bioluminescence puis répartis en 4 groupes de 8 animaux.

- Groupe contrôle, recevant le véhicule de la gemcitabine (NaCl 0,9%) ainsi que le flux de gaz (Ctrl)
- Groupe traité à la gemcitabine seule à la dose de 200 mg/kg (GEM)

- Groupe traité uniquement au plasma gun généré dans l'hélium (Plasma)
- Groupe traité à la gemcitabine (200 mg/kg) et au plasma gun (Plasma + GEM)

Les animaux ont été traités avec la gemcitabine administrée par voie intraveineuse et/ou au plasma gun hélium, en local après externalisation du pancréas et de la tumeur primaire, selon la procédure décrite précédemment.

Les animaux traités à la gemcitabine ont reçu 5 administrations espacées de 5 jours à la dose de 200 mg/kg sous un volume d'injection de 10 ml/kg. Les animaux traités au plasma gun hélium ont subi 3 séances espacées de 10 jours à une fréquence de 2 kHz, une tension de 13 kV et un débit de gaz de 340 ml/min.

L'administration de gemcitabine a été réalisée 24 h avant le traitement au plasma gun sur la base d'études ayant montré que lors d'une bithérapie gemcitabine/radiothérapie, les effets antitumoraux étaient maximaux lorsque la gemcitabine était administrée 24 h avant l'irradiation (Pauwels, et al., 2005).

Le schéma thérapeutique était donc le suivant :

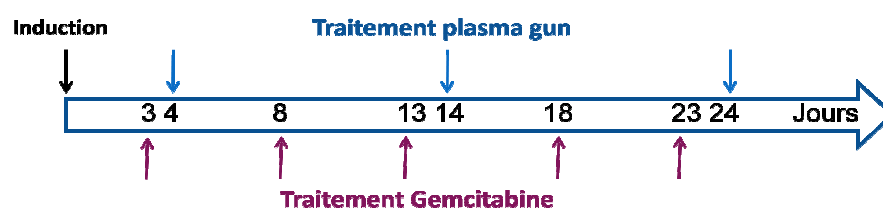


Figure 109 : Schéma thérapeutique du traitement au plasma gun et à la gemcitabine

Afin de suivre l'évolution tumorale, une imagerie de bioluminescence a été réalisée une fois par semaine jusqu'au 36^e jour post induction, stade au-delà duquel la bioluminescence n'est plus pertinente compte tenu du statut hypoxique de la tumeur.

3.2.6. Imagerie de bioluminescence

3.2.6.1. Imagerie *in vitro*

Après ajout de 15 µg/puits de luciférine et incubation à 37°C durant 5 minutes, l'imagerie a été réalisée avec un IVIS Lumina II (Caliper Life sciences). La bioluminescence a été quantifiée en traçant des ROIs autour de chaque puits et exprimée en photons/seconde (p/s).

La figure 110 présente un exemple d'image obtenue par bioluminescence après traitement des cellules au plasma gun.

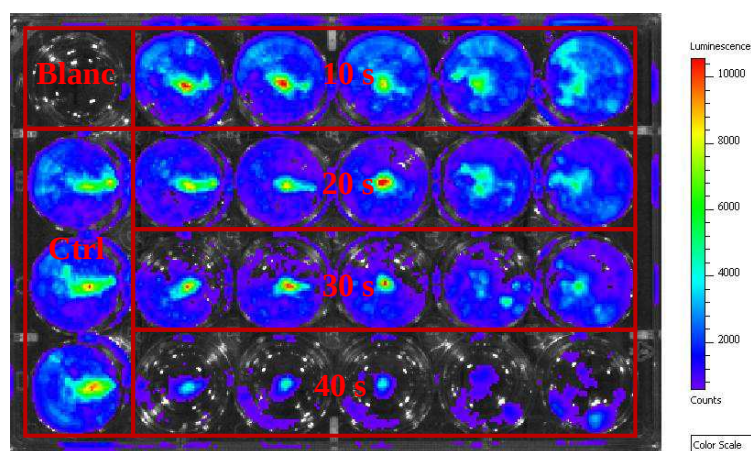


Figure 110 : Imagerie de bioluminescence après traitement des cellules MIA PaCa2-luc au plasma gun durant différents temps

3.2.6.2. Imagerie *in vivo*

Les souris ont été injectées en i.p. avec de la luciférine (Proméga) à la dose de 100 mg/kg. Cinq minutes après cette injection les animaux étaient maintenus sous anesthésie (2% Isoflurane dans l'air) pour la durée de l'imagerie. Les acquisitions étaient réalisées au binning médium (4x4), durant un temps variable (dépendant de l'intensité du signal) allant de 5 à 300 secondes.

Comme déjà évoqué, l'imagerie de bioluminescence est une imagerie planaire et les problèmes dus à l'absorption des photons et à la localisation du pancréas nous ont obligés à réaliser les acquisitions sur les souris en faces antérieure et latérale gauche. Tous les résultats de bioluminescence présentés pour le modèle orthotopique du pancréas représentent la somme

de la bioluminescence corps entier des 2 faces (latérale + antérieure), en photons/seconde (p/s).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'augmentation par rapport au premier temps de bioluminescence (J3, avant premier traitement à la gemcitabine), chaque animal étant son propre témoin.

3.2.7. Analyse de la fonction pancréatique

Le geste chirurgical lui-même ainsi que le traitement pouvant avoir un impact sur la physiologie du pancréas, les paramètres tels que la glycémie et les taux de lipase et amylase plasmatiques ont été étudiés.

3.2.7.1. Mesure de la glycémie

La mesure du taux de glycémie a été faite grâce à un lecteur de glycémie (Accu-Chek Active, Servier). Une goutte de sang a été prélevée au niveau de la veine saphène puis déposée sur la bandelette afin de lire la concentration de glucose sanguin de l'animal.

La mesure de la glycémie a été mesurée avant le geste chirurgical et le traitement (au plasma gun ou au flux de gaz) puis 10 min, 30 min et 60 minutes après.

3.2.7.2. Détermination des taux de lipases et amylases plasmatiques

Les prélèvements de sang ont été réalisés au niveau du sinus rétro-orbital 24 h après l'acte chirurgical sur les souris anesthésiées. Les enzymes ont été mesurées dans le plasma grâce à des réactifs de l'amylase et de la lipase (Horiba Medical), avec un automate dédié (Pentra 400 option I.S.E, Horiba Medical).

3.2.8. Nécropsie

Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale suivie d'une exsanguination. Les tumeurs ainsi que les organes présentant des métastases ont été prélevés puis imagés le plus rapidement possible par bioluminescence. Le volume ainsi que la masse tumorale ont été mesurés. Les tumeurs ont été sectionnées en deux, une moitié étant conservée en formol 10% et l'autre incluse dans un milieu d'enrobage cryogénique (OCTTM) puis congelée dans l'azote et conservée à -80°C.

3.3. Résultats

3.3.1. Effets du plasma gun sur la croissance *in vitro* de cellules tumorales MIA PaCa2-luc

Afin d'évaluer l'effet du plasma gun sur la croissance des cellules MIA PaCa2-luc *in vitro*, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits puis traitées au plasma gun avant d'être imagées par bioluminescence.

3.3.1.1. Influence des caractéristiques du plasma

3.3.1.1.1. Impact du flux de gaz

Le flux de gaz joue un rôle important car il va modifier le mélange gaz/air et donc la nature des espèces qui vont arriver sur les cellules. Dans cette expérience, nous avons cherché à déterminer l'impact de ce flux de gaz sur les cellules. Les débits de gaz ont été choisis en fonction de la capacité à générer un jet de plasma, le débit de gaz minimum pour obtenir un jet de plasma étant de 85 ml/min en néon et de 170 ml/min en hélium. Le débit maximal a été limité par le matériel utilisé (débitmètre ne pouvant aller au-delà de 480 ml/min).

Après ensemencement des cellules et imagerie de bioluminescence les histogrammes suivants ont été tracés (figures 111 et 112).

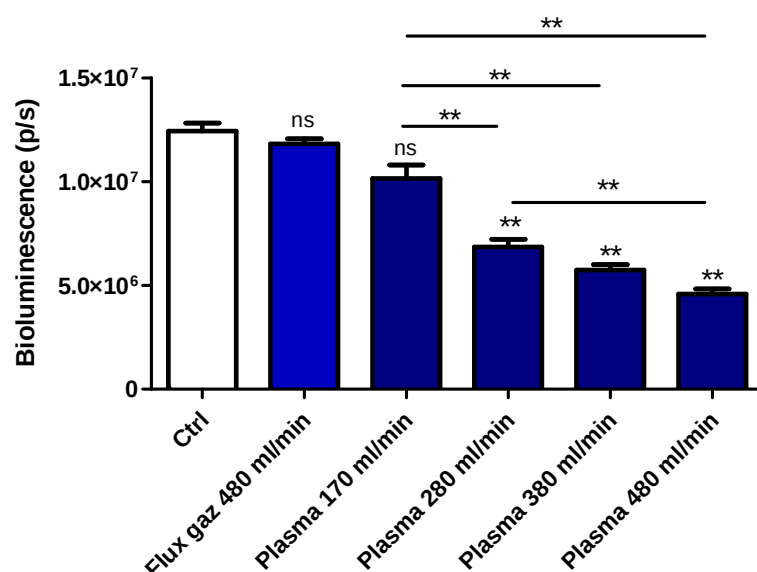


Figure 111 : Traitement durant 2 minutes à différents flux de gaz hélium

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

*: $p < 0,5$; **: $p < 0,01$ (Test de Mann Whitney)

L'augmentation du flux de gaz permet d'améliorer significativement l'effet sur l'inhibition de la croissance cellulaire. Les différences observées sont significatives entre les flux de gaz testés. Après 2 minutes de traitement à 170 ml/min, la diminution de l'intensité de bioluminescence est de 18% par rapport au groupe contrôle (Ctrl), cette diminution passant à 63% lorsque les cellules sont traitées avec un flux de gaz de 480 ml/min.

Pour la suite des études, les traitements *in vitro* au plasma gun utilisant l'hélium ont donc été réalisés avec un flux de gaz de 480 ml/min.

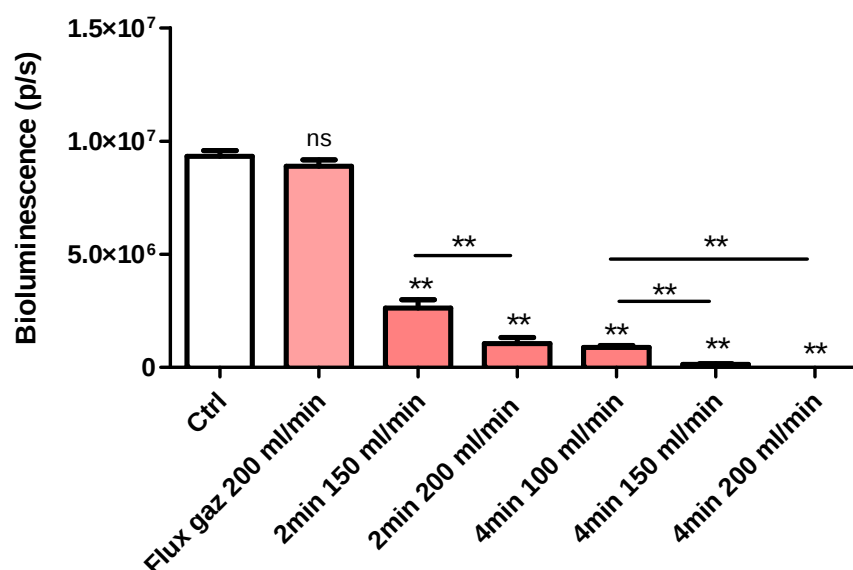


Figure 112 : Traitement durant 2 min ou 4 min à différent flux de gaz néon

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5). **: $p < 0,01$ (Test de Mann Whitney)

Des effets similaires ont été observés avec le néon. En effet, pour un même temps de traitement, plus le flux de gaz est élevé plus l'inhibition de la croissance cellulaire est importante. Lorsque les cellules subissent un traitement de 2 minutes, une diminution de 72% par rapport au groupe contrôle est observée avec un flux de gaz à 150 ml/min. Cette diminution passe à 89% lorsque les cellules subissent le même traitement avec un flux de gaz de 200 ml/min.

Pour la suite des études, les traitements *in vitro* au plasma gun utilisant le néon ont donc été réalisés avec un flux de gaz de 200 ml/min.

3.3.1.1.2. Effet selon la nature du gaz

Le plasma pouvant être créé à partir de nombreux gaz, modifiant alors les espèces produites, nous avons voulu tester l'impact du type de gaz sur l'inhibition de la croissance des cellules tumorales.

Les cellules ont subi un traitement au plasma gun à une fréquence de 200 Hz. Les flux de gaz ont été appliqués en fonction des résultats obtenus précédemment, soit un flux de 480 ml/min pour l'hélium et de 200 ml/min pour le néon. Il a par ailleurs été montré que le flux de gaz (hélium ou néon) seul n'induisait aucun effet sur les cellules.

Les courbes représentant le nombre de cellules viables 24h après traitement au plasma gun en fonction du temps de traitement ont été tracées pour les deux gaz (figure 113) grâce aux valeurs déterminées par bioluminescence.

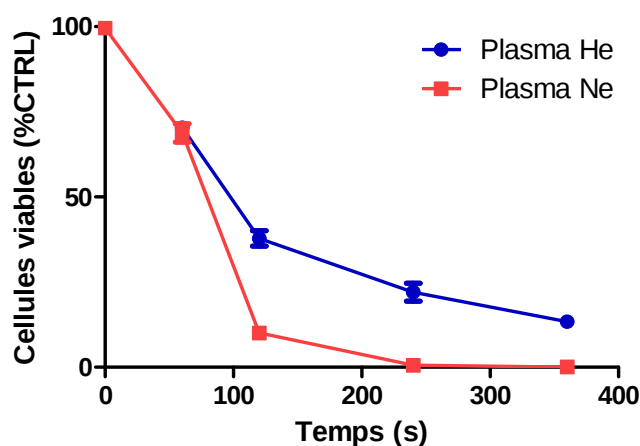


Figure 113 : Effet sur l'inhibition de la croissance cellulaire d'un traitement au plasma gun généré à partir de 2 gaz différents, le néon et l'hélium

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

Le temps nécessaire pour tuer 50 % des cellules a été déterminé selon la méthode de Hill slope. Il est de 83 secondes lorsque les cellules sont traitées avec le plasma gun généré dans l'hélium et de 78s lorsqu'il est généré dans le néon.

3.3.1.1.3. Impact de la fréquence de traitement

Comme le flux de gaz, la fréquence joue un rôle très important car elle va modifier le nombre d'espèces qui vont arriver sur les cellules en un temps donné. La fréquence a donc un impact direct sur la dose délivrée.

Après ensemencement des cellules selon la procédure décrite précédemment, celles-ci ont été traitées soit à la fréquence de 200 Hz soit à 2 kHz. En se basant sur l'imagerie de bioluminescence, une cinétique a été réalisée afin de déterminer le temps nécessaire pour tuer 50 % des cellules et les courbes correspondantes sont présentées figure 114.

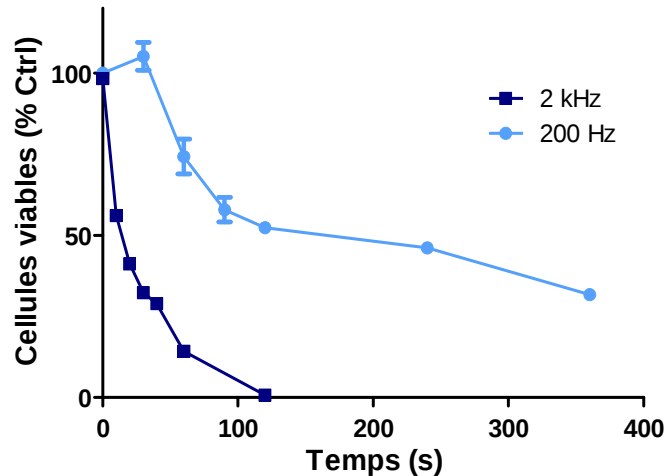


Figure 114 : Effet de la fréquence d'un traitement au plasma gun hélium

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

Le temps nécessaire pour tuer 50 % des cellules a été déterminé selon la méthode de Hill slope. Il est de 108 secondes lorsque les cellules sont traitées avec le plasma gun à la fréquence de 200 Hz et de 19 secondes à 2 kHz.

Si l'on se réfère au nombre d'impulsions (fréquence x temps) nécessaires pour tuer 50% des cellules, il faut à 200 Hz, 21 600 impulsions (200 x 108) et à 2 kHz 38 000 impulsions (200 x 19).

Ainsi, pour une fréquence faible le nombre d'impulsions nécessaires pour tuer 50 % des cellules est moins important que pour une fréquence plus élevée, mais le temps de traitement est cinq fois plus long. Compte tenu de l'importance de la durée du traitement pour les études *in vivo* (les souris ne peuvent pas rester anesthésiées pendant plusieurs heures) nous avons choisi de traiter les animaux à la fréquence de 2 kHz.

3.3.1.2. Effet d'une combinaison plasma gun/gemcitabine

Afin d'améliorer les effets obtenus avec le plasma gun seul sur l'inhibition de la croissance cellulaire, de la gemcitabine a été ajoutée dans le milieu de culture à la concentration de 5 nM 24 h avant traitement au plasma gun, temps optimal pour radiosensibiliser les cellules (Pauwels, et al., 2005).

Les résultats obtenus par imagerie de bioluminescence ont permis de tracer les courbes de survie cellulaire en fonction du temps de traitement au plasma gun associé ou non à la gemcitabine (figure 115).

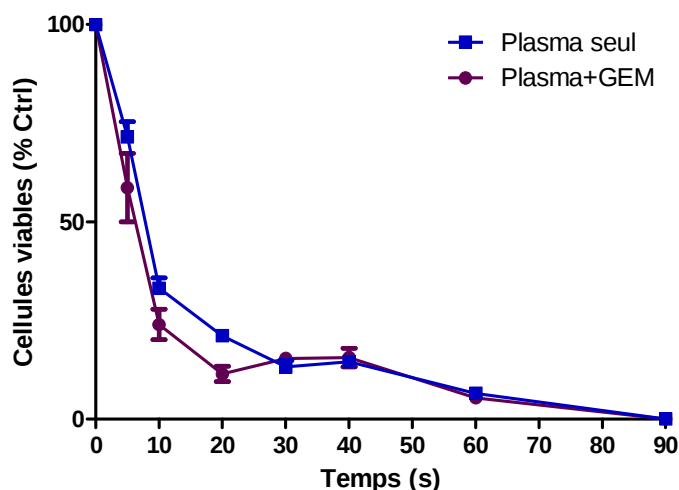


Figure 115 : Comparaison plasma seul et plasma en association à la gemcitabine

GEM : Gemcitabine. Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

Les résultats obtenus montrent une diminution du temps de traitement nécessaire pour tuer 50 % des cellules lorsque le plasma gun est associé à la gemcitabine (3,5s contre 7s pour le plasma seul). Si l'on se rapporte à la dose délivrée, exprimée en nombre d'impulsions (fréquence x temps de traitement), pour les cellules traitées au plasma gun seul il faut 11800 impulsions pour tuer 50 % des cellules contre 7000 impulsions pour la combinaison plasma + gemcitabine.

L'association du plasma gun à la gemcitabine permet donc de diminuer le temps de traitement ainsi que le nombre d'impulsions nécessaires pour tuer 50% des cellules *in vitro*.

3.3.2. Effets du plasma gun *in vivo*

3.3.2.1. Effet antitumoral du plasma gun selon la nature du gaz utilisé

Sachant que selon le type de gaz utilisé pour générer le plasma les espèces produites sont différentes, nous avons voulu tester l'impact de la nature du gaz sur l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo*.

Le suivi hebdomadaire par imagerie de bioluminescence de l'évolution tumorale a permis d'obtenir le graphique suivant (figure 116). Les résultats sont présentés en pourcentage de variation par rapport à l'intensité de bioluminescence mesurée avant traitement (J4).

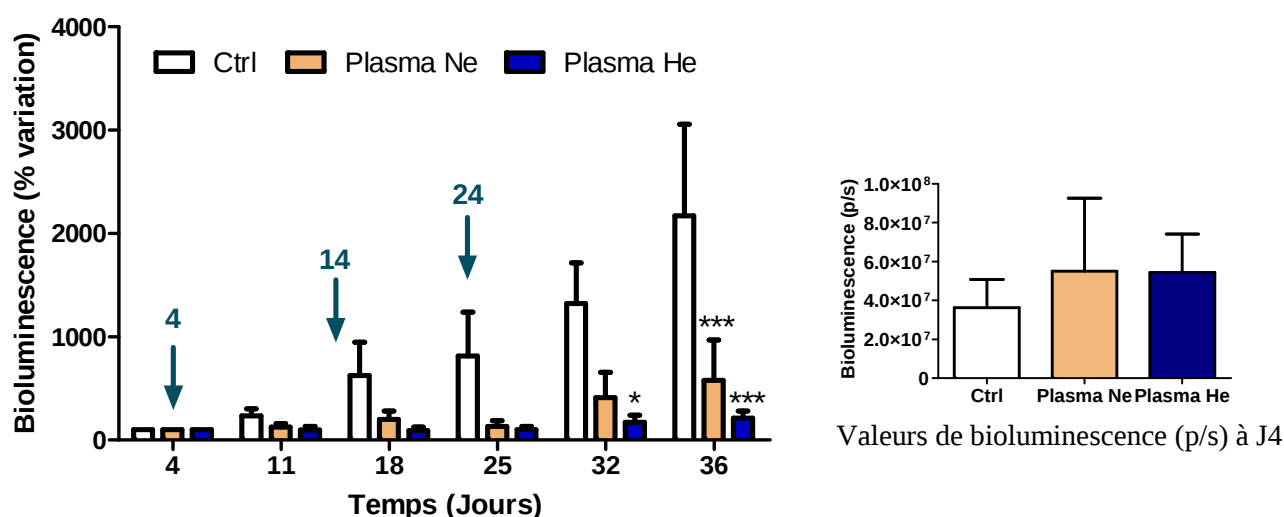


Figure 116 : Evolution tumorale après traitement au plasma gun Hélium ou Néon

Les jours de traitement sont indiqués par les flèches. Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=8). *: $p < 0,5$; ***: $p < 0,001$ (ANOVA suivie d'un post test Bonferroni)

Le traitement de la tumeur primaire au plasma gun permet de réduire significativement la croissance tumorale. Dès J18 soit 4 jours après le deuxième traitement, une tendance à l'inhibition de la croissance tumorale est observée pour les 2 groupes traités par rapport au groupe contrôle. Cette tendance se confirme à J36 où la différence entre les groupes contrôles et les groupes traités est statistiquement significative.

Par contre la différence entre les deux groupes traités n'est pas significative, mais il semble que le plasma gun hélium induit une inhibition de la croissance tumorale plus importante que le plasma gun néon.

Afin de confirmer les résultats obtenus par bioluminescence, une mesure directe du volume tumoral a également été réalisée le jour de la nécropsie (figure 117).

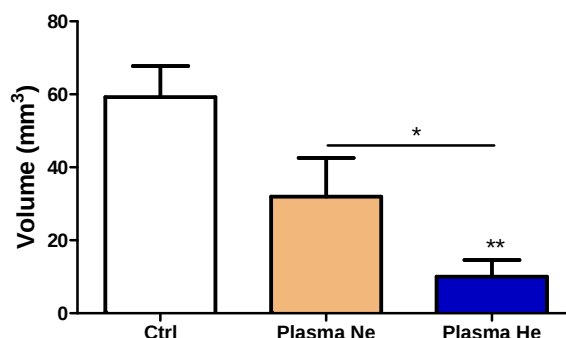


Figure 117 : Volume de la tumeur primaire le jour de l'autopsie (J36)

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=8).

**: $p < 0,5$; **: $p < 0,01$; (Test de Mann Whitney).*

Pour le groupe traité au plasma gun hélium, la moyenne des volumes tumoraux mesurés est de $10 \text{ mm}^3 (\pm 4,6)$ contre $59 \text{ mm}^3 (\pm 8,5)$ pour le groupe contrôle. Le traitement au plasma gun hélium entraîne une inhibition de la croissance tumorale qui conduit 12 jours après le dernier traitement à une différence de volume de 83 % entre le groupe plasma hélium et le groupe contrôle.

Pour le groupe traité au plasma gun néon, la différence de volume tumoral n'est pas significative par rapport au groupe contrôle. Ce résultat, qui n'est pas en accord avec celui obtenu en bioluminescence peut s'expliquer par le fait que les tumeurs traitées au plasma gun néon présentaient un aspect anormal, avec présence de zones brunes non bioluminescentes. L'absence de signal de bioluminescence au niveau de ces zones semble indiquer que la masse observée n'est pas constituée de tissu tumoral vivant.

Du fait du manque de stabilité du plasma gun néon et de son effet moindre sur l'inhibition de la croissance tumorale, nous avons donc retenu le plasma gun généré dans l'hélium pour la suite des études.

3.3.2.2. Effet du traitement et du geste chirurgical sur la fonction pancréatique

3.3.2.2.1. Impact sur le taux de glycémie

Sachant que des lésions pancréatiques peuvent entraîner une augmentation du taux de glycémie, celle-ci a été déterminée avant le geste chirurgical et le traitement (au plasma gun ou au flux de gaz) puis 10 min, 30 min et 60 minutes après (figure 118).

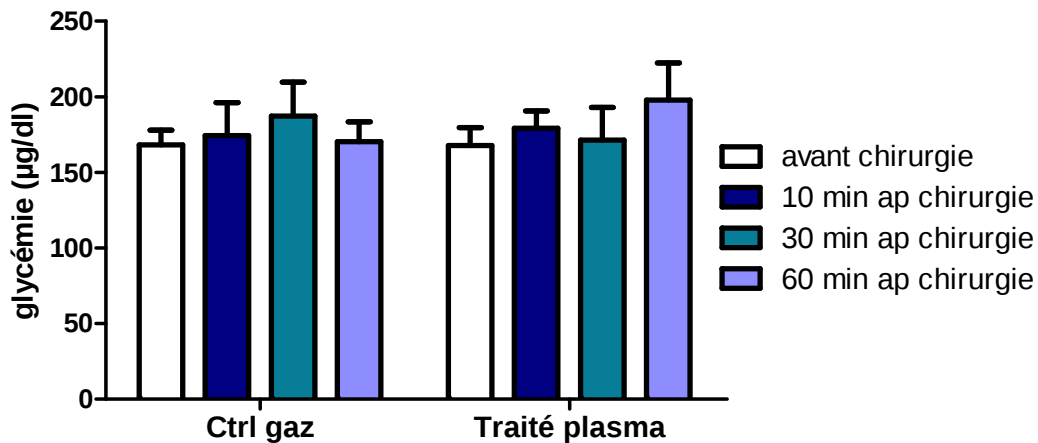


Figure 118 : Impact de la chirurgie et du traitement au plasma gun sur le taux de glycémie

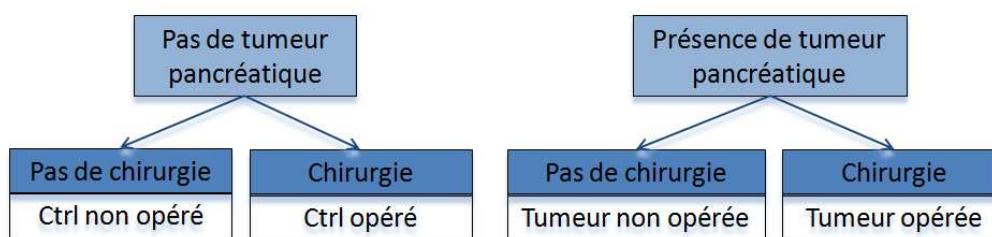
Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=6).

Aucun impact de la chirurgie ni du traitement au plasma gun sur le taux de glycémie des animaux n'a été mis en évidence.

3.3.2.2.2. Impact sur les taux de lipase et amylase

La lipase et l'amylase sont des enzymes digestives sécrétées en majorité par le pancréas. Une augmentation importante de leur taux peut révéler une lésion pancréatique. Ces deux enzymes ont donc été dosées au titre de biomarqueurs.

Pour cela, quatre groupes d'animaux (n=3) ont été étudiés :



Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 119.

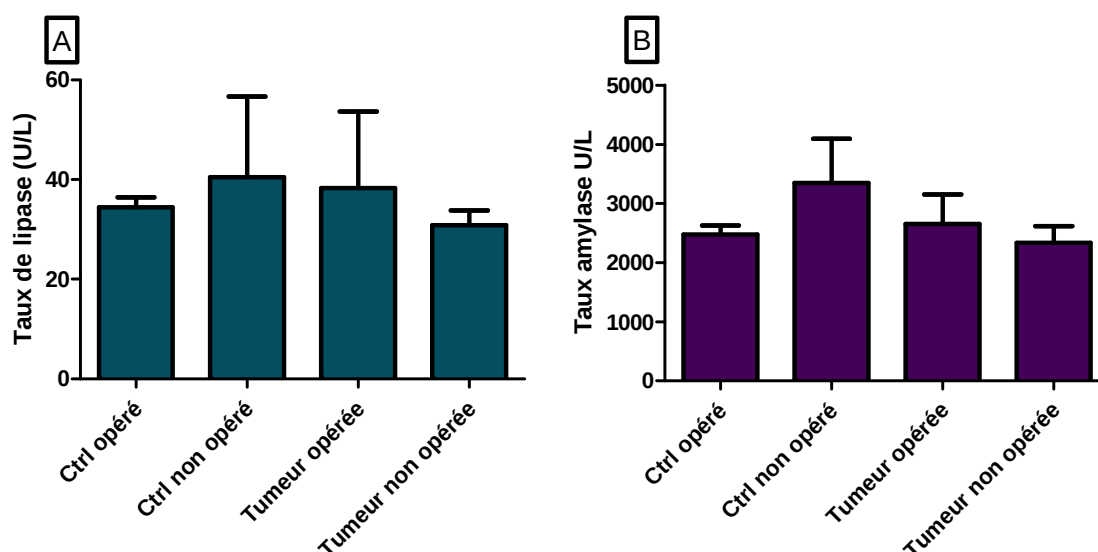


Figure 119 : Impact de l'acte chirurgical sur la sécrétion de lipase (A) et amylase (B)

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=3).

Nous n'avons pas observé d'effet de la chirurgie ni de la présence de tumeur sur les taux plasmatiques de lipase et amylase mesurés 24 h après l'acte chirurgical. Afin de s'assurer de ce résultat des mesures à des temps plus courts (12h) et plus longs (48h) après la chirurgie pourraient être réalisées.

3.3.2.3. Effet d'une association plasma gun / gemcitabine sur l'inhibition de la croissance tumorale

Afin d'améliorer les effets du traitement au plasma gun hélium, une association avec la gemcitabine a été envisagée.

L'intensité de bioluminescence mesurée après traitement (J10 à J36), rapportée à la valeur de bioluminescence mesurée avant traitement (J3) nous a permis de tracer le graphique suivant représentant l'évolution tumorale en pourcentage de variation de la bioluminescence (figure 120).

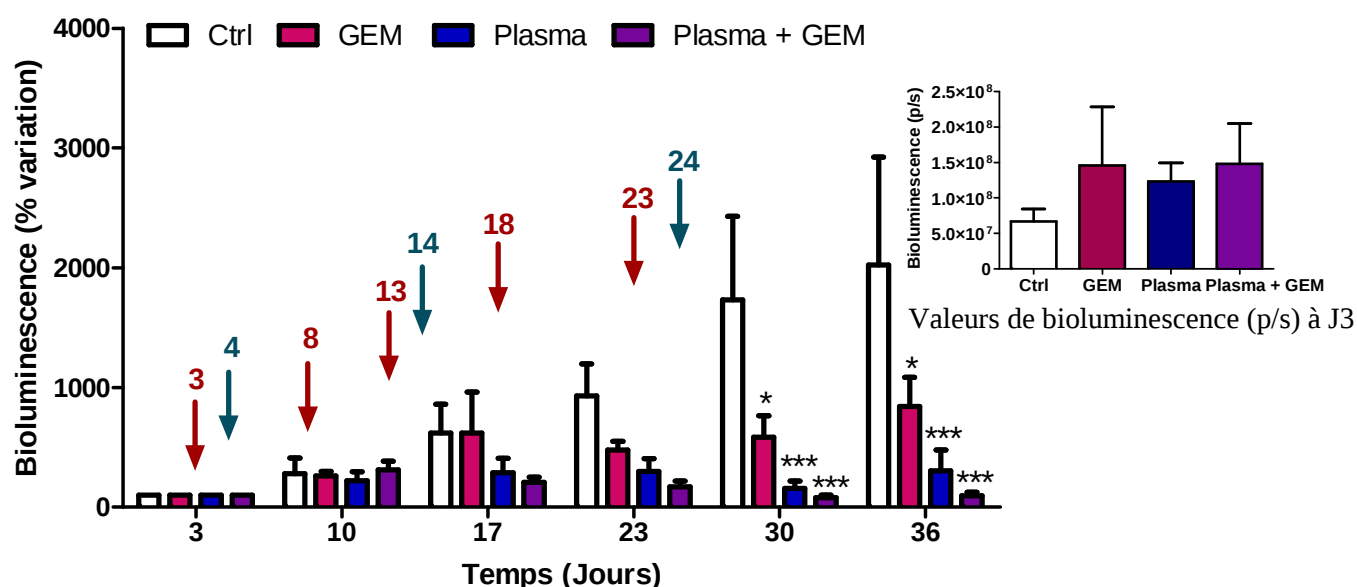


Figure 120 : Comparaison de l'effet d'un traitement au plasma gun seul ou en association à la gemcitabine

Les traitements à la gemcitabine sont représentés par les flèches rouges et les traitements au plasma gun par les flèches bleues. Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=8).

: $p < 0,5$; *: $p < 0,001$ (ANOVA suivie d'un post test Bonferroni)*

Une inhibition importante de la croissance tumorale est observée dès J23 dans les groupes traités et plus particulièrement dans les groupes ayant reçu le traitement au plasma gun. Cette observation se confirme à J30 où les différences entre traités et témoins sont statistiquement significatives. L'association plasma gun/gemcitabine semble améliorer l'effet antitumoral par rapport au traitement à la gemcitabine seule ou au plasma gun seul.

Afin de confirmer les résultats obtenus en bioluminescence, le volume tumoral a été mesuré lors de chaque traitement au plasma gun ainsi que le jour de l'autopsie. Les résultats sont présentés figure 121.

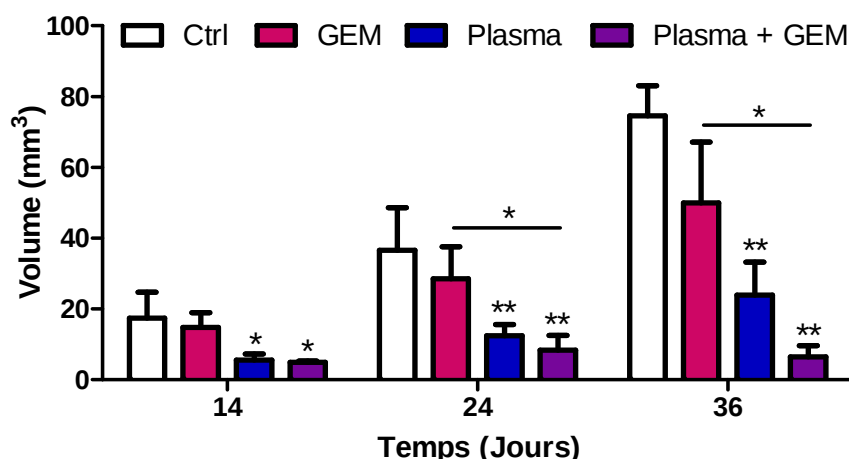


Figure 121 : Evolution du volume tumoral

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=8).

** : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (Analyse de variance)*

Les résultats obtenus après mesure du volume tumoral sont en accord avec ceux obtenus par imagerie de bioluminescence. Dès J14, une inhibition de la croissance tumorale est observée pour les groupes traités au plasma associé ou non à la gemcitabine. A partir de J24, pas d'effet significatif de la gemcitabine sur l'inhibition de la croissance tumorale mais un effet de la bithérapie par rapport au groupe contrôle et par rapport au groupe gemcitabine seule est obtenu. Ces effets persistent jusqu'au jour de l'autopsie (J36).

La masse tumorale a été évaluée le jour de l'autopsie, après excision de la tumeur primaire. La moyenne des masses tumorales de chaque groupe est représentée par la figure 122.

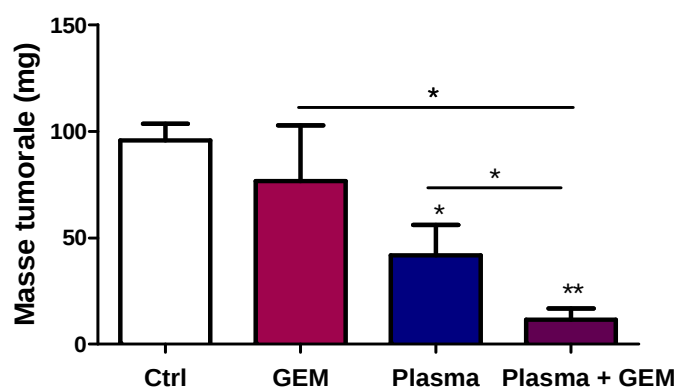


Figure 122 : Masse tumorale le jour de l'autopsie (J36)

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=8).

**: $p < 0,5$; **: $p < 0,01$ (Test de Mann Whitney)*

La moyenne des masses tumorales confirme tous les résultats obtenus précédemment soit un effet antitumoral du plasma seul et du plasma + gemcitabine par rapport au groupe contrôle et par rapport au groupe gemcitabine seule.

Une augmentation de l'effet du plasma est observée lorsque celui-ci est associé à la gemcitabine. Dans ces conditions, la masse tumorale est diminuée de 88 % par rapport au groupe contrôle et de 85 % par rapport au groupe gemcitabine seule. Une différence significative entre le groupe plasma seul et le groupe plasma + gemcitabine est observée, montrant une diminution de 73 % de la masse tumorale lors du traitement en association.

3.4. Discussion

Nous avons observé des effets importants du plasma gun sur l'inhibition de la croissance cellulaire *in vitro* et de la prolifération tumorale *in vivo*. Ces effets se sont avérés d'autant plus importants que la fréquence de traitement était augmentée (2 kHz) et que le gaz utilisé était l'hélium. L'augmentation de la fréquence a permis d'accroître la quantité d'espèces réactives délivrées au niveau de l'échantillon. Des études en cours devraient permettre de déterminer si cette augmentation de la concentration d'espèces produites est proportionnelle à la fréquence. Le flux de gaz et la nature du gaz semblent aussi jouer un rôle non négligeable. Concernant l'augmentation du débit de gaz, elle permet de limiter l'élévation de température à la surface de l'échantillon et génère un accroissement de la connexion du plasma à la masse, aboutissant dans une moindre mesure à une stabilisation du jet de plasma. En effet, si la connexion est trop forte, le plasma devient instable et le mode « jet de plasma » subit une transition vers le mode « arc électrique ». Il est donc indispensable de jouer sur le temps de traitement et le flux de gaz afin d'obtenir une connexion optimale au cours du temps. D'autre part, le plasma néon, plus instable que le plasma hélium (de par sa tension de claquage plus faible), semble moins efficace sur l'inhibition de la croissance tumorale, mais ce résultat demande à être confirmé.

