

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie



Année 2009

THESE N° 3333 / 14

Hypoxie Tumorale :
Place de l'Imagerie Fonctionnelle
au ¹⁸FMISO

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

Obtenu après soutenance du

Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de
Pharmacie Hospitalière et des Collectivités

Présenté et soutenu publiquement le 19 octobre 2009

Par

Pascal TREUIL
Né le 23 mars 1979 à Tulle

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 194747 2

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur Jacques BUXERAUD

Président

Monsieur le Professeur Jacques MONTEIL

Juge

Madame le Professeur Anne ROUSSIN

Juge

Madame le Docteur Isabelle QUELVEN

Juge

Monsieur le Docteur Christophe CELERIER

Membre invité

Monsieur le Docteur Dominique PLATS

Membre invité

DOYEN DE LA FACULTEMonsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences**VICE-DOYEN**Monsieur le Professeur **CARDOT** Philippe**VICE-DOYEN**Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de Conférences**PROFESSEURS****BENEYTOUT** Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD JacquesCHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE
THERAPEUTIQUE**CARDOT** Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH ChristianHYGIENE - HYDROLOGIE -
ENVIRONNEMENT**LOUDART** Nicole

PHARMACOLOGIE

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES**BASLY** Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN GIRY Karine

PHARMACIE GALENIQUE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE ClaudeBIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES,
INFORMATIQUE**CLEDAT** Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE

COMBY Francis

CHIMIE THERAPEUTIQUE

DELEBASSEE Sylvie

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

DEMIOT Claire-Elise

PHARMACOLOGIE

DREYFUSS Marie-Françoise

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

FAGNERE Catherine

CHIMIE ORGANIQUE

FROISSARD Didier

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

JAMBUT Anne-Catherine
LABROUSSE Pascal
LEGER David
LIAGRE Bertrand
LOTFI Hayat
MARION-THORE Sandrine
MARRE-FOURNIER Françoise
MILLOT Marion
MOREAU Jeanne
POUGET Christelle

ROUSSEAU Annick
SIMON Alain
TROUILLAS Patrick

VIANA Marylène
VIGNOLES Philippe

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

CHIMIE THERAPEUTIQUE
BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
SCIENCES BIOLOGIQUES
TOXICOLOGIE
CHIMIE THERAPEUTIQUE
BIOCHIMIE
PHARMACOGNOSIE
IMMUNOLOGIE
CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA
THERAPEUTIQUE
BIOMATHEMATIQUES
CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
PHARMACEUTIQUE
PHARMACOTECHNIE
BIOMATHEMATIQUES

ANGLAIS

A Dom...

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur Jacques BUXERAUD
Professeur des Universités
Chimie Organique et Chimie Thérapeutique
Faculté de Pharmacie de Limoges

Vous nous faites l'honneur de présider cette thèse et nous vous en remercions.

Durant notre formation, nous avons pu apprécier la pédagogie inégalée de votre enseignement, votre grande disponibilité, ainsi que la richesse de vos connaissances, professionnelles ou non.

Veillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A nos Directeurs,

Monsieur le Professeur Jacques MONTEIL
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Chef de service
Médecine Nucléaire

Pour ton soutien, tes précieux conseils dans la réalisation de ce travail, et ton accessibilité au quotidien (à toute heure), je t'exprime ici toute ma gratitude.

Madame le Docteur Isabelle QUELVEN
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Biophysique
Médecine Nucléaire

Tu m'as fait découvrir cette spécialité qui deviendra, je l'espère, mon métier.

Tu m'as toujours soutenu, conseillé, encadré...

Trouve ici, Isabelle, l'expression de mon amitié et de ma profonde gratitude.

A nos Maîtres et Juges,

Madame le Professeur Anne ROUSSIN
Professeur des Universités
Centre d'Evaluation et d'Information sur la Pharmacodépendance de Toulouse

Vous avez accepté de juger ce travail, pourtant éloigné de votre domaine.

Soyez assuré, Madame le Professeur, de ma profonde reconnaissance.

Aux membres invités,

Monsieur le Docteur Christophe CELERIER
Praticien Hospitalier
Chef de Service
Pharmacien atomique de l'Océan Indien

Tu as accepté de juger ce travail, et je t'en remercie. Merci infiniment pour ton aide et ta disponibilité, sans lesquelles je ne pourrais voir le soleil. Sois assuré de toute mon amitié.

Monsieur le Docteur Dominique PLATS
Assistant Spécialiste Pharmacie Hospitalière
Centre Hospitalier de Nevers
Mon AMI...

... de trente ans...depuis 25 ! Nous ne pouvions être séparés un jour comme celui-ci.

Tu me fais l'indescriptible honneur de siéger à mon jury et je t'en remercie.

La paire, entité ultime, est une fois de plus constituée.

A ma mère,

Merci pour tout ce que tu m'apportes, ton soutien et ta générosité en toute occasion, ta présence encore et toujours...

Puisses-tu être fière de ce que je suis.

A ma famille (rapportée ou non),

Merci d'être là, toujours, de m'entourer et me soutenir.

A mon arrière Grand-Mère et tous les miens qui ne sont plus...

Pas une journée ne se passe sans qu'une de mes pensées ne vous soit destinée...

Je vous dois tant !

A ma belle famille (Belcour, Messié et Rieu)

Qui m'a fait découvrir un si beau pays...

A mes premiers maîtres,

Les docteurs Marc Bekkouche et Olivier Marquet, qui m'ont initié, entre autre, à l'art pharmaceutique.

Au Docteur Daniel Rondelaud,

Pour son encadrement, sa patience et sa pédagogie lors de mes premiers pas dans le monde de la recherche...

Au Professeur Jean-Claude Vandroux,

Pour m'avoir accueilli dans le service, pour votre gentillesse et votre accessibilité au quotidien...

A mes amis, et leurs petits...

Fabrice et Dominique, et toute la petite famille : votre sens de la méthode et votre organisation sont un exemple pour nous ! Votre gentillesse également...

Caro et Nico, Mylène, Tony et Mélanie, Schteff et Cécilou, Mac et Anne-Laure : votre amitié que les kilomètres et le temps ne peuvent affaiblir est une ressource et une force pour moi.

Nox et Mumu, Nhix et Fafa, Benny, Crevette, Véro et tous les autres : ma petite famille de la « pharmacie »

Eddy et Virginie, Matthieu et Alejandra, Tanja et tous les autres...

Jean, Céline, Audrey, Florent, Nicolas, Guillaume et tous les autres corréziens...

Guillaume, mon co-équipier : toutes ces années sportives à tes côtés m'ont tellement apporté

A tous mes amis réunionnais...ou presque !

Alex, Sab, Bernard, Michèle, Stéphanie

A mes co-internes,

Sylvain, Anne-Sophie, Cécile, Jean-Baptiste, Julie, Emilie, Gaëlle, Hélène, Mickael, Nathalie, Sophie et tous les autres...

Merci pour ces bonnes années passées à vos côtés...

Aux services de Médecine Nucléaire limougeaud et réunionnais,

Merci pour votre accueil, votre sympathie et votre gentillesse...

A l'équipe EA3033 « Radiopharmaceutique et traitement de l'image » laboratoire de Biophysique la Faculté de Pharmacie de Toulouse,

Qui nous a fourni le ^{18}F MISO.

Au Laboratoire CYCLOPHARMA,

Qui nous ont fourni le ^{18}F FDG et aidé sur le plan logistique.

Aux rats sans qui je ne pourrais avoir d'aussi belles images...

SOMMAIRE

SOMMAIRE	8
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	12
DEVELOPPEMENT TUMORAL	14
I. Propriétés des cellules cancéreuses.....	14
II. De la lésion précancéreuse au cancer	15
III. Invasión tumorale	16
IV. Processus métastatique.....	18
NEOVASCULARISATION TUMORALE	21
I. Néovascularisation physiologique	22
II. Néovascularisation pathologique.....	23
III. HIF1	25
IV. Facteurs de l'angiogénèse, sous la dépendance de HIF	29
V. Traitements anti-angiogéniques	30
HYPOXIE TUMORALE	36
I. Physiopathologie.....	36
II. Actions moléculaire, cellulaire et conséquences métaboliques.....	37
III. Implication dans la chimiorésistance	42
IV. Implication dans la radiorésistance	43
EVALUATION de L'HYPOXIE TUMORALE	58
I. Techniques de détection.....	58
II. Radio-traceurs.....	66
EVALUATION de L'HYPOXIE TUMORALE par L'IMAGERIE au ¹⁸FMISO sur deux MODELES TUMORAUX chez le RAT	94
I. Matériel et méthode	94
II. Résultats.....	100
III. Discussion	111
CONCLUSION	119
BIBLIOGRAPHIE	120
SERMENT de GALIEN	130
TABLE des MATIERES	131
TABLE des FIGURES	135
TABLE des TABLEAUX	136
TABLE des EQUATIONS	137

ABREVIATIONS

- ¹⁸FAZA** : ¹⁸fluoroazomycine arabinoside ou arabinofuranoside
- ¹⁸FETA** : ¹⁸ fluoroetanidazole
- ¹⁸FETNIM** : ¹⁸ fluoroerythronitroimidazole
- ¹⁸FMISO** : ¹⁸fluoromisonidazole
- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- aFGF** : acidic Fibroblaste Growth Factor
- Akt** : serine/thréonine kinase
- AQ4N** : banoxantrone
- ARCON** : Accelerated Radiotherapy with CarbOgen and Nicotinamide
- ARNm** : Acide RiboNucléique messenger
- ATF6** : Activating Transcriptor Factor 1
- ATP** : Adenosine Tri Phosphate
- bFGF** : basic Fibroblaste Growth Factor
- BHE** : Barrière Hémato Encéphalique
- BOLD** : Blood Oxygen Level Dependent
- BSO** : L-5-buthionine sulphoximine
- CA4P** : Combretastatin A-4 phosphate
- CA9** : Carboxy Anhydrase 9
- CBP** : CREB binding protein
- CD44** : Cluster Differentiation 44
- CD44ICD** : CD44IntraCelularDomain
- CMH1** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité I
- Cox** : Cyclooxygénase
- COX** : Cytochrome c OXydase
- Cu-ATSM** : Cu(II)-diacetylbis (N4-methyl-thiosemicarbazone)
- Cu-PTSM** : Cu(II)-pyruvaldehyde-bis (N4-methyl-thiosemicarbazone)
- DADS** : DiAminoDithiols
- EGFR** : Epithelium Growth Factor Receptor
- EPO** : Erythropoïétine
- FADD** : Fas Associated Dead Domain protein
- FAK** : Focal Adhesion Kinases
- FIH** : Factor Inhibiting HIF

Flt1 : fms-like tyrosine kinase
FRAP : FKBP12-rapamycin-associated-protein
HBS : HIF1 Binding Site
HIF1 : Hypoxia Inducible Factor 1
HRE :Hypoxia Response Elements
IAZA : iodoazomycine arabinoside
IAZG ou **IAZGP** : iodoazomycinegalactoside ou galactopyranoside
IAZP : iodoazomycinepyranosides
IAZXP : iodoazomycine xylopyranoside
IgG1 : Immunoglobuline G1
IHC : ImmunoHistoFluorescence
IMRT : Intensity-Modulated Radiation Therapy
IRE1 : Inositol Requiring transmembrane kinase and Endonuclease 1
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IRP2 : Iron Regulatory Protein 2
ITK : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase
MAP kinase : Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC : Matrice Extra Cellulaire
mTOR : mamalian target of rapamycin
NO : Nitric Oxide
O₂ : dioxygène
ODD : Oxygen-Dependant Degradation Domain
OPN : Ostéopontine
PARP : Poly ADP Ribose Polymérase
PDGF : Platellet Derived Growth Factor
PERK : PKR-like ER protein Kinase
PHD : Prolyl-Hydroxylase
PI3K : PhosphatidyInositol 3-Kinase
PKR : Protéine Kinase activée par dsRNA
PLC δ : Phospholipase δ
PnAO : Propylène Amine Oxyme
pO₂ : pression partielle d'oxygène
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
pVHL : protein Von Hippel Lindau
RE : Reticulum Endoplasmique

REF1 : Redox Factor 1
ROS : Reactive Oxygen Species
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
SRC1 : Steroid Receptor Coactivator 1
SUV : Standardized Uptake Value
TEL : Transfert d'Énergie Lineique
TEMP : Tomographie à Emission MonoPhotonique
TEP : Tomographie à Emission de Positons
TGFβ : Tumor Growth Factor β
TH1 : T Helper 1
TOD : Tomographie Optique Diffuse
TPZ : Tirapazamine
TSP : trombospondine
uPA : urokinase Plasminogène Activator
UPR : Unfolded Protein Response
VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor
VPF : Vascular Permeability Factor
WLM : Working Level Months
XPB1 : X-box-binding protein-1

INTRODUCTION

L'hypoxie cellulaire est définie comme un déséquilibre entre les apports et les besoins de la cellule en oxygène (O_2). Ce phénomène se rencontre souvent au sein des tumeurs solides, en particulier dans les cancers tête et cou.

L'hypoxie tumorale, connue depuis les années 50 avec les travaux de Gray, est actuellement très étudiée. En effet, ce paramètre semble être un facteur pronostique important du développement tumoral et de la réponse au traitement : il est corrélé à l'agressivité tumorale, au développement de métastases et de rechute, et confère à la tumeur une résistance à la chimiothérapie, ainsi qu'à la radiothérapie.

Le développement de la tumeur nécessite O_2 et nutriments. Les cellules, qui se multiplient de façon intense et anarchique au sein de la masse tumorale, ont de plus en plus de difficultés pour capter les éléments nécessaires à leur croissance. Ces éléments ne diffusent qu'à une certaine distance des vaisseaux sanguins. Au-delà, un nouveau réseau vasculaire doit se mettre en place pour permettre une alimentation cellulaire correcte. Ce réseau croît sous l'effet de facteurs de croissance tumoraux, tels que Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF1), qui joue un rôle clé dans le processus angiogénique. La néoangiogénèse est donc un pré-requis à toute croissance tumorale et non une conséquence. Elle revêt une telle importance pour la physiologie tumorale qu'une classe thérapeutique particulière a été développée, celle des anti-angiogéniques. Ces médicaments ciblent et inhibent spécifiquement les facteurs et les voies de l'angiogénèse constituant ainsi de bons adjuvants de chimio ou de radiothérapie.

La néovascularisation tumorale se développe très rapidement pour former un réseau imparfait et chaotique, fait de vaisseaux au calibre irrégulier, présentant des shunts, et s'obturant transitoirement. Ces imperfections structurales ont un impact très lourd sur l'alimentation cellulaire et sont à la base des phénomènes hypoxiques des tumeurs solides. Ces conditions délétères pour le développement cellulaire vont obliger les cellules à s'adapter pour survivre. Elles détournent leur métabolisme vers des voies anaérobies et présentent des phénotypes plus agressifs. Les cellules tumorales acquièrent donc une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. De plus, les rayonnements ionisants agissant via la formation de radicaux libres oxygénés, la présence d' O_2 est indispensable : l'hypoxie constitue par elle-même un facteur de radiorésistance supplémentaire.

Connaître le statut d'oxygénation de la tumeur permettrait de mieux la caractériser, prévoir son évolution et sa résistance aux traitements, afin d'adapter le traitement. La pression

partielle tissulaire d'O₂ (pO₂) ne se mesure pas aisément. C'est un paramètre difficilement accessible et il n'existe pas, à ce jour, de technique de référence utilisable en routine. Les premières techniques, invasives, reposaient sur la réalisation de biopsies ou sur la mesure *in vivo* par électrodes, excluant de ce fait toutes les tumeurs profondes.

Ce n'est qu'en 1987 [1] que fut proposée pour la première fois l'exploration de l'hypoxie tumorale par une méthode d'imagerie non invasive reposant sur l'emploi de marqueurs radioactifs spécifiques. De nombreux travaux ont été menés afin de synthétiser des radio-traceurs spécifiques de l'hypoxie tumorale. Le premier utilisé, et qui reste le plus étudié en clinique en particulier, est le 18fluoromisonidazole (¹⁸FMISO). Beaucoup de traceurs furent développés à partir de sa structure, mais aujourd'hui, des composés, dont le mécanisme de ciblage de l'hypoxie est différent, sont en cours de développement.

Ce type d'imagerie *in vivo* permettrait d'une part l'exploration et le suivi en routine de l'hypoxie tumorale, et d'autre part sa cartographie précise au sein de la tumeur. Par ailleurs, l'évaluation des thérapies anti-angiogéniques et le guidage de la radiothérapie modulée sont autant d'applications potentielles de cette méthode d'imagerie.

Cet exposé comportera deux parties : une revue bibliographique, suivie d'une étude expérimentale.

La revue de la littérature reprendra les phénomènes et étapes indispensables au développement et à la croissance tumorale, en s'attardant sur la néoangiogénèse et les traitements anti-angiogéniques. Nous traiterons ensuite l'hypoxie tumorale : son mécanisme, sa régulation, son implication dans la résistance aux traitements et les moyens d'y remédier. Enfin, nous développerons les techniques de détection de l'hypoxie tumorale en portant un intérêt tout particulier à l'imagerie isotopique et aux radio-traceurs.

L'étude expérimentale a été menée dans deux modèles de tumeurs chez le rat, un modèle de cancer pulmonaire et un modèle d'ostéosarcome, qui sont en cours de développement dans l'équipe de recherche. L'objectif de cette étude préliminaire était d'évaluer et de comparer l'hypoxie tumorale par imagerie au ¹⁸FMISO dans ces 2 modèles animaux et de suivre son évolution.

DEVELOPPEMENT TUMORAL

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de cellules anormales de l'organisme qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. En outre, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer à distance pour former des métastases. Elles gagnent pour cela les canaux lymphatiques et les vaisseaux sanguins, par l'intermédiaire desquels elles peuvent être transportées dans les autres organes.

Après la description des caractéristiques d'une cellule cancéreuse, nous présenterons les différents mécanismes responsables de la croissance, de l'invasion tumorale et du processus métastatique.