Les effets antitumoraux du plasma gun ont pu être améliorés par combinaison avec la gemcitabine. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la gemcitabine présente en plus de ses effets cytotoxiques, des propriétés radiosensibilisantes sur les cellules tumorales humaines et murines, et notamment sur les cellules tumorales d'origine pancréatique (Cardillo, et al., 2002, Lawrence, et al., 1996, Shewach and Lawrence, 1996). Le mécanisme de

radiosensibilisation de la gemcitabine est encore mal connu mais il a été suggéré que la gemcitabine induirait une diminution du taux de Deoxyadénosine Triphosphate (dATP) entraînant une accumulation des cellules MIA PaCa2 en phase S (Yip-Schneider, et al., 2001) et conduisant à l'inhibition de la synthèse d'ADN. Ces effets s'apparentent à ceux observés lors d'un traitement par radiothérapie qui montrent une modulation du cycle cellulaire par incorporation au niveau de l'ADN de difluoro-dCTP (métabolite de la gemcitabine) conduisant à un blocage en phase S (Latz, et al., 1998).

Ainsi, la combinaison avec la gemcitabine a permis d'améliorer l'efficacité thérapeutique du plasma gun en augmentant l'activation de la voie apoptotique. Des analyses complémentaires sont à envisager afin de déterminer l'interaction pharmacologique des deux traitements. Dans notre cas, soit les deux thérapeutiques interagissent entre elles de manière positive et l'effet est synergique, soit il n'y a pas d'interaction, l'effet est alors simplement additif. Pour cela, des modèles mathématiques d'études pharmacologiques d'interactions tels que le modèle de Chou et Talalay pourraient être mis en œuvre (Chou and Talalay, 1976). Ce modèle mathématique basé sur des analyses d'interactions enzymatiques, permet d'étudier les effets résultant de l'utilisation de plusieurs anticancéreux et la modélisation peut être réalisée sur une approche plus large, non restreinte au cas de médicaments ayant le même mode d'action. De plus, cette méthode peut s'étendre à l'analyse de plus de deux agents, utilisés à de multiples niveaux de doses tout en permettant une analyse relativement simple des données (Raymond, et al., 2001).

A partir des résultats que nous avons obtenus et qui sont particulièrement encourageants, les perspectives pouvant être envisagées afin d'améliorer l'effet antitumoral du plasma gun sont multiples. Les prochains essais pourraient être basés d'une part sur une augmentation des doses de plasmas délivrées à l'animal (par augmentation de la fréquence de traitement par exemple), et d'autre part, sur l'association à d'autres molécules anticancéreuses ayant démontré des effets significatifs et supérieurs à la gemcitabine. En ce qui concerne ces autres chimiothérapies possibles, il pourrait s'agir par exemple de combinaisons de molécules comme le Folfirinox (association de 4 molécules: oxaliplatine, irinotecan, 5-fluorouracile et acide folinique) qui a démontré chez des patients atteints de cancer du pancréas une augmentation de la survie moyenne de 4 mois, sans impact négatif sur la qualité de vie des personnes par rapport à un traitement avec la gemcitabine (Conroy, et al., 2011). Dans ce cas, la combinaison plasma gun / chimiothérapie mettant en œuvre des molécules présentant des mécanismes d'action différents, dont le 5-FU, qui possède comme la gemcitabine des

propriétés radiosensibilisantes (Byfield, 1989). Toujours dans ce contexte, la combinaison avec des molécules plus récentes tels que le Sunitinib un inhibiteur des tyrosines kinases ou l'Évérolimus un immunosuppresseur de la classe des inhibiteurs de la protéine m-TOR qui ont aussi démontré une amélioration de la survie des patients (Walter, et al., 2012) pourrait être considérée.

Pour conclure, à partir des résultats que nous avons obtenus ainsi que la bonne tolérance du plasma gun par l'animal et la possibilité de réaliser des traitements locorégionaux ouvrent de nouvelles perspectives pour le traitement de cancers localisés mais non opérables compte tenu des risques associés à l'intervention comme c'est le cas lors de l'extension du processus tumoral aux canaux pancréatiques et biliaires.

Ce travail fait l'objet d'une publication, présentée en Annexe, et soumise à Cancer Letters.

Chapitre 4

Autres développements d'intérêt pour l'imagerie en cancérologie expérimentale

4. *Autres développements d'intérêt pour l'imagerie en cancérologie expérimentale*

Des outils pour l'évaluation et l'optimisation de modèles oncologiques par imagerie *in vivo* et *ex vivo* ont été développés ou mis en œuvre.

Le premier développement que nous proposons porte sur l'optimisation des conditions d'obtention d'un modèle reproductible de métastases osseuses, ainsi que sur la caractérisation de ces foyers tumoraux.

Le deuxième axe d'intérêt majeur auquel nous nous sommes intéressés concerne l'imagerie des vaisseaux et a consisté à mettre en place une méthode permettant une imagerie *ex vivo* à haute résolution de la vascularisation afin d'évaluer de manière quantitative les effets d'une nouvelle thérapie sur le remodelage vasculaire.

4.1. Modèle de métastases osseuses PC3M-lucC6

L'objectif de cette étude a été de mettre en place un modèle de métastases osseuses par injection de cellules de carcinomes prostatiques bioluminescentes (PC3M-C6 luc) soit directement au niveau de l'os, soit en intracardiaque, et de caractériser la croissance tumorale, la localisation ainsi que la nature des lésions osseuses par différentes modalités d'imagerie (Bioluminescence, TDM X et TEMP). Les techniques développées permettront de répondre aux problématiques des chercheurs visant par exemple à évaluer l'efficacité de stratégies thérapeutiques innovantes ou la physiopathologie de nouvelles lignées tumorales ciblant l'os. En effet, l'os représente le troisième site métastatique après le poumon et le foie et certains cancers ont de grandes propensions à envahir le squelette. Les cancers du sein, de la prostate et des poumons représentent à eux seuls 80 % de toutes les métastases osseuses (Maccauro, et al., 2011).

4.1.1. Etude bibliographique

4.1.1.1. Le cancer de la prostate

En France et dans les pays occidentaux en général, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme. Son taux d'incidence en 2010 est de 128,8 pour 100 000 hommes (source INCa, 2010). C'est un cancer de bon pronostic avec une survie relative à 5 ans supérieure à 80 % (source INCa, 2010).

Les métastases osseuses, impliquées dans plus de 70% des décès, sont la première cause de mortalité des patients atteints d'un cancer de la prostate.

4.1.1.2. Les métastases osseuses

Les métastases osseuses surviennent au cours de l'évolution de certains cancers, et sont retrouvées principalement dans les cancers du poumon, de la prostate, du rein, du sein et de la thyroïde (Coleman, et al., 2008). Leur survenue est un signe de mauvais pronostic, car elles témoignent d'une dissémination de la maladie

Les métastases osseuses se développent à partir de l'envahissement des capillaires sanguins de la moelle hématopoïétique. Elles causent un déséquilibre dans la balance ostéolyse/ostéogénèse, c'est-à-dire entre l'activité des ostéoblastes, cellules qui fabriquent de l'os et l'activité des ostéoclastes, cellules qui détruisent l'os (Coleman, et al., 2008). On distingue 3 types de métastases osseuses : les métastases lytiques (situation la plus fréquente), les métastases ostéocondensantes et les métastases mixtes.

Le tropisme des cellules métastatiques implique des mécanismes de migration et d'invasion cellulaire faisant intervenir différentes molécules (chémokines, cytokines, protéases, intégrines) qui permettent l'implantation des cellules dans le tissu osseux (Mishra, et al., 2011, Steeg, 2006).

Les étapes de la dissémination et de la colonisation métastatique sont les suivantes :

- **Détachement cellulaire et invasion** de la matrice extracellulaire : cette étape va mettre en jeu des molécules d'adhésion (afin de permettre l'ancrage cellulaire) et des protéases extracellulaires (afin de dégrader la matrice) et des facteurs de mobilité.
- **L'intravasation**, c'est-à-dire le passage dans la circulation sanguine ou lymphatique. Lors de cette étape, les cellules acquièrent des capacités de migration et d'adhérence à l'endothélium capillaire, en exprimant notamment des intégrines.
- **Survie dans la circulation** : les cellules ne vont pas proliférer, elles doivent lutter contre les agressions mécaniques, telles que la pression sanguine, et résister aux cellules du système immunitaire. Pour cela, elles vont interagir avec des plaquettes par l'intermédiaire de molécules d'adhésion et s'agréger entre elles afin de se bloquer dans les petits capillaires.
- **L'extravasation** du système circulatoire va nécessiter un contact entre les cellules tumorales et les cellules de l'organe cible. Une fois arrivées sur le site osseux, les cellules métastatiques vont produire des protéases à sérines et des métalloprotéases (MMPs) qui vont permettre de dégrader localement la matrice extracellulaire et d'envahir la moelle osseuse.
- **Survie et prolifération au niveau du site métastatique** : afin de survivre, les cellules tumorales vont s'ancrer dans le tissu grâce aux molécules d'adhésion qu'elles expriment et vont proliférer grâce à la production de facteurs de croissance.

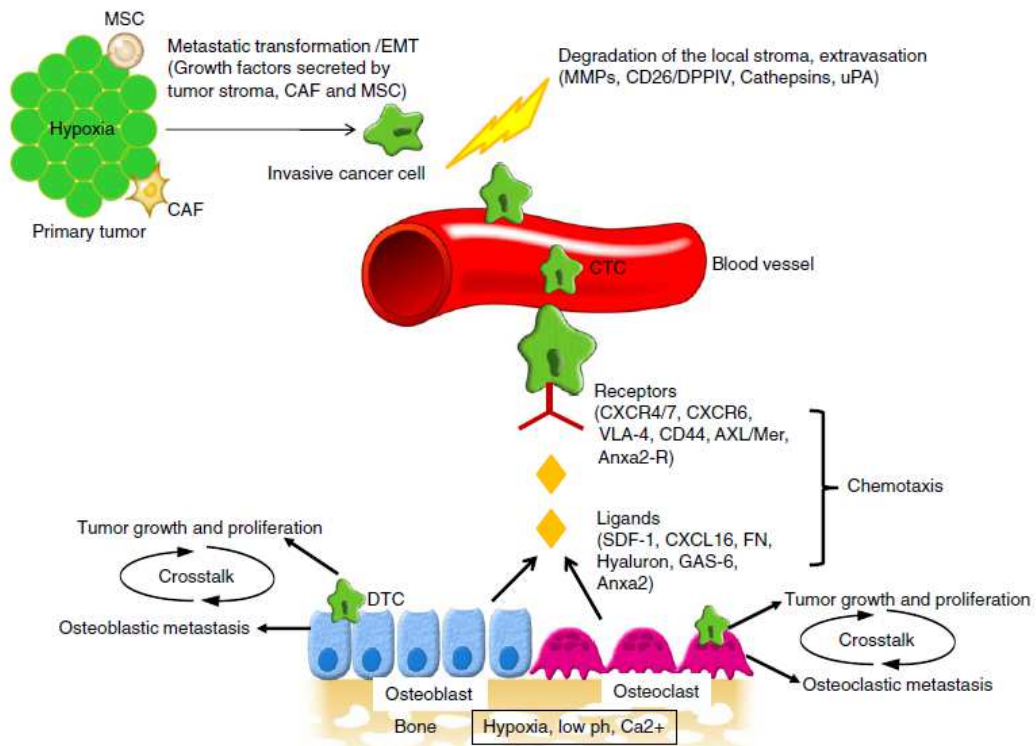


Figure 123 : Principe de la dissémination métastatique

(Mishra, et al., 2011)

4.1.1.2.1. Les métastases osseuses ostéolytiques

L'ostéolyse est principalement la conséquence d'une activation des ostéoclastes par les cellules tumorales et n'est pas due à une dégradation directe de l'os par ces cellules tumorales ostéolytiques (Clines and Guise, 2005). Elles vont sécréter différents facteurs qui vont stimuler l'activité des ostéoclastes et inhiber celle des ostéoblastes, conduisant ainsi à l'ostéolyse (figure 124).

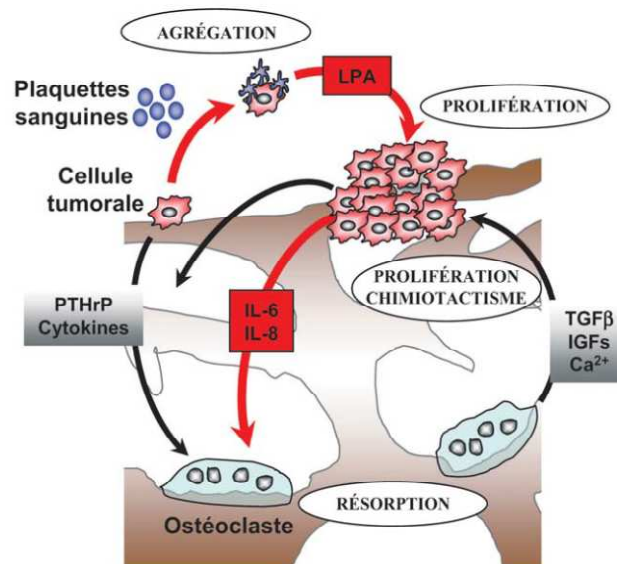


Figure 124 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'une métastase ostéolytique

Les cellules tumorales produisent de nombreux facteurs dont la PTHrP et des cytokines qui stimulent la résorption osseuse. Les facteurs de croissance et le Ca^{2+} libérés de la matrice osseuse résorbée stimulent la prolifération cellulaire et le recrutement de nouvelles cellules tumorales au site métastatique et augmentent la sécrétion des facteurs pro-ostéoclastiques (PTHrP, PGE2). L'interaction des cellules tumorales avec les plaquettes sanguines induit l'agrégation plaquettaire et la formation d'acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA va agir directement sur la prolifération tumorale et indirectement sur la résorption osseuse en stimulant la sécrétion des interleukines pro-ostéoclastiques IL-6 et IL-8. Le développement tumoral, la résorption osseuse et l'agrégation plaquettaire sont des phénomènes qui s'entretiennent mutuellement (Peyruchaud, 2007).

Les facteurs spécifiques du tissu osseux jouant un rôle important dans la formation des métastases osseuses sont les suivants :

- Le Transforming Growth Factor β (TGF β), sécrété par les ostéoblastes et incorporé dans la matrice osseuse, peut être libéré lors de la résorption par les ostéoclastes. Le relargage de TGF β va agir directement sur les cellules tumorales en augmentant la sécrétion de PTHrP (ParaThyroid Hormone-related Protein) et de prostaglandine E2 (PGE2) ce qui va induire une stimulation de la résorption osseuse (Guisse, 2000, Hiraga, et al., 2006, Yin, et al., 1999).
- L'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) exerce *in vitro* une action chimiotactique et mitogène sur les cellules tumorales (Guisse and Mundy, 1998).
- Les interleukines sont d'autres molécules du tissu osseux, elles vont moduler le remodelage osseux et agir sur la différenciation et l'activité des ostéoclastes (Mundy, 1993). Ces interleukines pourraient aussi intervenir dans la formation des métastases osseuses.

4.1.1.2.2. Les métastases osseuses ostéocondensantes

Contrairement aux mécanismes rencontrés dans l'ostéolyse maligne, les cellules tumorales sécrètent cette fois différents facteurs qui inhibent l'activité des ostéoclastes et stimulent celle des ostéoblastes, conduisant ainsi à une ostéocondensation des métastases (figure 125).

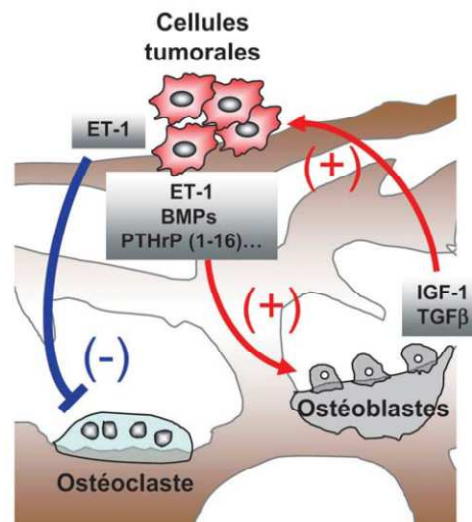


Figure 125 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'une métastase ostéocondensante

Les facteurs produits par les cellules tumorales inhibent l'activité des ostéoclastes (ET-1) et stimulent celle des ostéoblastes (ET-1, BMPs, PTHrP). Au cours de la formation osseuse, les facteurs de croissance (IGF-1, TGFβ) produits par les ostéoblastes stimulent la progression tumorale. Le développement tumoral et la formation osseuse s'entretiennent mutuellement (Peyruchaud, 2007).

Le facteur jouant un rôle primordial dans la formation des métastases ostéocondensantes est l'endothéline-1 (ET-1), facteur dont l'effet mitogène sur les ostéoblastes, stimule la formation osseuse (Logothetis and Lin, 2005) et dont l'effet inhibiteur sur les ostéoclastes empêche la résorption osseuse (Chiao, et al., 2000).

D'autres facteurs pro-ostéoblastiques sont impliqués dans les processus d'ostéocondensation et vont stimuler la prolifération. Il s'agit des facteurs de croissance tels que le VEGF et le PDGF, ainsi que les BMPs (Bone Morphogenic Proteins) qui vont favoriser la différenciation des ostéoblastes (Logothetis and Lin, 2005).

Les travaux de recherche préclinique ont permis de mieux comprendre les raisons pour lesquelles certains cancers induisent des métastases ostéolytiques et d'autres des métastases

ostéocondensantes. L'amélioration des méthodes d'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des métastases osseuses et la mise au point de modèles animaux représentatifs des situations observées chez l'homme permettront de développer des approches thérapeutiques encore plus spécifiques.

4.1.2. Matériels et méthodes

4.1.2.1. Les cellules PC3M-lucC6

La lignée PC3 a été obtenue à partir d'une métastase osseuse d'un patient atteint d'adénocarcinome prostatique androgénorésistant de grade IV (Kaighn, et al., 1979). Il s'agit d'une tumeur extrêmement agressive *in vivo* comme *in vitro* qui sert couramment de modèle pour le cancer de la prostate (Faintuch, et al., 2011) et permet de générer des tumeurs osseuses.

La lignée cellulaire luminescente PC3M-lucC6 Bioware® (Caliper Life Science, USA) a été obtenue par transfection stable du gène de la Luciférase Firefly Nord Américaine, exprimée à partir du promoteur SV40 (1500 photons/secondes/cellules).

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm², dans du milieu MEM (Gibco) supplémenté avec du SVF (10%) (VWR), de la L-glutamine (5 mM), du pyruvate de sodium (1 mM) et des acides aminés essentiels (1%). Les cellules sont maintenues en croissance à 37°C sous 5% de CO₂.

4.1.2.2. Induction tumorale et animaux

Ces cellules étant d'origine humaine, nous avons utilisé des souris immunodéficientes BalbC nude femelles âgées de 6 semaines (Charles River, France), les animaux étant hébergés selon les conditions décrites paragraphe 2.2.2.2.

Afin de générer des lésions osseuses, 2 techniques d'injections sont possibles : par voie intra-osseuse et par voie intracardiaque.

4.1.2.2.1. La voie intra-osseuse

Nous avons injecté 1 million de cellules PC3M-lucC6 en phase exponentielle de croissance sous un volume de 5 μ l dans la tête osseuse du tibia gauche, au niveau de l'os spongieux, lieu de l'hématopoïèse, afin de favoriser l'apparition de lésions osseuses qui représentent le développement local d'une tumeur maligne plus qu'une vraie métastase localisée dans l'os après embolisation vasculaire. Cette procédure d'injection a été mise au point sur la base données bibliographiques (Corey, et al., 2002). Afin de standardiser les injections et de limiter la variabilité, le positionnement de l'aiguille a été validé par radiographie X (figure 126).

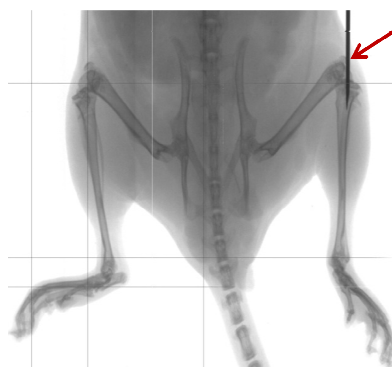


Figure 126 : Imagerie X planaire du positionnement de l'aiguille lors d'une injection intra osseuse

4.1.2.2.2. La voie intracardiaque

Pour obtenir des métastases osseuses, il est bien décrit qu'il est nécessaire d'injecter les cellules au niveau du ventricule gauche de la souris afin que les cellules se distribuent dans la circulation systémique, diffusent dans tout l'organisme et colonisent différents sites osseux. Dans le cas d'une injection au niveau du sang veineux, par voie i.v. conventionnelle ou après injection dans le ventricule droit, les cellules vont dans la circulation pulmonaire et restent localisées au niveau du poumon et du foie (Cf. chapitre 1 domiciliation cellulaire).

Cette contrainte d'injection dans le ventricule gauche constitue une étape critique dans la réussite de l'étude car il est impossible, lors de l'administration des cellules de connaître la position de l'aiguille et le taux de prise de greffe n'est que de 60-70%. Des méthodes de

contrôle qualité de l'injection ont été développées en bioluminescence, fluorescence ou scintigraphie, mais ces méthodes qui permettent de visualiser la distribution des cellules dans les minutes qui suivent l'injection des cellules ne permettent pas d'éviter une mauvaise injection (ventricule droit ou à côté). Il est donc particulièrement opportun de réaliser un contrôle qualité avant l'injection des cellules et l'une des approches que nous avons retenue est la mesure du signal de pression intraventriculaire qui permet de valider la position gauche du cathéter.

4.1.2.3. Mesure de la pression ventriculaire

Les signaux de pression endocavitaires ont un profil spécifique par rapport aux signaux de pression artérielle systémique. De plus, dans le ventricule droit, la pression systolique mesurée chez la souris est de l'ordre de 30 mmHg alors qu'elle atteint 110 mmHg dans le ventricule gauche (Joho, et al., 2007).

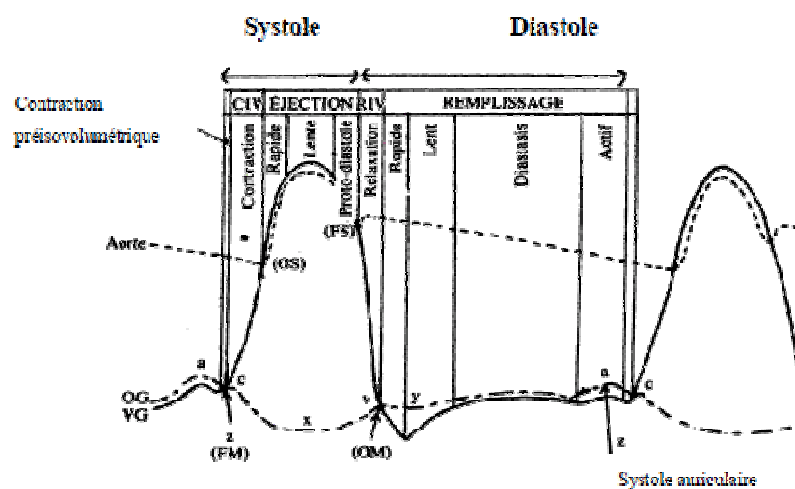


Figure 127 : Courbe de pression ventriculaire, auriculaire et aortique

(Source : Medix cours de médecine 2003/2011)

Afin de réaliser la mesure de pression intracardiaque, un cathéter implanté dans le ventricule de la souris a été relié à un capteur de pression, lui-même relié à l'appareil de mesure (Statham P23XL) (figure 128).

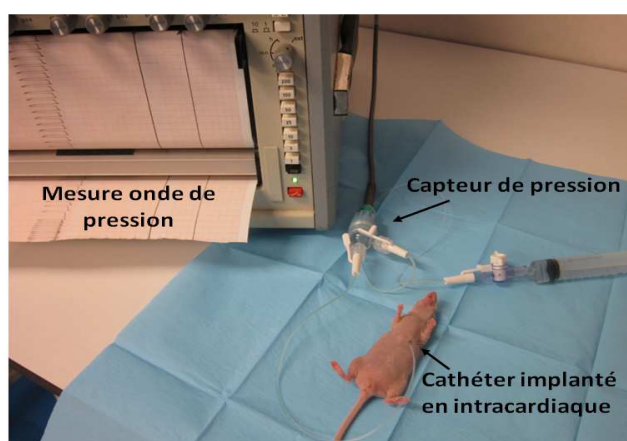


Figure 128 : Mesure de la pression ventriculaire par implantation d'un cathéter en intracardiaque

Une fois la position du cathéter validée au niveau de ventricule gauche, $2 \cdot 10^6$ cellules PC3M-lucC6 sont injectées sous un volume de 100 μl dans du PBS 1X.

4.1.2.4. Imagerie de bioluminescence

Le suivi de l'évolution tumorale et de la dissémination métastatique a été réalisé par imagerie de bioluminescence, selon les paramètres décrits paragraphe 2.2.2.4.

4.1.2.5. Marquage des cellules PC3M-lucC6 à l' ^{111}In

Les cellules PC3M-lucC6 ont été marquées *via* du NHS-DOTA à l' ^{111}In . Cette modalité de marquage sur les protéines membranaires a été préférée à celle classiquement utilisée pour le marquage intracellulaire des granulocytes en Médecine Nucléaire, *via* l'oxinate (8-hydroxyquinoléine) d'indium (BertrandCaix, et al., 1996), afin d'éviter le risque d'induction de l'apoptose due à la cytotoxicité de l'oxynate (Gholamrezanezhad, et al., 2009). La procédure de marquage des cellules était la suivante : 20 millions de cellules PC3M-lucC6 ont été conjuguées à 45 μg de NHS-DOTA. Après 2h d'incubation à température ambiante, les cellules dérivées au NHS-DOTA ont été centrifugées. Le culot de cellules a ensuite été radiomarké avec 260 MBq d' $^{111}\text{InCl}_3$ (Covidien) (préalablement neutralisé et ramené à pH 6,2). L'activité volumique finale mesurée, après marquage des cellules, était de 55 MBq/ml et

la viabilité cellulaire (mesurée au bleu trypan) supérieure à 70 %. Les cellules ont ensuite été injectées en intracardiaque au niveau du ventricule gauche sous contrôle de la pression intraventriculaire comme décrit précédemment.

4.1.2.6. Radiomarquage du MDP au ^{99m}Tc

Le MDP (10 mg) en présence de 1 mg de SnCl_2 , après dissolution dans du NaCl 0,9% (5ml) a été marqué avec 740 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (pertechnétate) afin d'obtenir une activité volumique finale de 150 MBq/ml. 200 μl de cette solution de ^{99m}Tc -MDP (30MBq) ont été injectés par voie intraveineuse à l'animal.

L'imagerie du métabolisme osseux a été réalisée 1 heure après administration par imagerie TEMP couplée à un scanner X en tant que bimodalité de repérage anatomique

4.1.2.7. Imagerie scintigraphique

Scintigraphie

La correspondance entre l'onde de pression intracardiaque mesurée et le ventricule injecté a été validée par injection de 100 μl de macroagréats d'albumine marqués par 7,4 MBq de ^{99m}Tc puis par imagerie en scintigraphie 2D. Les acquisitions ont été réalisées grâce à une gamma caméra (Gamma Imager, Biospace) avec une matrice de 256 x 256 durant 2 minutes, dans une fenêtre en énergie de 125-155 keV.

Cette gamma caméra dont le photomultiplicateur est à anodes croisées permet d'obtenir des images dont la résolution est de l'ordre de 2 mm.

Tomographie d'Emission Monophotonique

Les images de domiciliation cellulaire après injection de cellules PC3M-lucC6 marquées à l' ^{111}In ainsi que l'étude du métabolisme osseux par injection de ^{99m}Tc -MDP ont été acquises en TEMP (nanoSPECT/CT, Bioscan Inc.). Pour chaque acquisition, 24 projections de 60s ont été réalisées dans une fenêtre d'énergie de 125-155 keV pour le ^{99m}Tc -MDP et dans deux fenêtres d'énergie, 155-188 keV et 220-270 keV, pour l' ^{111}In (ces fenêtres étaient centrées sur

les 2 raies d'émission de l'Indium 111 (171 keV et 245 keV)). La demi-vie de 2,6 jours de l' ^{111}In nous a permis de réaliser une cinétique sur 72h.

Un algorithme de reconstruction (HighSPECT) a été utilisé pour générer des images 3D quantifiables et analysables grâce au logiciel InVivoScope (version 1.44, Bioscan).

Afin de faciliter la localisation des lésions, une imagerie par TDM X (nanoSPECT/CT, Bioscan) a été couplée à l'imagerie TEMP. Pour chaque acquisition, 180 projections avec une énergie de 45 kVp ont été réalisées. Les images 3D ont été obtenues grâce à un algorithme de reconstruction (In VivoScope).

4.1.2.8. Imagerie par tomодensitométrie X à haute résolution

L'imagerie par TDM X à haute résolution nous a permis de réaliser une imagerie anatomique à haute résolution des lésions osseuses.

Le CT120 (General Electric HealthCare) est un scanner de 3^{ème} génération embarquant un système « Step and Shoot », avec le tube à rayons X et le détecteur CCD, de type capteur plan, qui tournent ensemble autour de l'échantillon (Cf. paragraphe 1.1.1.).

Dans le protocole que nous avons mis en œuvre, la tension appliquée au tube était de 100 kVp et le courant de 50 mA. 360 projections ont été réalisées par champs de vue avec un temps d'exposition de 20 ms. Les données brutes ont été reconstruites par méthode analytique avec l'algorithme de Feldkamp (Feldkamp, et al., 1984), en images de 65536 niveaux de gris (16 bits) avec une résolution de 50 μm .

Le traitement et l'analyse des données ont été réalisés avec le logiciel MicroView (Micro View Analysis version 2.3; GE Healthcare).

4.1.2.9. Quantification des lésions observées par Tomодensitométrie X

Afin de réaliser une étude quantitative de la gravité des lésions visualisées par scanner X, une méthode de quantification du volume osseux inspirée des méthodes décrites dans la bibliographie (Sone, et al., 2010) a été mise en place (figure 129).

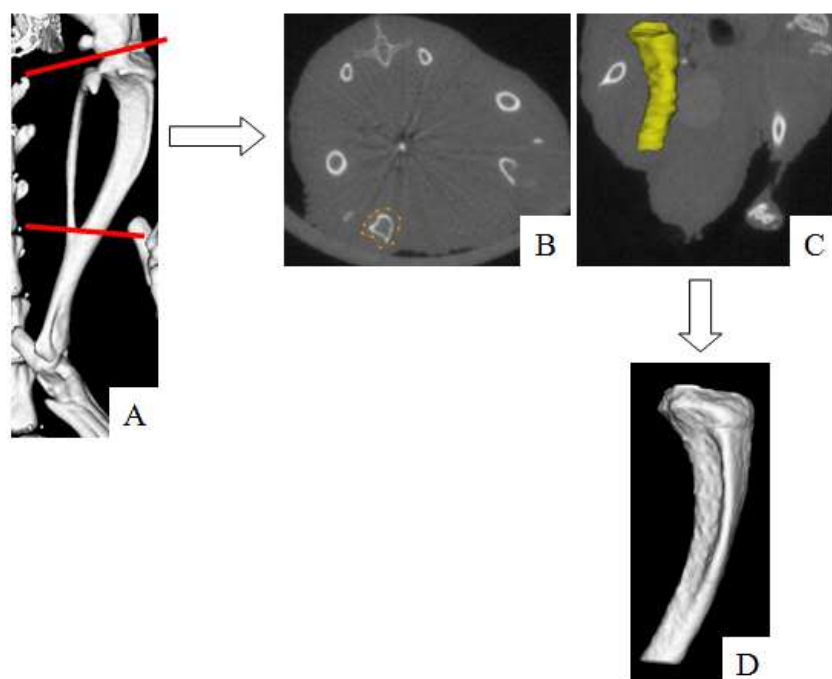


Figure 129 : Méthode de quantification des lésions osseuses

Pour quantifier le volume osseux (en mm^3), des régions d'intérêt ont été tracées sur chaque plan de coupe transversale (B) entre les repères rouge (A) (tête du tibia et la zone d'interaction entre le tibia et le péroné). Une fois la région d'intérêt tracée (C), une reconstitution du volume de celle-ci a été réalisée, en isosurface, avec un seuillage de 350 et un facteur de qualité de surface de 1 (D).

Pour chaque animal, le tibia controlatéral ne recevait pas de cellules tumorales et servait de contrôle (tibia sain). En traçant une région d'intérêt entre la tête du tibia et l'intersection tibia/péroné pour chaque patte, nous avons calculé le rapport tibia atteint/tibia sain afin de déterminer le pourcentage de perte osseuse du tibia présentant des lésions.

4.1.3. Résultats

4.1.3.1. Correspondance entre onde de pression mesurée et ventricule injecté

La correspondance entre l'onde de pression mesurée et le ventricule cardiaque injecté a été validée par injection de macroagréats d'albumine marqués au Technétium^{99m} qui permet une imagerie de la perfusion pulmonaire par embolisation transitoire des capillaires (figure 130).

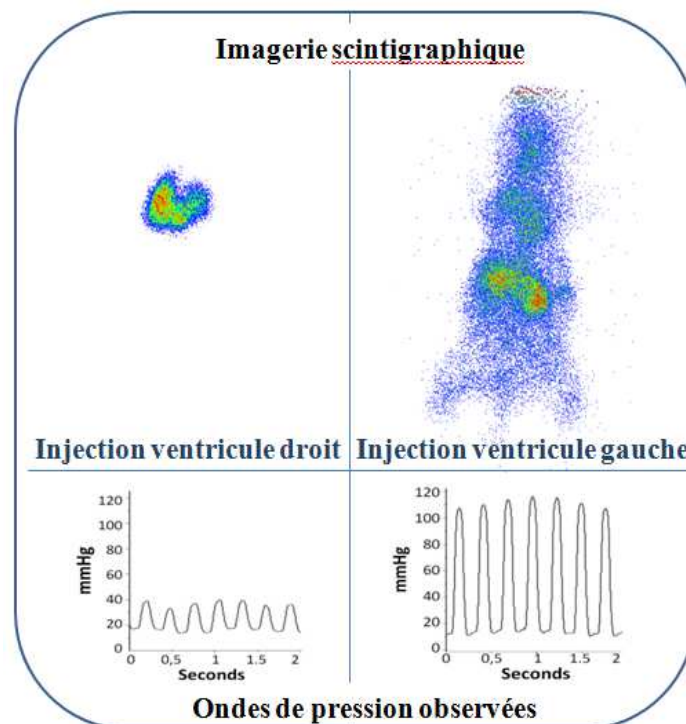


Figure 130 : Validation de l'injection intracardiaque : confrontation de l'imagerie scintigraphique aux mesures de pression

Ainsi, lors d'une injection au niveau du ventricule droit, la pression ventriculaire systolique mesurée est d'environ 20 mmHg, et la distribution des macroagréats d'albumine est (5 minutes après injection) uniquement pulmonaire. Lors d'une injection au niveau du ventricule gauche de la souris, la pression ventriculaire systolique mesurée est de 110 mmHg et la distribution des macroagréats d'albumine (5 minutes après injection) est générale, avec une forte fixation hépatique.

Cette stratégie nous a permis d'évaluer le rapport entre la pression intracardiaque mesurée et la distribution des particules. Ainsi, grâce à la mesure de l'onde de pression, le succès de l'injection peut être prédit, ce qui devrait permettre d'inclure dans un protocole uniquement les souris injectées dans le ventricule gauche et d'améliorer l'homogénéité des lots d'animaux qui présenteront des métastases osseuses.

4.1.3.2. Etude de la domiciliation cellulaire après injection intracardiaque

La domiciliation des cellules PC3M-luc dans les heures suivant l'injection par voie intracardiaque est un phénomène peu documenté que nous avons choisi d'étudier par imagerie tomoscintigraphique. Une cinétique de suivi par imagerie TEMP nous a permis d'apporter des informations concernant ce point.

En fonction du ventricule injecté, nous avons confirmé les résultats de la scintigraphie planaire avec une domiciliation cellulaire clairement différente entre ventricules droit et gauche (figures 131 et 132).

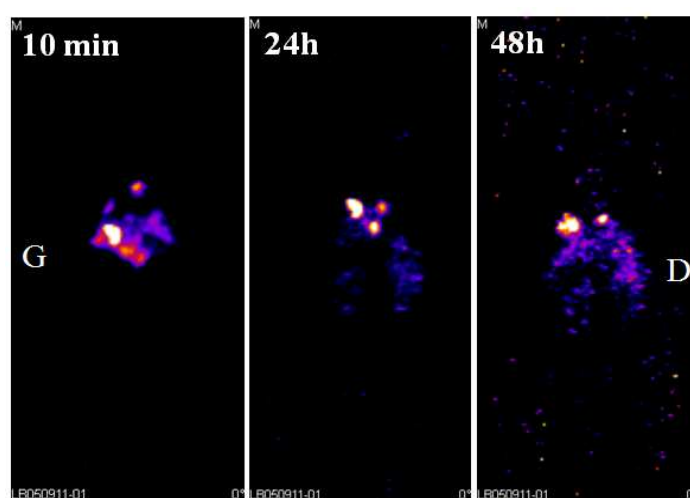


Figure 131 : Domiciliation pulmonaire (emboles) après injection dans le ventricule droit de cellules PC3 marquée à l' ^{111}In

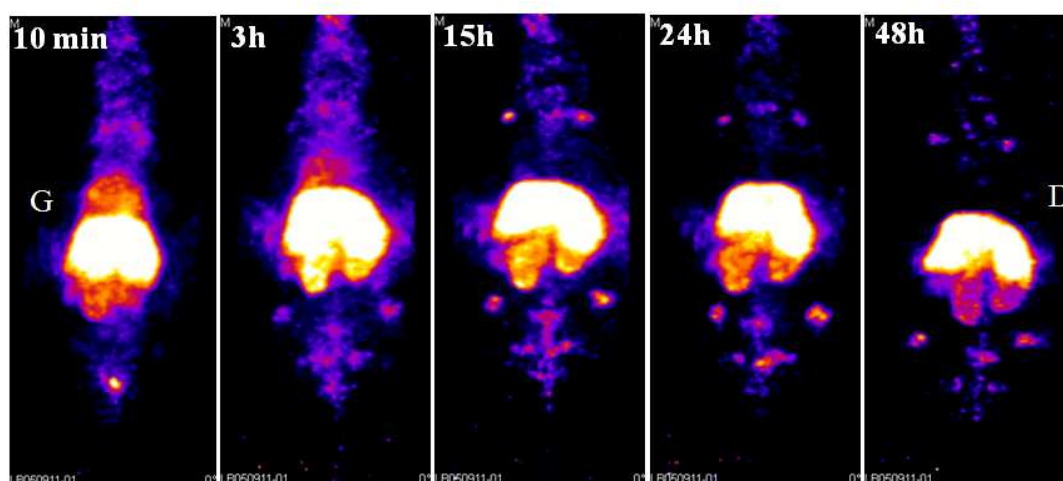


Figure 132 : Domiciliation cellulaire systémique (10 min post injection) puis essentiellement hépatique après injection dans le ventricule gauche de cellules PC3 marquée à l' ^{111}In

Les images obtenues en TEMP confirment que lorsque les cellules sont injectées au niveau du ventricule droit (figure 131), celles-ci restent localisées dans les poumons et se distribuent peu dans l'organisme, après plusieurs heures. Au contraire, lorsque les cellules sont injectées au niveau du ventricule gauche (figure 132), la dissémination dans tout l'organisme est très rapide, dès les premières secondes après injection, et perdure pendant plusieurs jours.