I. Propriétés des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses capables d'être à l'origine d'un processus tumoral doivent acquérir au cours de la cancérogénèse les caractéristiques suivantes :

- une capacité de croissance exagérée stimulée de façon non physiologique (production autocrine, par le stroma tumoral, de facteurs de croissance et/ou de leurs récepteurs ; activation de la transduction des signaux mitogènes...),
- l'insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire (Rb, p53, ...) avec inactivation du récepteur de signaux antiprolifératifs tels que le TGF β (tumor growth factor β) et échappement à la différenciation cellulaire,
- l'échappement à l'apoptose par différents mécanismes dont l'activation de la voie d'Akt (sérine thréonine kinase), et à l'immunosurveillance par la sécrétion de cytokines inhibant la réponse Th1 (T helper). Cela diminue l'expression des antigènes d'histocompatibilité CMH1 (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et réprime l'expression de FADD (Fas Associated Dead Domain protein) impliqué dans la transduction des messages d'apoptose,
- la capacité de se diviser de façon illimitée et d'échapper à la mort par sénescence soit par dérégulation du gène de la télomérase, soit par activation de mécanismes alternatifs permettant le maintien des télomères,

- la capacité d'induire une néoangiogénèse nécessaire au soutien de la croissance tumorale, par modification de l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de l'angiogénèse (switch angiogénique) [2],

- les capacités d'invasion et de métastase. Le processus d'invasion met en jeu l'activation de nombreux mécanismes cellulaires leur permettant de survivre en milieu hétérotopique, de se déplacer et de sécréter des enzymes protéolytiques. Le potentiel métastatique suppose de nouvelles capacités d'effraction vasculaire, de survie dans le milieu sanguin, de reconnaissance d'un endothélium cible puis de homing, d'angiogénèse et de croissance dans le tissu d'accueil. Dès que la taille de la tumeur dépasse 2 mm^3 , elle doit acquérir en outre des propriétés de néoangiogénèse pour assurer l'oxygénation de ses propres cellules.

II. De la lésion précancéreuse au cancer

La cancérogénèse est un processus séquentiel qui fait intervenir l'accumulation progressive de mutations génétiques conduisant à une activation des oncogènes et une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Elle peut être modélisée en trois phases : l'initiation ou lésion rapide et irréversible de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN), la promotion qui correspond à une exposition prolongée au carcinogène et stabilise la lésion, et la progression désignant l'acquisition des propriétés de multiplication, d'indépendance et d'invasion.

II.A. Initiation

La première étape d'initiation, irréversible et rapide, consiste en une dysrégulation génomique qui conduit à une lésion définitive de l'ADN. Il existe différents types d'initiateurs tels que des virus, des produits chimiques ou encore des rayons. Les cellules initiées ne sont pas des cellules tumorales car d'une part, elles n'ont pas encore acquis une autonomie de croissance, et d'autre part, on ne peut les différencier morphologiquement des autres cellules non initiées.

II.B. Promotion

La promotion correspond à la prolifération clonale des cellules initiées. Cette deuxième étape est le résultat d'un faisceau d'interactions entre cytokines ou autres facteurs de croissance et leurs récepteurs. Il en résulte une perte de l'homéostasie tissulaire et l'émergence de clones cellulaires transformés. C'est à ce niveau qu'apparaissent les lésions

précancéreuses. Ces anomalies histopathologiques peuvent aboutir à l'apparition d'un cancer. C'est un ensemble lésionnel traduisant un processus cancéreux plus ou moins manifeste mais sans envahissement ou à un stade limité. Il peut s'agir de néoplasie intraépithéliale (cancer du col utérin ou de la prostate), de dysplasie dans le cas des épithéliums (cancer de l'estomac, du colon, du foie, du larynx...), ou encore de carcinome *in situ* (urothélium, bronches). Elles peuvent précéder le cancer invasif ou disséminé, ou y être fortement associées.

II.C. Progression

La progression désigne l'acquisition de l'indépendance de croissance, de l'expression phénotypique de la malignité et d'une instabilité génétique de plus en plus marquée. L'accroissement du taux de division cellulaire augmente les risques de mutations. Cette phase se prolonge avec le temps par l'acquisition progressive de caractéristiques de plus en plus malignes, de mécanismes biochimiques de l'invasion tumorale, de la capacité métastatique. La lésion précancéreuse devient tumeur maligne.

III. Invasion tumorale

L'invasion tumorale est définie par le franchissement de la membrane basale et la pénétration des cellules dans le tissu conjonctif sous-jacent, puis dans les tissus environnants. L'invasion met en jeu plusieurs mécanismes :

III.A. Modulation de l'expression des molécules d'adhésion

III.A.1. Adhésion intercellulaire

Les cellules épithéliales normales sont généralement étroitement unies les unes aux autres au niveau de systèmes de jonctions intercellulaires. Les cellules cancéreuses sont moins cohésives et perdent parfois toute adhérence intercellulaire. L'un des mécanismes principaux mis en jeu est la diminution de l'expression de la cadhérine épithéliale ou cadhérine E, fréquemment observée dans les cancers évolués. C'est une glycoprotéine transmembranaire calcium dépendante impliquée dans l'adhésion de cellule à cellule au niveau des jonctions adhérentes. Ces jonctions sont responsables du maintien de l'architecture tissulaire, de la limitation de la mobilité et de la prolifération cellulaire. La cadhérine E joue donc un rôle important dans le maintien de la cohésion cellulaire et de l'architecture tissulaire normale et s'oppose à la mobilité cellulaire, à l'invasion et à la métastase. La perte de cette inhibition de contact au niveau des jonctions intercellulaires est l'une des caractéristiques fondamentales de la croissance cancéreuse.

III.A.2 Adhésion cellule-Matrice Extra Cellulaire (MEC)

La cellule cancéreuse qui va migrer hors de la membrane basale a également besoin d'adapter ses molécules d'ancrage à de nouveaux types de matrices extracellulaires.

Les intégrines constituent une famille de protéines transmembranaires qui forment des récepteurs d'adhésion pour les composants de la matrice extracellulaire. Par leurs propriétés structurales et leur rôle de connexion entre les protéines de l'environnement et le cytosquelette d'une part, et par celui de signalisation intracellulaire d'autre part, elles jouent un rôle fondamental dans l'adhésion, la mobilité, la survie et la prolifération cellulaire.

La transduction des signaux de survie "ancrage-dépendants" met en jeu des tyrosines kinases associées aux intégrines, les protéines Focal Adhesion Kinases (FAK) qui protègent les cellules adhérentes de l'apoptose p53-dépendante par stimulation de la Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) et de la voie d'Akt. Les kinases de type FAK sont surexprimées dans certains types de cancers (cancers colorectaux, du sein, de l'estomac, du foie, du col de l'utérus...). Les intégrines assurent donc l'adhésion de chaque cellule à un substrat qui lui est spécifique, ce qui conditionne leur survie.

Les cellules cancéreuses modulent le type d'intégrine exprimée à leur surface pour franchir la membrane basale et s'adapter à de nouveaux environnements hétérotopiques.

III.B. Sécrétion d'enzymes protéolytiques

La cellule épithéliale cancéreuse dérègle plusieurs cascades d'enzymes protéolytiques interconnectées telles que le système urokinase Plasminogène Activator (uPA) qui aboutit à la transformation de plasminogène en plasmine, les cathepsines et enfin les métalloprotéases dont l'activité est modulée par des inhibiteurs tissulaires spécifiques. Ces enzymes sont susceptibles de dégrader la membrane basale et la MEC.

III.C. Motilité et migration cellulaire dans la MEC

Les cellules cancéreuses sont capables d'activer les mécanismes de régulation très fins qui président la mobilité cellulaire, et de se déplacer dans la MEC. Les protéines kinases FAK, associées aux intégrines, régulent le remodelage du cytosquelette impliqué dans l'adhésion au substrat et la mobilité cellulaire. Elles soutiennent également la survie et la prolifération cellulaire en sensibilisant les récepteurs de la voie des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP-kinases) à l'action des mitogènes locaux. Elles contribueraient enfin à l'activation de la transcription des métalloprotéases matricielles.

III.D. Capacité d'induction d'angiogénèse

Aussi bien pour assurer sa croissance locale que celle des métastases, le tissu cancéreux a besoin de nutriments, d'O₂ et donc de vascularisation. Les cellules tumorales peuvent produire les facteurs nécessaires au recrutement cellulaire et à la croissance vasculaire. Cette capacité d'engendrer une néoangiogénèse est donc un prérequis nécessaire à toute croissance tumorale et non une conséquence.

IV. Processus métastatique

Le processus métastatique met en jeu plusieurs mécanismes communs avec ceux de l'invasion tels que l'activité protéolytique, la motilité et l'angiogénèse. Il implique en outre de nombreuses autres propriétés de la cellule cancéreuse incluant les capacités d'intravasation, de survie sans ancrage dans la circulation, d'extravasation, de survie et de prolifération dans un environnement hétérotopique.

IV.A. Intravasation

L'intravasation dans les capillaires tumoraux sanguins ou lymphatiques fait appel aux propriétés de motilité et de remodelage de la MEC décrits plus haut pour l'invasion.

IV.B. Survie

La survie des cellules dans la circulation sanguine résulte de l'activation de voies de survie ancrage-indépendantes. Le détachement de la MEC induirait en effet l'apoptose d'une cellule normale. Les mutations génétiques que comporte la cellule tumorale sont responsables d'activation de voies antiapoptotiques (PI3K, Akt).

IV.C. Extravasation

L'extravasation et le tropisme d'organe : il est connu depuis longtemps que certains cancers présentent un profil métastatique caractéristique ciblant certains organes (métastases osseuses pour le cancer de la prostate, métastases hépatiques pour les tumeurs digestives, métastases pulmonaires pour les sarcomes, ...).

L'extravasation des cellules cancéreuses met en jeu les mécanismes suivants :

- adhésion entre les cellules cancéreuses et la sélectine E des cellules endothéliales,
- adhésion entre intégrines de la cellule tumorale et ligands endothéliaux,

- sécrétion de chémokines par l'organe cible, reconnues par les cellules métastatiques,

- rôle de Cluster Differentiation 44 (CD44): CD44, molécule transmembranaire d'adhésion à l'acide hyaluronique de la MEC et des membranes basales, est exprimée par la plupart des cellules cancéreuses et impliquée dans la migration, le homing et la croissance métastatique. CD44 est de plus sujette à un clivage protéolytique intramembranaire par des métalloprotéases qui libèrent le domaine intracytosolique CD44 IntraCellular Domain (CD44ICD). CD44ICD pénètre dans le noyau et joue le rôle d'activateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de la motilité cellulaire.

IV.D. Survie et prolifération cellulaire dans un environnement hétérotopique

La cellule cancéreuse métastatique trouve et induit, dans le nouveau microenvironnement où elle s'établit, les conditions nécessaires à sa survie par le jeu d'interactions cellule-stroma, cellule-cellule et de facteurs de croissance diffusibles. Les mécanismes de la dormance cellulaire, par lesquels les cellules métastatiques peuvent survivre sous forme de cellules isolées ou de microamas préangiogéniques sans proliférer pendant des années voire des dizaines d'années, de même que les facteurs qui peuvent pousser ces cellules métastatiques à proliférer après des temps de latence extrêmement prolongés, ne sont pas connus. Plusieurs théories ont été évoquées :

- l'influence de la masse tumorale primitive : l'exérèse de la tumeur primitive pourrait supprimer la sécrétion de facteurs de croissance autocrines nécessaires à la croissance des métastases,

- certaines infections, inflammations ou cicatrisations pourraient libérer des facteurs de croissance nécessaires au déclenchement de la croissance des micrométastases dormantes,

- l'incapacité de micrométastases dormantes à assurer la néoangiogenèse nécessaire à leur croissance en milieu hétérotopique a souvent été évoquée mais n'a jamais été prouvée. Toutefois, la capacité de certains traitements anti-angiogéniques à inhiber la croissance de micrométastases pulmonaires a été démontrée dans des modèles expérimentaux animaux.

La cancérogénèse apparaît comme un processus séquentiel. Les cellules cancéreuses évoluent pour acquérir les caractéristiques essentielles au développement du cancer, et pour s'adapter aux conditions très variables de leur environnement. Leur installation et leur

développement dans un site métastatique résultent de multiples interactions avec le microenvironnement de l'organe cible. L'invasion tumorale met en jeu de nombreux médiateurs et mécanismes, en premier lieu la néoangiogénèse.

NEOVASCULARISATION TUMORALE

La néovascularisation désigne le processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle a lieu de manière naturelle au moment du développement embryonnaire ou des menstruations, mais aussi de façon pathologique dans le développement des cancers. Ainsi, le phénotype angiogénique cancéreux est d'ailleurs caractérisé par une forte densité vasculaire tumorale.

Les cellules cancéreuses agglomérées en tumeur ont besoin pour survivre d'une vascularisation importante du fait de leur besoin en O₂, nutriments et autres sources d'énergie [3]. Lors d'une prolifération cellulaire maligne, le nombre de couches de cellules autour de la vascularisation physiologique de l'hôte augmente. Au niveau des couches les plus éloignées, une hypoxie, fonction de la diminution de la diffusion de l'O₂, va s'installer, entraînant des changements métaboliques. Les cellules tumorales vont alors susciter une réaction de la part de l'hôte leur permettant d'obtenir les nutriments dont elles ont besoin pour proliférer et former une tumeur de plus grande taille [4].

L'expérience suivante permet d'illustrer ce propos. Des cellules tumorales cultivées *in vitro* dans l'agar peuvent former des colonies de taille importante (plusieurs milliers de cellules). Cependant, au bout d'un certain nombre de multiplications, le centre de la colonie, souvent constitué par les cellules souches, ne reçoit plus de nutriments, devient hypoxique et finit par mourir. On observe une nécrose centrale, et la disparition de toute la colonie (les cellules filles ayant perdu le pouvoir de mitoses indéfinies). *In vivo*, l'apparition d'une réaction de l'hôte, sous l'influence de facteurs spécifiques fabriqués par les cellules tumorales, permet à celles-ci de disposer des néovaisseaux indispensables à la constitution de la tumeur. Cependant, il ne s'agit pas seulement de néovaisseaux, mais de toute une réaction conjonctive associée, appelée stroma-réaction.

Dans cette partie, nous décrirons le processus de néovascularisation physiologique avant d'expliquer en quoi il peut devenir pathologique, via notamment le switch angiogénique. Nous définirons ensuite le facteur HIF1 et expliquerons son rôle central dans l'établissement de la nouvelle vascularisation de la tumeur, au moyen des nombreux facteurs angiogéniques qu'il contrôle. Enfin nous verrons qu'il est possible d'exploiter ses voies de signalisation pour développer des traitements ciblés anti-angiogéniques.

I. Néovascularisation physiologique

Folkman est l'un des premiers à avoir étudié le processus de néovascularisation.

Physiologiquement, la néovascularisation comporte 3 étapes :

- la vasculogénèse : synthèse des nouveaux vaisseaux,
- l'angiogénèse : arborisation par bourgeonnement à partir des vaisseaux nouvellement formés,
- l'artériogénèse : maturation et stabilisation du réseau [5].

I.A. Vasculogénèse

Elle correspond à la synthèse du réseau vasculaire primitif à partir de progéniteurs communs aux cellules endothéliales et hématopoïétiques : les hémangioblastes. Ces derniers existent sous forme d'amas dans le sac embryonnaire. Leur devenir sera fonction de leur position au sein de ces amas : à l'extérieur, ils vont se différencier en cellules endothéliales, tandis qu'au centre ils deviendront des précurseurs hématopoïétiques. Ces îlots angioblastiques migrent ensuite et se différencient en plexus vasculaire sous l'action de Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) et basic Fibroblaste Growth Factor (bFGF).

I.B. Angiogénèse

Elle représente l'étape par laquelle les nouveaux vaisseaux se développent à partir d'une structure endothéliale préexistante, par bourgeonnement et remodelage. Elle peut être physiologique chez l'adulte au moment des menstruations ou de la grossesse. Lors des processus pathologiques, l'angiogénèse serait médiée par l'inflammation, la cicatrisation, la croissance tumorale, le psoriasis, la rétinopathie diabétique et les arthrites rhumatoïdes. On distingue 6 étapes :

- vasodilatation, perméabilité endothéliale, support péri-endothélial (VEGF et l'angiopoïétine 2),
- prolifération et migration des cellules endothéliales (VEGF, angiopoïétine 1, FGF, Platellet Derived Growth Factor (PDGF), intégrines),
- formation de la lumière (VEGF, angiopoïétine 1, intégrines),
- survie des cellules endothéliales (VEGF, intégrines),
- différenciation endothéliale spécifique d'organe tel que la barrière hématoencéphalique (BHE) (VEGF, MEC),
- remodelage (VEGF, intégrines).

I.C. Artériogénèse

Egalement appelée myogénèse vasculaire, elle constitue l'étape de muscularisation et de stabilisation du réseau vasculaire nouvellement formé. L'origine des cellules musculaires lisses est multiple (cellules endothéliales, mésenchymateuses, macrophages, précurseurs médullaires). Ces cellules sont recrutées, migrent et prolifèrent sous l'effet de différents facteurs tels que PDGF, FGF, TGF β , VEGF et angiopoïétine 1. Un remodelage médié par l'angiopoïétine 2 (rôle de stabilisation, = anti-angiopoïétine 1) suivra leur différenciation.

II. Néovascularisation pathologique

La néovascularisation tumorale (Figure 1) n'est pas complètement similaire au phénomène physiologique [6].