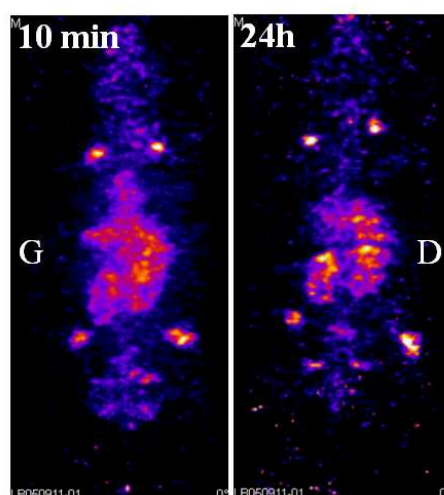


Figure 133 : Domiciliation après injection dans le ventricule gauche d' ^{111}In libre

Toutefois, cette méthode de marquage des cellules PC3M-luc à l' ^{111}In ne nous permet pas de confirmer précisément les sites de domiciliation. En effet, comme nous pouvons l'observer dans la figure 133, après injection d' ^{111}In libre au niveau du ventricule gauche, celui-ci n'est pas totalement éliminé ; il se distribue également au niveau du foie, des reins et des sites osseux, plus particulièrement au niveau des articulations (épaules, rotules). Afin de limiter ces fixations non spécifiques de l'indium libre au niveau des articulations et du foie, une injection complémentaire de DTPA à faible dose, préconisée dans d'autres méthodes de marquage à l' ^{111}In , pourrait être envisagée. En effet, le DTPA, puissant chélatant de l'Indium pourrait améliorer l'élimination par voie urinaire de l'indium libre et ainsi limiter sa fixation hépatique et osseuse. Une alternative pour limiter le bruit de fond articulaire mais non hépatique serait de réaliser une imagerie TEP après marquage des cellules avec du PTSM marqué au cuivre 64, cette modalité ayant par ailleurs l'avantage de ne marquer que les cellules métaboliquement actives (Jalilian, et al., 2007). Cependant, compte tenu de la période du ^{64}Cu (12,7 h), l'étude cinétique serait dans ce cas limitée aux 36 premières heures, ce qui nous conduit à privilégier la SPECT à l' ^{111}In .

4.1.3.3. Suivi de la dissémination métastatique par imagerie

Une fois l'injection dans le ventricule gauche validée, la démarche classique est de réaliser un suivi de la dissémination métastatique par bioluminescence, la positivité des souris signant la présence de métastases.

Toutefois, cette modalité ne permet pas de qualifier la nature (lytique ou condensante) ni de donner des informations sur la sévérité de ces lésions osseuses. C'est pourquoi une approche complémentaire par imagerie multimodalités (anatomique à haute résolution (TDM X) et fonctionnelle (TEMP)) s'avèrera indispensable dans un second temps pour répondre à ces questions.

4.1.3.3.1. La voie intra-osseuse

Suivi de la prolifération métastatique par bioluminescence

Après induction par injection dans le tibia, le suivi de l'évolution tumorale a été réalisé chaque semaine par imagerie de bioluminescence (figure 134).

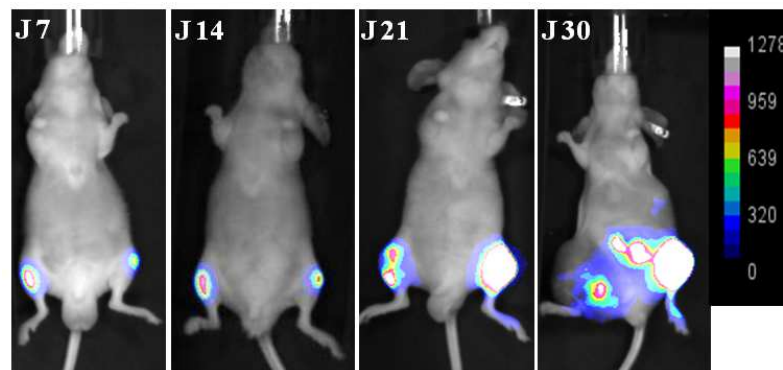


Figure 134 : Evolution tumorale après injection de cellules PC3M-luc en intra-tibial

Dès le 7^e jour post induction les souris sont positives en bioluminescence, la prise de greffe est donc effective. L'évolution tumorale est très rapide et dès le 30^e jour post induction, les souris présentent des tumeurs de taille très importante, environ 3000-4000 mm³ (mesure au pied à coulisse le jour de l'autopsie) et doivent être euthanasiées.

Imagerie anatomique haute résolution des lésions osseuses

Afin de déterminer précisément le volume osseux, une imagerie anatomique par tomодensitométrie X a été réalisée.



Figure 135 : Visualisation des lésions osseuses par scanner X à J21

Vingt et un jours après injection des cellules au niveau de la tête du tibia, les lésions observées au scanner X restent localisées au niveau du site d'injection mais sont nettement visibles (figure 135). Ces lésions sont de natures lytiques puisque une perte de tissu osseux est identifiée.

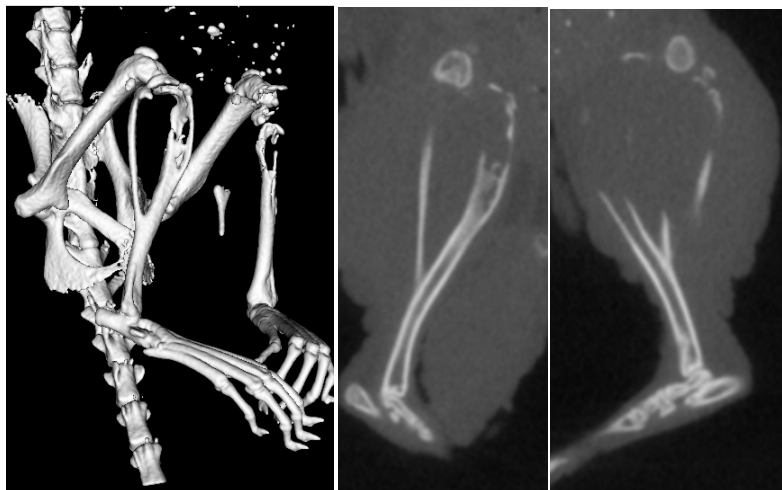


Figure 136 : Visualisation des lésions osseuses par scanner X à J32

Après 32 jours, les lésions osseuses ostéolytiques sont très importantes et génèrent des fractures osseuses au niveau du péroné (figure 136).

La quantification à chaque temps d'imagerie a permis de caractériser l'évolution du volume osseux au cours du temps (figure 137).

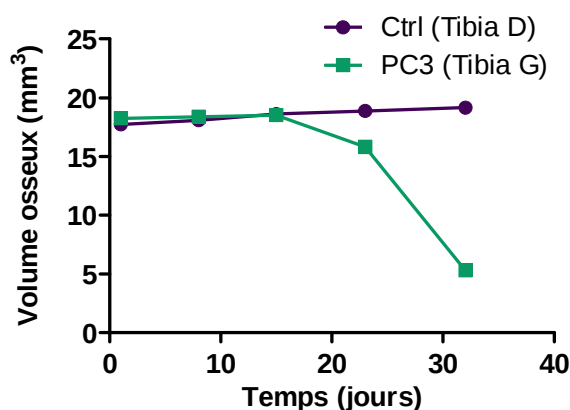


Figure 137 : Comparaison de l'évolution du volume osseux du tibia porteur d'une lésion osseuse par rapport au volume osseux du tibia contrôle

Après injection de cellules PC3M-lucC6 directement dans la tête du tibia, le volume osseux est stable pendant une quinzaine de jours, sans différence avec le tibia contrôle puis diminue très rapidement et après 32 jours, le tibia présente une lyse osseuse très importante nécessitant le sacrifice des animaux. Le volume osseux du tibia controlatéral, ayant reçu une injection de PBS, reste constant dans le temps.

4.1.3.3.2. La voie intra-cardiaque

Suivi de la prolifération métastatique par bioluminescence

Après injection des cellules au niveau du ventricule gauche, un suivi de la dissémination métastatique a été réalisé par imagerie de bioluminescence (figures 138 et 139).

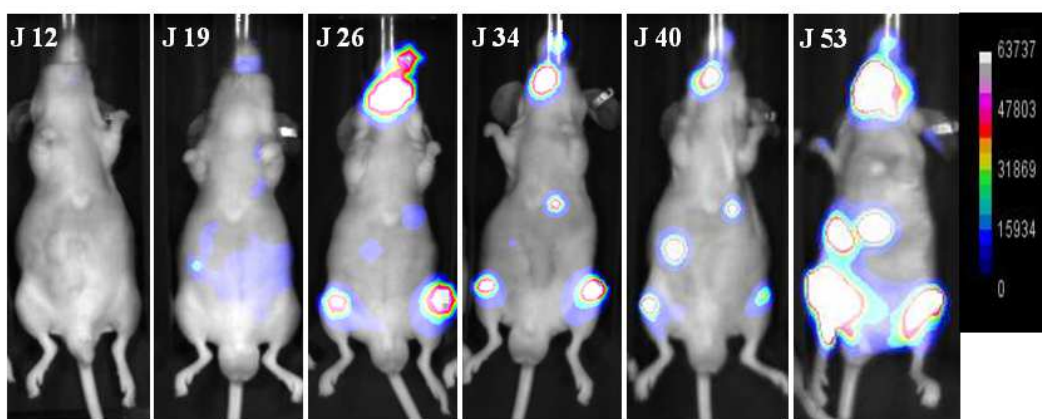


Figure 138 : Evolution de la dissémination métastatique après injection de cellules PC3M-lucC6 en intracardiaque dans le ventricule gauche
(souris face antérieure)

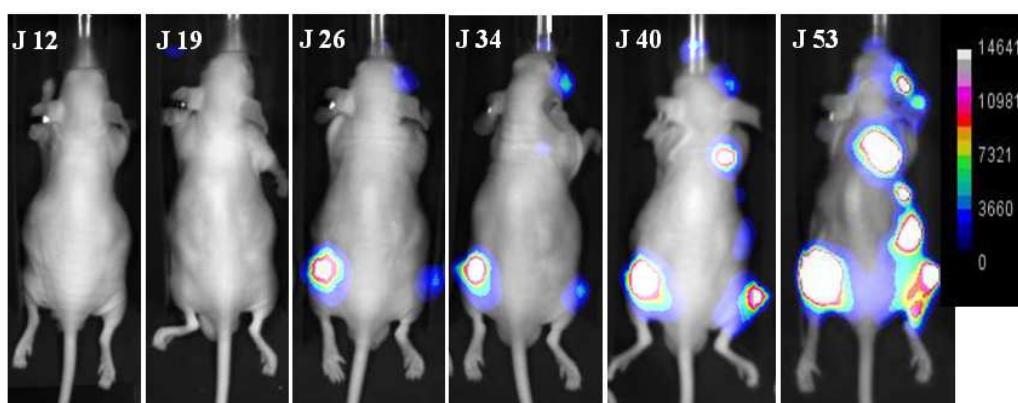
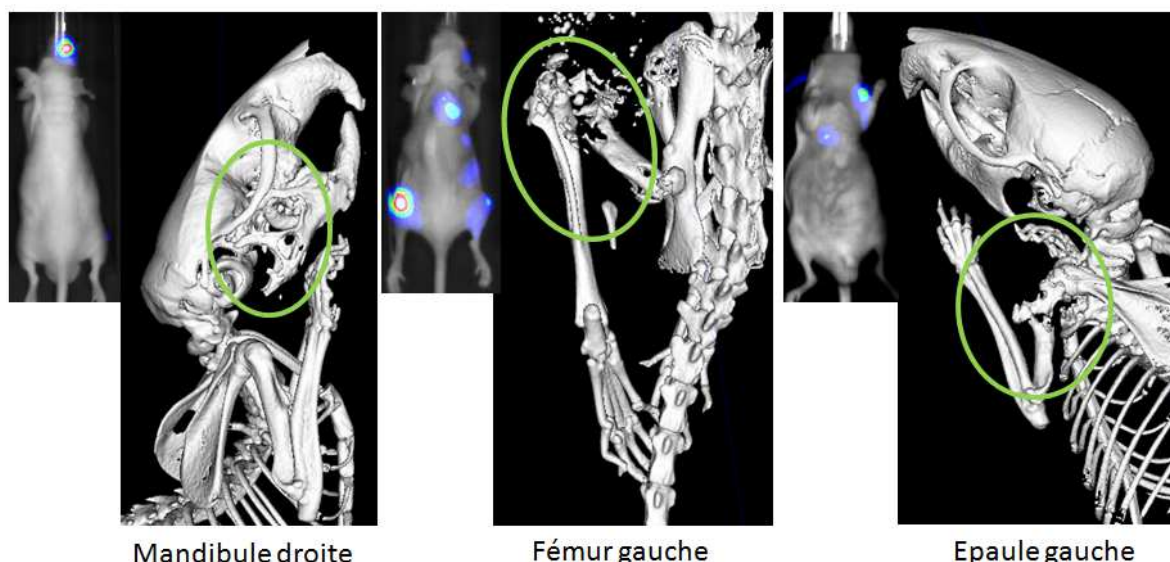


Figure 139 : Evolution de la dissémination métastatique après injection de cellules PC3M-lucC6 en intracardiaque dans le ventricule gauche
(souris face postérieure)

Lorsque les cellules PC3M-lucC6 sont injectées au niveau du ventricule gauche, la prise de greffe est beaucoup plus lente, 20 jours post-induction seulement 30% des souris sont positives. Il faut attendre 30 jours post-induction pour que l'ensemble des souris soient positives en bioluminescence.

Imagerie anatomique à haute résolution des lésions osseuses

Afin de compléter les informations de la bioluminescence (imagerie de la croissance tumorale), une imagerie anatomique à haute résolution a donc été réalisée.



Mandibule droite Fémur gauche Epaule gauche
Figure 140 : Les différentes métastases osseuses observées après induction intracardiaque

Les images obtenues par tomodensitométrie X présentent une bonne concordance avec celles obtenues par imagerie de bioluminescence. En effet, les signaux de bioluminescence présents au niveau des épaules, de la mandibule et des pattes antérieures sont représentatifs de métastases osseuses PC3M-lucC6 ostéolytiques, comme nous le confirment les images obtenues par tomodensitométrie X (figure 140).

Etude de la balance ostéolyse/ostéogénèse par tomoscintigraphie d'émission monophotonique

Afin d'étudier la fonction métabolique de l'os et de valider la nature ostéolytique des métastases osseuses obtenues après injection de cellules PC3M-luc, nous avons choisi d'utiliser comme traceur le Méthylène DiPhosphonate (MDP).

Comme décrit dans la littérature et mis en pratique dans les services de Médecine Nucléaire des hôpitaux, l'imagerie du métabolisme osseux a été réalisée 1 heure après administration de ^{99m}Tc -MDP par imagerie TEMP couplée au scanner X afin faciliter la localisation des lésions (figure 141).

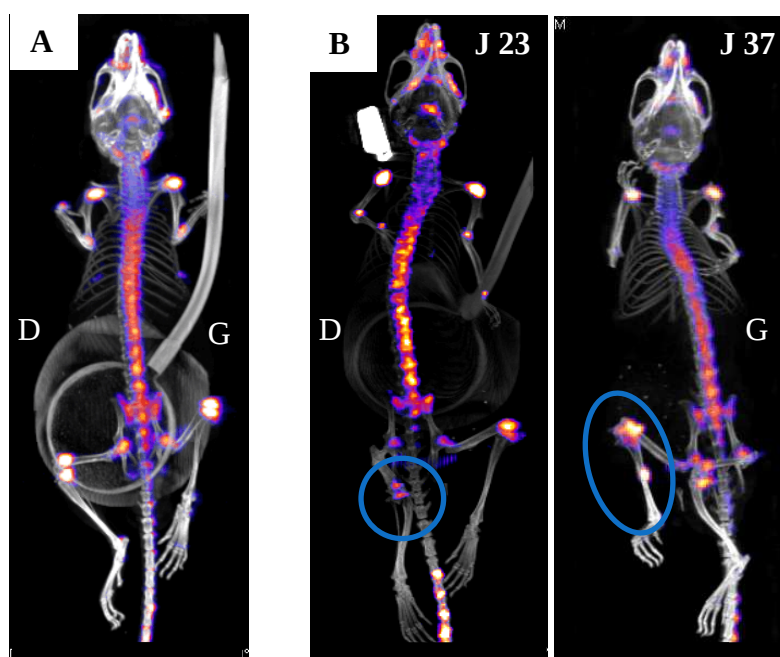


Figure 141 : Imagerie TEMP couplée au scanner X 1h après injection de ^{99m}Tc -MDP à différents stades de la pathologie

A : souris témoin ; B : souris présentant des métastases osseuses au niveau du tibia.

Après injection de ^{99m}Tc -MDP, tous les sites de remodelage osseux, colonne vertébrale, articulations, crâne, sont marqués de façon homogène.

Pour la souris témoin (sans tumeur), une fixation bilatérale identique est observée pour chaque articulation. Pour la souris présentant une tumeur au niveau du tibia droit, 23 jours après induction, un hyposignal est observé par rapport au tibia controlatéral sain. Cet hyposignal observé une hypofixation du MDP et signe la nature ostéolytique de la tumeur.

Lorsque la tumeur est à un stade plus avancée (J37), la masse tumorale, trop importante, entraîne des fractures osseuses notamment au niveau du péroné, conduisant à la mise en place de phénomènes compensatoires comme l'ostéogénèse afin de réparer la fracture. L'ostéogénèse mise en place peut être visualisée dans la figure 141B par apparition d'un hypersignal au niveau du genou et du péroné.

Il est important de combiner les deux modalités d'imagerie afin de valider la nature ostéolytique ou non de la tumeur. La présence de fractures suite à des lésions trop importantes peut biaiser le résultat de la scintigraphie au ^{99m}Tc -MDP, conduisant à caractériser certaines tumeurs d'ostéocondensantes alors qu'elles sont ostéolytiques.

4.1.4. Discussion

Selon l'objectif recherché, deux sites d'injection des cellules tumorales sont envisageables pour obtenir des lésions osseuses.

La méthode par injection directe dans la tête osseuse du tibia est de technicité relativement simple et entraîne l'apparition rapide de lésions très ostéolytiques, avec un rendement de prise de tumeur de 100%, mais du fait d'une croissance de la tumeur primaire trop rapide, ce modèle ne permet pas d'obtenir des métastases à distance et n'est donc pas représentatif de la dissémination métastatique observée chez l'homme. Il peut toutefois être utilisé en première intention dans le cas de screening de molécules par exemple. La voie intracardiaque est la seule voie d'administration, pour les cellules PC3, qui permet de garantir l'obtention de métastases osseuses avec une localisation et une cinétique de croissance plus représentative de la pathologie humaine. En effet, 20 jours après injection des cellules, les premières métastases osseuses apparaissent avec des localisations différentes (mandibule, vertèbres, articulations...) représentative des sites de métastases osseuses observés lors d'un adénocarcinome prostatique chez l'homme (Hess, et al., 2006). Par ailleurs, l'amélioration de la procédure d'induction par mesure du signal de pression intraventriculaire avant l'injection des cellules a permis d'améliorer le nombre d'animaux présentant des métastases inclus dans les lots expérimentaux.

L'imagerie anatomique par TDM X permet de confirmer la présence des lésions osseuses visualisées par imagerie de bioluminescence, mais surtout d'évaluer le statut du volume osseux et de qualifier la nature des lésions. Par contre, compte tenu de la résolution du scanner X (CT120) utilisé au cours de ce travail, l'analyse des lésions au niveau de la microarchitecture osseuse est impossible mais pourrait être réalisée sur les prélèvements osseux *ex vivo* avec d'autres types d'appareils dédiés. Enfin, l'imagerie du métabolisme osseux par injection de ^{99m}Tc -MDP est particulièrement intéressante dans le cas de lésions ostéocondensantes qui sont plus difficilement détectables par TDM et permet ainsi de signer la nature des lésions osseuses.

Ces modèles de métastases osseuses (par injection intra-osseux et intra-cardiaque) nous ont permis de mettre en place et de valider de nouveaux outils pour la détection, la caractérisation et la quantification des lésions osseuses observables dans de nombreux modèles orthotopiques de cancer. Toutefois, l'utilisation combinée de ces trois modalités d'imagerie n'est pas obligatoire pour les études d'évaluations précliniques. En effet, la

bioluminescence et la scintigraphie sont des modalités d'imagerie qui vont permettre de visualiser précocement et au niveau du corps entier les sites métastatiques avec une sensibilité supérieure au scanner X. Celui-ci pose par ailleurs des problèmes méthodologiques lorsqu'il s'agit de générer un grand nombre de coupes jointives pour une détection corps entier. Cependant, dans le cas de tumeurs osseuses avérées, le scanner X s'impose comme étant la seule modalité d'imagerie permettant de quantifier avec précision le volume de perte osseuse. Ainsi, dans le cas d'études précliniques avec des modèles animaux bioluminescents, la scintigraphie au MDP ne semble pas indispensable puisque la bioluminescence permet de détecter les foyers métastatiques et que le scanner X permet de qualifier et de quantifier les lésions osseuses. Cependant, pour des modèles non bioluminescents, et chez l'homme, la scintigraphie au MDP est nécessaire à la détection précoce et corps entier des métastases, et doit être associée en cas de positivité, au scanner X afin de signer avec précision l'étendue de la lésion osseuse. Une autre modalité d'imagerie par fluorescence 3D, moins contraignante que la scintigraphie (absence de radioactivité) va probablement s'imposer dans les prochaines années en imagerie préclinique, en permettant une imagerie du remodelage osseux par utilisation de phosphonates fluorescents dans le proche infrarouge du type de l'Osteosense® (Figueiredo, et al., 2008), dont le mécanisme de liaison à l'os est identique au MDP.

Dans le cas de modèles de cancer de la prostate de nombreuses applications sont possibles, notamment pour la caractérisation de la physiopathologie de nouvelles lignées cellulaires. C'est le cas de la lignée IGR-CaP1 (Chauchereau, et al., 2011), provenant d'une tumeur humaine de cancer de la prostate localisé et qui présente un fort remodelage osseux. Il en est de même pour l'évaluation du comportement de lignées cellulaires modifiées génétiquement telles que les cellules LNCaP et PC3 surexprimant la connexine 43 (jonction intercellulaire de type *gap*, impliquées dans le processus de cancérogenèse), sur la dissémination métastatique (Lamiche, et al., 2012). L'évaluation ne s'arrête pas simplement aux métastases de carcinomes prostatiques mais peut être étendue à d'autres types de cancers métastatiques, et par exemple à des modèles de tumeurs mammaires. Ces modèles pouvant être obtenus par injection de cellules 4T1 (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001) ou MCF-7 (Fong, et al., 2010) par exemple, vont générer des métastases de nature ostéolytiques qui pourront être évaluées par les méthodes mise en œuvre au cours de cette thèse. Enfin, d'autres applications sont envisageables, notamment dans le cas de tumeurs primaires osseuses, afin d'évaluer précocement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par exemple, l'équipe de F.

Rédini cherche à évaluer, sur un modèle murin d'ostéosarcome, les effets précoces sur le métabolisme osseux, d'une chimiothérapie (ifosfamide) associée à deux agents inhibiteurs de la dégradation osseuse (l'acide zolédronique et les siRNAs ciblant la cytokine Rankl). Ces deux bithérapies ont déjà démontrées une activité anti-résorptive sur des modèles d'ostéosarcomes (Heymann, et al., 2005, Rousseau, et al., 2010). Dans ce cas, il peut être intéressant de disposer d'indicateurs précoces de la réponse au traitement et l'imagerie fonctionnelle de la balance ostéolyse/ostéogénèse présente tout son intérêt.

Ainsi, les méthodes d'injection de cellules et de caractérisation des métastases que nous avons développées présentent un intérêt pour la compréhension des processus métastatiques et permettraient de contribuer au screening *in vivo* puis à la validation de l'efficacité de nouvelles thérapies sur la prévention ou le traitement des métastases osseuses.

4.2. Imagerie à haute résolution de la vascularisation

Le dernier développement que nous présentons consiste à réaliser une imagerie anatomique ex vivo de l'architecture vasculaire en mettant au point une méthode permettant de réaliser une empreinte du réseau vasculaire grâce à une résine radio-opaque. L'intérêt de cette technique est de pouvoir quantifier de manière très précise les effets de nouvelles molécules anticancéreuses sur la réorganisation de la vascularisation tumorale.

4.2.1. Etude bibliographique

4.2.1.1. Casting de la vascularisation

La méthode de « Casting de la vascularisation » que nous allons nommer plus simplement « Cast » est une méthode qui permet de reconstruire la structure tridimensionnelle des vaisseaux sanguins des organes et des tissus par injection d'une résine dans la circulation (Konerding, et al., 1999). L'ajout d'un composé radio-opaque dans la formulation de la résine rend possible la visualisation des vaisseaux « castés » par TDM X (Meyer, et al., 2007).

Cette méthode est souvent suivie d'une étape de corrosion permettant d'éliminer les tissus entourant les vaisseaux. Les échantillons peuvent ensuite être analysés par Microscopie Electronique à Balayage, technique qui est la plus décrite (Verli, et al., 2007). Dans notre cas, l'injection d'agents de contraste permet de rendre les vaisseaux radio-opaques et ainsi de les différencier des tissus grâce au scanner X, cette méthode permettant de s'affranchir de l'étape de corrosion et des artefacts susceptibles d'être induits par ce processus.

A l'origine, les résines utilisées étaient à base de produits naturels tels que la gélatine, la colle ou l'amidon. Avec les avancées réalisées dans le domaine de la chimie, de nouvelles résines synthétiques, permettant de reproduire avec plus de précisions l'architecture vasculaire ont été développées. Ces résines sont de faible viscosité afin de perfuser les petits vaisseaux et présentent, après durcissement, une élasticité et une résistance suffisantes pour limiter les risques de déchirures lors de la dissection (Meyer, et al., 2007).

La mise en œuvre de résine radio-opaque également de faible viscosité va permettre d'obtenir des échantillons pouvant être analysés par TDM X afin de générer des images haute résolution de l'architecture vasculaire.

4.2.1.2. Effet d'un traitement à la dexaméthasone sur l'architecture vasculaire

Dans le modèle de gliosarcome 9L chez le rat les effets thérapeutiques de la dexaméthasone, en particulier sur l'inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale, ont été décrits il y a plusieurs années (Folkman and Ingber, 1987).

Plusieurs mécanismes permettant d'expliquer les effets anti-angiogéniques de la dexaméthasone ont été caractérisés.

D'une part, il a été démontré que la dexaméthasone diminuait significativement l'activité de l'activateur tissulaire du plasminogène dans le surnageant des cellules 9L *in vitro* (Wolff, et al., 1993). Cette observation suggère que la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire est inhibée, ce qui contribue à son effet anti-angiogénique.

D'autre part, de nombreuses études ont démontré que la dexaméthasone avait un effet direct sur les molécules solubles impliquées dans l'angiogenèse, et plus spécifiquement, qu'elle entraînait une diminution de l'expression de VEGF, *in vitro* et *in vivo* avec une diminution de 15 % de son expression dans des tumeurs sous cutanées de gliosarcome 9L et C6 (Machein, et al., 1999).

Depuis la caractérisation de ces mécanismes, des études ont montré des effets significatifs de la dexaméthasone sur la vascularisation des tumeurs 9L induites en orthotopiques (Badrudjoja, et al., 2003, Darpolor, et al., 2011). C'est pourquoi nous avons choisi ce modèle pour valider notre méthode de cast.

4.2.2. Matériels et méthodes

4.2.2.1. Animaux et induction tumorale

Pour les études de validation de la méthode de cast, des rats Lewis femelles âgés de 6-7 semaines (150-250g) (Charles River) ont été utilisés.

Pour l'étude de cast de tumeurs de gliosarcome 9L et l'évaluation de l'effet antiangiogénique de la dexaméthasone, 10 rats Fisher F344 mâles (Charles River) de 8 semaines ont été inclus dans le protocole.

Afin d'induire les tumeurs, 10 rats Fisher F344 ont été anesthésiés avec de l'isoflurane (1,5%-2%). Une aiguille a été insérée sous la peau (flanc gauche) et 150 µl d'une solution contenant 3 millions de cellules 9L en phase exponentielle de croissance ont été injectés (Bansal, et al., 2008, Ngoc Trinh, et al., 2011).

4.2.2.2. Traitement à la dexaméthasone

Une fois les tumeurs ayant atteint un volume suffisant (700 mm^3), soit environ 20 jours post-induction, les animaux ont été répartis en 2 groupes de 5 animaux en fonction de la taille des tumeurs afin d'obtenir des lots homogènes :

- Groupe 1 : Témoin, solvant de la dexaméthasone (eau ppi)
- Groupe 2 : Dexaméthasone à la dose de 3 mg/kg/jours.

Les animaux ont été traités à la dose de 3 mg/kg/jour durant 5 jours consécutifs. Le schéma thérapeutique ainsi que les doses de dexaméthasone ont été choisis à partir des données retrouvées dans la littérature (Darpolor, et al., 2011). 24h après le dernier traitement, les animaux ont été anesthésiés puis castés selon la procédure décrite ci-dessous.

4.2.2.3. Formulation de la résine

Afin de réaliser « l’empreinte » de la vascularisation, l’élément principal est la résine. La résine utilisée est une résine de faible viscosité à base de PU4ii (polyuréthane) (VasQtec) (Krucker, et al., 2006). Pour permettre la visualisation des vaisseaux castés par tomодensitométrie X, il est nécessaire d’ajouter à la formulation de la résine un agent de contraste iodé. L’iode va atténuer le faisceau de rayons X et permettre de différencier la vascularisation des tissus. L’agent de contraste iodé que nous avons utilisé est le Lipiodol Ultrafluide (Guerbet, France) dont la teneur en iode est de 480 mg/ml (Meyer, et al., 2007). La résine PU4ii est composée d’un pigment bleu permettant de suivre facilement sa diffusion dans tous les organes. Ainsi notre résine « finale » injectée aux animaux a été préparée en mélangeant le lipiodol et la résine PU4ii dans de l’EthylMethylKetone.

Juste avant l’administration à l’animal, un durcisseur est ajouté à la préparation, ce mélange devant ensuite être utilisé dans les 20 minutes afin de maintenir une viscosité suffisamment faible et permettre une bonne diffusion dans les petits vaisseaux.

4.2.2.4. Méthode de casting de la vascularisation

L’animal préalablement anesthésié avec du pentobarbital (i.p. 60 mg/kg) est placé en décubitus dorsal, une incision au niveau du sternum est réalisée et la cage thoracique est ouverte afin de dégager le cœur du péricarde. Un cathéter est ensuite inséré au niveau du ventricule gauche, jusqu’à l’aorte.

Dans un premier temps, une solution héparinée (1%) de Krebs Henseleit est administrée *via* le cathéter afin d’éliminer tout le sang de la circulation. L’animal est alors prêt à recevoir la résine. La perfusion est réalisée à un débit de 4 ml/min. La diffusion de la résine est suivie grâce à l’augmentation graduelle de la coloration bleue de l’animal (figure 142).

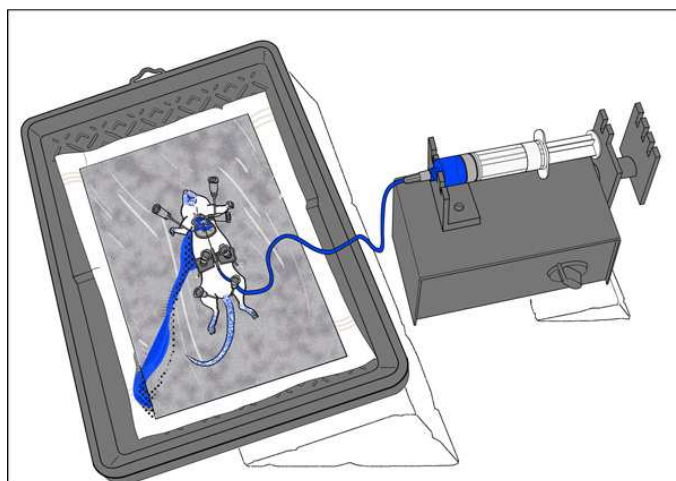


Figure 142 : injection de la résine

(Illustration Sabine Freiermuth)

Une fois l'animal totalement perfusé, un délai de 24h est nécessaire afin que la résine durcisse. Les organes cibles sont ensuite prélevés et conservés dans du formol 4% à température ambiante afin d'être imaged au scanner X.

4.2.2.5. Acquisitions et quantifications par tomодensitométrie X

4.2.2.5.1. Les protocoles d'acquisition

Afin d'optimiser la qualité des images, plusieurs protocoles d'acquisition ont été développés.

Pour cela, il est indispensable de tenir compte des capacités de calcul et de stockage de l'appareil afin de ne pas générer des données trop volumineuses qui poseront des problèmes de reconstruction. Un des éléments le plus limitant est le tube à rayons X, dont l'échauffement ne doit pas dépasser 60% en cours d'acquisition. Sachant que les paramètres tels que le temps d'exposition, la tension, l'intensité et le nombre de projections ont un impact direct sur l'augmentation de température du tube, il a été nécessaire de moduler ces paramètres avec précaution.

Les différents protocoles que nous avons créés pour l'acquisition des échantillons de CAST sont présentés ci-dessous.

	FHR1	FHR2	CAST
Nombre total de vues	720	2880	1200
Projections moyennées	4	1	3
Voltage (kVp)	70	70	70
Courant (mA)	50	50	50
Binning	2x2	2x2	1x1
Temps d'exposition (ms)	20	20	100
Gain	150	130	150
Résolution (µm)	50,3	50,3	25,2

Tableau 7 : Protocoles d'acquisition créés pour le cast

Les paramètres que nous avons fait varier sont : le nombre de vues, le nombre de projections moyennées, le binning et le temps d'exposition. Les protocoles d'acquisitions mis en place ont permis d'obtenir des images avec une résolution théorique de 50 ou 25 µm.

4.2.2.5.2. Traitement de l'image et quantification

Afin d'obtenir des informations quantitatives relatives à la vascularisation, le logiciel iMorph, développé par E. Brun et J. Vicente au sein du laboratoire IUSTI de Marseille a été mis à notre disposition (Brun and Vicente, 2010, Brun, et al., 2009).

iMorph est un logiciel pour l'analyse d'image tridimensionnelle. Il permet la caractérisation morphologique des milieux poreux et du matériel cellulaire.

Le logiciel effectue une étude morphologique à l'échelle micrométrique qui permet une classification locale des voxels afin d'identifier les formes telles que les plaques et les tubes. Particulièrement décrites dans l'analyse des travées osseuses, ces formes (plaques et tubes) sont retrouvées au niveau de la vascularisation. Enfin, le logiciel fournit une description topologique en générant des graphiques des phases solides et liquides.

Binarisation des images

La première étape du traitement de l'image qui est aussi l'une des plus importantes est la binarisation de l'image. Cette étape consiste à séparer tous les pixels de l'image en deux classes, généralement représentées par des pixels blancs (1) et des pixels noirs (0). Dans les deux cas, un seuil a été défini de manière à séparer les objets d'intérêt (les vaisseaux) du bruit de fond (tissus).

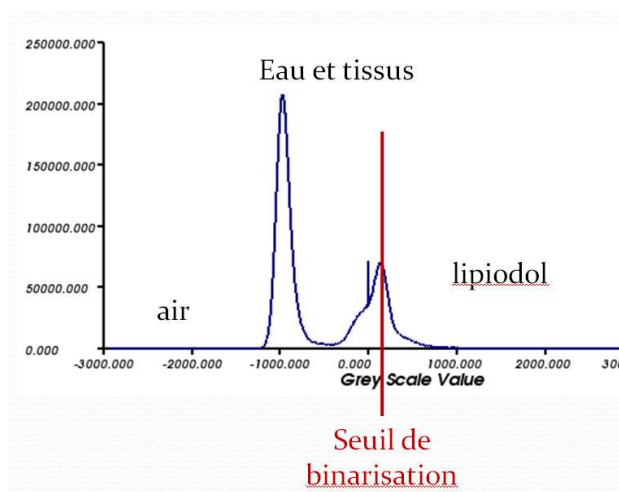


Figure 143 : Détermination du seuil de binarisation

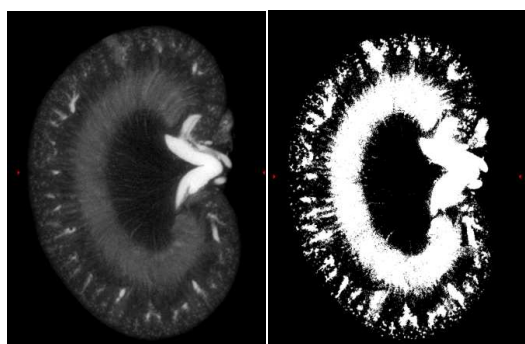


Figure 144 : Binarisation d'une image

A : Image en niveau de gris (rein) ; B : Image binarisée (noir et blanc)

Analyse granulométrique

Une fois l'image binarisée, une analyse granulométrique a été réalisée. Cette méthode permet de quantifier la distribution en taille des objets ou particules présents dans l'image.

La granulométrie est l'étude de la distribution statistique des tailles de particules. Cette méthode d'analyse s'inspire de l'analyse granulométrique à base de tamisages successifs

employée en géologie qui consiste à faire passer des éléments de tailles différentes au travers de tamis de mailles croissantes. En analyse d'image, les tamis sont remplacés par une succession d'ouvertures morphologiques (diamètres d'ouverture), et la masse des particules par le volume des pixels de l'image. La transposition de la granulométrie au traitement de l'image en appliquant des familles d'ouvertures successives de tailles croissantes est appelée granulométrie par ouverture.

Les résultats obtenus lors de l'analyse granulométrique avec le logiciel iMorph sont exprimés en occurrences et en diamètres d'ouverture.

Par exemple :

Diamètre (µm)	Occurrences
50 µm	113
100 µm	225
150 µm	468

Dans cet exemple, cela signifie qu'il y a 225 voxels dans l'image qui possèdent un diamètre de 100 µm (± 25 µm).

Grâce au logiciel iMorph, la distribution (en pourcentage) des vaisseaux dans des classes de diamètres de 50 µm a été déterminée. Cet outil va donc nous permettre de quantifier l'impact d'une thérapie sur la taille des vaisseaux.