Chez l'embryon, les cellules endothéliales sont connectées de façon lâche et sont activement croissantes alors que chez l'adulte, elles sont quiescentes et encapsulées dans une large musculature et une MEC. D'où la nécessité probable de signaux différents chez l'adulte. Par exemple, des molécules comme les cyclooxygénases (Cox), les protéinases, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène et le monoxyde d'azote ne semblent pas impliqués dans le développement vasculaire de l'embryon alors qu'elles affectent sensiblement l'angiogénèse pathologique. De plus, l'angiogénèse pathologique est souvent induite par une inflammation. Monocytes, macrophages, plaquettes et autres leucocytes sont attirés sur les sites d'inflammation ou de cicatrisation, en partie par des facteurs angiogéniques. Ces cellules dérivées du sang produisent à leur tour des facteurs angiogéniques et artériogéniques (VEGF, bFGF, TGF β , ...), facteurs qui vont stimuler les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

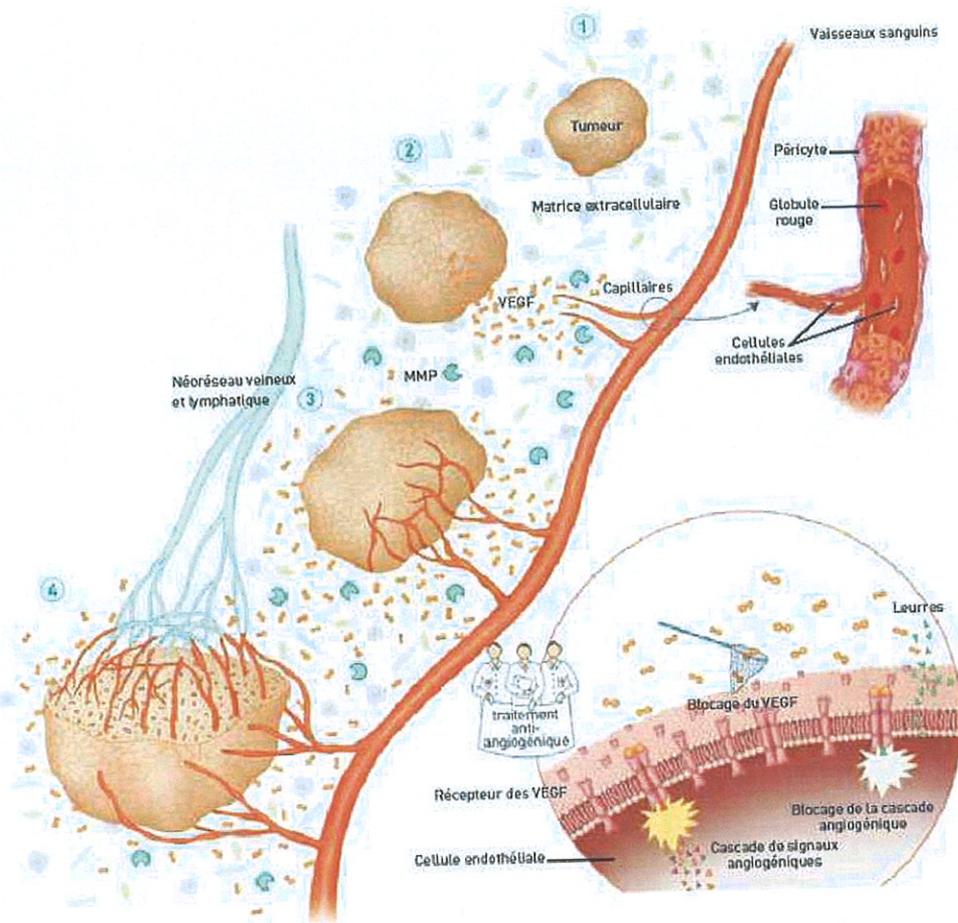


Figure 1 : Néovascularisation tumorale.

Folkman en 1971 [2] postule que la croissance tumorale est dépendante de la néovascularisation (angiogénèse) et que le passage de la phase latente à la phase agressive serait contrôlé par cette néovascularisation grâce à des substances diffusibles provenant de la tumeur. Ce passage a été dénommé le switch angiogénique. Il s'agit d'une rupture de l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de l'angiogénèse (Figure 2).

L'hypoxie stimule l'expression des facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A) et inhibe l'expression ou la production de facteurs anti-angiogéniques tels que la trombospondine 2 (TSP2), grâce à la stabilisation d'HIF1 α et l'activation oncogénique de facteurs de croissance. La TSP2 est un antagoniste de TSP1, elle participe à la quiescence de l'endothélium vasculaire. La balance penche alors vers les activateurs, un nouveau réseau vasculaire va croître.

Inversement, quand l'oxygénation augmente ou quand l'effet des oncogènes et des facteurs de croissance est inhibé, la production des inhibiteurs est supérieure à celle des activateurs. Cela entraîne un blocage de l'angiogénèse tumorale et une régression des néovaisseaux.

L'action de l'hypoxie est médiée par un facteur principalement, HIF1. Il tient le rôle central dans la plupart des mécanismes sous l'influence de l'hypoxie.

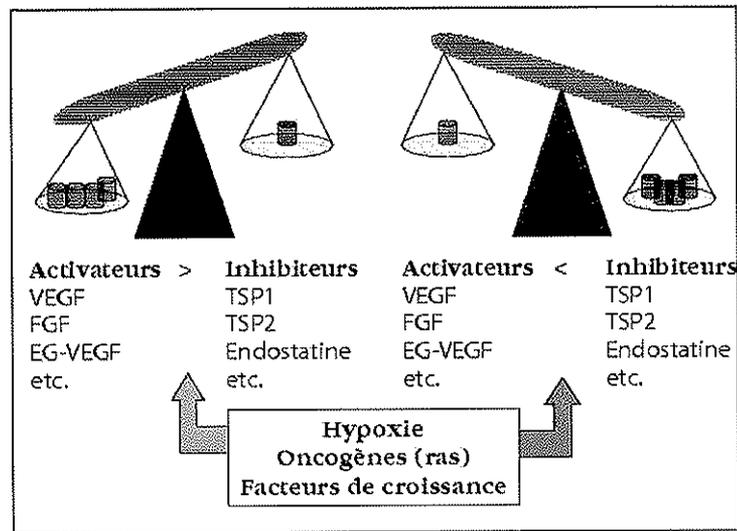


Figure 2 : Switch angiogénique.

III. HIF1

HIF1 appartient à la famille des protéines à double hélice (Figure 3). C'est un hétérodimère composé de deux sous-unités, HIF1 α et β , qui se trouvent dans les tissus de nombreuses espèces (mammifères, vers, insectes...) [7]. Il est le principal régulateur de l'homéostasie dépendant de l'O₂ et joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques de développement. Des investigations chez des fœtus murins déficients en HIF1 α ont montré que la mort fœtale est inévitable [8], ce qui signifie que HIF1 α est un facteur indispensable à la vie [9-12].

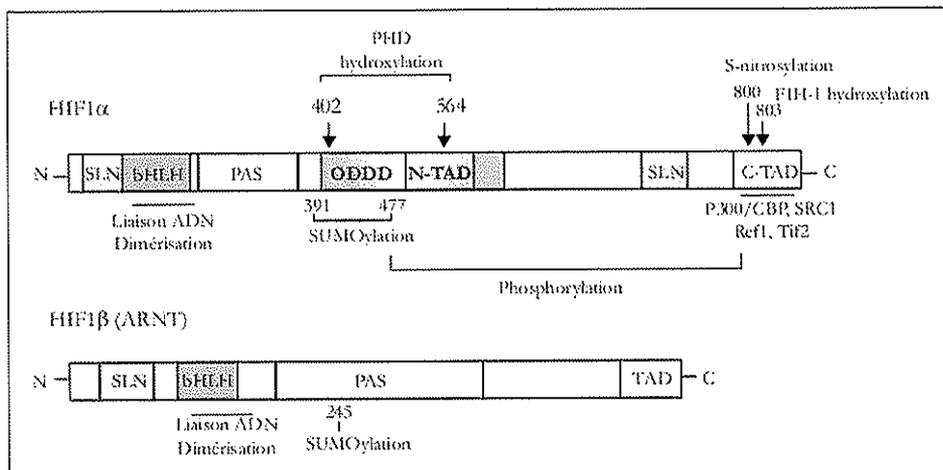


Figure 3 : Structure de HIF1 α et HIF1 β .

L'activation de HIF1 dépend uniquement de HIF1 α , stabilisée par l'hypoxie. HIF1 β , en revanche, est constitutive et donc exprimée indépendamment de la pression partielle d'O₂ (pO₂). *In vitro*, l'activation de HIF1 α est observée dès un mélange à 5 % d'O₂ et elle augmente jusqu'à 0,2-0,1 % d'O₂ soit 1,6-0,8 mmHg, niveau signant pratiquement l'anoxie. Lorsque l'apport en O₂ se normalise, HIF1 α disparaît en quelques minutes, sa demi-vie étant de 5 minutes. Il a cependant été démontré que HIF1 α est exprimée dans des conditions normoxiques dans le cerveau, le rein, le foie, le cœur et le muscle squelettique de souris [13]. Ces observations ont conduit à l'hypothèse qu'une concentration de base de HIF1 α est nécessaire pour assurer une expression continue des gènes indispensables à l'approvisionnement en énergie et au maintien d'une fonction cellulaire suffisante.

Les mécanismes moléculaires intracellulaires de détection de l'hypoxie et de transduction du signal, chez les cellules de mammifères, sont peu connus. La synthèse mitochondriale d'anions superoxyde et de peroxyde, ou Reactive Oxygen Species (ROS) dans les cellules hypoxiques pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'activité de HIF1 α et dans la transcription des gènes cibles. En effet les ROS, formées au niveau mitochondrial comme produits accessoires de la chaîne respiratoire, agiraient comme transmetteurs de signaux. Si cette théorie fait encore l'objet de controverses, il est cependant admis que le signal O₂ est converti en signal redox. Des cytokines et des facteurs de croissance peuvent aussi réguler l'expression de HIF1 α par des signaux redox et/ou des cascades de kinases. La régulation redox est donc un facteur important de régulation de HIF1 α car elle affecte la liaison aux coactivateurs essentiels CREB binding protein (CBP) et p300.

D'autres facteurs interviennent et régulent cette liaison, soit positivement comme le Redox Factor 1 (REF1) ou Steroid Receptor Coactivator 1 (SRC1), soit négativement comme Iron Regulatory Protein 2 (IRP2) qui favorise l'ubiquitinylation et la dégradation protéosomale.

La régulation de HIF1 α (FIGURE 4) par l'hypoxie se joue au niveau de la stabilisation de la protéine et non pas au niveau de la transcription de son gène. Cela signifie que la protéine HIF1 α sera synthétisée de manière constitutive en normoxie et ensuite dégradée par le biais de la cascade ubiquitine/protéasome. Les enzymes-clés O₂-dépendantes qui contrôlent la dégradation de HIF-1 α sont des hydroxylases : ce sont les HIF1 α hydroxylases asparagynyl-hydroxylase factor inhibiting HIF (FIH) et Prolyl-Hydroxylase (PHD). Ces hydroxylases hydroxylent des résidus prolyle ou asparagynyle qui sont présents dans le domaine O₂-dépendant responsable de la dégradation (ODD) de HIF1 α . Les domaines de HIF1 α hydroxylés lui confèrent une très forte affinité pour la protéine Von Hippel Lindau (pVHL), composant du complexe ligase ubiquitine E3 (la maladie de von Hippel-Lindau est une

maladie autosomique dominante caractérisée par la formation de tumeurs). HIF1 α va alors subir une polyubiquitinylation avant d'être dégradée dans le protéasome. Sous des conditions hypoxiques, la fraction ubiquitinylée diminue fortement, ce qui aboutit à l'accumulation de HIF1 α . L'hypoxie n'a cependant pas le pouvoir de dissocier pVHL de HIF1 α et le mécanisme responsable de la diminution de l'ubiquitinylation n'est pas encore défini (Figure 5).

L'action de FIH diffère de celle des PHD. FIH induit un changement de la balance hydrophile/hydrophobe de HIF1 α rendant impossible toute liaison aux coactivateurs essentiels CBP et p300 cités plus haut. L'hydroxylation de HIF1 α représente donc un double système de blocage. D'autres systèmes de modifications post-transcriptionnels (phosphorylation, acétylation, sumoylation, S-nitrosylation) peuvent aussi contribuer à la réponse cellulaire à l'hypoxie.

pVHL n'est pas le seul facteur d'ubiquitinylation déterminant la demi-vie de HIF1 α . p53 interagit également avec HIF1 α . Dans les cellules tumorales, la perte de pVHL ou de p53 entraîne une augmentation de l'expression de HIF1 α et donc de la transcription de gènes codant pour le VEGF. PI3K, Akt et FKBP12-*rapamycin-associated-protein* (FRAP) sont aussi capables d'induire l'expression de HIF1 α et de VEGF sans conditions hypoxiques. Phosphatase and TENSin homolog (PTEN), suppresseur tumoral, est régulé négativement par PI3K : la perte de l'activité de PTEN induit une augmentation de l'expression de HIF1 α .

En résumé, HIF1 α est synthétisé de façon constante en normoxie, mais il est ensuite instantanément hydroxylé et suit un processus de dégradation intracellulaire, jusqu'à sa destruction par les protéasomes. En hypoxie, les hydroxylases sont inhibées et ne peuvent donc pas hydroxyler HIF1 α . HIF1 α n'est donc plus dégradé, migre dans le noyau et forme un dimère avec HIF1 β , et finalement active les gènes cibles. Ainsi, les hydroxylases spécifiques à HIF1 α peuvent être considérées comme des éléments importants dans la détection de l'O₂, si ce n'est pas comme les véritables senseurs d'O₂.

L'hypoxie stabilise HIF1 α , qui sera finalement transportée dans le noyau des cellules pour augmenter l'expression des gènes HIF1-dépendants. La translocation nucléaire se produit indépendamment des conditions d'hypoxie et de la sous-unité HIF1 β qui se trouve de manière constitutive dans le noyau. Une fois arrivée dans le noyau, HIF1 α , via sa moitié N-terminale, se dimérise avec HIF1 β et le complexe résultant se lie à une séquence basique de gènes régulant l'O₂, la séquence HIF1 binding site (HBS). HBS est la séquence-clé des éléments répondant à l'hypoxie ou Hypoxia Response Elements (HRE). Cette séquence est le régulateur de plus de 70 gènes cible dépendants de HIF1 [14], impliqués la réponse cellulaire à l'hypoxie, via la glycolyse, l'érythropoïèse... comme nous le détaillerons par la suite. On

estime que 1 à 2 % du génome est modulé par l'hypoxie. Certains de ces gènes contrôlent plus spécifiquement l'angiogénèse et le remodelage vasculaire.

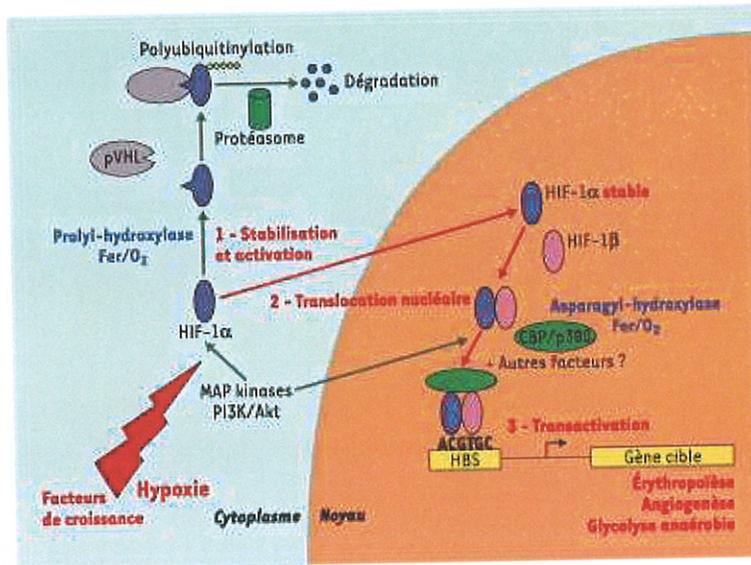


Figure 4 : Régulation de HIF1 en présence d'O₂ (A) ou non (B).

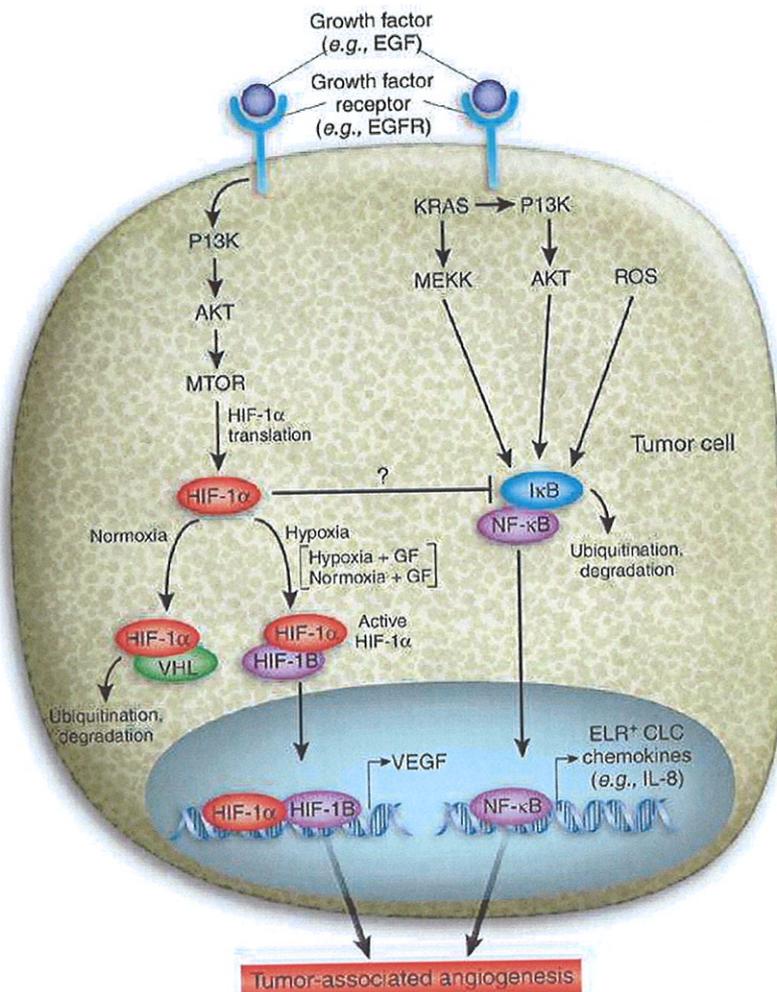


Figure 5 : Hypoxie et angiogénèse tumorales.