4.2.3. Résultats

4.2.3.1. Choix du protocole d'acquisition

Les deux protocoles FHR (Fast High Resolution) permettent d'obtenir des images avec une résolution de 50 µm. Pour FHR2, par rapport à FHR1 la résolution spatiale a été améliorée par augmentation du nombre de vues, mais le bruit de fond a été augmenté (diminution du gain) et la sensibilité diminuée (diminution du nombre de projections

moyennée). Ces deux protocoles permettent d'obtenir des images de bonne qualité avec des temps d'acquisition raisonnables (environ 30 minutes par champ de vues)

Le protocole CAST permet quant à lui d'obtenir une résolution de 25 μm et génère des images de très haute résolution, mais avec un temps d'acquisition considérable (2h par champ de vue). Ce protocole, dont la résolution spatiale et la sensibilité sont améliorées, a l'avantage de présenter un faible bruit de fond et donc d'améliorer le rapport signal sur bruit.

Après comparaison des acquisitions réalisées avec ces 3 protocoles, nous avons choisi d'utiliser le protocole CAST, qui malgré ce temps d'acquisition très long permet de mieux visualiser les petits vaisseaux.

4.2.3.2. Détermination de la reproductibilité des acquisitions

Afin d'évaluer la reproductibilité de notre technique de Cast et des méthodes d'acquisition et de quantification, il nous a fallu choisir un organe permettant de représenter correctement les différents diamètres des vaisseaux observés dans une tumeur. Pour cela, nous avons choisi les reins. Ceux-ci ont été castés, imagés puis quantifiés.

Sachant que pour un même rat la répartition en taille du réseau vasculaire est similaire, nous avons pu confronter les résultats obtenus pour les deux reins d'un même animal.

La figure 145 présente les reins droit et gauche d'un rat, après acquisition avec le protocole CAST et après reconstruction. Les images sont représentées en MIP (Maximum Intensity Projection).

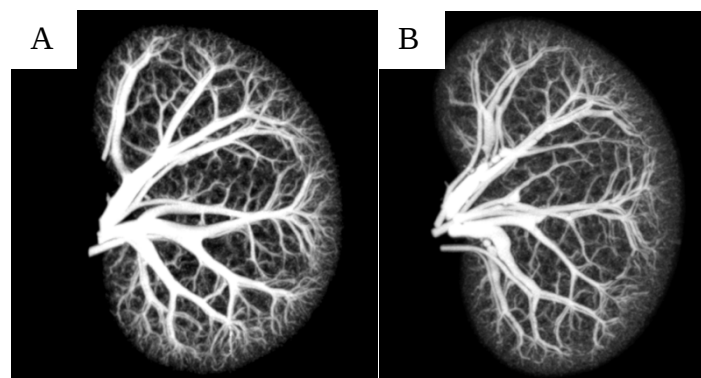


Figure 145 : Cast de reins de rat

A : rein droit ; B : rein gauche

Le diamètre des vaisseaux a été mesuré grâce au logiciel iMorph. Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogramme du pourcentage de vaisseaux dans chaque classe de diamètre avec un intervalle de 50 μm .

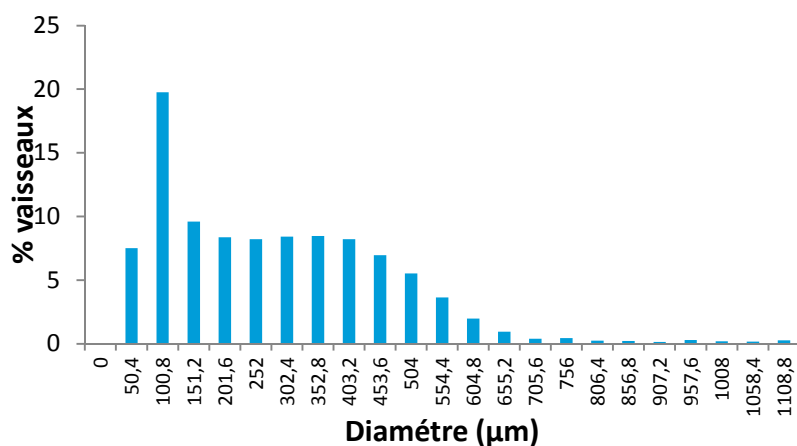


Figure 146 : Répartition des vaisseaux en pourcentage selon leurs diamètres

Ce graphique montre que la majorité des vaisseaux (20%) ont un diamètre compris entre 100 et 150 μm .

Afin de simplifier l'analyse des résultats pour la suite des études, les valeurs obtenues ont été réparties selon 3 classes :

- Petits vaisseaux : diamètres < 150 μm .
- Vaisseaux moyens : diamètres entre 150 et 500 μm .
- Gros vaisseaux : diamètres > 500 μm .

Six reins de rats ont été analysés et la répartition des vaisseaux quantifiée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

	Rat 1		Rat 2		Rat 3	
	Rein D	Rein G	Rein D	Rein G	Rein D	Rein G
Seuil de binarisation	135	122	126	139	125	134
< 150 μm	27.3 %	26.9 %	38.1 %	38.5 %	30.4 %	31.2%
150 μm < x < 500 μm	58.3 %	51.4 %	45.8 %	49.9 %	48.2%	51.1 %
>500 μm	14.5 %	21.7 %	16.1 %	11.6 %	18.2 %	19.8 %

Tableau 8 : Répartition des vaisseaux selon 3 classes de diamètres

Pour les deux reins d'un même animal, la répartition en pourcentage de vaisseaux d'une même classe sont globalement similaires.

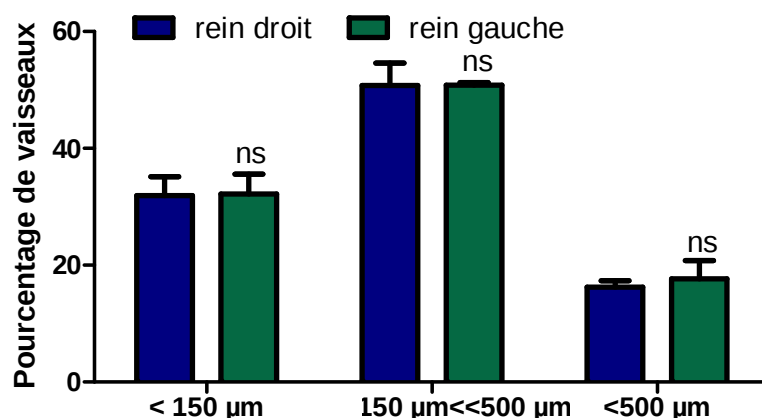


Figure 147 : Comparaison de la répartition des vaisseaux des deux reins selon trois classes de diamètre

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=3). (Test t de student)

Pour les deux reins d'un même animal, la répartition en pourcentage de vaisseaux d'une même classe sont similaires.

4.2.3.3. Imagerie de la vascularisation à proximité de l'os

Sachant que de nombreuses tumeurs et métastases sont localisées à proximité ou bien au niveau des os dans des situations où la vascularisation est souvent contrainte, nous avons essayé de réaliser une imagerie Cast du réseau vasculaire au niveau de la colonne vertébrale.

La colonne vertébrale est constituée des vertèbres, de la moelle épinière ainsi que de la vascularisation entourant la colonne. La densité de l'os étant très proche de celle de l'agent de contraste (lipiodol) et donc de la vascularisation que nous cherchons à visualiser, il a été nécessaire de diminuer la densité de l'os. Pour ce faire, une décalcification de la colonne à l'EDTA 10% a été réalisée.

La figure 148 montre deux coupes transversales d'une colonne vertébrale avant et après décalcification, acquises en TDM X avec le protocole CAST.

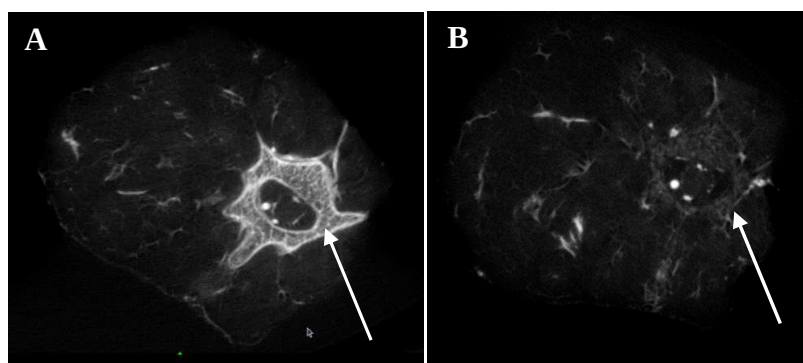


Figure 148 : Coupe transversale de colonne de rat en niveaux de gris, avant et après décalcification (seuillages identiques)

A : avant décalcification, B : après décalcification

Après incubation dans l'EDTA 10% durant 10 jours, la densité de l'os a significativement diminuée. En effet, après cette décalcification, la périphérie des vertèbres (partie la plus dense) a disparu et les travées osseuses ne sont plus discernables.

L'effet de la décalcification est également bien visible sur les colonnes vertébrales entières (figure 149).



Figure 149 : Colonne vertébrale de rat castée, avant et après décalcification.

Image MIP. A : colonne avant décalcification ; B : colonne après décalcification

Au vu de ces résultats encourageant, il semble que la méthode de décalcification à l'EDTA nous permette de nous affranchir de la densité de l'os et qu'à terme il soit possible de s'intéresser à la vascularisation de tumeurs osseuses.

4.2.3.4. Evaluation des effets d'un traitement sur la vascularisation tumorale

Le but de cette phase de mon travail était donc d'évaluer le potentiel du cast pour quantifier les effets de la dexaméthasone sur la vascularisation de tumeurs de glioblastome humain 9L, induites en sous cutanée chez le rat (n=5).

Impact du traitement à la dexaméthasone sur la croissance tumorale

Les tumeurs ayant été induites par voie sous cutanée, le volume tumoral a pu être déterminé par mesure au pied à coulisse. Il a été mesuré avant traitement et a permis de randomiser les animaux.

L'évolution du volume tumoral suite aux traitements à la dexaméthasone est représentée par la figure 150.

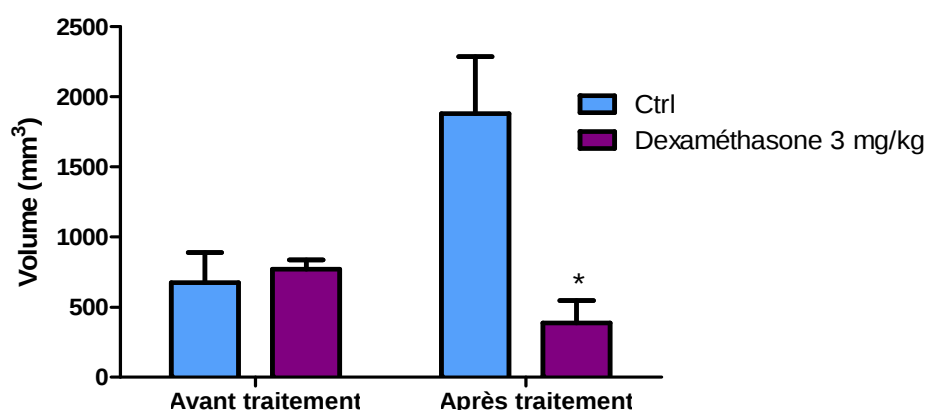


Figure 150 : Evolution du volume tumoral avec ou sans traitement à la dexaméthasone

*Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5). *: $p < 0.05$ (Test de Mann Whitney)*

Pour les animaux du groupe contrôle, l'évolution tumorale est de 278% en 7 jours (temps entre mesure avant et après traitement). Pour les animaux traités à la dexaméthasone durant 5 jours consécutifs à la dose de 3 mg/kg, une diminution de 50 % du volume tumoral est observée après 7 jours de traitement.

Impact du traitement à la dexaméthasone sur la vascularisation tumorale

Afin d'évaluer l'effet du traitement à la dexaméthasone sur la vascularisation tumorale, les tumeurs « castées » ont été imagées au scanner X. L'architecture vasculaire des animaux témoins et traités est visualisée sur la figure 151.

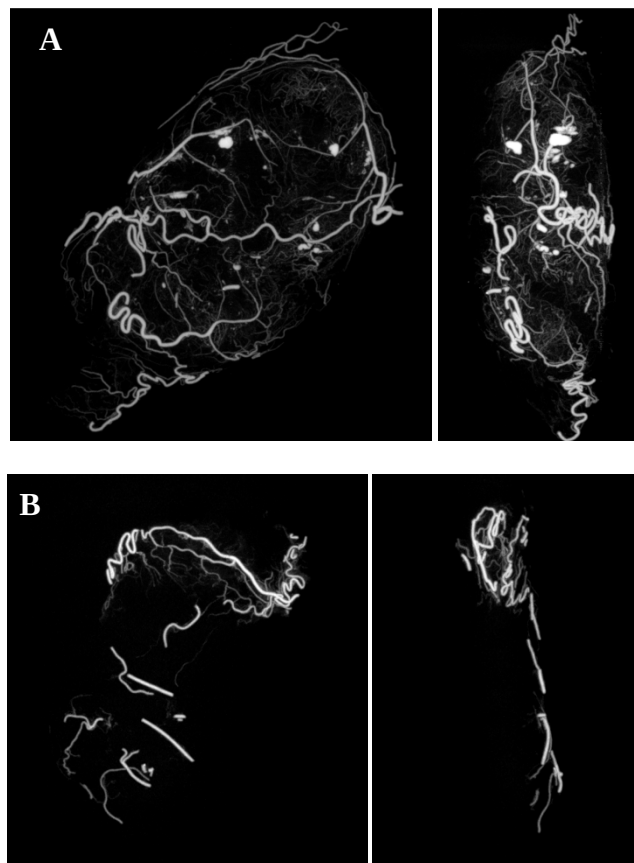


Figure 151 : Visualisation de l'impact d'un traitement à la dexaméthasone

A : Tumeur contrôle ; B : Tumeur traitée à la dexaméthasone. Images MIP.

Les images obtenues au scanner X permettent de révéler l'impact du traitement sur le réseau vasculaire. En effet, lors d'un traitement à la dexaméthasone, de nombreux vaisseaux tumoraux ont été supprimés et la densité vasculaire est nettement plus faible. Au contraire, le réseau vasculaire de la tumeur contrôle est riche et continu.

Un histogramme de répartition en pourcentage de vaisseaux selon les 3 classes de diamètres retenues a pu être établi grâce au logiciel iMorph (figure 152).

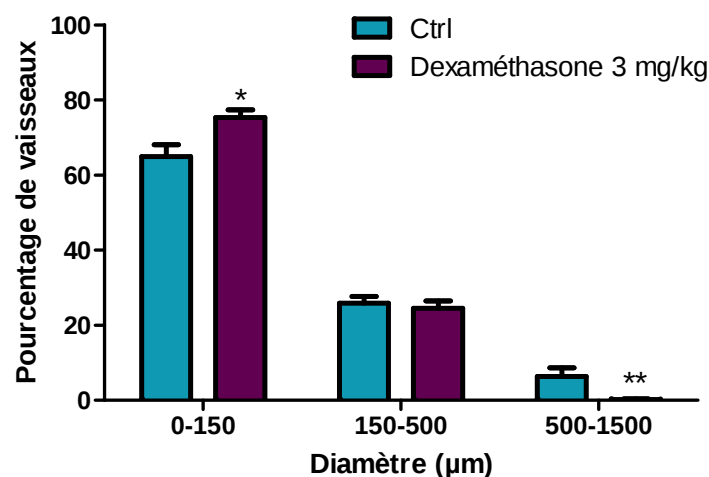


Figure 152 : Répartition des vaisseaux tumoraux en pourcentage selon 3 classes de diamètres

Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM (n=5).

**: $p < 0.5$; **: $p < 0.01$ (Test de Mann Whitney)*

Suite au traitement à la dexaméthasone, les vaisseaux de diamètres supérieurs à 500 μm ont pratiquement disparu à la faveur des vaisseaux de petits diamètres (0-150 μm) qui ont augmenté de 10 % par rapport au groupe contrôle. Les vaisseaux de diamètres intermédiaires (150 μm - 500 μm) restent dans les mêmes proportions, que les tumeurs soient traitées ou non à la dexaméthasone.

4.2.4. Discussion

Cette méthode de casting de la vascularisation, par injection de résine radio-opaque dans le réseau vasculaire via l'aorte, permet d'obtenir une empreinte tridimensionnelle de la vascularisation chez le rat. Elle offre la possibilité de générer des prélèvements de taille relativement petite pouvant être imagés par des systèmes de tomodensitométrie X à haute résolution.

Dans notre cas, de part l'utilisation d'un scanner X dédié au petit animal (CT120), il a été nécessaire d'optimiser les protocoles d'acquisitions afin d'obtenir des images présentant une haute résolution (25 μm) avec un bruit de fond limité. Le protocole créé (protocole CAST) non compatible avec l'imagerie *in vivo* car avec un temps d'acquisition très long (> 2h), permet de réaliser des images 3D d'échantillons *ex vivo* avec une résolution suffisante pour

l'analyse et la caractérisation des vaisseaux par un logiciel d'analyse morphologique tels qu'iMorph.

Ce logiciel, grâce à la méthode « d'analyse granulométrique d'ouverture » détermine la répartition des diamètres des vaisseaux en pourcentage, au sein d'un échantillon. L'étude comparative des reins d'un même animal a ainsi validé le modèle de casting de la vascularisation, tant au niveau de la reproductibilité de l'obtention des échantillons *ex vivo* suite à l'injection de résine, que de l'acquisition et de l'analyse des images.

L'étude des effets de la dexaméthasone sur la vascularisation des tumeurs de glioblastomes 9L a mis en évidence la possibilité de déterminer l'impact d'un traitement sur l'architecture vasculaire et notamment sur la distribution du diamètre des vaisseaux.

La mesure histologique de la densité vasculaire constitue la démarche classique mais elle est limitée par le recours à des prélèvements susceptibles d'altérer la vascularisation tumorale et la tumeur elle-même. De plus, elle ne permet pas d'étudier la vascularisation fonctionnelle. Pour cela, une méthode non invasive, l'échographie Doppler, permet d'apporter des informations morphologiques précises sur les vaisseaux péri- et intratumoraux ainsi que des informations fonctionnelles telles que la vitesse des flux vasculaires. Cette modalité d'imagerie *in vivo* permet de détecter des vaisseaux supérieurs à 100 μm . Même si l'utilisation de microbulles contribue à augmenter cette limite de détection, l'hyperperméabilité des néovaisseaux entraîne par l'effet EPR une diffusion de ces agents de contrastes, et empêche la détection et la quantification de diamètres inférieurs à 100 μm . Actuellement, aucune modalité *in vivo* ne permet de détecter avec précision l'architecture des microvaisseaux, la résolution des appareils, alors insuffisante, nécessite la mise en œuvre de ruptures technologiques permettant de réaliser des acquisitions suffisamment courtes, peu irradiantes, et de haute résolution ($<50 \mu\text{m}$) compatibles avec les études *in vivo*. D'autre part les mouvements naturels de l'animal (respiration, battements cardiaques) entraînent un flou dans les images qu'il est difficile de supprimer à ce niveau de résolution peu compatible avec les possibilités actuelles de la synchronisation sur l'ECG et la respiration.

Ainsi, les méthodes *ex vivo* et notamment la méthode de casting de la vascularisation représente une bonne alternative, car elle permet de reconstruire l'architecture 3D ce qui est impossible en histologie et grâce à l'injection de résine, la vascularisation alors figée n'est pas altérée lors du prélèvement de l'organe.

Cette méthode de casting de la vascularisation permet de réaliser des images tridimensionnelles à haute résolution du réseau vasculaire, et grâce aux méthodes d'analyses morphologiques et plus particulièrement d'analyses granulométriques, d'évaluer l'effet d'une thérapie sur l'architecture du réseau vasculaire. Cet outil pourrait par exemple être appliqué dans le cas d'évaluation préclinique de l'impact de nouvelles molécules anti-angiogéniques sur la réorganisation de la vascularisation. L'utilisation d'un microCT dont la résolution est proche du micromètre (μ CT50, Scanco Medical, Suisse et SkyScan, Bruker) rendrait possible la distinction des vaisseaux d'un diamètre inférieur à 50 μ m et pourrait être envisagée pour des études futures, notamment sur des modèles murins.

Discussion générale

Lors de cette thèse qui s'est déroulée en collaboration entre le Centre d'imagerie du Petit Animal (CIPA), au CNRS d'Orléans et le Centre de Recherches Biologiques (CERB) à Baugy, différentes modalités d'imageries ont été appliquées à plusieurs modèles orthotopiques de cancer chez le petit animal dans le but d'apporter de nouveaux outils pour l'oncopharmacologie comme pour des études plus fondamentales sur le biologie des tumeurs primaires et des métastases.

La majeure partie de ce travail a été concentrée sur le développement et la validation de modèles animaux de cancer dont la croissance tumorale et la dissémination métastatique ont été évaluées par imagerie de bioluminescence. L'avantage de ces modèles « bioluminescents » est de permettre un suivi longitudinal et quantitatif du même animal, ce qui permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer la pertinence des résultats au regard des effets attendus en clinique dans le cadre d'une recherche translationnelle.

Deux modèles murins de cancers fortement représentés chez l'homme ont été développés :

- **Modèle de cancer du colon :** obtenu après injection de cellules de carcinome colorectal HCT116-luc au niveau du caecum, ce modèle dont l'évolution de la tumeur primaire et le pattern de dissémination métastatique (au niveau du foie, des reins, de la rate, de l'estomac et des poumons) sont cohérents avec les observations faites chez l'homme (Gubitosi, et al., 2009) a été évalué. Pour cela, l'effet d'un traitement de référence dans le cancer colorectal, le 5-Fluorouracile, a été testé dans une démarche de validation visant à préciser la sensibilité de la technique vis-à-vis de la réponse tumorale. Plusieurs doses ont été expérimentées et celle de 20 mg/kg, pour laquelle aucun signe de toxicité n'a été observé, a permis d'obtenir une inhibition de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique en concordance avec les effets décrits dans la bibliographie (Gil-Ad, et al., 2008, Jin, et al., 2009) et pourra être utilisée comme substance de référence pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce modèle de carcinome colorectal HCT116-luc permet un suivi longitudinal de la prolifération tumorale et de la dissémination métastatique. Même s'il est difficile de discriminer les métastases *in vivo* à un stade avancé du cancer sans mettre en œuvre une correction de l'image, l'évaluation précise de l'activité lumineuse totale émise par les seules métastases en s'affranchissant de la bioluminescence de la tumeur primaire peut être considérée comme un marqueur quantitatif de la prolifération tumorale. La précision pourrait d'ailleurs être encore affinée par l'application d'une technique de correction spectrale pour

estimer l'absorption des photons de bioluminescence pour chaque foyer avant de réaliser la somme des émissions individuelles (Pesnel, et al., 2011). Cette technique qui impose cependant de tripler le nombre d'acquisitions par incidence alourdit donc considérablement le protocole en réduisant le débit des animaux explorés. Elle est de ce fait réservée à des situations pour lesquels l'objectif tend vers une quantification quasiment absolue du processus biologique.

D'autres modalités d'imagerie pourraient présenter un intérêt, notamment dans le cas de modèles animaux non bioluminescents afin de détecter les foyers tumoraux, par exemple, par scanner X ou bien par scintigraphie en utilisant du ^{18}F -FDG, qui même s'il n'est pas très spécifique reste très utilisé pour la détection des tumeurs malignes dont le métabolisme glucidique est augmenté. Enfin, dans le cas d'études des aspects physiopathologiques du cancer, tels que l'hypoxie, l'angiogénèse ou l'apoptose, des sondes moléculaires spécifiques peuvent être mises en œuvre en fluorescence ou scintigraphie. Celles-ci permettront d'évaluer les effets de nouvelles stratégies thérapeutiques sur ces processus fortement impliqués dans le développement des tumeurs et dans la résistance aux traitements.

- **Modèle de cancer du pancréas** : obtenu après injection de cellules d'adénocarcinome pancréatique ductal MIA PaCa2-luc au niveau du pancréas, ce modèle présente des caractéristiques physiopathologiques similaires à celles observées lors du cancer du pancréas chez l'homme. D'une part, les métastases ont été retrouvées au niveau du foie, des intestins, du diaphragme, du péritoine, de la rate et des reins, sites similaires à ceux observés lors d'un adénocarcinome pancréatique chez l'homme (Saif, et al., 2011). D'autre part, l'hypoxie, caractéristique des tumeurs du pancréas humain (Koong, et al., 2000), a pu être mise en évidence au sein des tumeurs. Ainsi, suite à l'observation d'une perte du signal de bioluminescence (imagerie dépendant de l' O_2 et de l'ATP) au niveau de la tumeur primaire 40 jours après induction tumorale, il a été démontré *in vivo* par une imagerie TEP au ^{64}Cu -ATSM la présence de zones hypoxiques. Ces observations ont été confirmées par immunohistochimie, sur coupe de tumeurs, grâce à un marquage avec un anticorps anti-pimonidazole. Chez l'homme, l'hypoxie, en particulier dans le cas d'adénocarcinome ductal, est une des causes de mauvais pronostic (Koong, et al., 2000) et jouerait un rôle déterminant dans la résistance aux radio- et chimio-thérapies (Blouw, et al., 2003).

Dans le but d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques, la gemcitabine a été choisie comme molécule de référence. Celle-ci a montré un effet inhibiteur sur la prolifération

tumorale à la dose de 200 mg/kg en corrélation avec les données bibliographiques (Katz, et al., 2003).

Ce modèle est désormais opérationnel pour l'évaluation de nouvelles formulations telles que les nanoparticules et de stratégies innovantes telles que les plasmas froids fibrés. Toutefois, selon le but recherché, il est nécessaire d'adapter le schéma expérimental. Le suivi doit être inférieur à 40 jours dans le cas d'études d'efficacité nécessitant une quantification précise et répétée de l'évolution tumorale et plus particulièrement de la croissance de la tumeur primaire par bioluminescence. Dans le cas d'évaluation des effets sur la prolifération métastatique ou sur la résistance au traitement due au caractère hypoxique de la tumeur les études doivent être plus longues, et d'autres modalités d'imagerie, indépendante du métabolisme (O_2 et ATP), comme l'imagerie de l'expression des intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$ en fluorescence proche infrarouge 3D ou en TEP peuvent être mis en œuvre afin de réaliser un suivi quantitatif de l'évolution tumorale. Dans tous les cas, la mesure du volume tumoral en fin d'étude permet de confirmer les résultats.

Une autre partie importante de mon travail de thèse a été l'évaluation d'une nouvelle thérapie ciblée par plasma froid fibré, le plasma gun, sur le modèle orthotopique d'adénocarcinome pancréatique MIA PaCa2-luc. Dans le cas de cancer du pancréas non opérable, notamment lors d'une atteinte de canaux biliaires et pancréatiques, un traitement ciblé par photothérapie dynamique a montré une certaine efficacité (Topazian, et al., 2012). Cependant, compte tenu des effets secondaires liés à ce traitement (photosensibilisation, brûlures), la mise en œuvre d'une nouvelle thérapie, utilisant la même modalité d'application (cathétérisme) pourrait permettre d'améliorer le rapport bénéfice/risque.

Le plasma gun a montré des effets significatifs sur l'inhibition de la croissance cellulaire *in vitro* ainsi que sur la croissance tumorale *in vivo*. Afin d'augmenter les effets obtenus, la gemcitabine qui a démontré des propriétés radiosensibilisantes sur les cellules tumorales humaines et murines (Cardillo, et al., 2002, Lawrence, et al., 1996, Shewach and Lawrence, 1996) a été administrée en complément du traitement au plasma gun. Les effets obtenus ont montré une augmentation de l'inhibition de la prolifération tumorale lors du traitement en bithérapie. Compte tenu de ces résultats très encourageants, il est envisagé d'augmenter la dose de plasma délivrée, notamment par augmentation de la fréquence, dans la limite de tolérance par les tissus sains, afin d'améliorer l'effet antitumoral.

Le plasma gun, bien toléré chez l'animal avec les paramètres mis en œuvre dans nos études, pourrait permettre à terme, de traiter chez l'homme des tumeurs localisées et difficilement opérables, notamment dans le cas d'atteinte des canaux biliaires et pancréatiques comme lors d'une Tumeur Intracanalair Papillaire Mucineuse du Pancréas (TIPMP). D'autres champs d'applications en oncologie sont envisagés, notamment dans le cas de récidives colorectales ou lors de plages de dysplasie pulmonaire ou à la jonction oesophago-gastrique.

Enfin, la dernière partie de cette thèse a consisté à optimiser des techniques afin de caractériser et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- **Modèle de métastases osseuses** : suite à l'injection intracardiaque au niveau du ventricule gauche, les cellules de carcinome prostatique PC3M-luc, colonisent les sites osseux, et génèrent des métastases osseuses de type ostéolytiques. Chez la souris, l'administration intra-cardiaque ne présente pas de difficulté majeure mais le ciblage spécifique du ventricule gauche, permettant d'atteindre la circulation systémique, est particulièrement délicat entraînant un nombre limité d'animaux susceptibles de présenter des métastases osseuses. Un certain nombre de sujet étant par ailleurs porteurs de foyers péricardiques ou médiastinaux qui introduisent une variabilité et donc une dégradation de la sensibilité des études en onco-pharmacologie. Cette voie d'administration est la seule permettant de garantir l'obtention de métastases osseuses avec des localisations (mandibule, vertèbres, articulations...) et une cinétique de croissance assez représentative de la pathologie humaine (Hess, et al., 2006). L'amélioration de la procédure d'induction par mesure du signal de pression intraventriculaire avant l'injection des cellules a permis d'augmenter le nombre d'animaux présentant des métastases et de réduire la variabilité inter-individuelle. Après injection de macroagréats d'albumine marqués au ^{99m}Tc , nous avons pu, par imagerie scintigraphique, corrélérer la distribution des cellules dans l'organisme à l'onde de pression intra-ventriculaire mesurée. Une pression intra-ventriculaire systolique de 110 mmHg correspond ainsi à une injection au niveau du ventricule gauche alors qu'une pression 5 fois plus faible (20 mmHg) correspond à une injection dans le ventricule droit.

D'autre part, nous avons cherché à déterminer la domiciliation des cellules PC3M-luc après administration dans le ventricule gauche, le but étant de disposer d'un moyen de déterminer les éventuelles niches tumorales de façon précoce pour appréhender la biologie de la métastase. En effet, la comparaison de la domiciliation initiale des cellules à la

localisation finale des métastases est un élément essentiel dans la compréhension du processus métastatique et pour cela il est nécessaire de déterminer la corrélation ou non entre les observations précoces et les sites métastatiques avérés. Pour cela, les cellules PC3M-luc ont été marquées à l' ^{111}In afin d'être suivies en TEMP durant 96 h. Les résultats obtenus n'ont pas permis de répondre à cette question, car l' ^{111}In libre s'est fixé au niveau de sites osseux (articulations). De nouvelles études doivent être réalisées, par exemple par co-injection de DTPA, puissant chélatant de l'Indium, à faible dose en complément de l'administration des cellules PC3M-luc marquées à l' ^{111}In comme préconisé dans d'autres méthodes de marquage. Cela permettrait d'améliorer l'élimination par voie urinaire de l'indium libre et limiterait ainsi sa fixation hépatique et osseuse *via* sa liaison à la transferrine. Un marquage des cellules PC3M-luc par d'autres marqueurs tels que des fluorochromes IR par exemple est également envisageable pour rendre possible le suivi de la domiciliation sur des temps plus long (15 jours) et sans fixation osseuse du fluorochrome libre. Quelques marqueurs ont été développés et on peut citer une carbocyanine lipophile fluorescent dans le proche infrarouge, DiR, qui permet de marquer directement les membranes cellulaires (Kalchenko, et al., 2006) mais avec des artefacts possibles liés aux échanges de lipides entre cellules (trogocytose). Un dérivé NHS fluo (VivoTag 680[®]) qui permet de marquer les cellules par fixation covalente à des composants cellulaires après internalisation (Swirski, et al., 2007) est une alternative particulièrement séduisante tant qu'elle n'impacte pas sur les propriétés physiologiques des cellules marquées.

Enfin, des paramètres tels que le délai d'apparition des métastases après induction, la nature ostéolytique ou ostéocondensante des lésions ont été évalués par différentes modalités d'imagerie. L'imagerie de bioluminescence nous a permis de déterminer le temps de prise de greffe (30 jours pour le modèle PC3M-luc) et les principaux sites de métastases osseuses (tibia et mandibule). La TDM a confirmé les observations faites en bioluminescence et a permis de caractériser et de quantifier avec plus de précisions les lésions ostéolytiques. Enfin l'imagerie TEMP du métabolisme osseux, par injection de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP a confirmé le caractère ostéolytique des métastases osseuses PC3M-luc et offrira une alternative pour une détection corps entier des foyers en absence de suivi des cellules par imagerie de l'expression génique (bioluminescence ou fluorescence infrarouge d'une protéine rapporteuse).

Ce modèle, nous a permis de valider 3 modalités d'imagerie permettant la détection et la caractérisation des métastases osseuses. La bioluminescence et la scintigraphie au MDP pour la détection précoce des métastases et le scanner X pour la caractérisation et la quantification

précise du volume osseux. Ces modalités d'imagerie pourront ainsi être appliquées à tous les modèles murins de cancer présentant des métastases au niveau de l'os, qu'elles soient ostéocondensantes, ostéolytiques ou mixtes.

- **Imagerie haute résolution du réseau vasculaire** par casting de la vascularisation. Cette méthode permet de visualiser par scanner X, la structure tridimensionnelle des vaisseaux suite à l'injection de résine radio-opaque dans le réseau vasculaire. Par une optimisation des protocoles d'acquisition nous avons réussi à acquérir des images de haute résolution (25 μm) pouvant être analysées grâce à un logiciel d'analyse d'images du type iMorph (J. Vicente, IUSTI, Marseille) fournissant des informations quantitatives et statistiques.

D'autres méthodes peuvent être envisagées pour la visualisation ou la quantification de la vascularisation. Le réseau vasculaire peut ainsi être exploré *in vivo*, par angiographie ou échographie doppler microbulles mais dans ce cas, les résolutions obtenues (environ 100 μm) ne permettent pas de quantifier les microvaisseaux, à l'origine de la néovascularisation. La quantification peut être réalisée *in vitro* par la mesure histologique de la densité vasculaire, mais cette technique est limitée par le recours à des prélèvements susceptibles d'altérer la vascularisation tumorale et la tumeur elle-même et elle ne permet pas d'étudier une vascularisation fonctionnelle. Ainsi le Cast qui préserve la structure tridimensionnelle des vaisseaux et de la tumeur semble une alternative intéressante pour la visualisation et la quantification des effets de nouvelles thérapies sur la vascularisation.

Cette technique d'imagerie *ex vivo* de la vascularisation permet de générer des données compatibles avec des logiciels d'analyses d'images jusqu'alors uniquement utilisés dans les domaines de physique des matériaux. Le logiciel (iMorph) nous a permis de déterminer les caractéristiques morphologiques des échantillons tels que la répartition des diamètres des vaisseaux dans des classes de 50 μm . Pour la suite des études, il peut être envisagé d'étudier d'autres paramètres, tels que la tortuosité, caractéristique de la désorganisation de l'architecture vasculaire de la tumeur. En effet, il a été démontré, lors d'un traitement anti-angiogénique, une réorganisation du réseau vasculaire, notamment par normalisation de la vascularisation (Jain, 2005). Cette réorganisation va conduire au rétablissement des caractéristiques d'une vascularisation tissulaire « normale » dans la tumeur, par disparition des capillaires immatures, et régularisation de l'architecture des autres vaisseaux modifiant ainsi la tortuosité.

Cette méthode d'imagerie à haute résolution de la vascularisation permettrait d'évaluer précocement les effets d'une nouvelle molécule sur la réorganisation du réseau vasculaire et représente une alternative à l'histologie en complément des explorations fonctionnelles, moléculaires ou anatomiques de l'imagerie *in vivo*.

A travers ces exemples, nous pouvons appréhender l'intérêt de l'imagerie pour le développement et la validation de nouvelles thérapies anticancéreuses. Hormis son intérêt majeur qui est de diminuer le nombre d'animaux, une des règles principales en expérimentation animale (Règle des 3R), l'imagerie préclinique permet d'évaluer l'efficacité et d'aborder les mécanismes d'actions de nouvelles stratégies thérapeutiques avec une grande précision.

Les modalités d'imageries précliniques, de plus en plus perfectionnées permettent aujourd'hui de détecter des foyers tumoraux inférieurs aux millimètres, et les sondes utilisées, de plus en plus spécifiques, permettent d'explorer des mécanismes moléculaires bien précis impliqués dans des phénomènes tels que l'apoptose, l'hypoxie, l'angiogenèse, les activités protéasiques et le métabolisme osseux. L'arrivée prochaine de la tomographie moléculaire de fluorescence infrarouge à haute résolution et l'imagerie optoacoustique vont contribuer à élargir la palette des explorations *in vivo* qui rendent désormais incontournable l'imagerie en onco-pharmacologie et en recherche préclinique translationnelle.

Références bibliographiques

- Ackerman, J. J. H., T. H. Grove, G. G. Wong, D. G. Gadian, and G. K. Radda. 'Mapping of Metabolites in Whole Animals by P-31 Nmr Using Surface Coils', *Nature* **Vol. 283, No. 5743**, 167-170, 1980.
- Agarwal, A., M. A. Mackey, M. A. El-Sayed, and R. V. Bellamkonda. 'Remote Triggered Release of Doxorubicin in Tumors by Synergistic Application of Thermosensitive Liposomes and Gold Nanorods', *Acs Nano* **Vol. 5, No. 6**, 4919-4926, 2011.
- Akkoul, S., R. Ledee, R. Leconge, C. Leger, R. Harba, S. Pesnel, S. Lerondel, A. Lepape, and L. Vilcahuaman. 'Comparison of Image Restoration Methods for Bioluminescence Imaging', *Image and Signal Processing* **Vol. 5099**, 163-172, 2008.
- Almuhaideb, A., N. Papathanasiou and J. Bomanji. 'F-18-FDG PET/CT Imaging In Oncology', *Annals of Saudi Medicine* **Vol. 31, No.1**, 2011.
- Al-Mulla, F., M. S. Bitar, J. W. Feng, S. Park, and K. C. Yeung. 'A New Model for Raf Kinase Inhibitory Protein Induced Chemotherapeutic Resistance', *Plos One* **Vol. 7, No. 1**, 2012.
- An, Hongyu, Qingwei Liu, Yasheng Chen, and Weili Lin. 'Evaluation of Mr-Derived Cerebral Oxygen Metabolic Index in Experimental Hyperoxic Hypercapnia, Hypoxia, and Ischemia', *Stroke* **Vol. 40, No. 6**, 2165-2172, 2009.
- Anger, H. O. 'Use of a Gamma-Ray Pinhole Camera for Invivo Studies', *Nature* **Vol. 170, No. 4318**, 200-201, 1952.
- Arteel, G. E., R. G. Thurman, and J. A. Raleigh. 'Reductive Metabolism of the Hypoxia Marker Pimonidazole Is Regulated by Oxygen Tension Independent of the Pyridine Nucleotide Redox State', *European Journal of Biochemistry* **Vol. 253, No. 3**, 743-750, 1998.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J. M. Isner. 'Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization', *Circulation Research* **Vol. 85, No. 3**, 221-228, 1999.
- Ashman L.E., Menaschi WP. Treatment of surfaces with low pressures plasmas. *US Patent 3 701 628*. 31 octobre 1972.
- Backer, Marina V., Zoya Levashova, Vimalkumar Patel, Brian T. Jehning, Kevin Claffey, Francis G. Blankenberg, and Joseph M. Backer. 'Molecular Imaging of Vegf Receptors in Angiogenic Vasculature with Single-Chain Vegf-Based Probes', *Nature Medicine* **Vol. 13, No. 4**, 504-509, 2007.
- Badrudjoja, M. A., H. G. J. Krouwer, S. D. Rand, K. J. Rebro, A. P. Pathak, and K. M. Schmainda. 'Antiangiogenic Effects of Dexamethasone in 9l Gliosarcoma Assessed by Mri Cerebral Blood Volume Maps', *Neuro-Oncology* **Vol. 5, No. 4**, 235-243, 2003.
- Bansal, Aditya, Wang Shuyan, Toshiko Hara, Robert A. Harris, and Timothy R. DeGrado. 'Biodisposition and Metabolism of F-18 Fluorocholine in 9l Glioma Cells and 9l Glioma-Bearing Fisher Rats', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **Vol. 35, No. 6**, 1192-1203, 2008.
- Barnett, Edward M., Xu Zhang, Dustin Maxwell, Qing Chang, and David Piwnica-Worms. 'Single-Cell Imaging of Retinal Ganglion Cell Apoptosis with a Cell-Penetrating, Activatable Peptide Probe in an in Vivo Glaucoma Model', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **Vol. 106, No. 23**, 9391-9396, 2009.
- Bartl, R. 'A Query from Medical Practice: The Biological Half-Life of Biophosphonates', *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **Vol. 133, No. 51-52**, 2700-2701, 2008.