IV. Facteurs de l'angiogénèse, sous la dépendance de HIF

HIF1 joue son rôle de chef d'orchestre de la néoangiogénèse en contrôlant la transcription des gènes des facteurs de croissance, indispensables à la formation, la croissance et la maturation du nouveau réseau vasculaire, dont les principaux sont le VEGF, les FGF et les angiopoïétines (FIGURE 6).

IV.A. VEGF

Ce facteur de croissance angiogénique, encore appelé facteur de perméabilité vasculaire (VPF), est présent physiologiquement mais il est aussi sécrété par la tumeur. Il dispose de récepteurs transmembranaires spécifiques dont les principaux sont fms-like tyrosine kinase (Flt1) ou VEGFR1 et Flk1 ou VEGFR2. Mitogène *in vitro* et angiogénique *in vivo*, il cible spécifiquement les cellules endothéliales car elles sont les seules à posséder ses récepteurs. VEGF régit la migration et la prolifération des cellules endothéliales, ce qui aboutit à la synthèse de tubes capillaires. Physiologiquement, il est responsable du développement vasculaire pendant l'embryogénèse, et du maintien de l'homéostasie du vaisseau adulte. La surexpression de ce facteur et de ses récepteurs, induite par l'hypoxie, est corrélée avec la progression tumorale et un mauvais pronostic [15].

IV.B. FGF

Le FGF se compose d'au moins 24 membres, dont les plus importants sont le FGF1 ou aFGF pour acide FGF, et le FGF2 ou bFGF. Il est synthétisé par les fibroblastes, les cellules endothéliales et agit sur des récepteurs spécifiques. Normalement, son action est très régulée. FGF1 et 2 ont un rôle majeur dans l'angiogénèse et le développement des tumeurs. Il n'est relargué *in vivo* qu'à partir de cellules nécrotiques, par dégradation de la MEC, et agit sur les gènes modifiant le cycle cellulaire. FGF2 a un puissant effet mitogène et chimiotactique pour les cellules endothéliales, fibroblastiques et musculaires lisses des vaisseaux. Il induit la prolifération, la migration et la différenciation de ces cellules, et diminue un inhibiteur, la thrombospondine. C'est lui qui interviendra préférentiellement dans le processus de néovascularisation tumorale.

IV.C. Angiopoïétine 1

Cet agent anti-angiogénique est responsable de la stabilisation du réseau vasculaire par le recrutement de péricytes, la stabilisation des interactions cellules endothéliales/MEC et péricytes. Antiapoptotique, il permet également la différenciation des cellules endothéliales.

IV.D. Angiopoïétine 2

Antagoniste de l'angiopoïétine 1, elle induit l'angiogénèse via la potentialisation du VEGF.

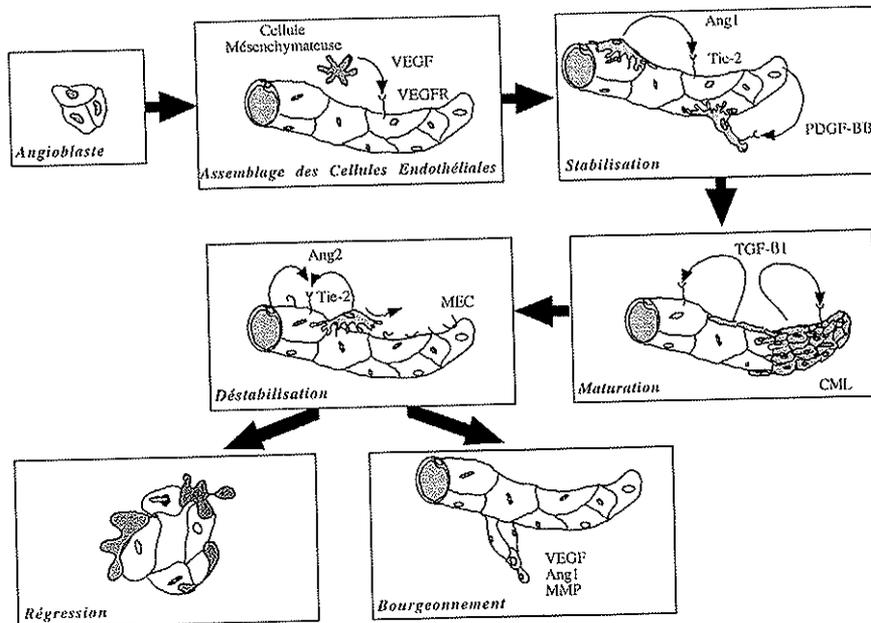


Figure 6 : Néoangiogénèse tumorale.

V. Traitements anti-angiogéniques

L'angiogénèse est considérée comme un facteur de métastase : il existe une corrélation entre la production de facteurs angiogéniques, la densité vasculaire de la tumeur, le nombre de métastases et le mauvais pronostic de nombreux cancers (sein, poumon, prostate...). L'action potentielle de médicaments à visée anti-angiogénique pourrait s'exercer surtout pour la prévention des métastases ou la réduction du risque de récurrence locale (cerveau), après un traitement local ou général approprié [6].

La caractérisation des mécanismes moléculaires de l'angiogénèse a conduit à l'identification de nouvelles cibles et à l'apparition de thérapies ciblées. Utilisés seuls ou en plus des autres stratégies thérapeutiques, ces traitements montrent une spécificité d'action permettant d'épargner les cellules saines.

La néoangiogénèse est régulée par un équilibre complexe entre facteurs pro- et anti-angiogéniques, parmi lesquels le VEGF apparaît comme un élément clé. Il contrôle la fabrication des néovaisseaux : augmentation de la perméabilité vasculaire, prolifération et migration des cellules endothéliales, survie des cellules endothéliales. Les cellules tumorales sécrètent d'autres médiateurs et facteurs de croissance tels que le PDGF, le bFGF et les angiopoïétines, qui activent les cellules endothéliales et favorisent la formation de la nouvelle

vascularisation. De nombreux médicaments, dont certains sont déjà commercialisés, interfèrent avec ces acteurs moléculaires du processus angiogénique [16].

La mort des néovaisseaux obtenue par certains de ces médicaments permet de réduire la taille tumorale.

Les principales voies de signalisation ciblées sont celles du VEGF et de la Cox 2.

V.A. Voie du VEGF

V.A.1 Anticorps monoclonaux

Le bevacizumab (AVASTIN[®]) est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, capable d'inhiber la croissance tumorale. Il démontre une bonne tolérance globale malgré les risques d'hypertension artérielle, d'hémorragie et de thromboembolie.

Les travaux de Yang furent parmi les premiers à comparer l'anticorps anti-VEGF bevacizumab à un traitement placebo chez des patients porteurs d'adénocarcinome du rein métastatiques [17]. Les patients traités présentaient une survie sans progression à huit mois significativement supérieure. On retrouve dans les études suivantes [5] une supériorité significative en termes de réponse avec notamment une diminution de la perfusion tumorale, de la densité microvasculaire, de la pression interstitielle, du nombre de cellules endothéliales circulantes matures viables ou de leurs progéniteurs, aussi bien qu'en termes de survie. Un gain en survie globale a également été démontré pour des pathologies néoplasiques en phase avancée telles que l'adénocarcinome du sein métastatique ou le cancer bronchique non à petites cellules. L'activité antitumorale d'un inhibiteur de l'angiogénèse et sa capacité à retarder la progression tumorale d'une tumeur, pour laquelle la production de VEGF est un facteur pronostique établi, étaient démontrées.

Un autre anticorps, de type Immunoglobuline G1 (IgG1) et dirigé contre le VEGFR2, fait actuellement l'objet de recherche.

V.A.2. Inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK)

De nombreuses études rapportées dès l'ASCO 2005 démontrent l'activité antitumorale d'autres inhibiteurs de la signalisation du VEGF, les ITK [18, 19].

▪ *Sunitinib*

Demetri *et al.* compare le sunitinib (SUTENT[®]), un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase (RTK) cKIT, PDGFR, et VEGFR1 et 2, *versus* placebo chez des patients porteurs de tumeurs stromales gastro-intestinales réfractaires à l'imatinib, démontrant un gain significatif en survie sans progression et en survie globale [18]. Le sunitinib semble également actif contre les adénocarcinomes du rein et du sein métastatiques [20] après échec des

chimiothérapies classiques. Il en est de même d'un autre inhibiteur des RTK du VEGF, le sorafenib (NEXAVAR[®]), dans le cancer du rein [19].

- *PTK/ZK*

C'est un ITK des VEGFR1 et 2 évalué dans le glioblastome, les cancers colorectaux et le rénaux métastatiques.

- *Semaxanib*

Le premier inhibiteur spécifique des VEGFR-TKR (récepteur Flk1), a vu son développement clinique interrompu à cause de résultats décevants. Il en est de même pour le SU6668, qui inhibe les TK du PDGFR, FGFR1 et VEGFR2.

- *Autres*

D'autres ITK des VEGFR1 et 2, du récepteur à l'Epithelium Growth Factor (EGFR) ou du PDGFR sont à l'étude.

V.A.3. Autres inhibiteurs du VEGF

- *VEGF-Trap (AFLIBERCEPT[®])*

Il s'agit d'une protéine de fusion entre des portions du VEGFR1 humain (Flt1) et du VEGFR2 (KDR) avec un fragment Fc des IgG1 humaines. Elle se lie avec une affinité 100 fois supérieure à celle des anticorps monoclonaux au VEGF circulant ou tissulaire pour l'inactiver. Des résultats ont été obtenus dans les cancers rénaux et coliques.

- *Immunothérapie cellulaire*

Des lymphocytes CD8+ spécifiques du VEGF testés chez la souris ont montré une capacité d'inhibition de la croissance tumorale.

- *Ribosyme anti-Flt1*

C'est une petite molécule synthétique ciblant l'Acide RiboNucléique messager (ARNm) du VEGFR1 actuellement en phase II.

- *Aplidine*

Ce cyclodepsipeptide en phase I diminuerait l'expression du VEGFR1 et induirait même un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

- *Oligonucléotides antisens*

Des études *in vitro* sont menées sur des cellules HeLa (Helen Lane) et montrent une diminution de la croissance tumorale. Le mécanisme réside dans le ciblage et la neutralisation de l'ARNm du VEGF.

L'ensemble des études évaluant les anti-VEGF montre une toxicité limitée du traitement, avec une possible augmentation de l'incidence des hémorragies et d'accidents vasculaires qui reste inférieure à 1 % et des hypertensions de grade 3-4 chez moins de 20 % des patients [21].

V.B. Inhibition de la Cox-2

La Cox-2 a été détectée dans les cellules cancéreuses, la vascularisation tumorale et les capillaires adjacents préexistants. Sa détection dans la néovascularisation caractérise les carcinomes. Une partie des propriétés antitumorales des inhibiteurs de la Cox-2 peut être attribuée à l'inhibition de l'angiogénèse induite par les prostaglandines et le VEGF, mais la Cox-2 peut aussi jouer un rôle dans la migration et la survie des cellules endothéliales, la perméabilité des vaisseaux et l'inhibition des réponses immunes. Ensemble, ces phénomènes contribuent à la croissance tumorale et pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles d'inhibiteur tel que le célécoxib (CELEBREX®).

V.C. Autres voies d'inhibition de l'angiogénèse

V.C.1. Inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse

L'endostatine et l'angiostatine sont des peptides dérivés de protéines naturelles qui présentent des propriétés anti-angiogéniques. La TSP-1 est un autre inhibiteur naturel de l'angiogénèse et l'ABT-510, un nanopeptide qui en dérive, mime les activités de la protéine endogène.

V.C.2. Inhibiteurs de l'EGFR

De multiples inhibiteurs de l'EGFR sont actuellement en développement clinique. Il s'agit de petites molécules telles que le gefitinib (IRESSA®) ou l'erlotinib (TARCEVA®), ou d'anticorps monoclonaux. La plupart de ces agents ont des propriétés anti-angiogéniques, notamment via l'inhibition de la production du VEGF par la cellule tumorale.

V.C.3. Antagonistes des intégrines

Le VITAXIN® est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'intégrine avb3. EMD 121974, un antagoniste des intégrines avb3 et avb5, montre des réponses dans des mélanomes ou des tumeurs cérébrales dans des études précliniques.

V.C.4. Divers

▪ NEOVASTAT®

Cet inhibiteur oral de l'angiogénèse cible le VEGFR1 et les métalloprotéases 2, 9 et

▪ *Voie de la Raf-1*

Raf est impliquée dans l'angiogénèse induite par le VEGF et le bFGF. Un inhibiteur spécifique de Raf-1 a été développé : BAY 43-9006. Il a démontré une bonne tolérance.

▪ *Combretastatin A-4 phosphate*

La prodrogue phosphorylée CA4P est un analogue synthétique de la combrestatine, un agent se liant à la tubuline qui induit *in vitro* spécifiquement l'apoptose des cellules endothéliales proliférantes, et qui entraîne une réduction allant jusqu'à 90 % du flux sanguin tumoral dans des modèles de tumeurs greffées. La cardiotoxicité est son principal effet secondaire. Il s'agit d'un agent vasculotoxique plutôt qu'anti-angiogénique.

▪ *Squalamine*

La squalamine est un stérol anti-angiogénique naturel qui a prouvé son efficacité dans le traitement des souris xéno greffées avec des tumeurs ovariennes humaines. Elle augmente les effets du cisplatine. Les cellules surexprimant HER2 sont résistantes au platine et cette résistance est supprimée quand le cisplatine est combiné à la squalamine.

▪ *Thalidomide*

Cet inhibiteur de l'angiogénèse induite par le VEGF ou le FGF-2 présente une forte efficacité clinique dans les myélomes malgré des neuropathies périphériques et une somnolence. Des analogues de la thalidomide plus efficaces comme le CC-5013 (REVLIMID[®]) sont actuellement développés.

▪ *TNP-470*

Le TNP-470, analogue synthétique de la fumagiline, est un inhibiteur naturel de l'angiogénèse. Il présente des effets modestes dans des cancers du rein et du col utérin mais aussi une toxicité neurologique limitante.

▪ *2-méthoxyestradiol*

C'est un métabolite de l'oestrogène endogène qui inhibe la prolifération tumorale via ses activités anti-angiogéniques et proapoptotiques.

▪ *Inhibiteurs des histones déacétylases*

Des travaux précliniques montrent les potentialités anti-angiogéniques des inhibiteurs des histones déacétylases via l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans l'angiogénèse. Ces produits montrent une synergie d'action avec d'autres anti-angiogéniques tels que le PTK/ZK.

▪ *Cytotoxiques conventionnels*

Les agents conventionnels utilisés à faible dose sur une période prolongée (chimiothérapie métronomique) peuvent montrer une activité clinique, probablement via l'inhibition de l'angiogénèse. Un récent travail a montré que le paclitaxel à faible dose en

perfusion continue avait une toxicité directe sur les cellules endothéliales, effet augmenté par l'association avec le célécoxib.

Le développement clinique de ces produits ne peut cependant se concevoir sans l'intégration de nouveaux outils d'évaluation comme l'imagerie fonctionnelle ou des biomarqueurs d'activité qui viendront compléter les critères classiques de jugement (réponse objective, temps jusqu'à progression, survie). Un des défis actuels est de déterminer si ces agents doivent être combinés entre eux ou combinés avec des chimiothérapies conventionnelles pour augmenter de façon significative la survie des patients. Ce défi implique de nouveaux modèles de développement clinique qui doivent tenir compte des spécificités d'action et des toxicités propres de ces produits.

HYPOXIE TUMORALE

Malgré la néovascularisation induite par la tumeur via la production de facteurs de croissance pro-angiogéniques, il existe au sein de la tumeur des zones hypoxiques, le nouveau réseau vasculaire ayant une croissance rapide mais très imparfaite.

Ces phénomènes hypoxiques, relativement constants dans les tumeurs solides, constituent un facteur important de la biologie tumorale et de la réponse au traitement. Ils sont corrélés à l'agressivité tumorale, au développement de métastases et de rechutes, et confèrent à la tumeur une chimiorésistance et une radiorésistance, mais aussi une instabilité génétique et des phénotypes plus agressifs et invasifs [4, 22, 23].

L'hypoxie est pour de nombreux cancers (col, pancréas, cerveau, prostate, tête et cou), un facteur pronostique fort et indépendant de la taille, du grade, de l'étendue de la nécrose et de l'hémoglobémie selon Padhani et Brown [24, 25].

Après avoir défini la physiopathologie de l'hypoxie tumorale, nous aborderons son action au niveau moléculaire, cellulaire et métabolique. L'implication de l'hypoxie dans la résistance aux chimiothérapies ainsi qu'aux radiothérapies sera ensuite expliquée, puis les radiosensibilisants, développés pour pallier la radiorésistance, seront présentés.

I. Physiopathologie

L'hypoxie résulte d'une inadéquation des apports d'O₂ par rapport aux besoins des tissus. Au niveau physiopathologique [26], on distingue trois types d'hypoxie : anémique, chronique et aiguë.

L'hypoxie anémique simplement mise en évidence par la numération formule sanguine est une conséquence de l'anémie pouvant être chimio- ou tumoro-induite et responsable d'une diminution de l'oxygénation.