- Baudelet, C., and B. Gallez. 'Current Issues in the Utility of Blood Oxygen Level Dependent Mri for the Assessment of Modulations in Tumor Oxygenation', *Current Medical Imaging Reviews* **Vol. 1, No. 3**, 229-243, 2005.
- Beer, Ambros J., Roland Haubner, Mario Sarbia, Michael Goebel, Stephan Luderschmidt, Anca Ligia Grosu, Oliver Schnell, Markus Niemeyer, Horst Kessler, Hans-Juergen Wester, Wolfgang A. Weber, and Markus Schwaiger. 'Positron Emission Tomography Using F-18 Galacto-Rgd Identifies the Level of Integrin Alpha(V)Beta(3) Expression in Man', *Clinical Cancer Research* **Vol. 12, No. 13**, 3942-3949, 2006.
- Bergler, W., K. Huber, N. Hammerschmitt, and K. Hormann. 'Tonsillectomy with Argon Plasma Coagulation (Apc): Evaluation of Pain and Hemorrhage', *Laryngoscope* **Vol. 111, No. 8**, 1423-1429, 2001.
- Bernhard, E. J., A. Maity, R. J. Muschel, and W. G. McKenna. 'Effects of Ionizing-Radiation on Cell-Cycle Progression - a Review', *Radiation and Environmental Biophysics* **Vol. 34, No. 2**, 79-83, 1995.
- Bertolini, Francesco, Yuval Shaked, Patrizia Mancuso, and Robert S. Kerbel. 'The Multifaceted Circulating Endothelial Cell in Cancer: Towards Marker and Target Identification', *Nature reviews. Cancer* **Vol. 6, No. 11**, 835-45, 2006.
- BertrandCaix, J., G. Freyburger, L. Bordenave, S. Labrousse, R. Bareille, F. Lefebvre, C. Baquey, and D. Ducassou. 'Functional Upregulation of Granulocytes Labeled with Technetium-99m-Hmpao and Indium-111-Oxinate', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 37, No. 5**, 863-868, 1996.
- Bhattacharya, Arup, Steve G. Turowski, Ivan Dominguez San Martin, Ashwani Rajput, Youcef M. Rustum, Robert M. Hoffman, and Mukund Seshadri. 'Magnetic Resonance and Fluorescence-Protein Imaging of the Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Efficacy of Selenium in an Orthotopic Model of Human Colon Cancer', *Anticancer Research* **Vol. 31, No. 2**, 387-393, 2011.
- Bhattacharyya, Sibaprasad, Shuyan Wang, Daniel Reinecke, William Kiser, Jr., Robert A. Kruger, and Timothy R. DeGrado. 'Synthesis and Evaluation of near-Infrared (Nir) Dye-Herceptin Conjugates as Photoacoustic Computed Tomography (Pct) Probes for Her2 Expression in Breast Cancer', *Bioconjugate Chemistry* **Vol. 19, No. 6**, 1186-1193, 2008.
- Bicknell, G. R., and G. M. Cohen. 'Cleavage of Dna to Large Kilobase Pair Fragments Occurs in Some Forms of Necrosis as Well as Apoptosis', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **Vol. 207, No. 1**, 40-47, 1995.
- Blankenberg, F. G., P. D. Katsikis, J. F. Tait, R. E. Davis, L. Naumovski, K. Ohtsuki, S. Kopiwooda, M. J. Abrams, M. Darkes, R. C. Robbins, H. T. Maecker, and H. W. Strauss. 'In Vivo Detection and Imaging of Phosphatidylserine Expression During Programmed Cell Death', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **Vol. 95, No. 11**, 6349-6354, 1998.
- Blankenberg, Francis G. 'In Vivo Imaging of Apoptosis', *Cancer Biology & Therapy* **Vol. 7, No. 10**, 1525-1532, 2008.
- Blankenberg, Francis G., Zoia Levashova, Susanta K. Sarkar, John Pizzonia, Marina V. Backer, and Joseph M. Backer. 'Noninvasive Assessment of Tumor Vegf Receptors in Response to Treatment with Pazopanib: A Molecular Imaging Study', *Translational Oncology* **Vol. 3, No. 1**, 56-64, 2010.
- Blouw, B., H. Song, T. Tihan, J. Bosze, N. Ferrara, H. P. Gerber, R. S. Johnson, and G. Bergers. 'The Hypoxic Response of Tumors Is Dependent on Their Microenvironment', *Cancer Cell* **Vol. 4, No. 2**, 133-46, 2003.
- Boersma, H. H., I. H. Liem, G. J. Kemerink, P. W. L. Thimister, L. Hofstra, L. M. L. Stolk, W. L. van Heerde, M. T. W. Pakbiers, D. Janssen, A. J. Beysens, C. P. M. Reutelingsperger, and G. A. K. Heidendal. 'Comparison between Human

- Pharmacokinetics and Imaging Properties of Two Conjugation Methods for Tc-99m-Annexin A5', *British Journal of Radiology* **Vol. 76, No. 908**, 553-560, 2003.
- Bornmann, C., R. Graeser, N. Esser, V. Zirolì, P. Jantschke, T. Keck, C. Unger, U. T. Hopt, U. Adam, C. Schaechtele, U. Massing, and E. Von Dobschuetz. 'A New Liposomal Formulation of Gemcitabine Is Active in an Orthotopic Mouse Model of Pancreatic Cancer Accessible to Bioluminescence Imaging', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **Vol. 61, No. 3**, 395-405, 2008.
- Bossy-Wetzel, E., and D. R. Green. 'Caspases Induce Cytochrome C Release from Mitochondria by Activating Cytosolic Factors', *Journal of Biological Chemistry* **Vol. 274, No. 25**, 17484-17490, 1999.
- Boucher RM. State of the art in gas plasma sterilization. *Med. Device Diagnost. Indust.* **Vol. 7**, 51-56, 1985.
- Bouvet, M., and R. M. Hoffman. 'Clinically-Relevant Orthotopic Metastatic Models of Pancreatic Cancer Imageable with Fluorescent Genetic Reporters', *Minerva Chirurgica* **Vol. 64, No. 5**, 521-539, 2009.
- Brahimi-Horn, Christiane, and Jacques Pouyssegur. 'The Role of the Hypoxia-Inducible Factor in Tumor Metabolism Growth and Invasion', *Bulletin du cancer* **Vol. 93, No. 8**, E73-80, 2006.
- Brooks, P. C., R. A. F. Clark, and D. A. Cheresh. 'Requirement of Vascular Integrin Alpha(V)Beta(3) for Angiogenesis', *Science* **Vol. 264, No. 5158**, 569-571, 1994.
- Brovko, L. Y., O. A. Gandelman, T. E. Polenova, and N. N. Ugarova. 'Kinetics of Bioluminescence in the Firefly Luciferin Luciferase System', *Biochemistry-Moscow* **Vol. 59, No. 2**, 195-201, 1994.
- Brown, L. M., R. L. Cowen, C. Debray, A. Eustace, J. T. Erler, F. C. D. Sheppard, C. A. Parker, I. J. Stratford, and K. J. Williams. 'Reversing Hypoxic Cell Chemoresistance in Vitro Using Genetic and Small Molecule Approaches Targeting Hypoxia Inducible Factor-1', *Molecular Pharmacology* **Vol. 69, No. 2**, 411-418, 2006.
- Bruehlmeier, M., U. Roelcke, P. A. Schubiger, and S. M. Ametamey. 'Assessment of Hypoxia and Perfusion in Human Brain Tumors Using Pet with F-18-Fluoromisonidazole and O-15-H2O', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 45, No. 11**, 1851-1859, 2004.
- Brun, E., and J. Vicente. 'Volumetric Segmentation of Trabecular Bone into Rods and Plates - a New Method Based on Local Shape Classification', (Ed.)^(Eds.), *Conference on Medical Imaging 2010 - Image Processing*, 2010.
- Brun, Emmanuel, Jerome Vicente, Frederic Topin, Rene Occelli, and Michael J. Clifton. 'Microstructure and Transport Properties of Cellular Materials: Representative Volume Element', *Advanced Engineering Materials* **Vol. 11, No. 10**, 805-810, 2009.
- Byfield, J. E. '5-Fluorouracil Radiation Sensitization - a Brief Review', *Investigational New Drugs* **Vol. 7, No. 1**, 111-116, 1989.
- Cao, S., D. P. Baccanari, S. S. Joyner, S. T. Davis, Y. M. Rustum, and T. Spector. '5-Ethynyluracil (776c85) - Effects on the Antitumor-Activity and Pharmacokinetics of Tegafur, a Prodrug of 5-Fluorouracil', *Cancer Research* **Vol. 55, No. 24**, 6227-6230, 1995.
- Cardillo, T. M., R. Blumenthal, Z. L. Ying, and D. V. Gold. 'Combined Gemcitabine and Radioimmunotherapy for the Treatment of Pancreatic Cancer', *International Journal of Cancer* **Vol. 97, No. 3**, 386-392, 2002.
- Carlin, S., N. Khan, T. Ku, V. A. Longo, S. M. Larson, and P. M. Smith-Jones. 'Molecular Targeting of Carbonic Anhydrase IX in Mice with Hypoxic Ht29 Colorectal Tumor Xenografts', *Plos One* **Vol. 5, No. 5**, 2010.
- Carmeliet, P. 'Angiogenesis in Life, Disease and Medicine', *Nature* **Vol. 438, No. 7070**, 932-936, 2005.

- Carmeliet, P., and D. Collen. 'Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Vascular Development', *Vascular Growth Factors and Angiogenesis* **Vol. 237**, 133-158, 1999.
- Carmeliet, Peter, and Rakesh K. Jain. 'Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis', *Nature* **Vol. 473, No. 7347**, 298-307, 2011.
- Carrato, A., J. Gallego, and E. Diaz-Rubio. 'Oxaliplatin: Results in Colorectal Carcinoma', *Critical Reviews in Oncology Hematology* **Vol. 44, No. 1**, 29-44, 2002.
- Castano, Ana P., Pawel Mroz, and Michael R. Hamblin. 'Photodynamic Therapy and Anti-Tumour Immunity', *Nature Reviews Cancer* **Vol. 6, No. 7**, 535-545, 2006.
- Castedo, M., T. Hirsch, S. A. Susin, N. Zamzami, P. Marchetti, A. Macho, and G. Kroemer. 'Sequential Acquisition of Mitochondrial and Plasma Membrane Alterations During Early Lymphocyte Apoptosis', *Journal of Immunology* **Vol. 157, No. 2**, 512-521, 1996.
- Cepeda, V., M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, and J. M. Perez. 'Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity', *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **Vol. 7, No. 1**, 3-18, 2007.
- Chang, H. Y., and X. L. Yang. 'Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases', *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **Vol. 64, No. 4**, 821-+, 2000.
- Chauchereau, Anne, Nader Al Nakouzi, Catherine Gaudin, Sylvestre Le Moulec, Daniel Compagno, Nathalie Auger, Jean Benard, Paule Opolon, Francois Rozet, Pierre Validire, Gaelle Fromont, and Karim Fizazi. 'Stemness Markers Characterize Igr-Cap1, a New Cell Line Derived from Primary Epithelial Prostate Cancer', *Experimental Cell Research* **Vol. 317, No. 3**, 262-275, 2011.
- Chen, Yu-Hung, Chiau-Yuang Tsai, Pon-Yu Huang, Meng-Ya Chang, Pai-Chiao Cheng, Chen-Hsi Chou, Dong-Hwang Chen, Chrong-Reen Wang, Ai-Li Shiau, and Chao-Liang Wu. 'Methotrexate Conjugated to Gold Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in a Syngeneic Lung Tumor Model', *Molecular Pharmaceutics* **Vol. 4, No. 5**, 713-722, 2007.
- Chiao, J. W., B. S. Moonga, Y. M. Yang, R. Kancharla, A. Mittelman, J. R. Wu-Wong, and T. Ahmed. 'Endothelin-1 from Prostate Cancer Cells Is Enhanced by Bone Contact Which Blocks Osteoclastic Bone Resorption', *British Journal of Cancer* **Vol. 83, No. 3**, 360-365, 2000.
- Chong, W. K. 'Radiofrequency Ablation of Liver Tumors', *Journal of Clinical Gastroenterology* **Vol. 32, No. 5**, 372-374, 2001.
- Chou, T. C., and P. Talalay. 'Multiple Inhibition and Isobol of Enzyme Kinetic System - Derivation of General Equations', *Federation Proceedings* **Vol. 35, No. 3**, 284-284, 1976.
- Chrastina, A., J. Zavada, S. Parkkila, T. Kaluz, M. Kaluzova, J. Rajcani, J. Patorek, and S. Pastorekova. 'Biodistribution and Pharmacokinetics of I-125-Labeled Monoclonal Antibody M75 Specific for Carbonic Anhydrase Ix, an Intrinsic Marker of Hypoxia, in Nude Mice Xenografted with Human Colorectal Carcinoma', *International Journal of Cancer* **Vol. 105, No. 6**, 873-881, 2003.
- Clapper, M. L., H. H. Hensley, W. C. L. Chang, K. Devarajan, M. T. Nguyen, and H. S. Cooper. 'Detection of Colorectal Adenomas Using a Bioactivatable Probe Specific for Matrix Metalloproteinase Activity', *Neoplasia* **Vol. 13, No. 8**, 685-691, 2011.
- Clément F, Cambus JP, Panousis E, Cousty S, Ricard A, Held B. Study of human plasma coagulation when exposed to afterglows at atmospheric pressure and in impulsed DBD conditions. *Second International Conference on Plasma Medicine*. San Antonio, Texas, USA 2009.

- Clezardin, P., J. Gligorov, and P. Delmas. 'Mechanisms of Action of Bisphosphonates on Tumor Cells and Prospects for Use in the Treatment of Malignant Osteolysis', *Joint Bone Spine* **Vol. 67, No. 1**, 22-29, 2000.
- Clines, G. A., and T. A. Guise. 'Hypercalcaemia of Malignancy and Basic Research on Mechanisms Responsible for Osteolytic and Osteoblastic Metastasis to Bone', *Endocrine-Related Cancer* **Vol. 12, No. 3**, 549-583, 2005.
- Coleman, Robert, Janet Brown, Evangelos Terpos, Allan Lipton, Matthew R. Smith, Richard Cook, and Pierre Major. 'Bone Markers and Their Prognostic Value in Metastatic Bone Disease: Clinical Evidence and Future Directions', *Cancer Treatment Reviews* **Vol. 34, No. 7**, 629-639, 2008.
- Coleman, Robert E., Theresa A. Guise, Allan Lipton, G. David Roodman, James R. Berenson, Jean-Jacques Body, Brendan F. Boyce, Laura M. Calvi, Peyman Hadji, Eugene V. McCloskey, Fred Saad, Matthew R. Smith, Larry J. Suva, Russell S. Taichman, Robert L. Vessella, and Katherine N. Weilbaecher. 'Advancing Treatment for Metastatic Bone Cancer: Consensus Recommendations from the Second Cambridge Conference', *Clinical Cancer Research* **Vol. 14, No. 20**, 6387-6395, 2008.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, Unicanc Grp Tumeurs Digestives, and Prodige Intergrp. 'Folfinirox Versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer', *New England Journal of Medicine* **Vol. 364, No. 19**, 1817-1825, 2011.
- Cook, G. J. R., S. Houston, S. F. Barrington, and I. Fogelman. 'Technetium-99m-Labeled Hl91 to Identify Tumor Hypoxia: Correlation with Fluorine-18-Fdg', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 39, No. 1**, 99-103, 1998.
- Corey, E., J. E. Quinn, F. Bladou, L. G. Brown, M. P. Roudier, J. M. Brown, K. R. Buhler, and R. L. Vessella. 'Establishment and Characterization of Osseous Prostate Cancer Models: Intra Tibial Injection of Human Prostate Cancer Cells', *Prostate* **Vol. 52, No. 1**, 20-33, 2002.
- Coussens, L. M., B. Fingleton, and L. M. Matrisian. 'Cancer Therapy - Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations', *Science* **Vol. 295, No. 5564**, 2387-2392, 2002.
- Couturier, O., A. Luxen, J. F. Chatal, J. P. Vuillez, P. Rigo, and R. Hustinx. 'Fluorinated Tracers for Imaging Cancer with Positron Emission Tomography', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **Vol. 31, No. 8**, 1182-1206, 2004.
- Crane, Lucia M. A., George Themelis, K. Tim Buddingh, Tim Buddingh, Niels J. Harlaar, Rick G. Pleijhuis, Athanasios Sarantopoulos, Ate G. J. van der Zee, Vasilis Ntziachristos, and Gooitzen M. van Dam. 'Multispectral Real-Time Fluorescence Imaging for Intraoperative Detection of the Sentinel Lymph Node in Gynecologic Oncology', *Journal of visualized experiments : JoVE*, **No. 44**, 2010.
- Dardon, J. M. 'Pi3k and Mek Kinase Inhibitors in Lung Cancer Treatment in a Murine Transgenic Model', *Bulletin Du Cancer* **Vol. 96, No. 1**, 16-16, 2009.
- Darpolor, Moses M., Robert C. Molthen, and Kathleen M. Schmainda. 'Multimodality Imaging of Abnormal Vascular Perfusion and Morphology in Preclinical 9l Gliosarcoma Model', *Plos One* **Vol. 6, No. 1**, 2011.
- Dayde, David, David Ternant, Marc Ohresser, Stephanie Lerondel, Sabrina Pesnel, Herve Watier, Alain Le Pape, Pierre Bardos, Gilles Paintaud, and Guillaume Cartron. 'Tumor Burden Influences Exposure and Response to Rituximab: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling Using a Syngeneic Bioluminescent Murine Model Expressing Human Cd20', *Blood* **Vol. 113, No. 16**, 3765-3772, 2009.

- de Hevesy, G. 'Medical Progress Due to Isotope Research', *Archiv fur Kinderheilkunde* **Vol. 140, No. 4**, 202-3, 1950.
- de Vries, E. G. E., J. A. Gietema, and S. de Jong. 'Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutic Implications', *Clinical Cancer Research* **Vol. 12, No. 8**, 2390-2393, 2006.
- Dearling, J. L. J., J. S. Lewis, G. E. D. Muller, M. J. Welch, and P. J. Blower. 'Copper Bis(Thiosemicarbazone) Complexes as Hypoxia Imaging Agents: Structure-Activity Relationships', *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **Vol. 7, No. 3**, 249-259, 2002.
- Deer, Emily L., Jessica Gonzalez-Hernandez, Jill D. Coursen, Jill E. Shea, Josephat Ngatia, Courtney L. Scaife, Matthew A. Firpo, and Sean J. Mulvihill. 'Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines', *Pancreas* **Vol. 39, No. 4**, 425-435, 2010.
- Denekamp, J., and A. Dasu. 'Inducible Repair and the Two Forms of Tumour Hypoxia - Time for a Paradigm Shift', *Acta Oncologica* **Vol. 38, No. 7**, 903-918, 1999.
- Diamond, I., R. Jaenicke, C. B. Wilson, A. F. McDonagh, S. Nielsen, and S. G. Granelli. 'Photodynamic Therapy of Malignant Tumors', *Lancet* **Vol. 2, No. 7788**, 1175-&, 1972.
- Dinca, Eduard B., Ramona V. Voicu, and Alexandru V. Ciurea. 'Bioluminescence Imaging of Invasive Intracranial Xenografts: Implications for Translational Research and Targeted Therapeutics of Brain Tumors', *Neurosurgical Review* **Vol. 33, No. 4**, 385-393, 2010.
- Dome, Balazs, Mary J. C. Hendrix, Sandor Paku, Jozsef Tovari, and Jozsef Timar. 'Alternative Vascularization Mechanisms in Cancer - Pathology and Therapeutic Implications', *American Journal of Pathology* **Vol. 170, No. 1**, 1-15, 2007.
- Donald, I., J. Macvicar, and T. G. Brown. 'Investigation of Abdominal Masses by Pulsed Ultrasound', *Lancet* **Vol. 1, No. JUN7**, 1188-1194, 1958.
- Dubois, A. B. 'The Relationship between Oxygen Tension and Light Production before and after Grinding up the Light Organs of Fireflies', *Biological Bulletin* **Vol. 119, No. 2**, 293-294, 1960.
- Dubois, L., W. Landuyt, K. Haustermans, P. Dupont, G. Bormans, P. Vermaelen, P. Flamen, E. Verbeken, and L. Mortelmans. 'Evaluation of Hypoxia in an Experimental Rat Tumour Model by F-18 Fluoromisonidazole Pet and Immunohistochemistry', *British Journal of Cancer* **Vol. 91, No. 11**, 1947-1954, 2004.
- Duggan, Sean T., and Gillian M. Keating. 'Pegylated Liposomal Doxorubicin a Review of Its Use in Metastatic Breast Cancer, Ovarian Cancer, Multiple Myeloma and Aids-Related Kaposi's Sarcoma', *Drugs* **Vol. 71, No. 18**, 2531-2558, 2011.
- Dunn, J. F., J. A. O'Hara, Y. Zaim-Wadghiri, H. Lei, M. E. Meyerand, O. Y. Grinberg, H. G. Hou, P. J. Hoopes, E. Demidenko, and H. M. Swartz. 'Changes in Oxygenation of Intracranial Tumors with Carbogen: A Bold Mri and Epr Oximetry Study', *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **Vol. 16, No. 5**, 511-521, 2002.
- Dvorak, H. F., J. A. Nagy, D. Feng, L. F. Brown, and A. M. Dvorak. 'Vascular Permeability Factor Vascular Endothelial Growth Factor and the Significance of Microvascular Hyperpermeability in Angiogenesis', *Vascular Growth Factors and Angiogenesis* **Vol. 237**, 97-132, 1999.
- Eberhard, A., S. Kahlert, V. Goede, B. Hemmerlein, K. H. Plate, and H. G. Augustin. 'Heterogeneity of Angiogenesis and Blood Vessel Maturation in Human Tumors: Implications for Antiangiogenic Tumor Therapies', *Cancer Research* **Vol. 60, No. 5**, 1388-1393, 2000.
- Eibl, G., and H. A. Reber. 'A Xenograft Nude Mouse Model for Perineural Invasion and Recurrence in Pancreatic Cancer', *Pancreas* **Vol. 31, No. 3**, 258-262, 2005.

- Einhorn, T. A., V. J. Vigorita, and A. Aaron. 'Localization of Tc-99m Methylene Diphosphonate in Bone Using Microautoradiography', *Journal of Orthopaedic Research* **Vol. 4, No. 2**, 180-187, 1986.
- Engelman, J. A., L. Chen, X. H. Tan, K. Crosby, A. R. Guimaraes, R. Upadhyay, M. Maira, K. McNamara, S. A. Perera, Y. C. Song, L. R. Chirieac, R. Kaur, A. Lightbown, J. Simendinger, T. Li, R. F. Padera, C. Garcia-Echeverria, R. Weissleder, U. Mahmood, L. C. Cantley, and K. K. Wong. 'Effective Use of Pi3k and Mek Inhibitors to Treat Mutant Kras G12d and Pik3ca H1047r Murine Lung Cancers', *Nature Medicine* **Vol. 14, No. 12**, 1351-1356, 2008.
- Eschmann, S. M., F. Paulsen, M. Reimold, H. Dittmann, S. Welz, G. Reischl, H. J. Machulla, and R. Bares. 'Prognostic Impact of Hypoxia Imaging with F-18-Misonidazole Pet in Non-Small Cell Lung Cancer and Head and Neck Cancer before Radiotherapy', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 46, No. 2**, 253-260, 2005.
- Etufugh, Chukwuemeka N., and Tania J. Phillips. 'Venous Ulcers', *Clinics in Dermatology* **Vol. 25, No. 1**, 121-130, 2007.
- Faintuch, B. L., G. E. F. Nunez, R. Teodoro, A. M. Moro, and J. Mengatti. 'Radiolabeled Nano-Peptides Show Specificity for an Animal Model of Human Pc3 Prostate Cancer Cells', *Clinics* **Vol. 66, No. 2**, 327-336, 2011.
- Faivre, S., D. Chan, R. Salinas, B. Woynarowska, and J. M. Woynarowski. 'Dna Strand Breaks and Apoptosis Induced by Oxaliplatin in Cancer Cells', *Biochemical Pharmacology* **Vol. 66, No. 2**, 225-237, 2003.
- Feldkamp, L. A., L. C. Davis, and J. W. Kress. 'Practical Cone-Beam Algorithm', *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision* **Vol. 1, No. 6**, 612-619, 1984.
- Fidler, I. J. 'Orthotopic Implantation of Human Colon Carcinomas into Nude-Mice Provides a Valuable Model for the Biology and Therapy of Metastasis', *Cancer and Metastasis Reviews* **Vol. 10, No. 3**, 229-243, 1991.
- Figueiredo, Jose Luiz, Carlo C. Passerotti, Todd Sponholtz, Hiep T. Nguyen, and Ralph Weissleder. 'A Novel Method of Imaging Calcium Urolithiasis Using Fluorescence', *Journal of Urology* **Vol. 179, No. 4**, 1610-1614, 2008.
- Filonov, Grigory S., Kiryl D. Piatkevich, Li-Min Ting, Jinghang Zhang, Kami Kim, and Vladislav V. Verkhusha. 'Bright and Stable near-Infrared Fluorescent Protein for in Vivo Imaging', *Nature Biotechnology* **Vol. 29, No. 8**, 757-U133, 2011.
- Flatmark, K., G. M. Maelandsmo, M. Martinsen, H. Rasmussen, and O. Fodstad. 'Twelve Colorectal Cancer Cell Lines Exhibit Highly Variable Growth and Metastatic Capacities in an Orthotopic Model in Nude Mice', *European Journal of Cancer* **Vol. 40, No. 10**, 1593-1598, 2004.
- Foehrenbach, H., J. L. Alberini, P. Maszelin, G. Bonardel, F. Tenenbaum, O. de Dreuille, B. Richard, J. F. Gaillard, and J. Y. Devaux. 'Positron Emission Tomography in Clinical Oncology', *Presse Medicale* **Vol. 32, No. 6**, 276-283, 2003.
- Folkman, J. 'Anti-Angiogenesis - New Concept for Therapy of Solid Tumors', *Annals of Surgery* **Vol. 175, No. 3**, 409-&, 1972.
- Folkman, J., and D. E. Ingber. 'Angiostatic Steroids - Method of Discovery and Mechanism of Action', *Annals of Surgery* **Vol. 206, No. 3**, 374-383, 1987.
- Fong, Jenna E., Damien Le Nihouannen, and Svetlana V. Komarova. 'Tumor-Supportive and Osteoclastogenic Changes Induced by Breast Cancer-Derived Factors Are Reversed by Inhibition of Gamma-Secretase', *Journal of Biological Chemistry* **Vol. 285, No. 41**, 31427-31434, 2010.
- Frangioni, J. V. 'In Vivo near-Infrared Fluorescence Imaging', *Current Opinion in Chemical Biology* **Vol. 7, No. 5**, 626-634, 2003.

- Freeman, J. W., C. A. Mattingly, and W. E. Strodel. 'Increased Tumorigenicity in the Human Pancreatic-Cell Line Mia Paca-2 Is Associated with an Aberrant Regulation of an Igf-1 Autocrine Loop and Lack of Expression of the Tgf-Beta Type Rii Receptor', *Journal of Cellular Physiology* **Vol. 165, No. 1**, 155-163, 1995.
- Fridman, G., G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman. 'Applied Plasma Medicine', *Plasma Processes and Polymers* **Vol. 5, No. 6**, 503-533, 2008.
- Fridman, Gregory, Ari D. Brooks, Manjula Balasubramanian, Alexander Fridman, Alexander Gutsol, Victor N. Vasilets, Halim Ayan, and Gary Friedman. 'Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria', *Plasma Processes and Polymers* **Vol. 4, No. 4**, 370-375, 2007.
- Fridman, Gregory, Alexey Shereshevsky, Monika M. Jost, Ari D. Brooks, Alexander Fridman, Alexander Gutsol, Victor Vasilets, and Gary Friedman. 'Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines', *Plasma Chemistry and Plasma Processing* **Vol. 27, No. 2**, 163-176, 2007.
- Fujibayashi, Y., H. Taniuchi, Y. Yonekura, H. Ohtani, J. Konishi, and A. Yokoyama. 'Copper-62-Atsm: A New Hypoxia Imaging Agent with High Membrane Permeability and Low Redox Potential', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 38, No. 7**, 1155-1160, 1997.
- Fujimoto, J., I. Aoki, H. Toyoki, S. Khatun, E. Sato, and T. Tamaya. 'Expression of Ets-1 Related to Angiogenesis in Uterine Endometrium During the Menstrual Cycle', *Journal of Biomedical Science* **Vol. 10, No. 3**, 320-327, 2003.
- Fukumura, D., F. Yuan, W. L. Monsky, Y. Chen, and R. K. Jain. 'Effect of Host Microenvironment on the Microcirculation of Human Colon Adenocarcinoma', *American Journal of Pathology* **Vol. 151, No. 3**, 679-688, 1997.
- Fushiki, H., T. Kanoh-Azuma, M. Katoh, K. Kawabata, J. Jiang, N. Tsuchiya, A. Satow, Y. Tamai, and Y. Hayakawa. 'Quantification of Mouse Pulmonary Cancer Models by Microcomputed Tomography Imaging', *Cancer Science* **Vol. 100, No. 8**, 1544-1549, 2009.
- Gadaleta, Cosmo, Annamaria Catino, and Vittorio Mattioli. 'Radiofrequency Thermal Ablation in the Treatment of Lung Malignancies', *In vivo (Athens, Greece)* **Vol. 20, No. 6A**, 765-7, 2006.
- Gallez, B., C. Baudalet, and B. F. Jordan. 'Assessment of Tumor Oxygenation by Electron Paramagnetic Resonance: Principles and Applications', *Nmr in Biomedicine* **Vol. 17, No. 5**, 240-262, 2004.
- Gambhir, S. S. 'Molecular Imaging of Cancer: From Molecules to Humans - Introduction', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 49**, 1S-4S, 2008.
- Geran, R. I., Schumach.Am, B. J. Abbott, Greenber.Nh, and Macdonal.Mm. 'Protocols for Screening Chemical Agents and Natural-Products against Animal Tumors and Other Biological-Systems', *Cancer Chemotherapy Reports Part 3* **Vol. 3, No. 2**, 1-&, 1972.
- Gerber, D. E. 'Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments', *American Family Physician* **Vol. 77, No. 3**, 311-319, 2008.
- Gholamrezanezhad, Ali, Sahar Mirpour, Jalil Majd Ardekani, Mohammad Bagheri, Kamran Alimoghadam, Sarah Yarmand, and Reza Malekzadeh. 'Cytotoxicity of (111)in-Oxine on Mesenchymal Stem Cells: A Time-Dependent Adverse Effect', *Nuclear Medicine Communications* **Vol. 30, No. 3**, 210-216, 2009.
- Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. 'Transduction - Integrin Signaling', *Science* **Vol. 285, No. 5430**, 1028-1032, 1999.
- Gil-Ad, I., A. Zolokov, L. Lomnitski, M. Taler, M. Bar, D. Luria, E. Ram, and A. Weizman. 'Evaluation of the Potential Anti-Cancer Activity of the Antidepressant Sertraline in

- Human Colon Cancer Cell Lines and in Colorectal Cancer-Xenografted Mice', *International Journal of Oncology* **Vol. 33, No. 2**, 277-286, 2008.
- Giovannetti, E., V. Mey, R. Danesi, I. Mosca, and M. Del Tacca. 'Synergistic Cytotoxicity and Pharmacogenetics of Gemcitabine and Pemetrexed Combination in Pancreatic Cancer Cell Lines', *Clinical Cancer Research* **Vol. 10, No. 9**, 2936-2943, 2004.
- Goda, F., J. A. Ohara, K. J. Liu, E. S. Rhodes, J. F. Dunn, and H. M. Swartz. 'Comparisons of Measurements of Po(2) in Tissue in Vivo by Epr Oximetry and Micro-Electrodes', *Oxygen Transport to Tissue Xviii* **Vol. 411**, 543-549, 1997.
- Goldberg, S. N., G. S. Gazelle, and P. R. Mueller. 'Thermal Ablation Therapy for Focal Malignancy: A Unified Approach to Underlying Principles, Techniques, and Diagnostic Imaging Guidance', *American Journal of Roentgenology* **Vol. 174, No. 2**, 323-331, 2000.
- Goldin, A., J. M. Venditti, N. Mantel, and I. Kline. 'Evaluation of Antileukemic Agents Employing Advanced Leukemia L1210 in Mice .4', *Cancer Research* **Vol. 21, No. 3**, 27-&, 1961.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, T. Jacks, D. E. Housman, C. J. Koch, S. W. Lowe, and A. J. Giaccia. 'Hypoxia-Mediated Selection of Cells with Diminished Apoptotic Potential in Solid Tumours', *Nature* **Vol. 379, No. 6560**, 88-91, 1996.
- Graham, J., M. Muhsin, and P. Kirkpatrick. 'Cetuximab', *Nature Reviews Drug Discovery* **Vol. 3, No. 7**, 549-550, 2004.
- Grierson, J. R., K. J. Yagle, J. F. Eary, J. F. Tait, D. F. Gibson, B. Lewellen, J. M. Link, and K. A. Krohn. 'Production of F-18 Fluoroannexin for Imaging Apoptosis with Pet', *Bioconjugate Chemistry* **Vol. 15, No. 2**, 373-379, 2004.
- Gronroos, T., L. Bentzen, P. Marjamaki, R. Murata, M. R. Horsman, S. Keiding, O. Eskola, M. Haaparanta, H. Minn, and O. Solin. 'Comparison of the Biodistribution of Two Hypoxia Markers F-18 Fetnim and F-18 Fmiso in an Experimental Mammary Carcinoma', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **Vol. 31, No. 4**, 513-520, 2004.
- Grund, K. E., D. Storek, and G. Farin. 'Endoscopic Argon Plasma Coagulation (Apc) First Clinical Experiences in Flexible Endoscopy', *Endoscopic surgery and allied technologies* **Vol. 2, No. 1**, 42-6, 1994.
- Guadagno, J. V., G. A. Donnan, R. Markus, J. H. Gillard, and J. C. Baron. 'Imaging the Ischaemic Penumbra', *Current Opinion in Neurology* **Vol. 17, No. 1**, 61-67, 2004.
- Gubitosi, Adelmo, Giancarlo Moccia, Francesca Antonella Malinconico, Francesco Gilio, Giovanni Iside, Umberto G. A. Califano, Fabrizio Foroni, Roberto Ruggiero, Giovanni Docimo, Domenico Parmeggiani, and Massimo Agresti. 'Unusual Metastasis of Left Colon Cancer: Considerations on Two Cases', *Acta Biomed* **Vol. 80, No. 1**, 80-2, 2009.
- Guilbaud, N., L. Kraus-Berthier, F. Meyer-Losic, A. Pierre, and J. Hickman. 'New Approaches in Experimental Oncology: In Search of Therapeutic Models', *Bulletin Du Cancer* **Vol. 88, No. 1**, 75-84, 2001.
- Guise, T. A. 'Molecular Mechanisms of Osteolytic Bone Metastases', *Cancer* **Vol. 88, No. 12 Suppl**, 2892-8, 2000.
- Guise, T. A., and G. R. Mundy. 'Cancer and Bone', *Endocrine Reviews* **Vol. 19, No. 1**, 18-54, 1998.
- Gunasekara, N. S., and D. Faulds. 'Raltitrexed - a Review of Its Pharmacological Properties and Clinical Efficacy in the Management of Advanced Colorectal Cancer', *Drugs* **Vol. 55, No. 3**, 423-435, 1998.
- Hata, Kohkichi, and Kohji Miyazaki. 'Color Doppler Imaging and Angiogenesis in Ovarian Tumors', *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* **Vol. 36, No. 3**, 127-30, 2003.