Les deux autres types d'hypoxie proviennent de la néovascularisation tumorale. Pendant la croissance rapide de la tumeur, une microvascularisation aberrante et anarchique se développe. Les vaisseaux présentent un diamètre variable, des culs-de-sac, des shunts, ce qui n'est pas le cas dans les tissus normaux. Cette déformation vasculaire à la fois

fonctionnelle et morphologique diminue l'oxygénation cellulaire créant un environnement hypoxique [27]. On distingue :

- l'hypoxie chronique, ou de diffusion, débute à environ 70 μm du vaisseau sanguin et s'accroît avec la distance. Elle trouve son origine dans l'organisation cordée des tumeurs. Les cellules se superposent en couches autour d'un capillaire, et à 200 μm de celui-ci apparaît une nécrose hyaline. Les cellules hypoxiques sont donc proches de cette zone de nécrose [23] à une distance intermédiaire de 70 à 200 μm dans laquelle elles sont exposées à une diffusion d' O_2 diminuée.

- l'hypoxie aiguë est une conséquence de la variabilité du flux sanguin tumoral. En effet le réseau vasculaire tumoral, fait de vaisseaux tortueux, au diamètre irrégulier, présentant des shunts artérioveineux, des culs-de-sac, et des territoires aussi faiblement musculieux qu'innervés, contribue à l'inconstance du flux sanguin. Des occlusions transitoires, dues à des augmentations de pression interstitielle intratumorale, peuvent également survenir [25, 28, 29].

Les hypoxies chroniques et aiguës déterminent finalement une hypoxie hétérogène pouvant être faible, intermédiaire ou sévère. L'hypoxie de sévérité intermédiaire est la plus importante pour le pronostic [30] car les cellules résistent à la thérapeutique tout en conservant leur capacité à proliférer [31].

Au sein de la tumeur, on observe donc une variabilité importante mais aussi continue du degré de l'hypoxie, c'est-à-dire qu'il n'existe pas de valeur seuil stricte pour caractériser l'hypoxie. Il est cependant montré que les processus métaboliques s'interrompent pour différents niveaux de pO_2 . Par exemple, on observe une déplétion en Adénosine TriPhosphate (ATP) pour une pO_2 moyenne inférieure à 10 mmHg . La phosphorylation oxydative diminue également à partir de cette valeur pour disparaître totalement sous les 0,5 mmHg . La radiorésistance apparaît pour 25 à 30 mmHg [32].

II. Actions moléculaire, cellulaire et conséquences métaboliques

L'hypoxie, via la stabilisation de HIF1 α , induit et contrôle la transcription de nombreux gènes responsables notamment de la néoangiogénèse, du métabolisme énergétique, et des voies de signalisation cellulaires (FIGURE 7). D'une façon générale, le facteur HIF1 α intervient dans la prolifération, la survie, la perfusion et l'invasion tissulaire des cellules néoplasiques [33].

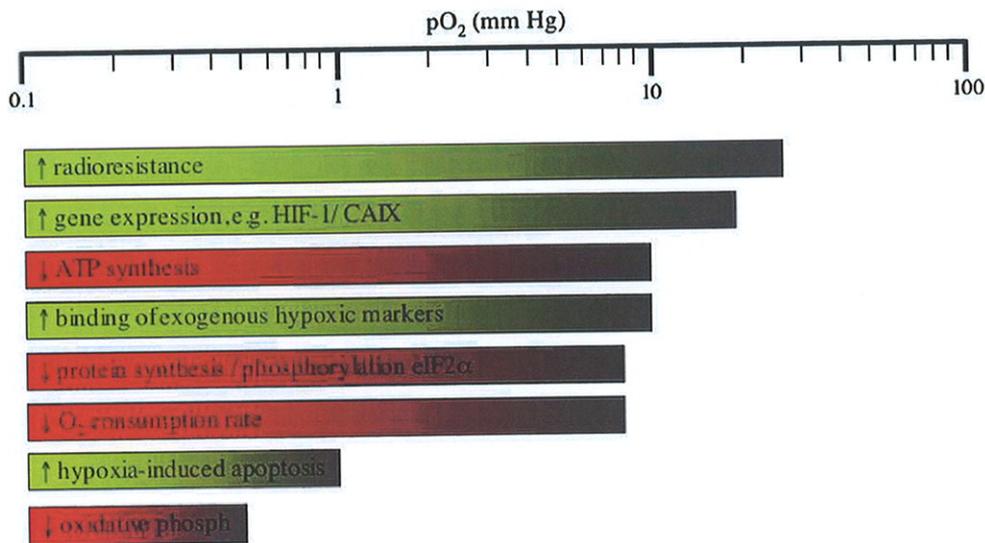


Figure 7 : Métabolismes cellulaires et pO₂.

II.A. Angiogénèse

Nous avons déjà abordé le rôle de l'hypoxie et d'HIF1 dans la production de cytokines pro-angiogéniques et de VEGF, faisant pencher la balance vers l'angiogénèse et déterminant le switch angiogénique.

L'interaction du VEGF avec son récepteur tyrosine kinase entraîne l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, dont quatre importantes :

- la voie Ras qui induit la prolifération cellulaire et l'induction de gènes cible,
- la voie FAK qui entraîne la migration cellulaire,
- la voie PI3K qui active la prolifération et la survie cellulaire,
- la voie Phospholipase δ (PLC δ) responsable de la perméabilité vasculaire et de la prolifération.

L'ensemble concourt à l'angiogénèse.

II.B. Action antiapoptotique

D'autre part, il existe au sein des cellules hypoxiques une surexpression de l'EGFR et de la Carboxy Anhydrase 9 (CA9). HIF1 α joue un rôle dans la sélection de cellules p53 mutantes, anti-apoptotique. Les taux augmentés de CA9 et d'HIF1 sont d'ailleurs significativement associés à un faible contrôle régional de la tumeur et une diminution de la survie globale [28].

II.C. Effet Warburg

Il semblerait que les cellules tumorales réduisent l'activité de leur chaîne respiratoire et utilisent préférentiellement la glycolyse pour produire de l'ATP, c'est l'effet Warburg. Lorsque celles-ci se trouvent au centre de la tumeur, zone faiblement oxygénée, elles transforment le pyruvate en lactate (voie anaérobie) pour maintenir un apport énergétique indispensable à leur survie [34]. Cette conversion est assurée par HIF1 α qui détermine la transcription de gènes codant pour les protéines suivantes :

- les transporteurs de glucose GLUT-1 et GLUT-3 qui augmentent la captation intracellulaire du glucose,
- les enzymes glycolytiques qui transforment le glucose en pyruvate,
- la lactate déshydrogénase qui transforme le pyruvate en lactate et la pyruvate déshydrogénase kinase 1 qui inhibe la pyruvate déshydrogénase,
- la cytochrome c oxydase COX4-2, plus efficace en conditions hypoxiques, qui remplace la COX4-1.

Il y a donc activation de la voie métabolique de la lactate déshydrogénase, alors que celle de la pyruvate déshydrogénase est inactivée, diminuant alors l'entrée du glucose dans le cycle de Krebs. L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale est par conséquent réduite (FIGURE 8).

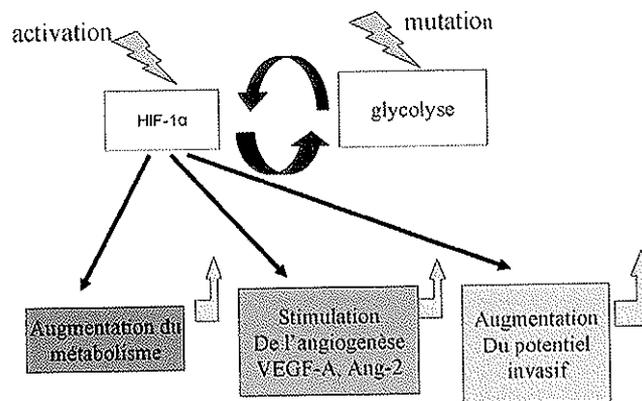


Figure 8 : Possible interaction entre la glycolyse et HIF1 α dans la cellule cancéreuse: les cellules hypoxiques deviennent plus agressives.

II.C. Voie de signalisation

La voie de signalisation métabolique Akt-mTOR (serine/thréonine kinase-mammalian Target Of Rapamycin) intègre les signaux de mitose et de nutrition chez les cellules de mammifères comme chez les levures. Cette voie est apparue pour réguler la croissance dans un environnement favorable mais elle est fréquemment détournée par les cellules

néoplasiques afin d'augmenter croissance et survie dans des conditions inappropriées ou peu favorables. Dans les cellules cancéreuses, elle est activée par des mitogènes stimulant les récepteurs tyrosine kinase ou conduisant à leur surexpression. Cette activation peut également s'exercer sur des effecteurs d'aval, par exemple Ras et PI3K. Or de récentes études ont montré que Akt et mTOR peuvent à leur tour activer HIF1 α , conduisant à une augmentation de la captation cellulaire du glucose et à une activation de la glycolyse [35]. 60 à 90 % des lignées cancéreuses basculent vers cette utilisation anaérobie du glucose, qui semble elle-même capable d'activer HIF1 α .

II.D. Unfolded Protein Response (UPR)

Un autre mécanisme important de régulation du métabolisme cellulaire en milieu hypoxique est l'UPR [36]. L'UPR correspond à une cascade de signaux intracellulaires dont le but est de restaurer l'homéostasie du Réticulum Endoplasmique (RE).

Le RE exprime un système complexe de protéines, cofacteurs et enzymes indispensables aux repliements des protéines en synthèse. Il est le compartiment par lequel transitent obligatoirement les protéines sécrétées. Elles y subissent un contrôle de qualité qui les conduira soit vers l'appareil de Golgi pour être sécrétées, soit vers la dégradation en cas de mauvaise conformation. Le RE est aussi le site de biosynthèse des lipides, et constitue la principale réserve calcique. Il joue un rôle crucial dans la biogénèse des organites, la différenciation cellulaire et l'apoptose.

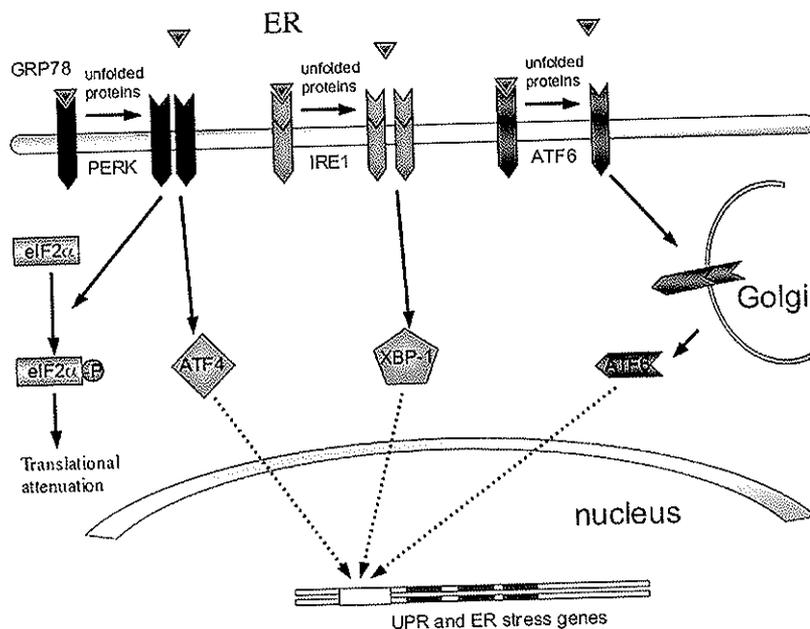


Figure 9 : Principaux médiateurs de l'UPR.

Un environnement oxygéné est maintenu dans le cytoplasme pour catalyser les modifications post-translotionnelles de ces protéines et leur permettre de fonctionner correctement. Beaucoup de conditions physiologiques et pathologiques telles que l'hypoxie interfèrent avec le fonctionnement du RE et conduisent à un repliement anormal des protéines. L'accumulation de protéines dans la lumière du RE peut être de nature physiologique (cellules sécrétrices) ou pathologique (protéines mal repliées). Cette accumulation pathologique conduit à un état nommé ER-stress susceptible d'activer l'UPR.

L'UPR augmente les capacités de repliement, de maturation, voire de dégradation du RE. Elle consiste en :

- une régulation négative de la synthèse protéique,
- une augmentation de la dégradation de ces protéines malformées,
- une activation des gènes pro-apoptotiques si le stress s'établit.

L'adaptation cellulaire à l'hypoxie induit donc, via l'activation de l'UPR, une régulation positive des gènes de réponse à l'hypoxie, avec une régulation négative des processus consommant de l'O₂ ou de l'énergie tels que la prolifération cellulaire ou la synthèse protéique. L'UPR joue un rôle primordial dans la conversion de la cellule vers un état de faible énergie [37].

Cette réponse se met en place à partir de l'activation de trois protéines transmembranaires du RE, PKR-like ER protein Kinase (PERK), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) et IRE1 (Inositol Requiring transmembrane kinase and Endonuclease 1) :

- Le principal médiateur de cette réponse est la Protéine Kinase activée par dsRNA (PKR) comme la PERK qui phosphoryle et inhibe le facteur d'initiation 2 α des eukaryotes. PERK est une kinase de Golgi normalement inactivée par la GRP78, protéine régulée par le glucose [29].

- IRE1, protéine transmembranaire, et l'ATF6, facteur d'activation de la transcription, sont deux régulateurs de l'UPR et des gènes de stress. IRE1 active le facteur de transcription X-box-binding protein-1 (XBP1) qui, après transport vers le noyau, va réguler positivement l'UPR et les gènes de stress, alors qu'ATF6 nécessite une protéolyse dans l'appareil de Golgi pour devenir un facteur d'activation de la transcription [38].

Ces trois facteurs, et donc toute la réponse UPR, sont régulés, entre autre, par une importante protéine, la GRP78. En l'absence de stress, elle se lie à PERK, IRE1, et ATF6 pour les inactiver. Lorsque les protéines pathologiques s'accumulent, elles chassent la GRP78, ce qui permet l'initiation de l'UPR et donc l'adaptation cellulaire aux conditions néfastes. La GRP78 apparaît donc indispensable à la survie des cellules en état de stress telles

que les cellules tumorales. En effet, ces dernières expriment beaucoup plus cette protéine que le tissu sain. Il a d'ailleurs été montré que, lorsque la GRP78 diminue, la croissance tumorale diminue, l'apoptose est accrue et le pouvoir invasif inhibé. Cela augmente également la sensibilité des cellules tumorales aux chimiothérapies [39].

L'hypoxie modifie donc la biologie des cellules cancéreuses qui survivent, deviennent plus agressives et acquièrent un pouvoir métastatique accru. Cette transformation est induite par les gènes sous la dépendance principale du facteur de transcription HIF1 α , lié à l'hypoxie.

III. Implication dans la chimiorésistance

L'hypoxie est responsable d'une résistance accrue des tumeurs envers les traitements de chimiothérapie. Bien qu'*in vitro* les chimiothérapies restent actives car il n'existe pas de problème de biodisponibilité, *in vivo*, l'action directe ou indirecte de nombreux facteurs associés est capable d'induire une chimiorésistance :

- L'hypoxie, associée ou non à des carences en divers nutriments tels que le glucose, est responsable d'une diminution du métabolisme cellulaire. Les cellules ralentissent leur cycle et peuvent même le stopper complètement [40, 41]. Cet hypométabolisme ne serait pas la conséquence d'une diminution de l'ATP ou du niveau énergétique de la cellule, mais serait plutôt induit par des protéines de stress hypoxique spécifiques issues de l'UPR [42]. Or la cible privilégiée des médicaments anticancéreux étant les cellules à renouvellement rapide, celles qui présentent un métabolisme ralenti seront moins soumises à la toxicité cellulaire de ces produits, et ce d'autant plus qu'elles sont souvent éloignées des vaisseaux sanguins.
- La concentration des anticancéreux est fonction d'un gradient de diffusion, c'est à dire qu'elle est plus élevée à proximité des vaisseaux sanguins (Figure 10). Cependant, leur diffusion n'est pas seulement fonction de la géométrie vasculaire ou de la distance au vaisseau sanguin. En effet, divers agents tels que les intercalants voient leur diffusion limitée par leur mécanisme de fixation. D'autres, tels que le melphalan, présentent également une distribution non homogène au sein des vaisseaux sanguins, ce qui accentue encore la variabilité de leur biodisponibilité.
- L'hypoxie, via l'UPR, induit l'amplification des gènes « multi drug resistance » codant pour des protéines qui confèrent une résistance à l'adriamycine, l'étoposide et le cisplatine.
- Les cellules ayant une oxygénation diminuée orientent leur métabolisme sur la voie du pyruvate, ce qui aboutit à l'abaissement du pH. Le pH extracellulaire est donc plus

faible au niveau des zones tumorales hypoxiques. Il existe un gradient de pH avec le milieu intracellulaire : on n'aura donc pas d'accumulation intracellulaire de médicaments basiques comme l'adriamycine, mais à l'inverse les composés acides tels le chlorambucil pourront s'accumuler.

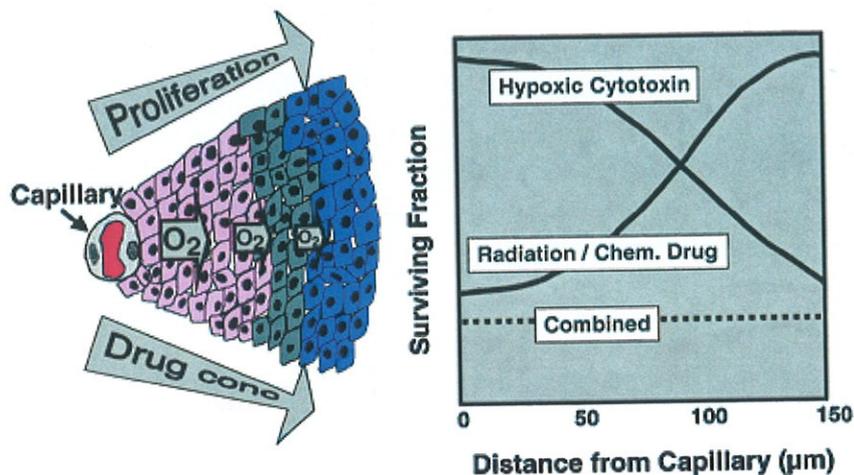


Figure 10 : Diffusion péri-vasculaire.