- Hausmann, W. 'The Sensitising Effect of Haematoporphyrine', *Biochemische Zeitschrift* **Vol. 30**, 276-316, 1911.
- Heijblom, M., J. M. Klaase, F. M. van den Engh, T. G. van Leeuwen, W. Steenbergen, and S. Manohar. 'Imaging Tumor Vascularization for Detection and Diagnosis of Breast Cancer', *Technology in Cancer Research & Treatment* **Vol. 10, No. 6**, 607-623, 2011.
- Heinlin, J., G. Isbary, W. Stolz, G. Morfill, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, T. Nosenko, J. L. Zimmermann, and S. Karrer. 'Plasma Applications in Medicine with a Special Focus on Dermatology', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **Vol. 25, No. 1**, 1-11, 2011.
- Heinlin, Julia, Gregor Morfill, Michael Landthaler, Wilhelm Stolz, Georg Isbary, Julia L. Zimmermann, Tetsuji Shimizu, and Sigrid Karrer. 'Plasma Medicine: Possible Applications in Dermatology', *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **Vol. 8, No. 12**, 968-976, 2010.
- Hernando, C. G., L. Esteban, T. Canas, E. Van den Brule, and M. Pastrana. 'The Role of Magnetic Resonance Imaging in Oncology', *Clinical & Translational Oncology* **Vol. 12, No. 9**, 606-613, 2010.
- Hess, K. R., G. R. Varadhachary, S. H. Taylor, W. Wei, M. N. Raber, R. Lenzi, and J. L. Abbruzzese. 'Metastatic Patterns in Adenocarcinoma', *Cancer* **Vol. 106, No. 7**, 1624-1633, 2006.
- Heymann, D., B. Ory, F. Blanchard, M. F. Heymann, P. Coipeau, C. Charrier, S. Couillaud, J. P. Thiery, F. Gouin, and F. Redini. 'Enhanced Tumor Regression and Tissue Repair When Zoledronic Acid Is Combined with Ifosfamide in Rat Osteosarcoma', *Bone* **Vol. 37, No. 1**, 74-86, 2005.
- Hicks, K. O., F. B. Pruijn, J. R. Sturman, W. A. Denny, and W. R. Wilson. 'Multicellular Resistance to Tirapazamine Is Due to Restricted Extravascular Transport: A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Study in Ht29 Multicellular Layer Cultures', *Cancer Research* **Vol. 63, No. 18**, 5970-5977, 2003.
- Hickson, J., S. Ackler, D. Klaubert, J. Bouska, P. Ellis, K. Foster, A. Oleksijew, L. Rodriguez, S. Schlessinger, B. Wang, and D. Frost. 'Noninvasive Molecular Imaging of Apoptosis in Vivo Using a Modified Firefly Luciferase Substrate, Z-Devd-Aminoluciferin', *Cell Death and Differentiation* **Vol. 17, No. 6**, 1003-1010, 2010.
- Hillen, Femke, and Arjan W. Griffioen. 'Tumour Vascularization: Sprouting Angiogenesis and Beyond', *Cancer and Metastasis Reviews* **Vol. 26, No. 3-4**, 489-502, 2007.
- Hiraga, T., A. Myoui, M. E. Choi, I. Yoshikawa, and T. Yoneda. 'Stimulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Bone-Derived Transforming Growth Factor-Beta Enhances Bone Metastases in Breast Cancer', *Cancer Research* **Vol. 66, No. 4**, 2067-2073, 2006.
- Hoffman, R. M. 'Orthotopic Metastatic Mouse Models for Anticancer Drug Discovery and Evaluation: A Bridge to the Clinic', *Investigational New Drugs* **Vol. 17, No. 4**, 343-359, 1999.
- Holland, J. P., J. S. Lewis, and F. Dehdashti. 'Assessing Tumor Hypoxia by Positron Emission Tomography with Cu-Atsm', *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **Vol. 53, No. 2**, 193-200, 2009.
- Horcajada, Patricia, Christian Serre, Gerard Ferey, Patrick Couvreur, and Ruxandra Gref. 'Hybrid Nanocarriers for Controlled Delivery of Antitumour and Retroviral Drugs Delivery', *M S-Medecine Sciences* **Vol. 26, No. 8-9**, 761-767, 2010.
- Horsman, M. R. 'Measurement of Tumor Oxygenation', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **Vol. 42, No. 4**, 701-704, 1998.
- Huchet, A., P. Fernandez, M. Allard, Y. Belkacemi, J. P. Maire, R. Trouette, S. Eimer, T. Tourdias, and H. Loiseau. 'Molecular Imaging of Tumour Hypoxia', *Cancer Radiotherapie* **Vol. 13, No. 8**, 747-757, 2009.

- Hun, Xu, Huaicheng Chen, and Wei Wang. 'A Electrogenerated Chemiluminescence Biosensor for Ramos Cancer Cell Using Dna Encapsulated Ru(Bpy)(3)Cl(2) as Signal Probe', *Biosensors & Bioelectronics* **Vol. 26, No. 9**, 3887-3893, 2011.
- Ikeda, E., M. G. Achen, G. Brier, and W. Risau. 'Hypoxia-Induced Transcriptional Activation and Increased Messenger-Rna Stability of Vascular Endothelial Growth-Factor in C6 Glioma-Cells', *Journal of Biological Chemistry* **Vol. 270, No. 34**, 19761-19766, 1995.
- Jain, R. K. 'Molecular Regulation of Vessel Maturation', *Nature Medicine* **Vol. 9, No. 6**, 685-693, 2003.
- Jain. 'Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy', *Science* **Vol. 307, No. 5706**, 58-62, 2005.
- Jalilian, Amir Reza, Pejman Rowshanfarzad, Yousef Yari Kamrani, Kamaledin Shafaii, and Mohammad Mirzaii. 'Production and Tumour Uptake of ⁶⁴Cu Pyruvaldehyde-Bis (N4-Methylthiosemicarbazone) for Pet and/or Therapeutic Purposes', *Nuclear medicine review. Central & Eastern Europe* **Vol. 10, No. 1**, 6-11, 2007.
- Jaszczak, R., D. Huard, P. Murphy, and J. Burdine. 'Radionuclide Emission Computed Tomography with a Scintillation Camera', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 17, No. 6**, 551-551, 1976.
- Jenkins, D. E., S. F. Yu, Y. S. Hornig, T. Purchio, and P. R. Contag. 'In Vivo Monitoring of Tumor Relapse and Metastasis Using Bioluminescent Pc-3m-Luc-C6 Cells in Murine Models of Human Prostate Cancer', *Clinical & Experimental Metastasis* **Vol. 20, No. 8**, 745-756, 2003.
- Jin, H. Y., X. F. Liu, V. K. M. Li, Y. J. Ding, S. F. Yun, F. Liu, S. M. Zhou, Y. Song, and M. Ni. 'A Simple Colostomy Implantation Model for Evaluating Colon Cancer', *International Journal of Colorectal Disease* **Vol. 24, No. 1**, 41-47, 2009.
- Jin, Heiying, Zhijian Yang, Jiangdong Wang, Suying Zhang, Yu Sun, and Yijiang Ding. 'A Superficial Colon Tumor Model Involving Subcutaneous Colon Translocation and Orthotopic Transplantation of Green Fluorescent Protein-Expressing Human Colon Tumor', *Tumor Biology* **Vol. 32, No. 2**, 391-397, 2011.
- Joho, S., S. Ishizaka, R. Sievers, E. Foster, P. C. Simpson, and W. Grossman. 'Left Ventricular Pressure-Volume Relationship in Conscious Mice', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **Vol. 292, No. 1**, H369-H377, 2007.
- Josse, O., D. Labar, B. Georges, V. Gregoire, and J. Marchand-Brynaert. 'Synthesis of F-18 - Labeled Ef3 2-(2-Nitroimidazol-1-Yl)-N-(3,3,3-Trifluoropropyl)-Acetamide , a Marker for Pet Detection of Hypoxia', *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **Vol. 9, No. 3**, 665-675, 2001.
- Kaighn, M. E., K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner, and L. W. Jones. 'Establishment and Characterization of a Human Prostatic-Carcinoma Cell-Line (Pc-3)', *Investigative Urology* **Vol. 17, No. 1**, 16-23, 1979.
- Kalchenko, V., S. Shivtiel, V. Malina, K. Lapid, S. Haramati, T. Lapidot, A. Brill, and A. Harmelin. 'Use of Lipophilic near-Infrared Dye in Whole-Body Optical Imaging of Hematopoietic Cell Homing', *Journal of Biomedical Optics* **Vol. 11, No. 5**, 2006.
- Kalghatgi, Sameer U., Gregory Fridman, Moogega Cooper, Gayathri Nagaraj, Marie Peddinghaus, Manjula Balasubramanian, Victor N. Vasilets, Alexander F. Gutsol, Alexander Fridman, and Gary Friedman. 'Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma', *Ieee Transactions on Plasma Science* **Vol. 35, No. 5**, 1559-1566, 2007.
- Kalghatgi S, Fridman A, Friedman G, Clyne AM. Non-thermal plasma treatment enhances proliferation of endothelial cells. *Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, Texas, USA* 2009.

- Karam, J. A., K. Ahrar, and S. F. Matin. 'Ablation of Kidney Tumors', *Surgical Oncology Clinics of North America* **Vol. 20, No. 2**, 341-+, 2011.
- Katayama, M., N. Sanzen, A. Funakoshi, and K. Sekiguchi. 'Laminin Gamma 2-Chain Fragment in the Circulation: A Prognostic Indicator of Epithelial Tumor Invasion', *Cancer Research* **Vol. 63, No. 1**, 222-229, 2003.
- Katz, M. H., S. Takimoto, D. Spivack, A. R. Moossa, R. M. Hoffman, and M. Bouvet. 'A Novel Red Fluorescent Protein Orthotopic Pancreatic Cancer Model for the Preclinical Evaluation of Chemotherapeutics', *Journal of Surgical Research* **Vol. 113, No. 1**, 151-160, 2003.
- Kawato, Y., M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga, and K. Sato. 'Intracellular Roles of Sn-38, a Metabolite of the Camptothecin Derivative Cpt-11, in the Antitumor Effect of Cpt-11', *Cancer Research* **Vol. 51, No. 16**, 4187-4191, 1991.
- Keidar, M., R. Walk, A. Shashurin, P. Srinivasan, A. Sandler, S. Dasgupta, R. Ravi, R. Guerrero-Preston, and B. Trink. 'Cold Plasma Selectivity and the Possibility of a Paradigm Shift in Cancer Therapy', *Br J Cancer* **Vol. 105, No. 9**, 1295-301, 2011.
- Kennedy, J. C., and R. H. Pottier. 'Endogenous Protoporphyrin-Ix, a Clinically Useful Photosensitizer for Photodynamic Therapy', *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **Vol. 14, No. 4**, 275-292, 1992.
- Kersemans, Veerle, James Thompson, Bart Cornelissen, Michael Woodcock, Philip D. Allen, Nico Buls, Ruth J. Muschel, Mark A. Hill, and Sean C. Smart. 'Micro-Ct for Anatomic Referencing in Pet and Spect: Radiation Dose, Biologic Damage, and Image Quality', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 52, No. 11**, 1827-1833, 2011.
- Khan, Nadeem, Sriram Mupparaju, Huagang Hou, Benjamin B. Williams, and Harold Swartz. 'Repeated Assessment of Orthotopic Glioma Po(2) by Multi-Site Epr Oximetry: A Technique with the Potential to Guide Therapeutic Optimization by Repeated Measurements of Oxygen', *Journal of Neuroscience Methods* **Vol. 204, No. 1**, 111-117, 2012.
- Killion, J. J., R. Radinsky, and I. J. Fidler. 'Orthotopic Models Are Necessary to Predict Therapy of Transplantable Tumors in Mice', *Cancer and Metastasis Reviews* **Vol. 17, No. 3**, 279-284, 1998.
- Kim, G., S. W. Huang, K. C. Day, M. O'Donnell, R. R. Agayan, M. A. Day, R. Kopelman, and S. Ashkenazi. 'Indocyanine-Green-Embedded Pebbles as a Contrast Agent for Photoacoustic Imaging', *Journal of Biomedical Optics* **Vol. 12, No. 4**, 2007.
- Kim, M. P., D. B. Evans, H. M. Wang, J. L. Abbruzzese, J. B. Fleming, and G. E. Gallick. 'Generation of Orthotopic and Heterotopic Human Pancreatic Cancer Xenografts in Immunodeficient Mice', *Nature Protocols* **Vol. 4, No. 11**, 1670-1680, 2009.
- Klohs, Jan, Andreas Wunder, and Kai Licha. 'Near-Infrared Fluorescent Probes for Imaging Vascular Pathophysiology', *Basic Research in Cardiology* **Vol. 103, No. 2**, 144-151, 2008.
- Kohne, C. H., and G. J. Peters. 'Uft: Mechanism of Drug Action', *Oncology-New York* **Vol. 14, No. 10**, 13-18, 2000.
- Konerding, M. A., W. Malkusch, B. Klapthor, C. van Ackern, E. Fait, S. A. Hill, C. Parkins, D. J. Chaplin, M. Presta, and J. Denekamp. 'Evidence for Characteristic Vascular Patterns in Solid Tumours: Quantitative Studies Using Corrosion Casts', *British Journal of Cancer* **Vol. 80, No. 5-6**, 724-732, 1999.
- Koong, A. C., V. K. Mehta, Q. T. Le, G. A. Fisher, D. J. Terris, J. M. Brown, A. J. Bastidas, and M. Vierra. 'Pancreatic Tumors Show High Levels of Hypoxia', *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **Vol. 48, No. 4**, 919-22, 2000.
- Krucker, T., A. Lang, and E. P. Meyer. 'New Polyurethane-Based Material for Vascular Corrosion Casting with Improved Physical and Imaging Characteristics', *Microscopy Research and Technique* **Vol. 69, No. 2**, 138-147, 2006.

- Kunimoto, T., K. Nitta, T. Tanaka, N. Uehara, H. Baba, M. Takeuchi, T. Yokokura, S. Sawada, T. Miyasaka, and M. Mutai. 'Antitumor-Activity of 7-Ethyl-10- 4-(1-Piperidino)-1-Piperidino Carbonyloxy-Camptothecin, a Novel Water-Soluble Derivative of Camptothecin, against Murine Tumors', *Cancer Research* **Vol. 47, No. 22**, 5944-5947, 1987.
- Kuzelova, Katerina, Dana Grebenova, and Zbynek Hrkal. 'Labeling of Apoptotic Jurl-Mk1 Cells by Fluorescent Caspase-3 Inhibitor Fam-Devd-Fmk Occurs Mainly at Site(S) Different from Caspase-3 Active Site', *Cytometry Part A* **Vol. 71A, No. 8**, 605-611, 2007.
- Lahorte, C. M. M., J. L. Vanderheyden, N. Steinmetz, C. Van de Wiele, R. A. Dierckx, and G. Slegers. 'Apoptosis-Detecting Radioligands: Current State of the Art and Future Perspectives', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **Vol. 31, No. 6**, 887-919, 2004.
- Lamiche, Coralie, Jonathan Clarhaut, Pierre-Olivier Strale, Sophie Crespín, Nathalie Pedretti, Francois-Xavier Bernard, Christian C. Naus, Vincent C. Chen, Leonard J. Foster, Norah Defamie, Marc Mesnil, Francoise Debiais, and Laurent Cronier. 'The Gap Junction Protein Cx43 Is Involved in the Bone-Targeted Metastatic Behaviour of Human Prostate Cancer Cells', *Clinical & Experimental Metastasis* **Vol. 29, No. 2**, 111-122, 2012.
- Lamoril, J., N. Ameziane, J. C. Deybach, P. Bouizegarene, and M. Bogard. 'Kras and Colorectal Cancer: An Important Step to the Personalized Medicine', *Immuno-Analyse & Biologie Specialisee* **Vol. 24, No. 4**, 196-209, 2009.
- Lassoued, Wiem, Danielle Murphy, Jeff Tsai, Ridha Oueslati, Gavin Thurston, and William M. F. Lee. 'Effect of Vegf and Vegf Trap on Vascular Endothelial Cell Signaling in Tumors', *Cancer Biology & Therapy* **Vol. 10, No. 12**, 1326-1333, 2010.
- Latz, D., K. Fleckenstein, M. Eble, J. Blatter, M. Wannenmacher, and K. J. Weber. 'Radiosensitizing Potential of Gemcitabine (2',2'-Difluoro-2'-Deoxycytidine) within the Cell Cycle in Vitro', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **Vol. 41, No. 4**, 875-882, 1998.
- Lauzier, M. C., M. D. Michaud, M. A. C. Dery, and D. E. Richard. 'Hif-1 Activation During Tumor Progression: Implications and Consequences', *Bulletin Du Cancer* **Vol. 93, No. 4**, 349-356, 2006.
- Lawrence, T. S., E. Y. Chang, T. M. Hahn, L. W. Hertel, and D. S. Shewach. 'Radiosensitization of Pancreatic Cancer Cells by 2',2'-Difluoro-2'-Deoxycytidine', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **Vol. 34, No. 4**, 867-872, 1996.
- Lee, Bi-Fang, Nan-Tring Chiu, Chien-Chung Hsia, and Lie-Hang Shen. 'Accumulation of Tc-99m Hl91 in Tumor Hypoxia: In Vitro Cell Culture and in Vivo Tumor Model', *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* **Vol. 24, No. 9**, 461-472, 2008.
- Lee, Brian W., Michael R. Olin, Gary L. Johnson, and Robert J. Griffin. 'In Vitro and in Vivo Apoptosis Detection Using Membrane Permeant Fluorescent-Labeled Inhibitors of Caspases', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **Vol. 414**, 109-35, 2008.
- Lee, J. M., G. Y. Jin, S. N. Goldberg, Y. C. Lee, G. H. Chung, Y. M. Han, S. Y. Lee, and C. S. Kim. 'Percutaneous Radiofrequency Ablation for Inoperable Non-Small Cell Lung Cancer and Metastases: Preliminary Report', *Radiology* **Vol. 230, No. 1**, 125-134, 2004.
- Leenders, W. P. J., B. Kusters, and R. M. W. de Waal. 'Vessel Co-Option: How Tumors Obtain Blood Supply in the Absence of Sprouting Angiogenesis', *Endothelium-New York* **Vol. 9, No. 2**, 83-87, 2002.

- Lewis, J. S., D. W. McCarthy, T. J. McCarthy, Y. Fujibayashi, and M. J. Welch. 'Evaluation of Cu-64-Atsm in Vitro and in Vivo in a Hypoxic Tumor Model', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 40, No. 1**, 177-183, 1999.
- Li, F., Z. J. Song, Q. H. Li, J. Wu, J. Y. Wang, C. Xie, C. T. Tu, J. Wang, X. W. Huang, and W. Y. Lu. 'Molecular Imaging of Hepatic Stellate Cell Activity by Visualization of Hepatic Integrin Alpha V Beta 3 Expression with Spect in Rat', *Hepatology* **Vol. 54, No. 3**, 1020-1030, 2011.
- Li, J., Y. P. Zhang, and R. S. Kirsner. 'Angiogenesis in Wound Repair: Angiogenic Growth Factors and the Extracellular Matrix', *Microscopy Research and Technique* **Vol. 60, No. 1**, 107-114, 2003.
- Li, Zhi Jie, William Ka Kei Wu, Simon Siu Man Ng, Le Yu, Hai Tao Li, Clover Ching Man Wong, Ya Chun Wu, Lin Zhang, Shun Xiang Ren, Xue Gang Sun, Kam Ming Chan, and Chi Hin Cho. 'A Novel Peptide Specifically Targeting the Vasculature of Orthotopic Colorectal Cancer for Imaging Detection and Drug Delivery', *Journal of Controlled Release* **Vol. 148, No. 3**, 292-302, 2010.
- Liu, Peng, Jianyong Li, Hua Lu, and Bei Xu. 'Thalidomide Inhibits Leukemia Cell Invasion and Migration by Upregulation of Early Growth Response Gene 1', *Leukemia & Lymphoma* **Vol. 50, No. 1**, 109-113, 2009.
- Livraghi, T., L. Solbiati, M. F. Meloni, G. S. Gazelle, E. F. Halpern, S. N. Goldberg, and Cooltip Collaborative Italian Grp. 'Treatment of Focal Liver Tumors with Percutaneous Radio-Frequency Ablation: Complications Encountered in a Multicenter Study', *Radiology* **Vol. 226, No. 2**, 441-451, 2003.
- Logothetis, C. J., and S. H. Lin. 'Osteoblasts in Prostate Cancer Metastasis to Bone', *Nature Reviews Cancer* **Vol. 5, No. 1**, 21-28, 2005.
- Longley, D. B., D. P. Harkin, and P. G. Johnston. '5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies', *Nature Reviews Cancer* **Vol. 3, No. 5**, 330-338, 2003.
- Lui, K. W., D. A. Gervais, R. A. Arellano, and P. R. Mueller. 'Radiofrequency Ablation of Renal Cell Carcinoma', *Clinical Radiology* **Vol. 58, No. 12**, 905-913, 2003.
- Luke, Geoffrey P., Doug Yeager, and Stanislav Y. Emelianov. 'Biomedical Applications of Photoacoustic Imaging with Exogenous Contrast Agents', *Annals of Biomedical Engineering* **Vol. 40, No. 2**, 422-437, 2012.
- Luker, G. D., and K. E. Luker. 'Luciferase Protein Complementation Assays for Bioluminescence Imaging of Cells and Mice', *Molecular Imaging: Methods and Protocols* **Vol. 680**, 29-43, 2011.
- Lungu, Gina F., Meng-n Li Li, Xueyi Xie, Lihong V. Wang, and George Stoica. 'In Vivo Imaging and Characterization of Hypoxia-Induced Neovascularization and Tumor Invasion', *International Journal of Oncology* **Vol. 30, No. 1**, 45-54, 2007.
- Lunt, Sarah Jane, Simon Akerman, Sally A. Hill, Matthew Fisher, Victoria J. Wright, Constantino C. Reyes-Aldasoro, Gillian M. Tozer, and Chryso Kanthou. 'Vascular Effects Dominate Solid Tumor Response to Treatment with Combretastatin a-4-Phosphate', *International Journal of Cancer* **Vol. 129, No. 8**, 1979-1989, 2011.
- Maccauro, Giulio, Maria Silvia Spinelli, Sigismondo Mauro, Carlo Perisano, Calogero Graci, and Michele Attilio Rosa. 'Physiopathology of Spine Metastasis', *International journal of surgical oncology* **Vol. 2011**, 107969, 2011.
- Machein, M. R., J. Kullmer, V. Ronicke, U. Machein, M. Krieg, A. Damert, G. Breier, W. Risau, and K. H. Plate. 'Differential Downregulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Dexamethasone in Normoxic and Hypoxic Rat Glioma Cells', *Neuropathology and Applied Neurobiology* **Vol. 25, No. 2**, 104-112, 1999.
- Maderna, P., and C. Godson. 'Phagocytosis of Apoptotic Cells and the Resolution of Inflammation', *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **Vol. 1639, No. 3**, 141-151, 2003.

- Mallidi, S., G. P. Luke, and S. Emelianov. 'Photoacoustic Imaging in Cancer Detection, Diagnosis, and Treatment Guidance', *Trends in Biotechnology* **Vol. 29, No. 5**, 213-221, 2011.
- Mansfield, J. R., K. W. Gossage, C. C. Hoyt, and R. M. Levenson. 'Autofluorescence Removal, Multiplexing, and Automated Analysis Methods for in-Vivo Fluorescence Imaging', *Journal of Biomedical Optics* **Vol. 10, No. 4**, 2005.
- Markus, R., D. C. Reutens, S. Kazui, S. Read, P. Wright, D. C. Pearce, H. J. Tochon-Danguy, J. I. Sachinidis, and G. A. Donnan. 'Hypoxic Tissue in Ischaemic Stroke: Persistence and Clinical Consequences of Spontaneous Survival', *Brain* **Vol. 127**, 1427-1436, 2004.
- Maublanc, J., J. P. Vuillez, J. N. Talbot, J. Lumbroso, J. P. Muratet, J. Y. Herry, and J. C. Artus. 'Positron Emission Tomography (Pet) and F-18 -Fluorodeoxyglucose (Fdg) in Cancerology', *Bulletin Du Cancer* **Vol. 85, No. 11**, 935-950, 1998.
- Max, R., Rcm Gerritsen, Ptga Nooijen, S. L. Goodman, A. Sutter, U. Keilholz, D. J. Ruiter, and R. M. W. DeWaal. 'Immunohistochemical Analysis of Integrin Alpha V Beta 3 Expression on Tumor-Associated Vessels of Human Carcinomas', *International Journal of Cancer* **Vol. 71, No. 3**, 320-324, 1997.
- McDonald, D. M., and P. L. Choyke. 'Imaging of Angiogenesis: From Microscope to Clinic', *Nature Medicine* **Vol. 9, No. 6**, 713-725, 2003.
- Mejean, A., J. M. Correas, N. Thiounn, Y. Chretien, O. Helenon, B. Dufour, and N. Grenier. 'Conservative Treatment of Kidney Cancer by Cryoablation and Radiofrequency', *Progres En Urologie* **Vol. 16, No. 2**, 101-104, 2006.
- Menaschi WP. Treatment of surfaces. *US patent 3 383 163*. 1968
- Mendelsohn, J., and J. Baselga. 'The Egf Receptor Family as Targets for Cancer Therapy', *Oncogene* **Vol. 19, No. 56**, 6550-6565, 2000.
- Meriggi, F., and A. Zaniboni. 'Gemox: A Widely Useful Therapy against Solid Tumors- Review and Personal Experience', *Journal of Chemotherapy* **Vol. 22, No. 5**, 298-303, 2010.
- Meyer, E. P., G. M. Beer, A. Lang, M. Manestar, T. Krucker, S. Meier, D. Mihic-Probst, and P. Groscurth. 'Polyurethane Elastomer: A New Material for the Visualization of Cadaveric Blood Vessels', *Clinical Anatomy* **Vol. 20, No. 4**, 448-454, 2007.
- Mishra, Anjali, Yusuke Shiozawa, Kenneth J. Pienta, and Russell S. Taichman. 'Homing of Cancer Cells to the Bone', *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* **Vol. 4, No. 3**, 221-35, 2011.
- Mitchell, J. S. 'Applications of Recent Advances in Nuclear Physics to Medicine - with Special Reference to the Pile and the Cyclotron as Sources of Radioactive Isotopes', *British Journal of Radiology* **Vol. 19, No. 228**, 481-487, 1946.
- Miwa, M., M. Ura, M. Nishida, N. Sawada, T. Ishikawa, K. Mori, N. Shimma, I. Umeda, and H. Ishitsuka. 'Design of a Novel Oral Fluoropyrimidine Carbamate, Capecitabine, Which Generates 5-Fluorouracil Selectively in Tumours by Enzymes Concentrated in Human Liver and Cancer Tissue', *European Journal of Cancer* **Vol. 34, No. 8**, 1274-1281, 1998.
- Moel, David, and John Thompson. 'Early Detection of Colon Cancer-the Kaiser Permanente Northwest 30-Year History: How Do We Measure Success? Is It the Test, the Number of Tests, the Stage, or the Percentage of Screen-Detected Patients?', *The Permanente journal* **Vol. 15, No. 4**, 30-8, 2011.
- Mordant, Pierre, Yohann Lorient, Benoit Lahon, Yves Castier, Guy Leseche, Jean-Charles Soria, Marie-Catherine Vozenin, Charles Decraene, and Eric Deutsch. 'Bioluminescent Orthotopic Mouse Models of Human Localized Non-Small Cell Lung Cancer:

- Feasibility and Identification of Circulating Tumour Cells', *Plos One* **Vol. 6, No. 10**, 2011.
- Mrad, O., J. Saunier, C. Aymes-Chodur, V. Mazel, V. Rosilio, F. Agnely, J. Vigneron, A. Etcheberry, and N. Yagoubi. 'Aging of a Medical Device Surface Following Cold Plasma Treatment: Influence of Low Molecular Weight Compounds on Surface Recovery', *European Polymer Journal* **Vol. 47, No. 12**, 2403-2413, 2011.
- Muhsin, M., J. Graham, and P. Kirkpatrick. 'Bevacizumab', *Nature Reviews Drug Discovery* **Vol. 3, No. 12**, 995-996, 2004.
- Mundy, G. R. 'Role of Cytokines in Bone-Resorption', *Journal of Cellular Biochemistry* **Vol. 53, No. 4**, 296-300, 1993.
- Murakami, Y., H. Takamatsu, J. Taki, M. Tatsumi, A. Noda, R. Ichise, J. F. Tait, and S. Nishimura. 'F-18-Labelled Annexin V: A Pet Tracer for Apoptosis Imaging', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **Vol. 31, No. 4**, 469-474, 2004.
- Ngoc Trinh, Huynh, Marie Morille, Jerome Bejaud, Pierre Legras, Anne Vessieres, Gerard Jaouen, Jean-Pierre Benoit, and Catherine Passirani. 'Treatment of 9l Gliosarcoma in Rats by Ferrociphenol-Loaded Lipid Nanocapsules Based on a Passive Targeting Strategy Via the Epr Effect', *Pharmaceutical Research* **Vol. 28, No. 12**, 3189-3198, 2011.
- Nishida, T., K. Inoue, Y. Kawata, N. Izumi, N. Nishiyama, H. Kinoshita, T. Matsuoka, and M. Toyoshima. 'Percutaneous Radiofrequency Ablation of Lung Neoplasms: A Minimally Invasive Strategy for Inoperable Patients', *Journal of the American College of Surgeons* **Vol. 195, No. 3**, 426-430, 2002.
- Ntziachristos, Vasilis. 'Fluorescence Molecular Imaging', *Annual review of biomedical engineering* **Vol. 8**, 1-33, 2006.
- Oh, Jung-Taek, Meng-Lin Li, Hao F. Zhang, Konstantin Maslov, George Stoica, and Lihong V. Wang. 'Three-Dimensional Imaging of Skin Melanoma in Vivo by Dual-Wavelength Photoacoustic Microscopy', *Journal of Biomedical Optics* **Vol. 11, No. 3**, 2006.
- Padhani, A. R., and S. M. Patel. 'Diffusion-Weighted Imaging', In N. C. Gourtsoyiannis (Ed.), *Clinical Mri of the Abdomen: Why, How, When*, Springer-Verlag Berlin, 2011.
- Padhani, Anwar R., Kenneth A. Krohn, Jason S. Lewis, and Markus Alber. 'Imaging Oxygenation of Human Tumours', *European Radiology* **Vol. 17, No. 4**, 861-872, 2007.
- Parmar, Kalindi, Peter Mauch, Jo-Anne Vergilio, Robert Sackstein, and Julian D. Down. 'Distribution of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow According to Regional Hypoxia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **Vol. 104, No. 13**, 5431-5436, 2007.
- Patan, S., L. L. Munn, and R. K. Jain. 'Intussusceptive Microvascular Growth in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft: A Novel Mechanism of Tumor Angiogenesis', *Microvascular Research* **Vol. 51, No. 2**, 260-272, 1996.
- Paulis, Y. W. J., Pmmb Soetekouw, H. M. W. Verheul, V. C. G. Tjan-Heijnen, and A. W. Griffioen. 'Signalling Pathways in Vasculogenic Mimicry', *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **Vol. 1806, No. 1**, 18-28, 2010.
- Pauwels, B., A. E. C. Korst, F. Lardon, and J. B. Vermorken. 'Combined Modality Therapy of Gemcitabine and Radiation', *Oncologist* **Vol. 10, No. 1**, 34-51, 2005.
- Peng, Q., A. M. Soler, T. Warloe, J. M. Nesland, and K. E. Giercksky. 'Selective Distribution of Porphyrins in Skin Thick Basal Cell Carcinoma after Topical Application of Methyl 5-Aminolevulinate', *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **Vol. 62, No. 3**, 140-145, 2001.

- Pesnel, Sabrina, Smail Akkoul, Roger Ledee, Remy Leconge, Arnaud Pillon, Anna Kruczynski, Rachid Harba, Stephanie Lerondel, and Alain Le Pape. 'Use of an Image Restoration Process to Improve Spatial Resolution in Bioluminescence Imaging', *Molecular Imaging* **Vol. 10, No. 6**, 446-452, 2011.
- Pesnel, Sabrina, Arnaud Pillon, Laurent Creancier, Nicolas Guilbaud, Christian Bailly, Anna Kruczynski, Stephanie Lerondel, and Alain Le Pape. 'Quantitation in Bioluminescence Imaging by Correction of Tissue Absorption for Experimental Oncology', *Molecular Imaging and Biology* **Vol. 13, No. 4**, 646-652, 2011.
- Petralia, Giuseppe, Nicola Fazio, Luke Bonello, Gabriele D'Andrea, Davide Radice, and Massimo Bellomi. 'Perfusion Computed Tomography in Patients with Hepatocellular Carcinoma Treated with Thalidomide: Initial Experience', *Journal of Computer Assisted Tomography* **Vol. 35, No. 2**, 195-201, 2011.
- Peyruchaud, Olivier. 'Mechanisms of Bone Metastasis Formation', *Journal de la Societe de biologie* **Vol. 201, No. 3**, 229-36, 2007.
- Piert, M., H. J. Machulla, M. Picchio, G. Reischl, S. Ziegler, P. Kumar, H. J. Wester, R. Beck, A. J. B. McEwan, L. I. Wiebe, and M. Schwaiger. 'Hypoxia-Specific Tumor Imaging with F-18-Fluoroazomycin Arabinoside', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 46, No. 1**, 106-113, 2005.
- Pili, Barbara, L. Harivardhan Reddy, Claudie Bourgaux, Sinda Lepetre-Mouelhi, Didier Desmaele, and Patrick Couvreur. 'Liposomal Squalenoyl-Gemcitabine: Formulation, Characterization and Anticancer Activity Evaluation', *Nanoscale* **Vol. 2, No. 8**, 1521-1526, 2010.
- Pillai, R., E. R. Marinelli, H. Fan, P. Nanjappan, B. Song, M. A. von Wronski, S. Cherkaoui, I. Tardy, S. Pochon, M. Schneider, A. D. Nunn, and R. E. Swenson. 'A Phospholipid-Peg2000 Conjugate of a Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (Vegfr2)-Targeting Heterodimer Peptide for Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging of Angiogenesis', *Bioconjugate Chemistry* **Vol. 21, No. 3**, 556-562, 2010.
- Plant, P. J., E. H. White, and W. D. McElroy. 'Decarboxylation of Luciferin in Firefly Bioluminescence', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **Vol. 31, No. 1**, 98-&, 1968.
- Pleijhuis, Rick G., Maurits Graafland, Jakob de Vries, Joost Bart, Johannes S. de Jong, and Gooitzen M. van Dam. 'Obtaining Adequate Surgical Margins in Breast-Conserving Therapy for Patients with Early-Stage Breast Cancer: Current Modalities and Future Directions', *Annals of Surgical Oncology* **Vol. 16, No. 10**, 2717-2730, 2009.
- Pointu, A. M., A. Ricard, N. Dodet, E. Odic, J. Larbre, and M. Ganciu. 'Production of Active Species in N-2-O-2 Flowing Post-Discharges at Atmospheric Pressure for Sterilization', *Journal of Physics D-Applied Physics* **Vol. 38, No. 12**, 1905-1909, 2005.
- Poupon, Marie-France. 'Biology of Cancer Metastasis', *Bulletin Du Cancer* **Vol. 93**, 165-174, 2006.
- Procissi, Daniel, Filip Claus, Paul Burgman, Jacek Kozirowski, J. Donald Chapman, Sunitha B. Thakur, Cornelia Matei, C. Clifton Ling, and Jason A. Koutcher. 'In Vivo F-19 Magnetic Resonance Spectroscopy and Chemical Shift Imaging of Tri-Fluoro-Nitroimidazole as a Potential Hypoxia Reporter in Solid Tumors', *Clinical Cancer Research* **Vol. 13, No. 12**, 3738-3747, 2007.
- Pulaski, B. A., and S. Ostrand-Rosenberg. 'Mouse 4t1 Breast Tumor Model', *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* **Vol. Chapter 20**, 2001.
- Rao, Jianghong, Anca Dragulescu-Andrasi, and Hequan Yao. 'Fluorescence Imaging in Vivo: Recent Advances', *Current Opinion in Biotechnology* **Vol. 18, No. 1**, 17-25, 2007.

- Ratner, B. D., N. B. Mateo, S. I. Ertel, and T. A. Horbett. 'Interactions of Plasma-Deposited Films with Living Cells', *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **Vol. 199**, 51-PMSE, 1990.
- Raymond, E., S. Faivre, A. M. Coudray, C. Louvet, and C. Gespach. 'Preclinical Studies of Oxaliplatin in Combination Chemotherapy', *Bulletin Du Cancer* **Vol. 88**, S26-S34, 2001.
- Reddy, L. Harivardhan, and Patrick Couvreur. 'Novel Approaches to Deliver Gemcitabine to Cancers', *Current Pharmaceutical Design* **Vol. 14**, **No. 11**, 1124-1137, 2008.
- Reischl, Gerald, Donna S. Dorow, Carleen Cullinane, Andrew Katsifis, Peter Roselt, David Binns, and Rodney J. Hicks. 'Imaging of Tumor Hypoxia with I-124 Iaza in Comparison with F-18 Fmiso and F-18 Faza - First Small Animal Pet Results', *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **Vol. 10**, **No. 2**, 203-211, 2007.
- Reivich, M., D. Kuhl, A. Wolf, J. Greenberg, M. Phelps, T. Ido, V. Casella, J. Fowler, E. Hoffman, A. Alavi, P. Som, and L. Sokoloff. 'Fluorodeoxyglucose-F-18 Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose-Utilization in Man', *Circulation Research* **Vol. 44**, **No. 1**, 127-137, 1979.
- Reshef, A., A. Shirvan, A. Akselrod-Ballin, A. Wall, and I. Ziv. 'Small-Molecule Biomarkers for Clinical Pet Imaging of Apoptosis', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 51**, **No. 6**, 837-840, 2010.
- Ribatti, D., A. Vacca, and F. Dammacco. 'New Non-Angiogenesis Dependent Pathways for Tumour Growth', *European Journal of Cancer* **Vol. 39**, **No. 13**, 1835-1841, 2003.
- Risau, W. 'Mechanisms of Angiogenesis', *Nature* **Vol. 386**, **No. 6626**, 671-674, 1997.
- Robinson, Stephen D., and Kairbaan M. Hodivala-Dilke. 'The Role of Beta 3-Integrins in Tumor Angiogenesis: Context Is Everything', *Current Opinion in Cell Biology* **Vol. 23**, **No. 5**, 630-637, 2011.
- Rousseau, J., V. Escribe, P. Perrot, G. Picarda, C. Charrier, D. Scherman, D. Heymann, F. Redini, and V. Trichet. 'Advantages of Bioluminescence Imaging to Follow Sirna or Chemotherapeutic Treatments in Osteosarcoma Preclinical Models', *Cancer Gene Therapy* **Vol. 17**, **No. 6**, 387-397, 2010.
- Ruelle, Benoit, Sophie Peeterbroeck, Rachel Gouttebaron, Thomas Godfroid, Fabien Monteverde, Jean-Pierre Dauchot, Michael Alexandre, Michel Hecq, and Philippe Dubois. 'Functionalization of Carbon Nanotubes by Atomic Nitrogen Formed in a Microwave Plasma Ar+N₂ and Subsequent Poly(Epsilon-Caprolactone) Grafting', *Journal of Materials Chemistry* **Vol. 17**, **No. 2**, 157-159, 2007.
- Russell, R. G. G., N. B. Watts, F. H. Ebetino, and M. J. Rogers. 'Mechanisms of Action of Bisphosphonates: Similarities and Differences and Their Potential Influence on Clinical Efficacy', *Osteoporosis International* **Vol. 19**, **No. 6**, 733-759, 2008.
- Rygaard, J., and C. O. Povlsen. 'Heterotransplantation of a Human Malignant Tumour To "Nude" Mice', *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* **Vol. 77**, **No. 4**, 758-60, 1969.
- Saif, Muhammad Wasif, Marianne Brennan, Robin Penney, Susan Hotchkiss, and Kristin Kaley. 'Cutaneous Metastasis in a Patient with Pancreatic Cancer', *JOP : Journal of the pancreas* **Vol. 12**, **No. 3**, 306-8, 2011.
- Scabini, M., F. Stellari, P. Cappella, S. Rizzitano, G. Texido, and E. Pesenti. 'In Vivo Imaging of Early Stage Apoptosis by Measuring Real-Time Caspase-3/7 Activation', *Apoptosis* **Vol. 16**, **No. 2**, 198-207, 2011.
- Schirner, M., A. Menrad, A. Stephens, T. Frenzel, P. Hauff, and K. Licha. 'Molecular Imaging of Tumor Angiogenesis', *Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Disease: Molecular and Cell Biological Aspects* **Vol. 1014**, 67-75, 2004.
- Serganova, I., M. Doubrovin, J. Vider, V. Ponomarev, S. Soghomonyan, T. Beresten, L. Ageyeva, A. Serganov, S. D. Cai, J. Balatoni, R. Blasberg, and J. Gelovani. 'Molecular

- Imaging of Temporal Dynamics and Spatial Heterogeneity of Hypoxia-Inducible Factor-1 Signal Transduction Activity in Tumors in Living Mice', *Cancer Research* **Vol. 64, No. 17**, 6101-6108, 2004.
- Serwer, Laura P., Charles O. Noble, Karine Michaud, Daryl C. Drummond, Dmitri B. Kirpotin, Tomoko Ozawa, Michael D. Prados, John W. Park, and C. David James. 'Investigation of Intravenous Delivery of Nanoliposomal Topotecan for Activity against Orthotopic Glioblastoma Xenografts', *Neuro-Oncology* **Vol. 13, No. 12**, 1288-1295, 2011.
- Shekhter, A. B., R. K. Kabisov, A. V. Pekshev, N. P. Kozlov, and Y. L. Perov. 'Experimental and Clinical Validation of Plasmadynamic Therapy of Wounds with Nitric Oxide', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **Vol. 126, No. 8**, 829-834, 1998.
- Shekhter, A. B., V. A. Serezhenkov, T. G. Rudenko, A. V. Pekshev, and A. F. Vanin. 'Beneficial Effect of Gaseous Nitric Oxide on the Healing of Skin Wounds', *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **Vol. 12, No. 4**, 210-219, 2005.
- Shewach, D. S., and T. S. Lawrence. 'Gemcitabine and Radiosensitization in Human Tumor Cells', *Investigational New Drugs* **Vol. 14, No. 3**, 257-263, 1996.
- Shimizu, Tetsuji, Bernd Steffes, Rene Pompl, Ferdinand Jamitzky, Wolfram Bunk, Katrin Ramrath, Matthias Georgi, Wilhelm Stolz, Hans-Ulrich Schmidt, Takuya Urayama, Shuitsu Fujii, and Gregor Eugen Morfill. 'Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination', *Plasma Processes and Polymers* **Vol. 5, No. 6**, 577-582, 2008.
- Shinde, R., J. Perkins, and C. H. Contag. 'Luciferin Derivatives for Enhanced in Vitro and in Vivo Bioluminescence Assays', *Biochemistry* **Vol. 45, No. 37**, 11103-11112, 2006.
- Shitara, Kohei, Keitaro Matsuo, Chihiro Kondo, Daisuke Takahari, Takashi Ura, Yoshitaka Inaba, Hidekazu Yamaura, Yozo Sato, Mina Kato, Yukihide Kanemitsu, Koji Komori, Seiji Ishiguro, Tsuyoshi Sano, Yasuhiro Shimizu, and Kei Muro. 'Prolonged Survival of Patients with Metastatic Colorectal Cancer Following First-Line Oxaliplatin-Based Chemotherapy with Molecular Targeting Agents and Curative Surgery', *Oncology* **Vol. 81, No. 3-4**, 167-174, 2011.
- Shulutko, A. M., N. V. Antropova, and Iu A. Kriuger. 'No-Therapy in the Treatment of Purulent and Necrotic Lesions of Lower Extremities in Diabetic Patients', *Khirurgiia*, **No. 12**, 43-6, 2004.
- Sipkins, D. A., D. A. Cheresch, M. R. Kazemi, L. M. Nevin, M. D. Bednarski, and K. C. P. Li. 'Detection of Tumor Angiogenesis in Vivo by Alpha(V)Beta(3)-Targeted Magnetic Resonance Imaging', *Nature Medicine* **Vol. 4, No. 5**, 623-626, 1998.
- Sladek, R. E. J., and E. Stoffels. 'Deactivation of Escherichia Coli by the Plasma Needle', *Journal of Physics D-Applied Physics* **Vol. 38, No. 11**, 1716-1721, 2005.
- Snyder, Cynthia S., Sharmeela Kaushal, Yuko Kono, Hop S. Tran Cao, Robert M. Hoffman, and Michael Bouvet. 'Complementarity of Ultrasound and Fluorescence Imaging in an Orthotopic Mouse Model of Pancreatic Cancer', *Bmc Cancer* **Vol. 9**, 2009.
- Sone, Shusuke, Kenji Tsushima, Kazuo Yoshida, Kazutoshi Hamanaka, Takaomi Hanaoka, and Ryoichi Kondo. 'Pulmonary Nodules: Preliminary Experience with Semiautomated Volumetric Evaluation by Ct Stratum', *Academic Radiology* **Vol. 17, No. 7**, 900-911, 2010.
- Song, Kwang Hyun, Erich W. Stein, Julie A. Margenthaler, and Lihong V. Wang. 'Noninvasive Photoacoustic Identification of Sentinel Lymph Nodes Containing Methylene Blue in Vivo in a Rat Model', *Journal of biomedical optics* **Vol. 13, No. 5**, 054033, 2008.
- Song, Z. W., and H. Steller. 'Death by Design: Mechanism and Control of Apoptosis', *Trends in Biochemical Sciences* **Vol. 24, No. 12**, M49-M52, 1999.

- Stantz, Keith M., Minsong Cao, Bo Liu, Kathy D. Miller, and Lili Guo. 'Molecular Imaging of Neutropilin-1 Receptor Using Photoacoustic Spectroscopy in Breast Tumors', (Ed.)[^](Eds.), *Conference on Photons Plus Ultrasound - Imaging and Sensing 2010*, 2010.
- Steeg, Patricia S. 'Tumor Metastasis: Mechanistic Insights and Clinical Challenges', *Nature Medicine* **Vol. 12, No. 8**, 895-904, 2006.
- Stemmler, H. J., D. diGioia, W. Freier, H. W. Tessen, G. Gitsch, W. Jonat, W. Brugger, E. Kettner, W. Abenhardt, H. Tesch, H. J. Hurtz, S. Rosel, O. Brudler, and V. Heinemann. 'Randomised Phase Ii Trial of Gemcitabine Plus Vinorelbine Vs Gemcitabine Plus Cisplatin Vs Gemcitabine Plus Capecitabine in Patients with Pretreated Metastatic Breast Cancer', *British Journal of Cancer* **Vol. 104, No. 7**, 1071-1078, 2011.
- Subramanian, G., J. G. McAfee, R. J. Blair, F. A. Kallfelz, and F. D. Thomas. 'Methylene-Tc-99m Diphosphonate - Superior Agent for Skeletal Imaging - Comparison with Other Technetium Complexes', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 16, No. 8**, 744-755, 1975.
- Sumiyama, Kazuki, Mitsuru Kaise, Masayuki Kato, Syouichi Saito, Kenichi Goda, Isao Odagi, Naoto Tamai, Shintaro Tsukinaga, Kazuhiro Matsunaga, and Hisao Tajiri. 'New Generation Argon Plasma Coagulation in Flexible Endoscopy: Ex Vivo Study and Clinical Experience', *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **Vol. 21, No. 7**, 1122-1128, 2006.
- Swirski, Filip K., Cedric R. Berger, Jose-Luiz Figueiredo, Thorsten R. Mempel, Ulrich H. von Andrian, Mikael J. Pittet, and Ralph Weissleder. 'A near-Infrared Cell Tracker Reagent for Multiscopic in Vivo Imaging and Quantification of Leukocyte Immune Responses', *Plos One* **Vol. 2, No. 10**, 2007.
- Tafreshi, N. K., M. M. Bui, K. Bishop, M. C. Lloyd, S. A. Enkemann, A. S. Lopez, D. Abrahams, B. W. Carter, J. Vagner, S. R. Gobmyer, R. J. Gillies, and D. L. Morse. 'Noninvasive Detection of Breast Cancer Lymph Node Metastasis Using Carbonic Anhydrases Ix and Xii Targeted Imaging Probes', *Clinical Cancer Research* **Vol. 18, No. 1**, 207-219, 2012.
- Tait, J. F., and D. Gibson. 'Interaction of Placental Anticoagulant Protein-I (Lipocortin V) with Model Membranes', *Progress in clinical and biological research* **Vol. 349**, 173-81, 1990.
- Takada, M., Y. Nakamura, T. Koizumi, H. Toyama, T. Kamigaki, Y. Suzuki, Y. Takeyama, and Y. Kuroda. 'Suppression of Human Pancreatic Carcinoma Cell Growth and Invasion by Epigallocatechin-3-Gallate', *Pancreas* **Vol. 25, No. 1**, 45-48, 2002.
- Takakura, Hideo, Ryosuke Kojima, Yasuteru Urano, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, and Tetsuo Nagano. 'Aminoluciferins as Functional Bioluminogenic Substrates of Firefly Luciferase', *Chemistry-an Asian Journal* **Vol. 6, No. 7**, 1800-1810, 2011.
- Tatsumi, M., K. Yutani, H. Kusuoka, and T. Nishimura. 'Technetium-99m Hl91 Uptake as a Tumour Hypoxia Marker: Relationship to Tumour Blood Flow', *European Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 26, No. 2**, 91-94, 1999.
- Teicher, B. A., J. S. Lazo, and A. C. Sartorelli. 'Classification of Anti-Neoplastic Agents by Their Selective Toxicities toward Oxygenated and Hypoxic Tumor-Cells', *Cancer Research* **Vol. 41, No. 1**, 73-81, 1981.
- Tekabe, Y., A. Klose, S. Nizami, J. Luma, F. Y. Lee, and L. Johnson. 'New Application of Optical Agent to Image Angiogenesis in Hindlimb Ischemia', *Journal of Biophotonics* **Vol. 4, No. 11-12**, 859-865, 2011.
- Terpogossian, M. M., M. E. Phelps, E. J. Hoffman, and N. A. Mullani. 'Positron-Emission Transaxial Tomograph for Nuclear Imaging (Pett)', *Radiology* **Vol. 114, No. 1**, 89-98, 1975.

- Toegel, S., O. Hoffmann, W. Wadsak, D. Ettlinger, L. K. Mien, K. Wiesner, J. Nguemo, H. Viernstein, K. Kletter, R. Dudczak, and M. Mitterhauser. 'Uptake of Bone-Seekers Is Solely Associated with Mineralisation! A Study with Tc-99m-Mdp, Sm-153-Edtmp and F-18-Fluoride on Osteoblasts', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **Vol. 33, No. 4**, 491-494, 2006.
- Tonks, L., and I. Langmuir. 'A General Theory of the Plasma of an Arc', *Physical Review* **Vol. 34, No. 6**, 0876-0922, 1929.
- Topazian, M., N. Zhong, T. H. Baron, S. S. Vege, and K. K. Wang. 'Photodynamic Therapy of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm', *Endoscopy* **Vol. 44, No. 2**, 214-216, 2012.
- Torimura, Takuji, Takato Ueno, Kinya Inoue, Hideki Lwamoto, Victor Tutsumi, Toru Nakamura, Osamu Hashimoto, Hirohisa Yano, and Michio Sata. 'Vegf Trap (Aflibercept) Suppresses Tumor Growth of Hepatocellular Carcinoma in Mice Mediated by the Inhibition of Angiogenesis and Vasculogenesis', *Hepatology* **Vol. 48, No. 4**, 975A-976A, 2008.
- Tredan, O., C. M. Galmarini, K. Patel, and I. F. Tannock. 'Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment', *Journal of the National Cancer Institute* **Vol. 99, No. 19**, 1441-1454, 2007.
- Tredan, Olivier, Rama Grantab, and Charles Dumontet. 'Can Tumor Hypoxia Be Turned into a Chemotherapeutic Advantage?', *Bulletin Du Cancer* **Vol. 95, No. 5**, 528-534, 2008.
- Treupel, L., M. F. Poupon, P. Couvreur, and F. Puisieux. 'Doxorubicin-Loaded Nanospheres Are Able to Circumvent Multidrug Resistance Invitro', *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **Vol. 313, No. 3**, 171-174, 1991.
- Ueno, H., K. Kiyosawa, and N. Kaniwa. 'Pharmacogenomics of Gemcitabine: Can Genetic Studies Lead to Tailor-Made Therapy?', *British Journal of Cancer* **Vol. 97, No. 2**, 145-151, 2007.
- van Vledder, Mark G., Sanne M. van Aalten, Turkan Terkivatan, Robert A. de Man, Trude Leertouwer, and Jan N. M. Ijzermans. 'Safety and Efficacy of Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Adenoma', *Journal of Vascular and Interventional Radiology* **Vol. 22, No. 6**, 787-793, 2011.
- Vandamme, M., E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J. M. Pouvesle, and A. L. Pape. 'Ros Implication in a New Antitumor Strategy Based on Non-Thermal Plasma', *Int J Cancer*, 2011.
- Vandamme, M., E. Robert, S. Pesnel, E. Barbosa, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape, and J. M. Pouvesle. 'Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results', *Plasma processes and polymers* **Vol. 7, No. 3-4**, 264-273, 2010.
- Venisnik, Katy M., Tove Olafsen, Andreas M. Loening, Meera Iyer, Sanjiv S. Gambhir, and Anna M. Wu. 'Bifunctional Antibody-Renilla Luciferase Fusion Protein for in Vivo Optical Detection of Tumors', *Protein Engineering Design & Selection* **Vol. 19, No. 10**, 453-460, 2006.
- Verli, F. D., T. R. Rossi-Schneider, F. L. Schneider, L. S. Yurgel, and A. L. de Souza. 'Vascular Corrosion Casting Technique Steps', *Scanning* **Vol. 29, No. 3**, 128-132, 2007.
- Vooijs, M., J. Jonkers, S. Lyons, and A. Berns. 'Noninvasive Imaging of Spontaneous Retinoblastoma Pathway-Dependent Tumors in Mice', *Cancer Research* **Vol. 62, No. 6**, 1862-1867, 2002.
- Vrignaud, Sandy, Jean-Pierre Benoit, and Patrick Saulnier. 'Strategies for the Nanoencapsulation of Hydrophilic Molecules in Polymer-Based Nanoparticles', *Biomaterials* **Vol. 32, No. 33**, 8593-8604, 2011.

- Wahl, O., M. Oswald, L. Tretzel, E. Herres, J. Arend, and T. Efferth. 'Inhibition of Tumor Angiogenesis by Antibodies, Synthetic Small Molecules and Natural Products', *Current Medicinal Chemistry* **Vol. 18, No. 21**, 3136-3155, 2011.
- Waksal, H. W. 'Role of an Anti-Epidermal Growth Factor Receptor in Treating Cancer', *Cancer and Metastasis Reviews* **Vol. 18, No. 4**, 427-436, 1999.
- Walter, Thomas, Hedia Brixi-Benmansour, Catherine Lombard-Bohas, and Guillaume Cadiot. 'New Treatment Strategies in Advanced Neuroendocrine Tumours', *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **Vol. 44, No. 2**, 95-105, 2012.
- Wang, X. D., X. Y. Xie, G. N. Ku, and L. H. V. Wang. 'Noninvasive Imaging of Hemoglobin Concentration and Oxygenation in the Rat Brain Using High-Resolution Photoacoustic Tomography', *Journal of Biomedical Optics* **Vol. 11, No. 2**, 2006.
- Wang, Y. G., and Y. Z. Chen. 'Syntheses and Antitumor Activities of New Spin-Labeled 5-Fluorouracil Derivatives .3', *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese* **Vol. 16, No. 6**, 896-899, 1995.
- Warlick, C. A., G. C. Lima, M. E. Allaf, I. M. Varkarakis, L. R. Kavoussi, T. W. Jarrett, and S. B. Solomon. 'Collecting System Involvement During Renal Tumor Cryoablation', *Journal of Urology* **Vol. 173, No. 4**, 263-263, 2005.
- Weizmann, Y., F. Patolsky, E. Katz, and I. Willner. 'Amplified Telomerase Analysis by Using Rotating Magnetic Particles: The Rapid and Sensitive Detection of Cancer Cells', *Chembiochem* **Vol. 5, No. 7**, 943-948, 2004.
- Wende K, Landsberg K, Lindequist U, Weltmann KD, van Woedtke T. *Microorganisms, human cells and cold atmospheric plasma – looking for an intersection. 2nd International Workshop on Plasma-Tissue Interactions*. Greifswald, Germany 2009.
- Wilmanns, C., D. Fan, C. A. Obrian, R. Radinsky, C. D. Bucana, R. Tsan, and I. J. Fidler. 'Modulation of Doxorubicin Sensitivity and Level of P-Glycoprotein Expression in Human Colon-Carcinoma Cells by Ectopic and Orthotopic Environments in Nude-Mice', *International Journal of Oncology* **Vol. 3, No. 3**, 413-422, 1993.
- Wolff, J. E. A., C. Guerin, J. Laterra, J. Bressler, R. R. Indurti, H. Brem, and G. W. Goldstein. 'Dexamethasone Reduces Vascular Density and Plasminogen-Activator Activity in 9l Rat-Brain Tumors', *Brain Research* **Vol. 604, No. 1-2**, 79-85, 1993.
- Xiao, Kai, Yuanpei Li, Juntao Luo, Joyce S. Lee, Wenwu Xiao, Abby M. Gonik, Rinki G. Agarwal, and Kit S. Lam. 'The Effect of Surface Charge on in Vivo Biodistribution of Peg-Oligocholic Acid Based Micellar Nanoparticles', *Biomaterials* **Vol. 32, No. 13**, 3435-3446, 2011.
- Xu, Heng, and Brad W. Rice. 'In-Vivo Fluorescence Imaging with a Multivariate Curve Resolution Spectral Unmixing Technique', *Journal of Biomedical Optics* **Vol. 14, No. 6**, 2009.
- Yang, J., J. H. Kim, G. H. Im, H. Heo, S. Yoon, J. Lee, J. H. Lee, and P. Jeon. 'Evaluation of Antiangiogenic Effects of a New Synthetic Candidate Drug Kr-31831 on Xenografted Ovarian Carcinoma Using Dynamic Contrast Enhanced Mri', *Korean Journal of Radiology* **Vol. 12, No. 5**, 602-610, 2011.
- Yi, S. Q., T. Shimokawa, K. Akita, T. Ohta, M. Kayahara, K. Miwa, and S. Tanaka. 'Anatomical Study of the Pancreas in the House Musk Shrew (*Suncus Murinus*), with Special Reference to the Blood Supply and Innervation', *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* **Vol. 273A, No. 1**, 630-635, 2003.
- Yin, J. J., K. Selander, J. M. Chirgwin, M. Dallas, B. G. Grubbs, R. Wieser, J. Massague, G. R. Mundy, and T. A. Guise. 'Tgf-Beta Signaling Blockade Inhibits Pthrp Secretion by

- Breast Cancer Cells and Bone Metastases Development', *Journal of Clinical Investigation* **Vol. 103, No. 2**, 197-206, 1999.
- Yip-Schneider, M. T., C. J. Sweeney, S. H. Jung, P. L. Crowell, and M. S. Marshall. 'Cell Cycle Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Enhanced Growth Inhibition in Combination with Gemcitabine in Pancreatic Carcinoma Cells', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **Vol. 298, No. 3**, 976-985, 2001.
- Younes, P., N. Chemla, B. Hamze, J. Mani, and J. F. Naouri. 'Prostate Mri Spectroscopy', *Annales D Urologie* **Vol. 41, No. 4**, 145-157, 2007.
- Yuan, H., T. Schroeder, J. E. Bowsher, L. W. Hedlund, T. Wong, and M. W. Dewhirst. 'Intertumoral Differences in Hypoxia Selectivity of the Pet Imaging Agent Cu-64(Ii)-Diacetyl-Bis(N-4-Methylthiosemicarbazone)', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 47, No. 6**, 989-998, 2006.
- Yunis, A. A., G. K. Arimura, and D. J. Russin. 'Human Pancreatic Carcinoma (Mia Paca-2) in Continuous Culture - Sensitivity to Asparaginase', *International Journal of Cancer* **Vol. 19, No. 1**, 128-135, 1977.
- Yutani, K., H. Kusuoka, K. Fukuchi, M. Tatsumi, and T. Nishimura. 'Applicability of Tc-99m-Hl91, a Putative Hypoxic Tracer, to Detection of Tumor Hypoxia', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 40, No. 5**, 854-861, 1999.
- Zagon, I. S., J. R. Jaglowski, M. F. Verderame, J. P. Smith, A. E. Leure-duPree, and P. J. McLaughlin. 'Combination Chemotherapy with Gemcitabine and Biotherapy with Opioid Growth Factor (Ogf) Enhances the Growth Inhibition of Pancreatic Adenocarcinoma', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **Vol. 56, No. 5**, 510-520, 2005.
- Zagzag, D., H. Zhong, J. M. Scalzitti, E. Laughner, J. W. Simons, and G. L. Semenza. 'Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Brain Tumors - Association with Angiogenesis, Invasion, and Progression', *Cancer* **Vol. 88, No. 11**, 2606-2618, 2000.
- Zhang, Rui, Wei Lu, Xiaoxia Wen, Miao Huang, Min Zhou, Dong Liang, and Chun Li. 'Annexin A5-Conjugated Polymeric Micelles for Dual Spect and Optical Detection of Apoptosis', *Journal of Nuclear Medicine* **Vol. 52, No. 6**, 958-964, 2011.
- Zhao, Dawen, Lan Jiang, Eric W. Hahn, and Ralph P. Mason. 'Comparison of (1)H Blood Oxygen Level-Dependent (Bold) and (19)F Mri to Investigate Tumor Oxygenation', *Magnetic Resonance in Medicine* **Vol. 62, No. 2**, 357-364, 2009.
- Zhou, X. D., B. W. Pogue, B. Chen, and T. Hasan. 'Analysis of Effective Molecular Diffusion Rates for Verteporfin in Subcutaneous Versus Orthotopic Dunning Prostate Tumors', *Photochemistry and Photobiology* **Vol. 79, No. 4**, 323-331, 2004.
- Zlotta, A. R., T. Wildschutz, G. Raviv, M. O. Peny, D. vanGansbeke, J. C. Noel, and C. C. Schulman. 'Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation (Rita) Is a Possible New Modality for Treatment of Renal Cancer: Ex Vivo and in Vivo Experience', *Journal of Endourology* **Vol. 11, No. 4**, 251-258, 1997.

Annexes

**Effects of a non thermal plasma treatment alone or in
combination with Gemcitabine in a MIA PaCa2-luc orthotopic
pancreatic carcinoma model**

Laura BRULLÉ^{1,2}, Marc VANDAMME^{1,3,6}, Delphine RIÈS³, Eric MARTEL², Eric
ROBERT³, Stéphanie LERONDEL¹, Valérie TRICHET^{5,7}, Serge RICHARD², Jean-Michel
POUVESLE³, Alain LE PAPE^{1,4}.

Affiliations:

1 : TAAM-CIPA, UPS44 CNRS, 3B rue de la Férollerie, 45071 ORLEANS cedex 2, France

2 : CERB, Chemin de Montifault, 18800 Baugy, France

3 : GREMI UMR-7344 CNRS, Université d'Orléans, 14 rue d'Issoudun - BP 6744, 45067

ORLEANS cedex 2, France

4 : INSERM U1100-EA6305, Université François Rabelais, Tours, France

5 : INSERM, UMR957, Nantes, France

6 : GERMITEC SAS, 30 rue Mozart, 92110 CLICHY, France

7 : Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de physiopathologie de
la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine,
Nantes, France

*** Corresponding author:** Laura BRULLÉ

CIPA-TAAM UPS44 CNRS

3B rue de la Férollerie

45071 ORLEANS cedex 2 - FRANCE

Tel : +33.2.38.25.58.80, Fax : +33.2.38.25.58.81

E-mail: laura.brulle@cnrs-orleans.fr

Shortened running title: Plasma treatment in pancreatic tumor model

Conflict of interest: None

1 **KEYWORDS**

2 Orthotopic pancreatic tumor, bioluminescence, hypoxia, cancer therapy, fibered-non-thermal
3 plasma.

4
5 **ABBREVIATIONS**

6 ATP: Adenosine TriPhosphate

7 BLI: BioLuminescence Imaging

8 CCD: *Charge* Coupled Device

9 DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium

10 DNA: *DeoxyriboNucleic Acid*

11 EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

12 FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

13 FDG: FluoroDeoxyGlucose

14 FITC: Fluorescein IsoThioCyanate

15 MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

16 NTP: Non-Thermal Plasma

17 PBS: Phosphate Buffered Saline

18 PET: Positron Emission Tomography

19 ROI: Region Of Interest

20 ROS: Reactive Oxygen Species

21 SCCM: Standard Cubic Centimeters per Minute

1 SEM: Standard Error of the Mean

2 TRITC: Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate

3 VIP: Vasoactive Intestinal Peptide

4

5 **CATEGORY**

6 Research Articles, Cancer Therapy (3.1.8)

7

8 **NOVELTY and IMPACT**

9 This paper describes the effects of a fibered non thermal plasma alone or in combination with
10 gemcitabine for the treatment of pancreatic carcinoma in a murine orthotopic model.

11 This is the first paper to report the *in vivo* antitumor effect of a non thermal plasma jet
12 (plasma gun).

13

1 **ABSTRACT**

2 Pancreatic tumors are the gastrointestinal cancer with the worst prognosis in humans and
3 with a survival rate of 5% at 5 years. Nowadays, no chemotherapy has demonstrated efficacy
4 in terms of survival for this cancer. Previous study focused on the development of a new
5 therapy by non thermal plasma showed significant effects on tumor growth for colorectal
6 carcinoma and glioblastoma. To allow targeted treatment, a fibered plasma (Plasma Gun) was
7 developed and its evaluation was performed on an orthotopic pancreatic carcinoma model
8 using a MIA PaCa2-luc bioluminescent cell line. The aim of this study was to characterize
9 this pancreatic carcinoma model and to determine the effects of Plasma Gun alone or in
10 combination with gemcitabine. During a 36 days period, quantitative BLI could be used to
11 follow the tumor progression and we demonstrated that plasma gun induced an inhibition of
12 MIA PaCa2-luc cells proliferation *in vitro* and *in vivo* and that this effect could be improved
13 by association with gemcitabine possibly thanks to its radiosensitizing properties.

1. Introduction

Developments in plasma physics make possible to use Non Thermal Plasma (NTP) in cancer research. Indeed, the first demonstration of plasma antitumor activity has been brought on subcutaneous tumors submitted to exposure *via* a large surface probe [1], the plasma being delivered in close vicinity of the powered electrode. Recently, improvements in fibered plasma generation allowed a propagation inside long, flexible and small capillaries using gas flow as low as few sccm. This new NTP source, so called Plasma Gun [2], is one of the large variety of plasma jets exhibiting unique features for biomedical applications, mainly endoscopic administration and *in situ* treatment of a variety of tumors.

Pancreatic tumors are one of the most lethal types of cancer. Treatments depend on the diagnosis stage, and are mainly based on a tumor resection followed by ionizing radiation and chemotherapy such as gemcitabine (2'2'-difluorodeoxycytidine). Despite these therapeutic approaches, only about 5% of the patients are still alive 5 years after being diagnosed. In this context, localized treatments such as photodynamic therapy are currently under investigations. Photodynamic therapy uses light emission at a specific wavelength combined with a photosensitizing agent in order to generate reactive oxygen species (ROS) in the treated area. For this purpose, specific agents are needed to target the tumor and to avoid systemic side effects such as those associated to sun exposure of the patient. Based on the exploitation of ROS properties, Plasma gun is a potential alternative for a loco regional treatment with *a priori* limited side effects. NTP is an ionized gas (air or noble gas) sustained by a pulsed electric discharge. It is known to have an antitumor effect *in vitro* on various cell lines and *in vivo* on heterotopic xenograft tumors [3]. This cold excited gas (<40°C) contains free charges (electrons, ions), free radicals, excited molecules and can be delivered through capillaries to induce ROS generation in a localized site. Indeed, in a previous study, an increase in mice survival was observed with NTP on U87 human malignant glioma and melanoma heterotopic

26 xenografts [3; 4; 5]. This antitumor effect was demonstrated to be associated to ROS
27 generation in the vicinity of the cells, leading to DNA damages, cells cycle arrest and finally
28 apoptosis induction with limited side effects to healthy tissues [4; 6].

29 In a context of translational research and considering the ability of plasma gun to deliver *in*
30 *situ* exposure to a tumor, a bioluminescent orthotopic pancreatic tumor was developed to
31 allow a longitudinal non-invasive follow up of tumor growth in a clinically relevant animal
32 model. In human, the most common pancreatic cancer is ductal adenocarcinoma [7],
33 developing within the exocrine part of the pancreas and characterized by a severe tumor
34 hypoxia [8] inducing a resistance against chemo- and radiation therapies [9]. In this goal,
35 among other pancreatic tumor cell lines, the MIA PaCa2 cell line appeared quite relevant for a
36 preclinical approach. The effects of plasma gun applied directly on primary pancreatic tumors
37 were compared to gemcitabine as a reference drug [10]. Moreover, considering the
38 radiosensitizing properties of gemcitabine [11], the potential interest of an association with
39 plasma was investigated.

40 We first documented the NTP and gemcitabine antitumor efficacy *in vitro* on MIA PaCa2
41 cells, and then we evaluated these treatments *in vivo*. So, a luciferase stable transduction of
42 MIA PaCa2 cells was done to allow tumor growth monitoring by *in vivo* bioluminescence
43 imaging (BLI). Interests and limitations of BLI, an imaging modality dependent of cells
44 metabolism and proliferation, were considered more especially in the context of this hypoxic
45 tumor.

2. Materials and Methods

2.1 Drugs and Chemicals

Gemcitabine was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and dissolved in sterile NaCl 0,9%. DMEM medium, fetal bovine serum, horse serum, L-glutamine (2mM), penicillin (50 IU/ml), and streptomycin (50 µg/ml) were from VWR (VWR International S.A.S, France). All other chemicals were from Sigma.

2.2 Culture of MIA PaCa2 cells

The MIA PaCa2 pancreatic cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were maintained in a humidified incubator at 37°C in 5% CO₂ with Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2,5% horse serum, 1% L-Glutamine and 1% penicillin and streptomycin.

2.3 Generation of luciferase expressing MIA PaCa-2 cells

To allow bioluminescence imaging (BLI), the MIA PaCa2 cell line was stably transduced with firefly luciferase encoding lentiviral particles as previously described [12]. Briefly, HEK293FT cells (Human Embryonic Kidney cells optimized for viral production) were transfected with 3 µg of the optimized packaging mix from ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen Life Technologies, Cergy-pontoise, France), 9 µg of pLNT-LucF [12; 13] and 0,9µg of the pFG12 [14] which encode the luciferase and the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), respectively. Virus-containing supernatants were harvested 48 hr post-transfection and concentrated 60-fold by ultrafiltration. To generate stably modified pancreatic adenocarcinoma cells, 10 000 MIA PaCa2 cells were seeded in wells of a 96-well plate in 100 µl medium and infected 24 hr later with 50 µl virus containing supernatant, corresponding to 250 EGFP viral units per cell. After 2 weeks, EGFP expression level was

quantified by flow cytometry. In addition, luciferase activity was measured for varying numbers of cells in a 96-well optical bottom plate (NUNC, Dominique Dutscher, Issy les Moulineaux, France) with 50 µl of lysis substrate buffer from the 'Steady-Glo Luciferase Assay System' (Promega) in each well. Light measurements were carried out in duplicate by spectrophotometry (VICTOR plate reader, Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) for 10 s and results were corrected for background luminescence from parental cells.

2.4 Animals and orthotopic tumor induction

Female Swiss *nude* mice (Charles River Laboratoires France - L'Arbresle, France) were acclimated for 5 days in the laboratory before experimentation.

Animals were housed in plastic cages inside a controlled ventilated rack with free access to water and food *ad libidum*. All experiments were performed in accordance with national animal care guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree no 87-848). Tumor xenografts, plasma treatment and BLI were carried out under general anesthesia obtained with 2,5% isoflurane in air (Aerrane®, Maurepas, France).

For tumor orthotopic xenografts, abdomens were prepped with betadine solution. A 1-cm wide incision was made in the left upper quadrant of the abdomen. The tip of pancreatic tail was gently grasped and pancreas/spleen were externalized in a lateral direction to be fully exposed. To improve injection reproducibility, a micromanipulator and a stereomicroscope, were used, the needle being inserted into the tail of pancreas and positioned in the pancreatic head region. $2 \cdot 10^6$ MIA PaCa2-luc cells in 50 µL PBS were slowly injected using a 27-gauge needle. The spleen was then returned to the appropriate position in abdomen, and skin and peritoneum closed with 5-0 vicryl sutures. The animals were then placed on a warming blanket until they recovered from anesthesia.

All along the study, body weight was followed as an indicator of the health status.

51

52 **2.5 Gemcitabine and NTP treatment**

53 For *in vitro* assays, MIA PaCa2 cells (5×10^4) were seeded in 24- or 96-well plates 24 hr
54 before gemcitabine or NTP treatment that was performed in open air, 2 mm above the surface
55 of the medium (500 μ l) containing adherent cells. Gemcitabine was dissolved directly in the
56 medium at different doses (1-200 nM).

57 Concerning *in vivo* studies, four days after surgical implantation of MIA PaCa2-luc cells,
58 mice were randomized according to bioluminescence and assigned into 4 groups of 8 mice
59 each. The first group was negative control (CTRL) and did not receive treatment but vehicle
60 (saline) and helium gas flow alone required for plasma. Mice in the second group (GEM)
61 received every 5 days gemcitabine *via* the dorsal tail vein at a dose of 200 mg/kg. Dosing was
62 performed during 20 days (5 treatments).

63 In the third group (NTP) mice received Plasma Gun three times, at a repetition rate of 2 kHz
64 during 10 min every 10 days, this protocol having previously shown a good tolerance by
65 healthy pancreatic tissue. During all treatment procedures, anesthetized mice were placed on a
66 temperature regulated silver plate, pancreas of the mice were externalized thanks to a surgical
67 procedure and at that time, caliper measurement was done. Either the helium flow alone or the
68 plasma was delivered through the capillary tip positioned at a distance of two millimeters
69 above the tumor during 10 minutes (**Figure 1a**).

70 In the last group, mice received a NTP/GEM combined treatment. Mice received gemcitabine
71 24 hr before NTP exposure. The therapeutic schedule was the same for gemcitabine alone and
72 NTP alone groups (i.e. every 5 days for gemcitabine, every 10 days for NTP) (**Figure 1b**).

73 At day 36 post induction, mice were euthanized and the tumor size measured with a caliper,
74 volume (V in mm^3) being calculated using the formula for an ellipsoid $V = 4/3\pi(a/2 \cdot b/2 \cdot c/2)$.
75 a, b, c being the full length of the three axes.

76

77 **2.6 Bioluminescence Imaging (BLI)**

78 BLI allows real-time and non-invasive imaging of tumor evolution. BLI is based on detection
79 of photon released through chemical reactions catalyzed by luciferase and depending on ATP
80 and O₂. As a consequence, BLI intensity is closely related to tumor activity and size at the
81 time the tumors are in aerobic conditions. During tumor growth, metabolism shifts towards
82 hypoxia and the bioluminescence as a biomarker becomes no more relevant.

83 BLI mice imaging was performed before the first treatment (D3) and then weekly during
84 treatment using the IVIS-luminaII imaging system (Caliper Life Sciences, Roissy, France).
85 Each mouse was intraperitoneally injected with luciferin potassium salt (Promega, France) at
86 a dose of 100 mg/kg and imaged after 5 minutes. Animals under gaseous anesthesia were
87 placed on a temperature controlled warm bed (37°C) inside the dark box of a high sensitivity
88 CCD camera cooled to -90°C. Acquisition settings (binning and duration) were set up
89 depending upon tumor activity. Region of interest (ROI) was drawn manually around the
90 tumor area, and the light (photons/sec) emitted from the ROI was measured using Living
91 Image software (Caliper Life Sciences, Roissy, France).

92

93 **2.7 Cell growth assay**

94 The cytotoxicity of NTP and Gemcitabine was investigated using MTT assay and BLI.

95 Briefly, cell viability was determined by measuring 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
96 diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye absorbance by living cells. Cells were seeded in 96
97 well culture plates and incubated overnight before being treated with NTP or Gemcitabine.
98 After a 48 hr incubation period, a MTT solution (2.5 mg/ml in PBS) was added to the culture
99 medium, and cells were incubated for 4 h. Formazan crystals resulting from MTT reduction
100 by viable cells were dissolved by the addition of an equal volume of solubilizing solution

(10% SDS in DMSO/acetic acid 99/1) in each well. The absorbance of formazan was measured at a wavelength of 570 nm.

For *in vitro* BLI imaging, cells were seeded in 24 well culture plates and incubated overnight before being treated with NTP or gemcitabine. After a 48 hr incubation period, 300 µg/ml luciferin potassium salt (Promega, France) were added in each well and the BLI was measured after 5 min incubation at 37°C using IVIS-lumina II imaging system (Caliper Life Sciences, Roissy, France). BLI intensity expressed in photons/sec in each well was normalized to the non-treated cell level.

2.8 Necropsy and pimonidazole assay

Pimonidazole as a 2-nitroimidazole compound is reductively activated at low-oxygen concentrations. Pimonidazole adducts bind to cell molecules that possess free thiol groups then accumulate *in vivo* and indicates tissue hypoxia directly at the cellular level. Hypoxyprobe[®] (pimonidazole) was obtained from the Natural Pharmacia International, Inc. (Research Triangle Park, NC) and was dissolved in 0,9% saline solution at a concentration of 120 mg/ml. Each animal received 120 mg/kg Hypoxyprobe[®] i.p. one hour prior to be sacrificed. Hypoxic accumulation of pimonidazole was determined by immunohistochemistry.

2.9 Immunohistochemistry

Tumors were embedded in Tissue Tek and frozen sections fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. After being washed with PBS, slices were incubated in 5% FBS (Invitrogen) and 0,1% Triton-X (Sigma-Aldrich) to inhibit nonspecific binding of antibodies. Primary antibodies were applied, and sections were incubated overnight at 4°C. The primary antibodies used were anti-luciferase rabbit polyclonal (1:100, Abcam, Cambridge, UK) and anti-pimonidazole mouse monoclonal (1:100, Hypoxyprobe, HPI, Inc.,

USA). Slices were then washed with PBS, FITC conjugated anti-mouse IgG and TRITC conjugated anti-rabbit IgG (1:500) were added and the tissue sections were incubated for 60 min at room temperature. Slices were coverslipped with DAPI mounting medium and visualized on a **ZEISS LSM 510 Meta** confocal microscope equipped with Axiovision software (CARL, ZEISS SAS, Le Pecq, France).

2.10 Data analysis

Results are expressed as means $\pm$ SEM. Statistical significance was determined by Mann-Whitney test. LD 50 was determined according to the Hill slope method (GraphPad Prism 5.0, La Jolla, CA). Differences were considered significant at p values $<0,05$.

3. Results

3.1 NTP and Gemcitabine present a significant antitumor effect *in vitro*

Lentiviral particles were used to transfer the firefly luciferase and EGFP genes to MIA PaCa2 cells. Two weeks after viral transduction, flow cytometry analysis showed that 100% of virus-treated MIA PaCa2 cells expressed EGFP (data not shown), indicating homogenous modification of cells. *In vitro* analysis of the luciferase activity revealed a 250 fold increase for virus-treated MIA PaCa2 cells (MIA PaCa2-luc cells) compared to parental cells (data not shown).