Il y a donc de nombreux phénomènes qui contribuent à la perte plus ou moins prononcée du pouvoir de mort cellulaire de la plupart des agents anticancéreux.

IV. Implication dans la radiorésistance

Mottram observe dès 1936 l'insensibilité des tumeurs sous anaérobiose au rayonnements gamma [43] (Figure 11). En 1953, Gray décrit une diminution de la sensibilité des tumeurs hypoxiques à la radiothérapie [44]. Après avoir expliqué le mécanisme d'action des rayonnements ionisants, nous définirons l'effet O_2 , puis nous traiterons les radiosensibilisants.

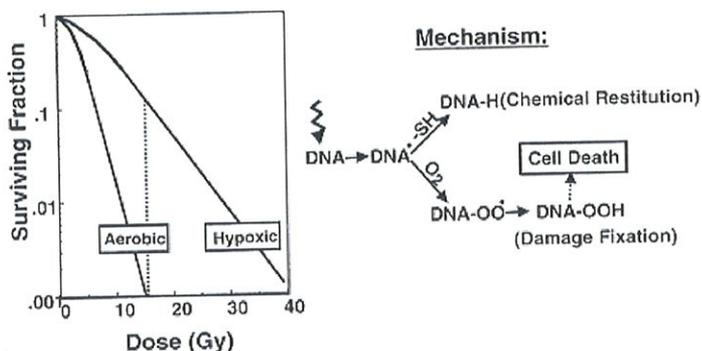


Figure 11 : Radiorésistance des cellules hypoxiques.

IV.A. Principe de la radiothérapie

La radiothérapie est une technique presque exclusivement dévolue au traitement des tumeurs cancéreuses. Une tumeur est curable par radiothérapie à condition qu'elle soit peu étendue car elle doit subir une irradiation homogène dans sa totalité, et que la dose nécessaire à sa destruction soit tolérable pour les tissus sains environnants. La radiothérapie doit pouvoir éliminer les cellules cancéreuses sans détruire les cellules saines, c'est-à-dire que l'on cherche à obtenir un effet différentiel entre cellules pathologiques et saines.

Lorsqu'un rayonnement, que se soit une particule en mouvement ou un rayonnement électromagnétique, pénètre dans un milieu matériel, il a une certaine probabilité d'interagir avec les atomes du milieu et de leur transférer de l'énergie.

Le rayonnement peut interagir directement avec une molécule d'intérêt biologique, c'est l'effet moléculaire direct, et créer, selon l'énergie transférée, une excitation ou une ionisation de la molécule.

Ces lésions moléculaires peuvent aussi être créées indirectement par l'intermédiaire de la radiolyse de l'eau. Cet effet indirect correspond au principal mécanisme d'action des rayonnements ionisants, la matière vivante pouvant être assimilée à l'eau (Figure 12).

La molécule d'eau est scindée en radicaux libres par le rayonnement incident. Ces radicaux libres très réactifs vont ensuite réagir entre eux, avec l' O_2 du milieu, et finalement avec les molécules cellulaires. Ce mode d'action via les radicaux libres est de découverte récente, la revue de Cohen-Jonathon *et al.* de 1999 traitant du mode d'action des radiations n'en faisant pas mention [45].

Les radicaux libres sont sensibles à la présence de composés chimiques, soit capables de les piéger comme les chélateurs ou les groupements protecteurs thiols, soit capables d'augmenter leur nombre comme l' O_2 , responsable d'une aggravation des réactions d'oxydation des macromolécules biologiques.

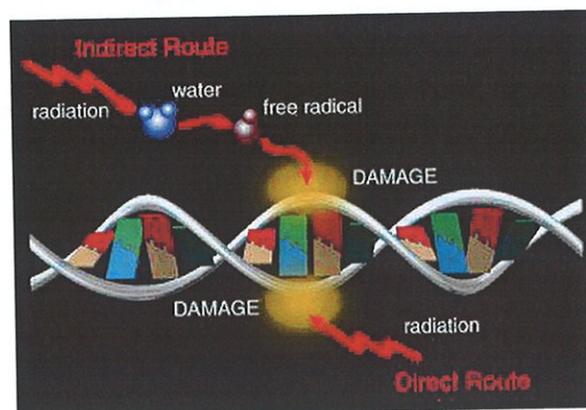


Figure 12 : Radiothérapie : mécanisme d'action.

Au niveau cellulaire les cibles moléculaires des altérations radio induites sont nombreuses : protéines, acides gras membranaires... Toutefois la cible critique est l'ADN, du fait de sa sensibilité et de son importance dans la vie cellulaire. Les lésions de l'ADN sont principalement des coupures simple-brin et double-brin de la double-hélice, ou des altérations des bases ou des sucres.

Ces lésions sont souvent sans conséquence car elles peuvent être réparées rapidement et sans erreur par divers systèmes de réparation cellulaire tels que les ligases, les excision-resynthèses, le système SOS, ... En effet la cellule, soumise à une attaque radicalaire constante mais modérée due à son environnement aérobie, est physiologiquement équipée pour gérer ce type de lésions.

En revanche, lors d'attaque radicalaire concentrée, comme en fin de trajectoire des particules ionisantes, les altérations plus nombreuses et portant sur les deux brins d'ADN sont souvent mal ou incomplètement réparées. Les conséquences peuvent être la mort cellulaire, mais aussi très rarement, la persistance de mutations responsables de cancers radioinduits ou de pathologies héréditaires.

En radiothérapie, la cytotoxicité des radiations ionisantes repose donc sur ces coupures double brin. De plus, les cellules cancéreuses sont moins efficaces pour réparer ces radiolésions et l'organisation d'un tissu cancéreux est moins apte à compenser les pertes cellulaires qu'un tissu sain.

L'impact des agents modificateurs de l'effet indirect est très important sur la sensibilité cellulaire aux rayonnements. Par exemple, la radio-résistance doublée des cellules hypoxiques par rapport aux cellules normoxiques illustre le rôle potentialisateur de l'O₂. L'hypoxie cellulaire est un phénomène qui, dans l'organisme humain, n'existe pratiquement que dans les tumeurs. Elle est considérée depuis longtemps comme un des principaux moyens des tissus tumoraux de résister à la radiothérapie [44, 46, 47].

L'efficacité biologique du rayonnement dépend enfin, de manière très importante, de sa distribution spatiale microscopique. En effet, nous avons vu que, si les lésions éloignées les unes des autres et peu importantes créaient des coupures simple-brin peu dangereuses, des ionisations concentrées étaient en revanche bien plus néfastes par le biais de cassure double-brin au potentiel létal. Cela implique que la densité d'ionisation (ou encore le transfert d'énergie linéique TEL) est importante : pour une même dose déposée, un rayonnement provoquant des ionisations dispersées (faible TEL) sera donc moins efficace qu'un rayonnement provoquant des ionisations très regroupées le long de trajectoires moins

nombreuses (fort TEL). L'emploi de rayonnements à haut TEL présente un autre avantage : les différences de radio-sensibilité s'estompent progressivement au fur et à mesure que le TEL du rayonnement augmente. Cet avantage est déterminant pour le traitement de tumeurs humaines dont 60 % renferment des foyers d'hypoxie.

IV.B. Radiorésistance et effet Oxygène

La différence de radiosensibilité entre cellules hypoxiques et normoxiques est définie comme le ratio des doses qui produisent le même niveau de mortalité cellulaire : 2,5 à 3 dans les cellules de mammifères.

En effet, O_2 réagit chimiquement avec les radicaux libres induits par les rayonnements ionisants, et entraîne la création de nouveaux radicaux libres au sein de l'ADN :

- O_2 : molécule ayant le plus d'affinité pour les électrons au sein de la cellule, réagit vite avec les électrons libres des radicaux libres. On a une « fixation » du dommage,
- Absence d' O_2 : la plupart des dommages des radicaux libres sont réparés par des réactions de réduction médiées par les groupements thiols, ou sulfhydrils, SH protecteurs.

Mais le degré de résistance reste fonction de la nature du rayonnement : l'effet oxygène est important pour les rayonnements de faible TEL, au sein de tissus présentant une pO_2 de 0 à 20 *mmHg* et pour des doses > 3 Gy, car ces rayonnements présentent un effet principalement indirect via la radiolyse de l'eau et la synthèse de radicaux libres.

En radiothérapie fractionnée, on peut avoir une adaptation cellulaire avec une résistance par augmentation de synthèse de radioprotecteurs via HIF1.

Deux approches permettent d'être plus actif au niveau tumoral, radiosensibiliser la tumeur ou augmenter son oxygénation :

- Hyperoxygéner :
 - Oxygénothérapie hyperbare : l'effet est prouvé mais ce traitement présente des effets secondaires importants...
 - Hyperthermie,
 - Gaz hyperoxique normobare souvent associé au nicotinamide vasoactif,
 - Augmentation du taux d'hémoglobine par l'administration de culots de sang ou d'érythropoïétine (EPO) ; un faible taux d'hémoglobine est corrélé positivement avec l'hypoxie,
 - RSR13 diminue l'affinité de l'hémoglobine pour O_2 ce qui augmente le relargage tissulaire et donc la pO_2 . Il peut également être considéré comme un

radiosensibilisant et son mécanisme d'action sera d'ailleurs décrit dans le chapitre les concernant.

◦ Radiosensibiliser :

Radiosensibiliser les cellules tumorales peut correspondre, littéralement, à les rendre plus sensibles à l'action des rayonnements ionisants. Mais cela peut également désigner le fait de les affaiblir, soit par cytotoxicité, soit par d'autres moyens sur lesquels nous reviendrons plus loin.

- Radiosensibilisateurs (affinité électronique de la molécule, augmentation de la radiolyse de l'eau) : nitroimidazolés tels que métronidazole, misonidazole (neurotoxique), doranidazole (PR350), étanidazole, nimorazole, motexafin gadolinium, texaphyrine...

- Cytotoxiques : imidazolés, quinolones, mitomycine C, tyrapazamine (TPZ) et banoxantrone (AQ4N) spécifique de la cellule hypoxique, pentoxifylline (diminue la viscosité sanguine) [28].

IV.C. Radiosensibilisants [48, 49]

L'hypoxie tumorale est responsable d'une résistance aux traitements, notamment à la radiothérapie. L'intérêt de ces produits réside dans la meilleure spécificité d'action que l'on pourra obtenir lors des traitements, donc dans l'augmentation de l'index thérapeutique. Cela revient à accroître les doses au niveau des tissus cible, tout en préservant le tissu sain environnant.

Nous allons voir qu'il existe nombre de substances capables de sensibiliser les cellules tumorales à l'action des radiations ionisantes, à l'image de certains traitements conventionnels de chimiothérapie.

Les radiosensibilisants ciblent différentes caractéristiques physiologiques de la tumeur telles que l'hypoxie, mais aussi les voies de signalisation intracellulaire, les mécanismes de réparation de l'ADN ou encore les groupements protecteurs.

IV.C.1. Radiosensibilisants oxygène-like

Il y a seulement 10 ans, la notion même de radicaux libres était absente des revues traitant les mécanismes d'action des radiations ionisantes pour tuer les cellules [45]. Aujourd'hui, les progrès de la biologie cellulaire ont permis de montrer l'existence et l'importance des radicaux libres. Ils apparaissent comme des intermédiaires obligatoires aux mécanismes complexes aboutissant à la mort cellulaire radio induite. L'O₂, radiosensibilisant incontournable, peut être considéré comme un radical libre inhabituel du fait de ses deux

électrons non appariés. Ceux-ci lui confèrent la propriété de réagir très rapidement avec d'autres radicaux libres pour en produire de nouveaux, extrêmement réactifs. L'O₂ a ainsi été un des premiers radiosensibilisants utilisés dans les études, puis des composés visant à augmenter sa mise à disposition cellulaire ou à mimer sa fonction de radiosensibilisant ont été développés.

▪ *L'oxygène*

Un des premiers traitements, et l'un des plus directs aussi, consistait en une **oxygénothérapie hyperbare** [50]. La réponse cellulaire à l'irradiation dépend fortement du taux d'O₂ disponible au sein de la tumeur. Plusieurs procédés d'augmentation du taux d'O₂ au niveau tumoral, aussi bien physiques que chimiques, ont été étudiés. L'oxygénothérapie hyperbare, employée dès les années 1950 [51], utilise l'O₂ comme un radiosensibilisateur dissous dans le plasma pour le délivrer aux tissus de manière passive et indépendante du taux d'hémoglobine. L'effet de l'oxygénothérapie hyperbare varie selon le schéma de fractionnement de la radiothérapie avec des récurrences locales moins fréquentes. En revanche, les effets indésirables sévères infligés sont significativement augmentés avec l'oxygénothérapie hyperbare [52].

Les chercheurs ont alors essayé d'augmenter la concentration en O₂ de l'air respiré dans des conditions normobariques, soit avec de l'O₂ à 100%, soit avec du carbogène (95% O₂ plus 5% dioxyde de carbone). Le carbogène est un gaz hyperoxique dont l'inhalation permet d'augmenter l'oxygénation tissulaire [53].

Une approche centrée sur l'hémoglobine a ensuite été investiguée.

Si l'anémie est en effet un facteur favorisant l'hypoxie, il n'est cependant pas possible de déterminer une hémoglobinémie idéale pour la radiothérapie. De plus, les transfusions de culots globulaires soulèvent de nombreux problèmes et sont réservées aux anémies ou aplasies sévères. Il est possible de pallier une anémie sans recours aux transfusions notamment par l'administration d'EPO. La contrepartie de taille, et délétère, est l'augmentation EPO induite de l'angiogénèse favorisant le développement tumoral et son potentiel métastatique.

Le **clofibrate**, un hypolipémiant connu pour diminuer l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂, pourrait à ce titre jouer le rôle de radiosensibilisant. Mais aucune recherche n'a encore été menée sur ce produit.

L'**acidose** et l'élévation de la température sont également capables de modifier l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ et donc d'augmenter son relargage au sein des tissus [54]. Le rôle de l'**hyperthermie** associée à la radiothérapie est cependant plus complexe. Elle induirait une augmentation de la perfusion, permettant une meilleure oxygénation tumorale, et présenterait une cytotoxicité directe et indirecte par action sur son environnement, notamment le pH. L'hyperthermie, évaluée en association avec la radiothérapie, a permis un gain de taux de contrôle local pour différentes tumeurs telles que des récidives mammaires, des mélanomes et des adénocarcinomes rénaux [55].

Il existe de nombreux produits capables de modifier la courbe de dissociation de l'hémoglobine et le **RSR13**, ou éfaproxiral, compte parmi les premiers développés. RSR13 est une petite molécule capable de se lier de façon non covalente au tétramère de l'hémoglobine. Il en résulte une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂, une augmentation de la P50 (pression pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50% en O₂) et donc, une augmentation de la pression partielle tissulaire en O₂. RSR13 pourrait augmenter les effets de la radiothérapie par ce biais. Chez la souris, l'administration de RSR13 a permis de diminuer la proportion de cellules hypoxiques viables de 24 à 9 % et de réduire la fraction tumorale survivante pour chaque dose de radiothérapie explorée. Cet effet est strictement O₂ dépendant, c'est-à-dire qu'à aucun moment RSR13 ne rentre dans la cellule visée. Ceci présente un intérêt considérable pour les tumeurs cérébrales moins accessibles aux thérapeutiques du fait de la BHE. En effet, cette barrière capable d'arrêter nombre de molécules laisse en revanche l'O₂ diffuser librement [56]. RSR13 semblerait présenter un bon profil de tolérance mais aucune étude n'a déterminé de dose maximum tolérée, mais la Food and Drugs Administration s'est prononcée contre l'adjonction de RSR13 dans le traitement des tumeurs solides ou cérébrales, jugeant les résultats trop préliminaires.

Le système vasculaire en général constitue également une approche intéressante pour moduler le taux d'O₂ au niveau de la tumeur.

La **pentoxifylline**, un dérivé méthylxanthine fluidifiant sanguin [57], a démontré une action positive sur l'oxygénation tumorale, avec une amélioration de la réponse aux radiations lorsqu'elle était administrée avant la séance de radiothérapie. Elle augmenterait la déformabilité des érythrocytes, réduirait la viscosité sanguine par diminution de l'agrégation plaquettaire, et présenterait enfin une action vasodilatatrice. Cependant aucune étude n'a encore pu objectiver d'amélioration de la réponse tumorale.

Le **nicotinamide**, inhibiteur de la réparation de l'ADN par interaction avec la poly ADP ribose polymérase (PARP), s'est montré intéressant comme agent vasodilatateur. En effet, chez l'animal, associé au carbogène ou à une radiothérapie fractionnée, il fut capable d'éliminer les hypoxies aiguës dues aux collapsus vasculaires. Beaucoup d'études ont été réalisées pour évaluer le protocole ARCON : accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide [58]. Les résultats hétérogènes en termes d'efficacité comme de tolérance ont finalement conduit à un essai de phase III dont les résultats sont attendus.

▪ *Radiosensibilisants électrophiles*

Dans les années 60, des études sur les propriétés de certains radiosensibilisants ont permis d'identifier une classe importante de sensibilisants électrophiles, les **nitroimidazolés**, dont les premiers représentants furent les nitrobenzènes.

Les nitroimidazolés sont parfois appelés radiosensibilisants oxygène-like en raison de certaines similitudes de leur comportement vis-à-vis des bases de l'ADN, stabilisant les dommages induits par les radiations ionisantes. Une étude de 1975 [59] a montré que pour créer des cassures au niveau des brins d'ADN, la présence de ces radiosensibilisants était nécessaire pendant la radiothérapie, et que leur administration, même quelques instants après, était totalement inefficace. Cela confirme encore que l'action des radicaux libres explique en grande partie le mécanisme de cytotoxicité radio-induite.

Le plus connu des nitroimidazolés est le **misonidazole** ou 2-nitroimidazole, capable de sensibiliser sélectivement les cellules hypoxiques sans atteindre les cellules normalement oxygénées. Les cellules hypoxiques présentent en effet un potentiel d'oxydoréduction suffisamment bas pour réduire le groupement nitro de la molécule. Lors de la réduction, les intermédiaires réactionnels formés vont être stabilisés par le déficit en O₂, ce qui leur permet de se fixer aux macromolécules cellulaires, par interactions électrostatiques ou en s'intercalant. De plus, cette réduction s'opère préférentiellement à celle des coenzymes cellulaires réduisant ainsi leur métabolisme. Enfin les intermédiaires réactionnels, tels que les radicaux libres, viennent également renforcer l'action de ceux provenant de la radiothérapie [48].

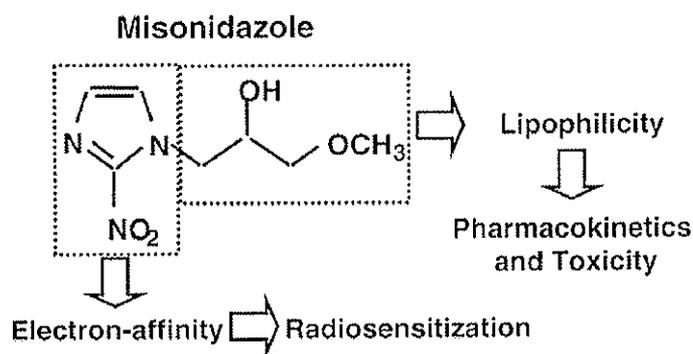


Figure 13 : Propriétés du misonidazole.

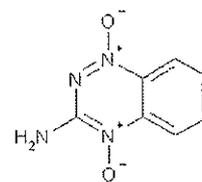
Le misonidazole a démontré son efficacité sur les tumeurs solides chez la souris sans induire de dommages collatéraux sur les tissus normaux. Chez l'homme, sa toxicité neurologique à type de neuropathies périphérique et centrale s'est montrée dose limitante (Figure 13). Au final, le misonidazole, à dose cliniquement tolérable, perd ses propriétés de sensibilisateur. L'hydrosolubilité a alors été augmentée afin de diminuer les neuropathies périphériques, avec notamment le pimonidazole qui s'est révélé plus efficace que le misonidazole *in vitro*, mais sans toxicité. Malheureusement, cette efficacité ne fut pas retrouvée *in vivo*. Cependant, montrant une bonne fixation tumorale, ce produit fut développé pour la détection de l'hypoxie tumorale par immunohistochimie et autoradiographie, comme nous en reparlerons.

Lorsqu'il fut établi que la radiosensibilisation était non seulement sous la dépendance de réactions d'oxydoréduction, mais aussi de nombreux autres facteurs, un nouveau screening des candidats potentiels a été réalisé. En effet, de nombreux produits jugés pas assez « actifs » en comparaison au misonidazole n'avaient pas été étudiés. Des essais cliniques ont alors révélé le **nimorazole**, ou 5-nitroimidazole [50], qui fut administré en routine au Danemark dans le traitement des cancers tête et cou.

▪ *N-oxydes aromatiques*

Des composés au coefficient de partage plus favorables et comportant une toxicité hypoxie spécifique intrinsèque ont été développés. Ils représentent ainsi une alternative aux nitroaromatiques avec une meilleure cytotoxicité.

La **tirapazamine** (Figure 14), une benzotriazine, présente en effet naturellement une cytotoxicité hypoxie spécifique. Son mécanisme d'action repose sur son importante toxicité à l'état réduit, sous conditions hypoxiques, envers l'ADN sur qui elle peut provoquer des cassures simple et double-brin. En présence d'O₂, la forme réduite active est vite réoxydée, perdant ainsi son



efficacité. Cette molécule présenterait en outre une forte action inhibitrice de la topoisomérase II, enzyme responsable des réparations de l'ADN.

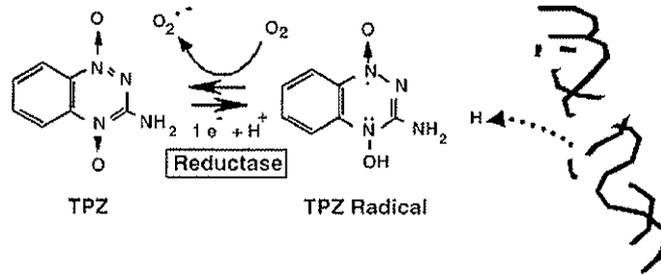


Figure 14 : Mécanisme de fixation de la tirapazamine.

Les résultats d'expérimentations chez la souris sont concluants avec une augmentation de la mort radio-induite des cellules tumorales. En préclinique, la TPZ a fait l'objet d'investigation seule ou en association avec des agents de chimiothérapie tels que le cisplatine. Son action peut en effet être potentialisée et, dans le cas présent, on observe une augmentation du nombre de cellules tuées de 0,5 log pour la TPZ seule à 2 log lors de l'association au cisplatine. Ce chiffre monte à 3 log avec l'association de 2 thérapeutiques, et même jusqu'à 7 log lorsque la TPZ est administrée 2 à 3 heures avant la chimiothérapie. Des essais de phase I et II ont donc été conduits chez des sujets atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules, avec des posologies de TPZ et de cisplatine de 300 mg/m² et 75 mg/m² respectivement. Cette posologie s'est révélée efficace, avec peu d'effets indésirables (crampe de grade 3 : 4,5% ; vomissements : 25%), mais les études suivantes ont fourni des résultats contradictoires.

Les résultats de l'association chimiothérapie, TPZ et radiothérapie fractionnée suggèrent que le ciblage des cellules hypoxiques avec TPZ peut revêtir une importance clinique dans la maladie localisée, au niveau des tumeurs présentant des sous-volumes hypoxiques importants.

▪ L'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) est considéré comme un oxygénomimétique car il présente les mêmes propriétés de radical libre dans son état « normal », et de composé très réactif vis-à-vis des autres radicaux libres. Cependant, malgré sa vitesse de réaction avec les électrons issus de la radiolyse de l'eau, il ne présente qu'une faible électrophilie. Le NO n'est pas capable d'altérer les sucres composant les bases de l'ADN comme peuvent le faire l'O₂ ou les nitroimidazolés, mais permet, à l'image de ces derniers, d'augmenter les lésions de l'ADN au sein des cellules irradiées par un mécanisme non complètement élucidé. Le temps de réparation cellulaire se trouverait augmenté en présence de NO. Connue depuis plus de 50 ans pour ses propriétés de radiosensibilisant des cellules hypoxiques, il s'est montré

significativement plus efficace que l'O₂ lui-même. De plus, sa captation rapide par les globules rouges maintient une faible concentration *in vivo*. Des travaux ont été menés dans le but de radiosensibiliser des cellules au moyen du NO endogène, par l'augmentation de sa synthèse ou de sa libération via des procédés physiques, chimiques, ou encore via la thérapie génique. Mais le développement de cette radiosensibilisation basée sur le NO s'est heurté à « l'effet de vol », c'est-à-dire la diminution de pression sanguine, qui a pour conséquence de rendre la tumeur plus hypoxique encore, ce qui va à l'encontre du principe de radiosensibilisation.

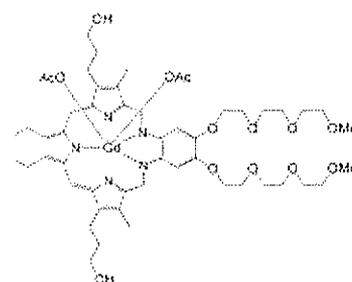
De plus, une étude de phase I a montré que l'inhibition de la NO synthétase était responsable d'une diminution du lit vasculaire tumoral. Or l'angiogénèse constitue une cible privilégiée des nouveaux traitements anticancéreux.

Le NO présente donc des mécanismes aussi nombreux que complexes et nombre d'études sont encore nécessaires avant d'envisager une application clinique.

IV.C.2. Augmentation du stress oxydatif et des dommages de l'ADN

Le mécanisme d'action des radiations ionisantes repose sur la création *in situ* de radicaux libres. Des composés dotés d'un grand pouvoir électrophile, capables de capter les électrons des antioxydants protecteurs, et pouvant facilement intégrer un cycle d'oxydoréduction, ont été développés. En capturant les électrons des antioxydants, ces produits vont affaiblir les défenses cellulaires ainsi que ses réserves énergétiques. Ce processus est appelé « futile redox cycling ».

Un des composés les plus étudiés est le **motexafin gadolinium**, macrocycle aromatique très électrophile. Facilement réduit, ce produit, en présence d'O₂, accepte les électrons provenant de divers métabolites cellulaires tels que les superoxydes ou autres ROS. A priori plus efficace en condition normoxique, il reste néanmoins actif sur la cellule hypoxique. Il améliore la réponse tumorale aux radiations et aux chimiothérapies chez l'animal et fait actuellement l'objet d'essais de phase III chez l'homme. Il agirait comme un médiateur redox au sein de la cellule tumorale, en ciblant spécifiquement la thiorédoxine réductase. L'inhibition de cette dernière crée un stress oxydatif, une cytotoxicité et augmente la réponse tumorale aux traitements. Enfin, motexafin gadolinium est directement cytotoxique. Cependant, les études *in vitro* et *in vivo* n'ont pu fournir de résultats homogènes et reproductibles. Des auteurs ont alors étudiés les différents travaux menés pour montrer au



final que l'activité de motexafin gadolinium était très liée à l'environnement cellulaire (acide ascorbique), et l'état d'oxydoréduction de la cellule (altération de la fixation, des processus cellulaires...). La tolérance paraît bonne, malgré une toxicité rénale réversible et dose limitante.

IV.C.3. Suppression des substances radioprotectrices

Chercher à induire une déplétion en thiol au sein de la cellule à détruire est une approche permettant d'accroître l'efficacité des rayonnements sans pour autant augmenter les doses délivrées aux tissus.

Le **L-5-buthionine sulphoximine** (BSO) [60], est un inhibiteur de la biosynthèse des groupements thiols. Il a été testé dans de nombreux essais cliniques, généralement dans un contexte de protocole de chimiothérapie (melphalan) envers lequel le glutathion est susceptible de se montrer protecteur. Relativement efficace *in vitro*, il se montre beaucoup moins actif *in vivo*. Les auteurs se l'expliquent par une faible pénétration cellulaire, mettant en cause sa structure polaire délétère pour le franchissement des membranes. Il ne semble pas y avoir d'étude sur l'avantage potentiel que peut conférer ce produit à un protocole de radiothérapie bien que cela présente un grand intérêt, avec notamment la possibilité de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, l'hypothèse que le glutathion ne serait pas le seul composé cellulaire à assumer une fonction protectrice vis-à-vis d'agents cytotoxiques est en train de se développer. En effet, d'autres antioxydants endogènes existent, comme l'acide ascorbique.

IV.C.4. Radiosensibilisation par les pyrimidines halogénées

Les agents de chimiothérapie capables de perturber le métabolisme des nucléotides ont le potentiel de sensibiliser les cellules tumorales à la radiothérapie. L'efficacité clinique des **fluoropyrimidines** a été prouvée dans de nombreux essais cliniques.

Lors de la synthèse de l'ADN, la cellule n'est pas capable de faire de différences entre le méthyle d'une thymidine ou l'halogène qui peut se substituer à lui. Les atomes de brome ou d'iode ont en effet une taille proche du groupement méthyle. Lors de l'irradiation, l'halogène agit comme un absorbeur d'électrons. La liaison carbone-halogène va alors se rompre pour former un radical carboné libre. Celui-ci pourra ensuite réagir avec l'O₂ pour donner un peroxyde susceptible de briser les brins d'ADN.

Plus récemment, ce sont les composés fluorés qui ont été étudiés, avec le **5-fluorouracil** ou un de ses prodrogues, la capecitabine. Ce dernier exploite la différence d'activité de la thymidine phosphorylase dans la tumeur et dans le tissu sain, améliorant ainsi

l'index thérapeutique. Des études sur le cancer colorectal ont suggéré que la capecitabine pouvait remplacer les bolus ou les perfusions de 5-fluorouracil dans cette indication.

Enfin, l'**hydroxyurée**, cytotoxique lui-même car inhibiteur de la ribonucléotide réductase, pourrait moduler la radiosensibilisation induite par les fluoropyrimidines ou l'iodo-desoxyuridine.

IV.C.5. Altération des mécanismes de réparation de l'ADN

Des drogues bioréductibles ont été développées dans le but de détruire les cellules hypoxiques. Elles comportent en général des fonctions nitro ou quinone qui peuvent, une fois réduites, créer des liaisons covalentes avec l'ADN cellulaire.

La **banoxantrone**, ou AQ4N, est une prodrogue (Figure 15). Sans affinité pour l'ADN dans cet état, il présente une fois réduit en AQ4, une haute affinité pour l'ADN et s'y lie très fortement. De plus, la distribution de chacune des formes diffère : AQ4N n'est retrouvé qu'au niveau cytoplasmique, alors qu'AQ4 se répartit dans le cytoplasme, au sein de la membrane nucléaire, et dans le noyau lui-même. Cette localisation lui permis de cibler les topoisomérases II, enzymes clé de la réplication cellulaire. Tout ceci laisse donc présager une action cytotoxique relativement ciblée sur la cellule tumorale en division, sans affecter le tissu sain peu sujet à l'hypoxie et se répliquant beaucoup moins. Néanmoins la réduction d'AQ4N n'est pas que fonction de l'hypoxie. Le cytochrome P450 est indispensable à la réaction, comme l'a montré le développement préclinique du produit. Il a également été montré que la présence de NADPH pouvait accroître la cytotoxicité d'un facteur 100. Au final, AQ4N, pour être actif et donc réduit, nécessite un environnement hypoxique, la présence de cytochrome P450, mais aussi de NADPH. Malgré tout, AQ4N utilisé seul ne présente qu'une faible cytotoxicité. Celle-ci devient intéressante lorsqu'on associe la radiothérapie. AQ4N stabiliserait les lésions induites par les rayonnements, par augmentation importante du temps de croissance tumorale. Selon d'autres études, on pourrait obtenir une radiosensibilisation maximum par l'administration d'AQ4N dans une fenêtre de 16 heures avant ou après la radiothérapie.

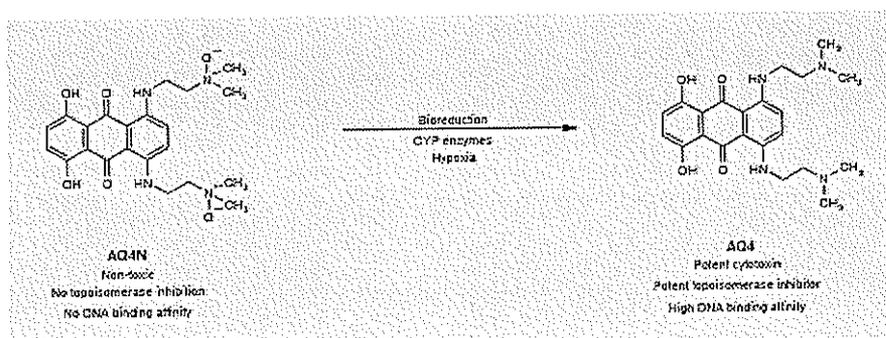


Figure 15 : Réduction d'AQ4N.

La PARP est une enzyme nucléaire favorisant la réparation des bases de l'ADN par excision, son inhibition présente donc un intérêt. Les premiers travaux sur le **nicotinamide** ont présenté de faibles résultats en termes d'inhibition de la PARP, suggérant que ce produit se montrerait plus actif en tant que vasodilatateur. Des travaux plus récents ont mis en évidence un inhibiteur plus efficace pour améliorer l'action de la radiothérapie *in vivo*. Chez la souris, le traitement par **AG14361** avant irradiation a augmenté significativement la sensibilité à la radiothérapie, portant le délai de croissance tumorale, de 19 jours avec la radiothérapie seule, à 37 jours.

IV.C.6. Ciblage des protéines de signalisation et des facteurs de croissance

C'est la nouvelle famille de radiosensibilisants étudiée.

Les protéines les plus étudiées dans ce contexte de radiothérapie sont les protéines de la famille Ras. Celles-ci sont déjà très connues car elles contrôlent les signaux cellulaires clés de la croissance et de la transformation cellulaire. La protéine Ras est active une fois l'addition d'un radical farnesyle effectuée par une farnesyl-transférase. Les inhibiteurs de cette enzyme, tel le **L-778,123** peuvent donc être investigués en tant que radiosensibilisants. Les études précliniques sont venues appuyer cette hypothèse, montrant la perte de radorésistance des tumeurs qui présentaient l'oncogène mutant Ras. Les essais cliniques qui ont suivi, phase I et II, ont confirmé cette hypothèse, montrant notamment qu'il n'y avait pas d'augmentation des lésions radio-induites sur le tissu sain. Ceci représente donc une approche pour améliorer l'index thérapeutique.

Une intense activité de recherche concerne l'EGFR. Une étude préclinique a testé l'association de la radiothérapie avec le **vandetanib**, un inhibiteur sélectif de tyrosine kinase de l'EGFR. Un ralentissement de la croissance cellulaire a pu être objectivé lorsque le vandetanib était administré de façon séquentielle, après la radiothérapie. En revanche, la réponse après un traitement concomitant n'a révélé aucune interaction significative entre les deux modalités. Un essai de phase II testant l'association cetuximab, anticorps anti-EGFR, et radiothérapie chez des patients atteints de cancers tête et cou évolués a montré des résultats spectaculaires. Cependant, nombre d'auteurs restent prudents et modérés, expliquant que l'impact de ces thérapies (cetuximab, gefitinib...) sur la population de cancers dans sa globalité, restait modeste.

La Cox2, liée à une résistance aux cytotoxiques, compte également parmi les cibles des radiosensibilisants. En effet, son inhibition améliore la réponse tumorale. Dans le cancer pulmonaire, le **célécoxib** a montré une action inhibitrice d'importants mécanismes de réparation cellulaire, action qui serait soutenue par NFκB. Il existe d'autres pistes à l'étude actuellement ou dans un proche avenir, telles que les anti-angiogéniques, un sulfoglycolipide...