The impact of the transduction with firefly luciferase expressing viral particles on cell growth *in vitro* was assessed during 96 hours and revealed no difference between both cell lines (MIA PaCa2 and MIA PaCa2-luc cells), **figure 2a**. Moreover, evaluation of treatment responses on non transduced and transduced cells was realized using gemcitabine. The cell viability and metabolism assays showed no modification of the two cells lines responses (**Figure 2b**). Using BLI, both treatments (NTP and gemcitabine) present a significant antiproliferative effect on pancreatic cells and the IC₅₀, as determined using Hill slope method, was 9 s and 10 nM for NTP and gemcitabine respectively (**Figure 3**). Combined treatment NTP/Gemcitabine (5 nM) lead to an IC₅₀ of 4 s. Considering the interesting antiproliferative potential of NTP and gemcitabine on MIA PaCa2-luc cells, the antitumor evaluation of these treatments was done *in vivo* on orthotopic xenografts.

3.2 Bioluminescence limitations are linked to the hypoxic characteristics of MIA PaCa2-luc tumors.

Before assessing the antitumor effect of gemcitabine and NTP treatments, we needed to characterize the orthotopic tumor model induced with MIA PaCa2-luc cells. Considering weight and tumor volume, no significant difference in tumor growth was observed at D36 between the groups of nude mice that received parental or transduced cells (**figure 4**). Next,

transduced cells were used for assessment of tumors BLI intensity from D10 to D48 (**figure 5**). An increase of BLI intensity was observed from D10 to D36 reflecting tumor growth, but a decrease of BLI intensity was observed from D42. This evolution of light emission which is not in accordance with the progression of tumor volume could be associated to several mechanisms including either a loss of luciferase gene expression or hypoxia, since BLI is an imaging modality strictly dependent upon cells metabolism.

To visualize the persistence of luciferase protein in the tumor cells, mice were euthanized on D48 and tumor excised to perform immunohistochemistry with an anti-luciferase antibody. As displayed in **figure 6a**, all cells presented a positive labeling of luciferase on the whole tumor section. To localize hypoxic cells in the tumors, a pimonidazole adducts staining was performed leading to a positive immunosignal in the center and the periphery of the tumor (**figure 6b**). From these observations, the assessment of primary tumor growth with quantitative BLI was considered as not relevant beyond 36 days after tumor induction.

3.3 Gemcitabine reduces tumor proliferation.

The gemcitabine antitumor efficacy was tested *in vivo* on orthotopic pancreatic tumors induced with MIA PaCa2-luc cells. BLI results are presented in **figure 7a**. In the group treated with saline and gas flow (CTRL group), an increase of BLI was observed along the weeks while in the group treated with gemcitabine (GEM group) a stabilization of BLI was obtained from D17. The observed antitumor effect was confirmed by caliper measurements at the end of the study (D36). Volumes of non-treated tumors were 80 mm³ as compared to 50 mm³ for treated tumors (**figure 7b**). Tumor weights lead to similar results with 96 mg and 76 mg respectively (**figure 7c**). At D36, the volume difference between gemcitabine-treated and non-treated tumors was significant ($p < 0,01$) whereas the weight difference was not significant.

52

53 **3.4 NTP treatment produces a greater effect than Gemcitabine on tumor growth.**

54 NTP and gemcitabine antitumor effects were then compared on MIA PaCa2-luc cell-induced
55 pancreatic tumors. Results obtained from BLI imaging performed once a week are presented
56 in **figure 7a**. In the CTRL group, an increase of BLI was observed, while in the group treated
57 with NTP (NTP group) a highly significant stabilization was induced by the treatment
58 ($p < 0,001$ at D30). The observed antitumor effect was confirmed from caliper measurements.
59 At D36, volumes of non-treated tumors were 80 mm^3 as compared to 16 mm^3 for treated
60 tumors (**figure 7b**). Tumor weights showed similar variations with 96 mg and 42 mg
61 respectively (**figure 7c**). So NTP was shown to be more effective than gemcitabine 200
62 mg/kg.

63

64 **3.5 The combination gemcitabine/NTP enhances the antitumor effect.**

65 By inhibiting the DNA synthesis, gemcitabine has been shown to enhance the cytotoxic
66 activity of radiation [11]. Our next goal was then to test the combined effects of NTP and
67 gemcitabine treatments to enhance the antitumor effect without increasing toxicity. When
68 combining NTP and GEM, BLI intensity was significantly lower than CTRL group (**Figure**
69 **7a**). At D36, a significant difference of tumor volumes was observed for the group treated
70 with the bitherapy (NTP+GEM group) (6 mm^3) as compared to CTRL group (80 mm^3).
71 Similar results were obtained for tumor weights with 12 mg for NTP+GEM group and 96 mg
72 for CTRL group (**Figure 7c**).

73 When comparing NTP+GEM and NTP groups, a significant difference of tumor weights, 12
74 mg and 42 mg respectively, was observed at D36 ($p = 0,03$). This observation shows that the
75 plasma gun antitumor effects are increased by 33% when it is associated with gemcitabine
76 (**figure 7c**).

4. DISCUSSION

This experimental work reports that plasma gun, alone and more especially in combination with gemcitabine, induces a significant reduction of tumor growth in a mouse orthotopic model of human pancreatic cancer.

Tumor of the exocrine pancreas mainly ductal adenocarcinoma, the most common form of pancreatic cancer [7], is rarely curable and has an overall survival rate of less than 5%. Moreover, chemotherapy and radiotherapy are ineffective in most cases, so new therapeutic approaches and *in vivo* models offering high predictivity for translational research are necessary. In this context, we evaluated a new antitumor strategy based on non-thermal plasma which allows a local treatment. Indeed, NTP can be applied at the end of a small catheter and has demonstrated significant antitumor activity on various cell lines *in vitro* including colorectal and melanoma cells [3; 15; 16; 17]. This antitumor activity is related to a major cell death induction resulting from high rate generation of ROS in the vicinity of the cells [3; 18]. With the Plasma Gun, the ROS are mainly produced at the capillary outlet where energy transfer occurs between the helium plasma and the ambient air.

This local treatment allows to avoid systemic side effects because only adjacent tissue of the tumor are exposed. Moreover, some studies showed a major sensitivity of tumor cells as compared to healthy tissues [6; 16]. This targeted effect could be explained by a better ROS tolerance of normal cells than tumor cells which have a higher basal level of ROS [19].

In our study, we investigated initially *in vitro* effects of gemcitabine and/or NTP on a representative cell line of ductal adenocarcinoma. An activity of gemcitabine in agreement with previous results [20; 21; 22] and a significant effect of NTP were observed. Given these encouraging results *in vitro*, and considering the good tolerance of plasma [15], we further investigated the potential antitumor properties of NTP treatment *in vivo*. Trying to provide more pertinent preclinical data, we have developed our approach in a context of translational

research using a relevant tumor model and a clinically based treatment strategy. The first requirement was the development of an orthotopic pancreatic tumor model in mouse with mainly metastatic potential [23; 24] and hypoxic component [25], thus closely mimicking the pathophysiology of human pancreatic cancer [26]. Despite the different morphology of human and mouse pancreas similar patterns of metastasis were observed in agreement with published data [26]. Indeed, at late times (D45) 70% mice exhibited spleen, peritoneum metastasis and few foci in liver, kidney, stomach, intestines and diaphragm (data not shown), supporting a preservation of cells properties following transduction. To date, a powerful and widely used imaging modality in oncopharmacology for orthotopic tumors is BLI, an imaging based on a gene expression dependent upon metabolism (O_2 and ATP). In aerobic conditions, bioluminescence intensity is closely dependent upon cell number and correlates with cell proliferation [27; 28]. In this study, our data showed a decreased bioluminescence beyond D36 in the control group, leading to two hypotheses: either loss of luciferase gene expression or hypoxic areas in the tumor. An anti-luciferase immunolabelling confirmed the presence of luciferase protein in the whole tumor. However, antipimonidazole immunolabelling revealed hypoxia both at the center and at the periphery of the tumor. This suggests that hypoxia is involved in the observed reduction of the bioluminescent signal. This hypoxia pattern was already reported in a preclinical model of pancreatic tumor [29] as well as in human pancreatic cancers which are characterized by a low oxygen tension [29]. The decrease of BLI along the tumor growth associated to the progression of hypoxia is an important limitation to consider for a relevant therapeutic drug evaluation that requires quantitative imaging. So, use of BLI for a longitudinal study of the primary tumor must be considered only during the time it is proportional to tumor size (<36 days for the present study). If it is necessary to document later stages for the primary tumor, other imaging modalities such as ^{18}F -FDG PET with satisfactory sensitivity [30], but a moderate specificity [31] is an alternative to get quantitative

data since scintigraphy with ^{111}In -pentetreotide or other biomarkers such as VIP [32] and bombesine [33] appear not to be efficient quantitative modalities in mice models. Another strategy could be the use of 3D infrared fluorescence imaging of integrins ($\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha\text{v}\beta 5$) that are overexpressed by both tumors and neo-endothelium [34]. However quantitation in 3D infrared fluorescence still requires some technological improvements. So, considering that our study can be achieved within the 36 days period and since it was possible to perform tumor size measurement at each treatment times, bioluminescence was considered as a suited modality to provide quantitative data. At the end of the study (D36), bioluminescence values were compared with tumor weights and volumes to confirm that at this time bioluminescence can be still considered as a relevant biomarker of tumor proliferation.

When NTP is applied directly on the tumor, a significant antitumor activity is obtained. Previous studies have showed such an *in vivo* antitumor effect of plasma on subcutaneous tumors [1; 4; 5] only. This paper reports for the first time a high antitumor activity of fibered plasma on an orthotopic model. We have previously reported that plasma antitumor activity was linked to a high rate generation of ROS in the vicinity of the cells and an apoptosis induction [3]. To improve NTP antitumor activity, recent *in vitro* studies suggest the potential interest of the combination of NTP with chemotherapy. Indeed, a beneficial effect of the combination of cyclophosphamide with NTP has been reported even if mechanisms involved are still not elucidated [6]. We chose to associate NTP treatment to gemcitabine, a classically used chemotherapy for pancreatic tumor.

This association could be of valuable interest because in addition to its cytotoxic effect, this nucleoside analogue is a potent radiosensitizer of rodent and human tumor cells, including pancreatic tumors [35; 36; 37]. It has been hypothesized that gemcitabine could induce Deoxyadenosine Triphosphate (dATP) depletion and cause an accumulation of MIA PaCa-2 cells in early S phase [38] as a result of the inhibition of DNA synthesis, which may play a

role in enhancing radiosensitivity [11]. These mechanisms associated to the effect of NTP on cell cycle, especially the multiphase cell cycle arrest observed after treatment [3; 39; 40], could increase the antitumor activity *via* an activation of the apoptotic pathway. We report here that gemcitabine administered 24h before NTP allows to reduce the tumor proliferation. This administration schedule was previously shown to be the most efficient in a context of radiotherapy [41]. Under the conditions used for our experiments, and in comparison with NTP group, a 33% decrease in tumor weight was obtained by combined therapy. As previously observed in radiotherapy, this improvement of antitumor activity using Gemcitabine/NTP combination may be the result of a modulation of cell cycle facilitating difluoro-dCTP incorporation in DNA [42].

In conclusion, our results suggest that fibered NTP could be a new therapeutic strategy against tumors, more especially when used in combination with antitumor drugs. The excellent tolerability and the effectiveness of NTP towards MIA PaCa2-luc cells *in vivo*, together with the ability to deliver NTP via a small capillary open new interesting perspectives for loco-regional or *in situ* applications more especially in the case of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. Other applications are considered such as colorectal recurrences and bronchopulmonary or Barrett's esophagus high grade dysplasias. Optimization of the NTP delivered dose to enhance the effects of the Gemcitabine/NTP combination then translation from orthotopic model in mice to dogs with spontaneous pancreas tumors is our next goal. For such a project, fibered plasma applications will be associated to interventional imaging using a near infra red fluorescence probe targeting integrins that are overexpressed by tumor foci.

1 5. ACKNOWLEDGEMENT

2 The authors are grateful to the Region Centre (APR “PlasMed”), Germitec, Conseil Regional
3 du Centre, CNRS and CG45. This work is also supported by French 'Agence Nationale de la
4 Recherche' (program ANR 2010 BLAN 0930 01). We would also like to thanks Bouchra
5 RAHBI and David GOSSET from Center for Molecular Biophysics (CBM, CNRS) for
6 immunohistochemistry and microscopy studies.

REFERENCES

- [1]M. Vandamme, E. Robert, S. Pesnel, E. Barbosa, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape, J.M. Pouvesle, Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results. *Plasma processes and polymers* 7 (2010) 264-273.
- [2]E. Robert, E. Barbosa, S. Dozias, M. Vandamme, C. Cachoncinlle, R. Viladrosa, J.M. Pouvesle, Experimental Study of a Compact Nanosecond Plasma Gun. *Plasma processes and polymers* 6 (2009) 795-802.
- [3]M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J.M. Pouvesle, A.L. Pape, ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int J Cancer* (2011).
- [4]M. Keidar, R. Walk, A. Shashurin, P. Srinivasan, A. Sandler, S. Dasgupta, R. Ravi, R. Guerrero-Preston, B. Trink, Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br. J. Cancer* 105 (2011) 1295-1301.
- [5]M. Vandamme, E. Robert, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape, J.M. Pouvesle, Response of Human Glioma U87 Xenografted on Mice to Non Thermal Plasma Treatment. *Plasma Medicine* 1 (2011) 27-43.
- [6]N. Georgescu, A.R. Lupu, Tumoral and Normal Cells Treatment With High-Voltage Pulsed Cold Atmospheric Plasma Jets. *IEEE Transactions on Plasma Science* 38 (2010) 1949-1955.
- [7]M.P. Wescott, A.K. Rustgi, Pancreatic Cancer: Translating Lessons from Mouse Models and Hereditary Syndromes. *Cancer Prevention Research* 1 (2008) 503-506.
- [8]A.C. Koong, V.K. Mehta, Q.T. Le, G.A. Fisher, D.J. Terris, J.M. Brown, A.J. Bastidas, M. Vierra, Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 48 (2000) 919-922.
- [9]B. Blouw, H. Song, T. Tihan, J. Bosze, N. Ferrara, H.P. Gerber, R.S. Johnson, G. Bergers, The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4 (2003) 133-146.
- [10]M.H. Katz, S. Takimoto, D. Spivack, A.R. Moossa, R.M. Hoffman, M. Bouvet, A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics. *Journal of Surgical Research* 113 (2003) 151-160.
- [11]L. Milas, T. Fujii, N. Hunter, M. Elshaikh, K. Mason, W. Plunkett, K.K. Ang, W. Hittelman, Enhancement of tumor radioresponse in vivo by gemcitabine. *Cancer Research* 59 (1999) 107-114.
- [12]J. Rousseau, V. Escriou, P. Perrot, G. Picarda, C. Charrier, D. Scherman, D. Heymann, F. Redini, V. Trichet, Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer Gene Therapy* 17 (2010) 387-397.
- [13]C. Demaison, K. Parsley, G. Brouns, M. Scherr, K. Battmer, C. Kinnon, M. Grez, A.J. Thrasher, High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Human Gene Therapy* 13 (2002) 803-813.
- [14]X.F. Qin, D.S. An, I.S.Y. Chen, D. Baltimore, Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003) 183-188.
- [15]G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A.B. Shekhter, V.N. Vasilets, A. Fridman, Applied plasma medicine. *Plasma Processes and Polymers* 5 (2008) 503-533.
- [16]J.Y. Kim, Y.Z. Wei, J.H. Li, P. Foy, T. Hawkins, J. Ballato, S.O. Kim, Single-Cell-Level Microplasma Cancer Therapy. *Small* 7 (2011) 2291-2295.

- [17]C.H. Kim, S. Kwon, J.H. Bahn, K. Lee, S.I. Jun, P.D. Rack, S.J. Baek, Effects of atmospheric nonthermal plasma on invasion of colorectal cancer cells. *Applied Physics Letters* 96 (2010).
- [18]S. Kalghatgi, C.M. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, G. Friedman, J. Azizkhan-Clifford, Effects of non-thermal plasma on Mammalian cells. *PLoS One* 6 (2011) e16270.
- [19]M. Lopez-Lazaro, Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 252 (2007) 1-8.
- [20]C. Bornmann, R. Graeser, N. Esser, V. Ziroli, P. Jantscheff, T. Keck, C. Unger, U.T. Hopt, U. Adam, C. Schaechtele, U. Massing, E. Von Dobschuetz, A new liposomal formulation of Gemcitabine is active in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer accessible to bioluminescence imaging. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61 (2008) 395-405.
- [21]I.S. Zagon, J.R. Jaglowski, M.F. Verderame, J.P. Smith, A.E. Leure-duPree, P.J. McLaughlin, Combination chemotherapy with gemcitabine and biotherapy with opioid growth factor (OGF) enhances the growth inhibition of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56 (2005) 510-520.
- [22]E. Giovannetti, V. Mey, R. Danesi, I. Mosca, M. Del Tacca, Synergistic cytotoxicity and pharmacogenetics of gemcitabine and pemetrexed combination in pancreatic cancer cell lines. *Clinical Cancer Research* 10 (2004) 2936-2943.
- [23]W.W. Tseng, D. Winer, J.A. Kenkel, O. Choi, A.H. Shain, J.R. Pollack, R. French, A.M. Lowy, E.G. Engleman, Development of an Orthotopic Model of Invasive Pancreatic Cancer in an Immunocompetent Murine Host. *Clinical Cancer Research* 16 (2010) 3684-3695.
- [24]M. Bouvet, R.M. Hoffman, Clinically-relevant orthotopic metastatic models of pancreatic cancer imageable with fluorescent genetic reporters. *Minerva Chirurgica* 64 (2009) 521-539.
- [25]G. Mees, R. Dierckx, C. Vangestel, C. Van de Wiele, Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 36 (2009) 1674-1686.
- [26]M.W. Saif, M. Brennan, R. Penney, S. Hotchkiss, K. Kaley, Cutaneous metastasis in a patient with pancreatic cancer. *JOP : Journal of the pancreas* 12 (2011) 306-308.
- [27]H. Zhao, J. Zhu, K. Cui, X. Xu, M. O'Brien, K.K. Wong, S. Kesari, W. Xia, S.T.C. Wong, Bioluminescence imaging reveals inhibition of tumor cell proliferation by Alzheimer's amyloid beta protein. *Cancer Cell International* 9 (2009).
- [28]K.D. Wilson, M. Huang, J.C. Wu, Bioluminescence Reporter Gene Imaging of Human Embryonic Stem Cell Survival, Proliferation, and Fate. *Bioluminescence: Methods and Protocols*, Second Edition 574 (2009) 87-103.
- [29]P. Buchler, H.A. Reber, R.S. Lavey, J. Tomlinson, M.W. Buchler, H. Friess, O.J. Hines, Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *Journal of Surgical Research* 120 (2004) 295-303.
- [30]K. Okano, K. Kakinoki, S. Akamoto, M. Hagiike, H. Usuki, Y. Yamamoto, Y. Nishiyama, Y. Suzuki, (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis of small pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 17 (2011) 231-235.
- [31]N.C. Buchs, L. Buehler, P. Bucher, J.-P. Willi, J.-L. Frossard, A.D. Roth, P. Addeo, A. Rosset, S. Terraz, C.D. Becker, O. Ratib, P. Morel, Value of contrast-enhanced 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in detection and presurgical assessment of pancreatic cancer: A prospective study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26 (2011) 657-662.
- [32]C. Hessenius, M. Bader, H. Meinhold, M. Bohmig, S. Faiss, J.C. Reubi, B. Wiedenmann, Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with pancreatic

- adenocarcinomas or neuroendocrine tumours. *European Journal of Nuclear Medicine* 27 (2000) 1684-1693.
- [33]A. Varvarigou, P. Bouziotis, C. Zikos, F. Scopinaro, G. De Vincentis, Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 19 (2004) 219-229.
- [34]M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H.-J. Wester, Ligands for Mapping $\alpha(v)\beta(3)$ -Integrin Expression in Vivo. *Accounts of Chemical Research* 42 (2009) 969-980.
- [35]D.S. Shewach, T.S. Lawrence, Gemcitabine and radiosensitization in human tumor cells. *Investigational New Drugs* 14 (1996) 257-263.
- [36]T.S. Lawrence, E.Y. Chang, T.M. Hahn, L.W. Hertel, D.S. Shewach, Radiosensitization of pancreatic cancer cells by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 34 (1996) 867-872.
- [37]T.M. Cardillo, R. Blumenthal, Z.L. Ying, D.V. Gold, Combined gemcitabine and radioimmunotherapy for the treatment of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer* 97 (2002) 386-392.
- [38]M.T. Yip-Schneider, C.J. Sweeney, S.H. Jung, P.L. Crowell, M.S. Marshall, Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298 (2001) 976-985.
- [39]C.H. Kim, J.H. Bahn, S.H. Lee, G.Y. Kim, S.I. Jun, K. Lee, S.J. Baek, Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells. *J Biotechnol* (2010).
- [40]X. Yan, F. Zou, S. Zhao, X. Lu, G. He, Z. Xiong, Q. Xiong, Q. Zhao, P. Deng, J. Hunag, G. Yang, On the Mechanism of Plasma Inducing Cell Apoptosis. *IEEE Transactions on Plasma Science* 38 (2010) 2451-2457.
- [41]B. Pauwels, A.E.C. Korst, F. Lardon, J.B. Vermorken, Combined modality therapy of gemcitabine and radiation. *Oncologist* 10 (2005) 34-51.
- [42]D. Latz, K. Fleckenstein, M. Eble, J. Blatter, M. Wannenmacher, K.J. Weber, Radiosensitizing potential of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine) within the cell cycle in vitro. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 41 (1998) 875-882.

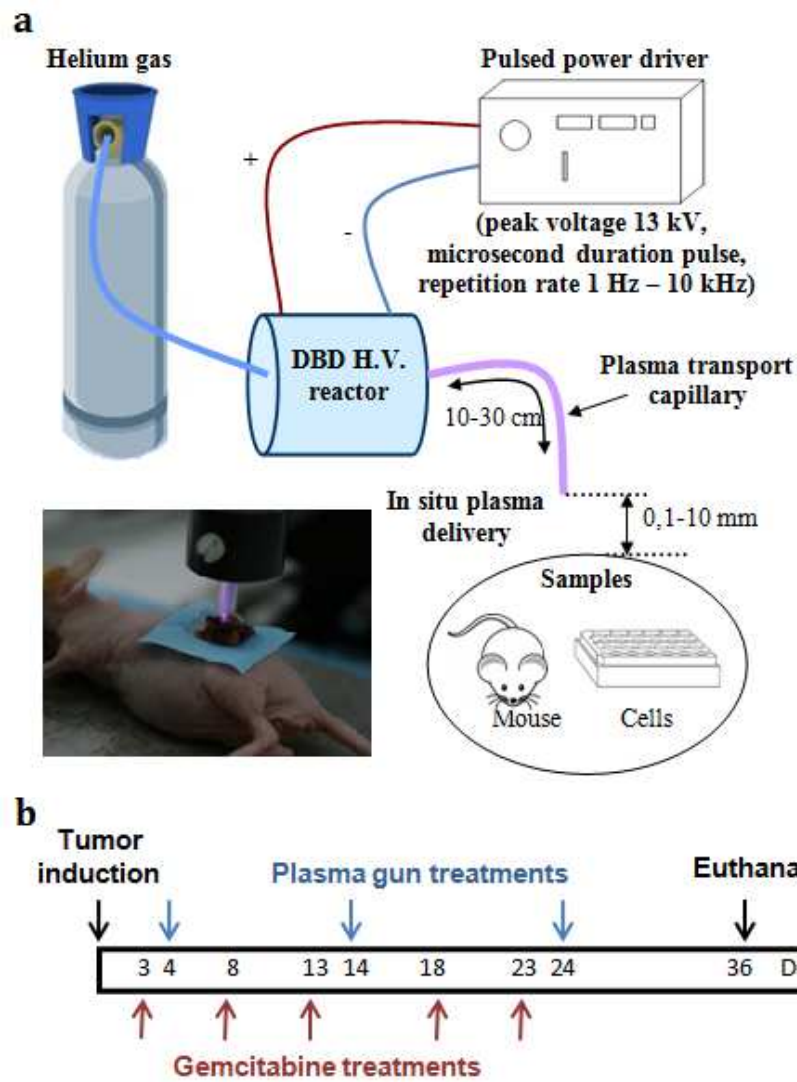


Figure 1: a) Schematics of the plasma gun setup; b) Therapeutic schedule of gemcitabine and plasma gun.

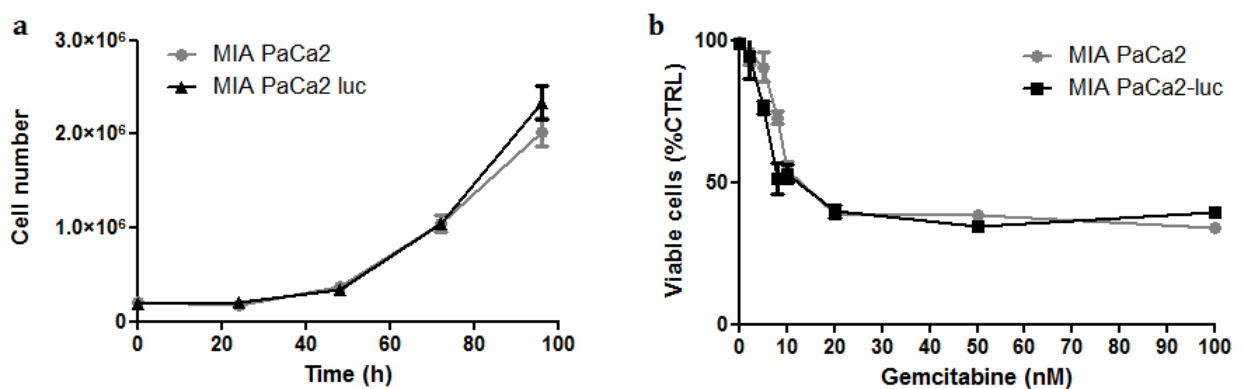


Figure 2: Impact of the transduction on MIA PaCa2 cells; a) *In vitro* cell growth of transduced and non transduced MIA PaCa2 cells. Each point represents the mean ($\pm$ SEM), $n=3$ for each group. b) Cells response to gemcitabine alone *in vitro*. Cell viability was determined 24h after treatment by MTT and was normalized to untreated cells. Each point represents the mean ($\pm$ SEM), $n=5$ for each group.

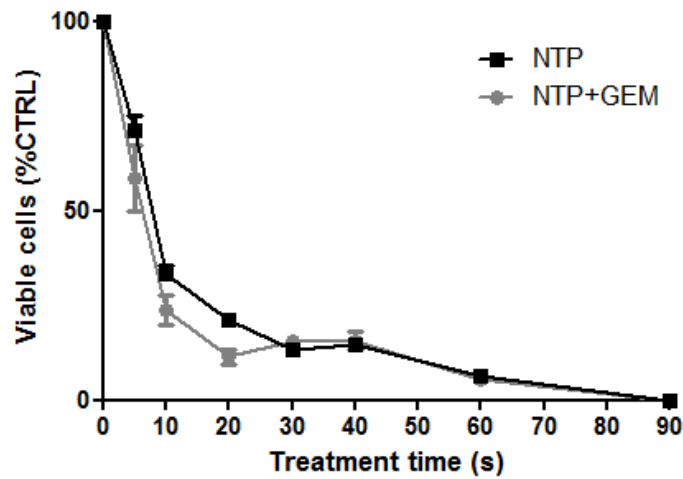


Figure 3: Inhibitory effect of NTP on cell proliferation *in vitro* in MIA PaCa2-luc cells. Cells were treated with NTP alone or in combination with gemcitabine. Cell viability was determined 24h after treatment by bioluminescence and was normalized to untreated cells. Each point represents the mean ($\pm$ SEM), $n=5$ for each group.

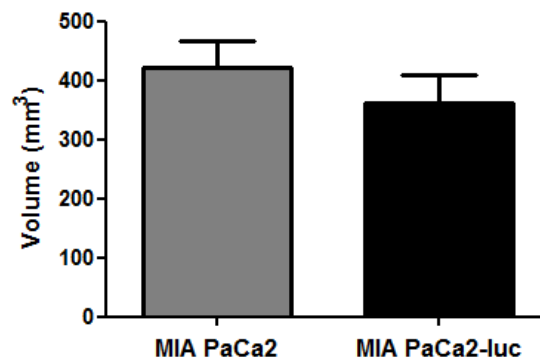


Figure 4: Tumor volume after orthotopic injection of transduced or non transduced MIA PaCa2 cells. Tumor volumes were measured with a caliper at the day of euthanasia (D36). The columns represent the means ($\pm$ SEM), $n=7$ for each group.

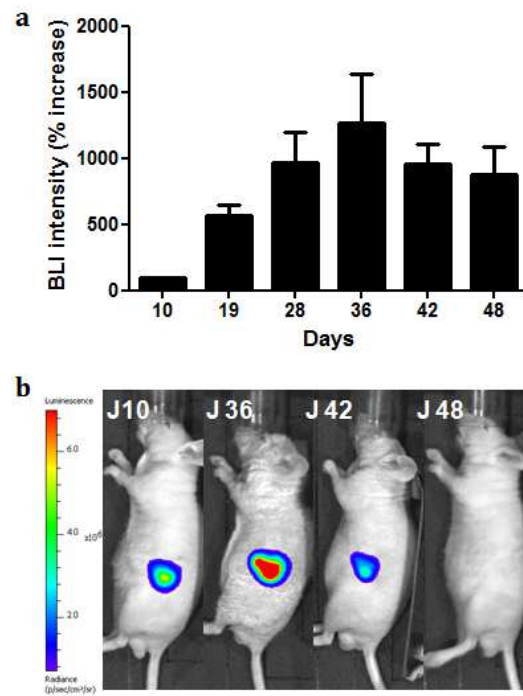


Figure 5: Growth of MIA PaCa-2 tumors xenografted into nude mice. a) Tumor volumes monitored by bioluminescence for the 48 days of the experiment. Values represent means $\pm$ SEM, $n=9$ for each group. b) Exemplary results from *in vivo* BLI, showing one non treated mouse with loss of BLI signal.

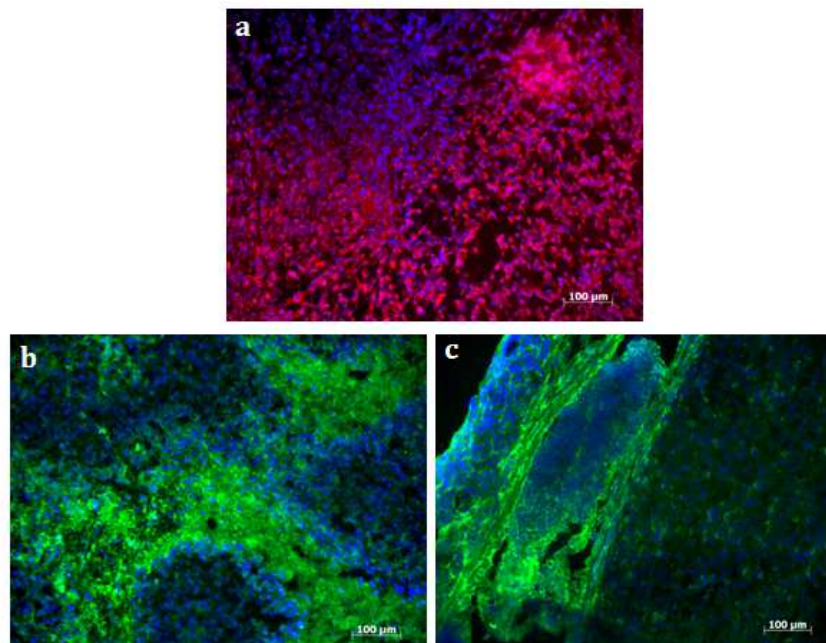


Figure 6: Immunohistochemistry of pancreatic tumor sections 48 days post MIA PaCa2-luc cell injection (Bar=100 μ m). a) Anti-luciferase antibody labeled with TRITC (red) confirmed luciferase expression in tumor sections; b and c) *In situ* detection of hypoxic tumor regions by using anti-pimonidazole antibody labeled with FITC (green). b) An intensive hypoxic tumor regions can be seen at the center. Positive immunosignals were also seen at the periphery c).

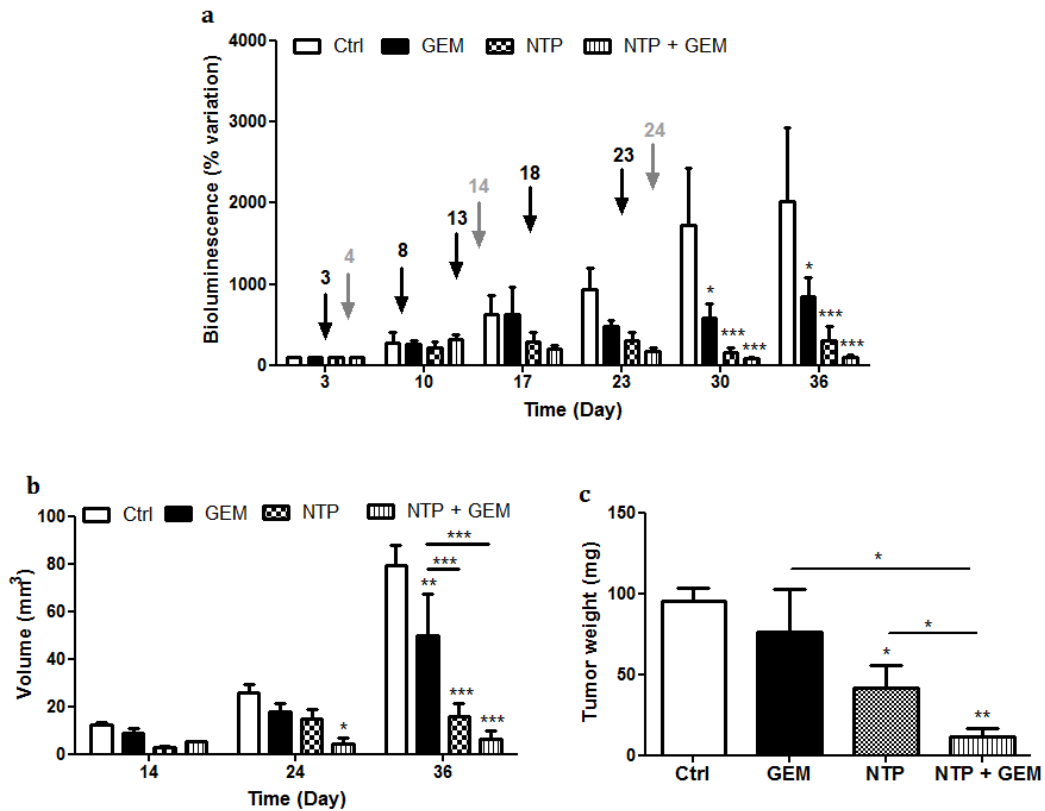


Figure 7: Plasma gun and gemcitabine treatments effects on tumor growth in an orthotopic pancreatic model. Three days after tumor induction mice were randomly assigned into 4 groups: control (CTRL), gemcitabine (GEM), plasma gun (NTP) and bitherapy (NTP+GEM), eight mice per group. a) Tumor evolution followed by bioluminescence. The gray arrows represent NTP treatments and the black arrows gemcitabine treatments days. Tumor BLI was normalized to signal at D3; b) tumor volume was determined using a caliper at two times of the plasma treatment and on day of euthanasia; c) tumor weight at the end of the study. Each point represents the mean ($\pm$ SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Laura BRULLÉ

Développement de stratégies d'imagerie multimodalités pour la pharmacologie des agents anticancéreux

Résumé :

L'imagerie préclinique dans le domaine de la cancérologie est en plein essor. Elle permet grâce à des modèles animaux représentatifs de cancers humains de comprendre les mécanismes de développement des pathologies et d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'un nouveau traitement.

Le principal objectif de ce travail a été de développer deux modèles orthotopiques de cancer (pancréas et colon) et d'évaluer des traitements de références ainsi qu'une nouvelle stratégie thérapeutique par plasma froid fibré appelée Plasma Gun. Les 2 modèles de cancers développés ont montré une bonne représentativité vis-à-vis des cancers humains, avec l'apparition de métastases à distance et la présence de zones hypoxiques. Le 5-fluorouracile pour le modèle orthotopique de carcinome colorectal HCT116-luc et la gemcitabine pour le modèle d'adénocarcinome pancréatique MIA PaCa2-luc ont induit à faible dose des effets discrets pouvant être mis en évidence grâce aux modalités d'imageries mises en œuvre. Après validation de nos démarches expérimentales une nouvelle stratégie thérapeutique, le Plasma Gun, a été évaluée et a montré des effets significatifs sur l'inhibition de la croissance tumorale.

Le second objectif de ma thèse a été de mettre en œuvre des outils pour l'induction et la caractérisation des métastases osseuses ainsi que pour l'imagerie haute résolution de la vascularisation. D'une part, les métastases osseuses obtenues par injection de cellules PC3M-luc en intracardiaque ont été évaluées et quantifiées grâce à différentes modalités d'imagerie (bioluminescence, scintigraphie et scanner X). D'autre part, la réalisation d'une imagerie haute résolution de la vascularisation a été possible grâce à la technique de casting qui permet de recréer la structure 3D de l'architecture vasculaire suite à l'injection d'une résine dans la circulation.

Les développements réalisés lors de cette thèse ont ainsi permis d'apporter des outils pour l'évaluation préclinique de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Mots clés : Imagerie du petit animal, cancérologie, modèles orthotopiques, Cast, Plasma Gun.

Development of multimodal imaging strategies for the pharmacology of anticancer agents

Summary :

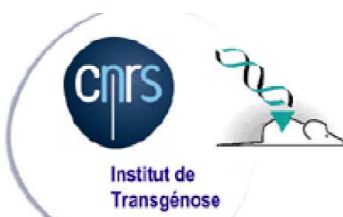
Preclinical imaging in oncology is booming. It allows, using representative animal models of human cancers, to understand the mechanisms of development of pathologies and to assess the therapeutic efficiency of a new treatment.

The main objective of this work was to develop two orthotopic models of cancer (pancreas and colon) and to assess on them the reference treatments as well as a new therapeutic strategy by non thermal plasma so called Plasma Gun. The two cancer models developed showed good representation in relation to human cancers, with the appearance of distant metastases and hypoxia. 5-fluorouracil for the HCT116-luc orthotopic model of colorectal carcinoma and gemcitabine for the MIA PaCa2-luc pancreatic adenocarcinoma model, have induced discrete effects at low dose which can be detected thanks imaging modalities. After validation of our experimental steps, a new therapeutic strategy, Plasma Gun was evaluated and showed significant effects on tumor growth inhibition.

The second objective was to carry out tools for the induction and the characterization of bone metastases and for high resolution imaging of the vasculature. On the one hand, bone metastases obtained by injection of PC3M-luc cells intracardially, was evaluated and quantified with different imaging modalities (bioluminescence, scintigraphy and Computed Tomography). And the other hand, the achievement of a high resolution imaging of vascularization, was possible by the casting method that restores the 3D structure of the vascular architecture following injection of a resin in the circulation.

Developments made during this thesis are new tools for preclinical evaluation of novel anticancer therapies.

Keywords : Small animal imaging, cancerology, orthotopic model, Cast, Plasma Gun.



CIPA-TAAM UPS44 CNRS
3B rue de la Férollerie
45071 ORLEANS Cedex 02

CERB
Chemin de Montifault
18800 BAUGY