Enfin, l'inhibition de HIF1 et de sa transcription constitue un objectif important pour la thérapeutique. Le principe consiste à cibler les facteurs de transcription qui régulent les événements liés à l'hypoxie, et donc plus particulièrement HIF1. Plusieurs approches génétiques et pharmacologiques ont été étudiées pour inhiber la transcription des gènes de HIF1 : inhibition de sa fixation aux protéines régulant son activité, inhibition du signal de transduction, ou encore stratégie antisens. Le principe de cette dernière est de produire une séquence d'ARN complémentaire, ou **ARN antisens**, qui reconnaît l'ARN de la cellule tumorale, ou ARN sens, se lie à ce dernier et l'inactive. Les principaux agents ciblant HIF1 sont les activateurs du cycle guanylyl, les inhibiteurs de HSP90, PI3K et mTOR, les agents déstabilisant les microtubules et les inhibiteurs de la topoisomérase I.

L'efficacité de la radiothérapie est limitée par sa toxicité sur le tissu sain et par la radiorésistance de certaines tumeurs. Le misonidasole est l'un des premiers agents découverts capables d'augmenter l'index thérapeutique des radiations ionisantes mais son profil de tolérance ne permet pas son utilisation à dose efficace dans cette indication. Les chercheurs ont alors développé des agents moins toxiques aux mécanismes d'action variés. Ces produits ne représentent qu'une petite partie de toutes les molécules en développement. La recherche s'oriente désormais vers d'autres thérapies telles que les anti-angiogéniques, la thérapie génique ou les liposomes radio-activés. L'idée de cette dernière approche est d'induire une cytotoxicité localisée au volume irradié par l'intermédiaire d'une réaction chimique radio-induite.

EVALUATION de L'HYPOXIE TUMORALE

Il est établi que l'hypoxie revêt une importance particulière dans la physiologie de la tumeur et la réponse aux traitements.

Pourtant, il n'y a actuellement pas de méthode simple et efficace d'évaluation de l'hypoxie utilisable en clinique. La méthode longtemps considérée comme la référence repose sur l'emploi d'électrodes polarographiques à O_2 capables de mesurer la pression partielle d' O_2 qui règne au sein d'un tissu [61].

Nous allons décrire les différentes techniques employées pour étudier l'hypoxie tumorale, en expliquant leur principe et en présentant leurs avantages et inconvénients, puis nous nous attarderons sur les techniques d'imagerie nucléaire et les différents radio-traceurs de l'hypoxie actuellement étudiés.

I. Techniques de détection

I.A. Electrodes polarographiques à O_2

Les électrodes polarographiques (Figure 16) mises au point par Clark en 1953 [62], ont été très utilisées pour étudier la corrélation hypoxie/pronostique.

Les molécules d' O_2 sont réduites au niveau de la cathode, les électrons étant fournis à l'anode par la formation de chlorure d'argent. Le courant électrique produit entre cathode et anode, proportionnel à la quantité d' O_2 consommée à la cathode, est transcrit en pO_2 exprimée en *mmHg* [63].

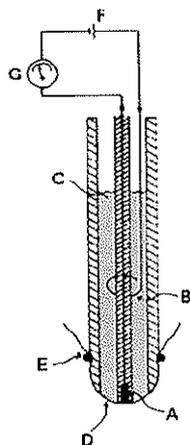


Figure 16: Electrode de Clark : cathode en platine (A), anode en argent (B), solution de KCl (C), film de téflon (D), anneau de maintien (E), circuit électrique (F), électronique de mesure (G).

Urbach [64] fut le premier à employer cette méthode pour explorer l'oxygénation d'une tumeur cutanée maligne. Ce n'est qu'en 1993 que Stone qualifia cette méthode de « gold standard » [61], au terme d'une étude comparant cette technique à la spectrométrie par

résonance magnétique, à la Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP) et à la Tomographie par Emission de Positron (TEP).

Cette technique comporte les inconvénients suivants :

- Il n'est pas possible de déterminer le type d'hypoxie (aiguë ou chronique)
- La viabilité des cellules ne peut être appréciée
- C'est une technique invasive limitée aux tumeurs accessibles de plus de 3 cm [65].
- Des perturbations du flux sanguin et de l'architecture tissulaire peuvent survenir
- Aucune information spatiale ne peut être obtenue [66].

La mesure de l'oxygénation tumorale ne peut donc être réalisée en routine par cette méthode.

I.B. Réflectivité différentielle ou tomographie optique diffuse (TOD)

Le TOD [67] est un appareil non invasif et non irradiant qui permet d'évaluer la proportion relative de l'hémoglobine oxygénée et de l'hémoglobine réduite dans les tissus. Le principe utilisé consiste à mesurer l'évolution de l'absorption de la lumière rouge ou infrarouge par l'hémoglobine. Deux diodes électroluminescentes, de longueurs d'onde respectives 0,66 et 0,94 μm sont couplées à deux fibres optiques dont les extrémités distales sont appliquées au niveau de la tumeur. Ces longueurs d'onde sont absorbées différemment par les formes oxygénées ou non de l'hémoglobine. La lumière rétrodiffusée vers la surface de la peau est captée par une troisième fibre optique et mesurée par une photodiode amplifiée.

Cette technique, qui permet de suivre des modifications de l'hypoxie au sein de la tumeur durant l'inhalation de carbogène par exemple, paraît plus adaptée au suivi de traitements de ce type qu'à la mesure ou la localisation de l'hypoxie. Elle ne permet pas non plus de déterminer le type d'hypoxie ou de discriminer les cellules en fonction de leur viabilité. Réalisée chez le volontaire sain et le sujet atteint de cancer du sein, la tomographie optique diffuse a fourni des résultats probants. Elle montre une distribution homogène chez le sujet sain, alors que les images des sujets malades présentent une distribution variable, avec une hétérogénéité au sein même du tissu néoplasique [68].

La méthode de mesure par capteur à fibre optique est basée sur le même principe que le TOD, exploitant également les différentes propriétés optiques de l'oxyhémoglobine et de la désoxyhémoglobine. Seddon *et al.* [69] comparent cette méthode à la référence, la mesure par électrode, pour conclure à l'équivalence de ces deux procédés. A l'inverse, Collingridge [70] rapporte la supériorité de l'électrode polarographique qui se montre significativement plus sensible dans son étude.

D'autres méthodes plus marginales telles que la mesure par cryospectrophotométrie ou par bioluminescence ont été développées.

I.C. Analyses sanguines

Le *et al.* [66] mesure le niveau sanguin de protéine hypoxie induite, comme le VEGF ou l'ostéopontine (OPN). Bien que le niveau de VEGF sanguin soit élevé chez les patients cancéreux, la relation entre l'hypoxie tumorale et un haut niveau de VEGF reste floue. OPN apparaît significativement corrélée à la pO_2 tumorale et serait même un facteur pronostique de survie. The Danish Head and Neck Cancer Study Group confirme ces résultats dans une étude évaluant la radiothérapie avec ou sans radiosensibilisant.

I.D. Immunohistochimie

L'examen immunohistochimique consiste à révéler sur coupe histologique, par réaction antigène-anticorps, la présence d'antigènes cellulaires intranucléaires, membranaires ou cytoplasmiques (Figure 17).

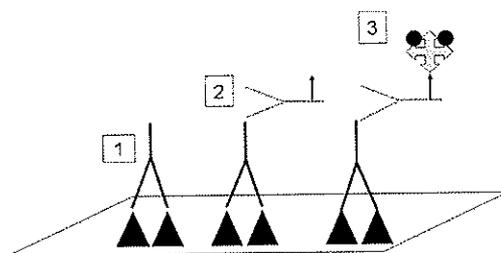


Figure 17 : Principe de l'immunohistochimie

Après la biopsie tumorale, des coupes ultrafines sont réalisées. L'anticorps primaire (1) est déposé directement sur le tissu et reconnaît, s'il existe, l'antigène recherché. Un deuxième anticorps (2) susceptible de se fixer à l'anticorps primaire et complexé à un système avidine-biotine-peroxydase (3) permettant la révélation est appliqué.

Néanmoins, les résultats connaissent des variations importantes d'un tissu à l'autre, d'un cas à l'autre. Ils dépendent de plusieurs étapes d'amont à commencer par la fixation, en particulier sa durée et le type de fixateur.

Le diagnostic, la recherche de cancer primitif, la recherche de facteurs pronostiques et la recherche de facteurs prédictifs de la réponse aux traitements sont les quatre indications essentielles en cancérologie.

Peu d'anticorps sont cependant spécifiques de l'hypoxie et les résultats sont à interpréter au vu d'une combinaison d'entre-eux en recherchant une cohérence dans leurs résultats en fonction des hypothèses diagnostiques. EF5, pimonidazole, CA9 ou encore HIF1 sont les marqueurs les plus utilisés pour l'évaluation de l'oxygénation tissulaire.

Le rôle prédictif de l'IHC est plus récent mais montre une augmentation parallèle à la recherche de thérapeutiques antitumorales ciblées spécifiques.

Cette approche est limitée par la nécessité de biopsier et la disponibilité des marqueurs.

I.E. Autoradiographie

Une autoradiographie est une image produite directement sur un film photographique par le rayonnement d'une substance radioactive. Cette technique permet de mettre en évidence une activité cellulaire au sein du cytoplasme ou du noyau de la cellule en utilisant une molécule intervenant spécifiquement dans cette activité. La molécule marquée par un élément radioactif sera injectée à l'animal puis intégrera le métabolisme dont elle est spécifique. A l'issue de cette phase, l'animal sera sacrifié, le tissu biopsié, fixé, et les coupes réalisées permettront la réalisation d'images par révélation sur un support photographique : des tâches apparaissent en regard des sites radioactifs du champ. Pour l'étude de l'hypoxie, les radiotraceurs utilisés sont proches de ceux que nous traiterons par la suite.

I.F. Imagerie *in vivo*

Les techniques que nous venons de traiter, soit ne permettent pas de cartographier l'hypoxie dans la tumeur (électrode polarographique, réflectivité différentielle, prise de sang), soit nécessitent des actes invasifs tels que la biopsie (IHC), voire même le sacrifice de l'animal (autoradiographie). A l'inverse, les techniques d'imagerie, non invasives, pourraient permettre de détecter et cartographier l'hypoxie des différentes tumeurs d'un patient. Ces examens pourraient être effectués de façon répétée : à la phase initiale pour prédire la réponse au traitement et avoir une valeur pronostique ; à différents temps pour le suivi thérapeutique ou l'évaluation de nouvelles thérapies [71]. La prise en compte de l'hétérogénéité de l'hypoxie tumorale dans la délimitation de volumes-cible de radiothérapie permettrait la réalisation de technique telle que l'Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT) qui peut apporter un bénéfice clinique pour les patients en termes de contrôle locorégional de la tumeur et de survie [72].

Deux types d'imagerie peuvent permettre cette approche : l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et l'imagerie radio-isotopique. L'IRM présente l'avantage de ne pas être

irradiante puisqu'elle ne requiert pas l'administration de radio-traceurs. Toutefois, l'application de cette technique au ciblage d'un métabolisme particulier est actuellement moins développée qu'en imagerie radio-isotopique.

I.F.1. IRM

L'IRM consiste à observer les tissus biologiques à travers les propriétés magnétiques du noyau d'hydrogène, un de leurs constituants majoritaires. En effet, le proton, du fait de sa charge et de son mouvement de rotation sur lui-même, se comporte comme un aimant.

Au cours d'une IRM, les tissus sont soumis à un champ magnétique. Il en résulte une aimantation proportionnelle à la quantité de noyaux d'hydrogène présents. La relaxation de cette aimantation est mesurée en IRM. Comme les tissus se distinguent par leur contenu en eau, la carte des relaxations reproduit l'anatomie des tissus.

L'IRM fonctionnelle Blood Oxygen Level Dependent (BOLD) est fondée sur l'observation en temps réel des variations de l'oxygénation du sang et des débits sanguins. L'O₂ entraîne la réduction du fer qui se retrouve à l'état d'ion ferreux Fe²⁺, laissant deux électrons non appariés au sein de la molécule de déoxy-hémoglobine. Ces électrons génèrent une modification du champ magnétique local. L'augmentation de la concentration locale en déoxy-hémoglobine entraîne ainsi une atténuation du signal IRM dans les zones contenant du sang désoxygéné, alors que l'oxy-hémoglobine n'a aucune influence.

Cette technique ne nécessite pas l'injection de traceur radioactif, puisque le traceur est endogène, et permet donc des examens répétés et de manière non invasive.

L'IRM BOLD fut comparée à la mesure par électrode dans une étude sur l'hypoxie du cancer de la prostate. Les bons résultats que cette technique a montrés en termes de quantification font d'elle un outil prometteur pour l'imagerie non invasive de l'hypoxie tumorale [73-76].

I.F.2. Imagerie nucléaire

Cette technique, à la différence de l'IRM, est irradiante car elle repose sur l'utilisation d'une molécule radiomarquée spécifique d'un phénomène à explorer. Différentes molécules permettent l'exploration de l'hypoxie, comme nous le détaillerons par la suite.

Après administration du traceur, le plus souvent par voie intra-veineuse, un délai est respecté afin de permettre la bonne distribution du traceur dans l'organisme avant l'acquisition des images. Cette acquisition, qui permet d'obtenir une image du fonctionnement d'un organe, peut-être réalisée selon plusieurs modalités, de façon statique ou dynamique. Nous ne discuterons ici que des acquisitions statiques. En fonction du type

d'émission radioactive, gamma ou positon, du radio-isotope, des caméras différentes seront utilisées : TEMP ou TEP.

▪ *TEMP*

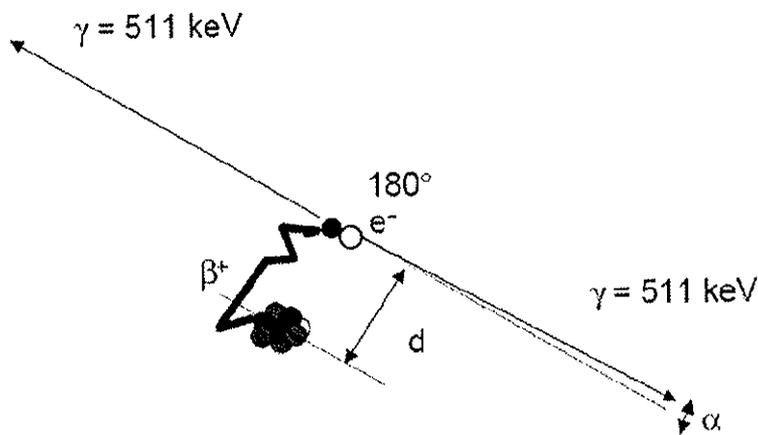
Les gamma-caméras sont constituées de cristaux d'iodure de sodium NaI. Le principe de détection des caméras TEMP est la scintillation : les atomes du cristal reçoivent les rayonnements incidents et cette interaction aboutit à l'émission d'un photon de fluorescence. Le nombre de photons est proportionnel à l'énergie perdue par le photon incident dans le cristal de NaI. Ces photons de scintillation sont dirigés vers la photocathode et, par effet photoélectrique, sont transformés en signal électrique qui sera amplifié et traité. Ce type de détection nécessite l'interposition d'un collimateur d'un le rôle est de limiter les rayonnements diffusés. La collimation permet d'améliorer la résolution spatiale mais à l'inconvénient de diminuer la sensibilité de détection.

▪ *TEP*

La TEP est une technique d'imagerie fonctionnelle capable de mesurer la distribution tridimensionnelle d'une molécule marquée par un radioélément émetteur de positons (Figure 18), le plus souvent le fluor 18 (^{18}F). L'acquisition est réalisée au moyen d'un ensemble de détecteurs répartis autour du sujet. Ceux-ci sont positionnés en couronne afin de détecter l'émission en coïncidence de deux photons gamma de 511 keV, fruits de l'annihilation d'un positon émis et d'un électron du milieu.

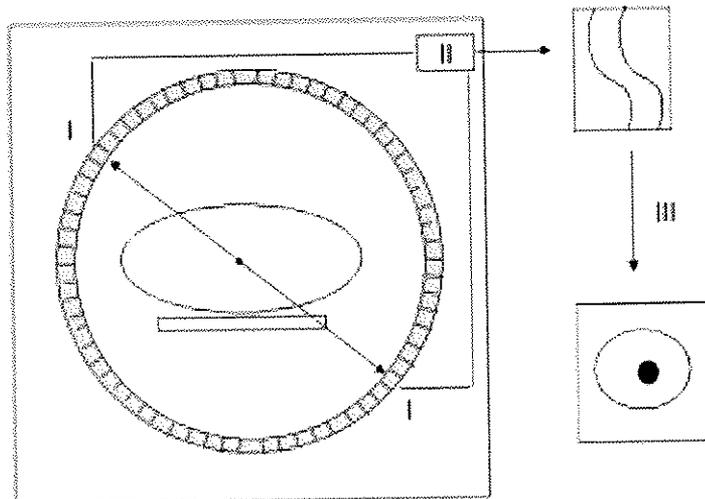
Contrairement à la TEMP, la TEP ne nécessite pas l'interposition de collimateur pour une acquisition tomographique en 3D. l'absence de collimateur améliore grandement la sensibilité sans altérer la résolution spatiale puisque le mode de détection est basé sur la localisation de la coïncidence.

Les coupes sont reconstruites par des algorithmes de plus en plus complexes pour s'adapter à des géométries d'acquisition tridimensionnelles (Figure 19). La correction des phénomènes physiques fournit une image représentative de la distribution du traceur.



1 Désintégration du positon et réaction d'annihilation. Une fois émis, le positon (+) parcourt quelques millimètres (d) dans les tissus, durant lesquels il perd toute son énergie cinétique. Quand le positon est pratiquement au repos, il interagit avec un électron (e^-) du milieu, suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma γ de 511 keV, émis dans des directions opposées.

Figure 18: Désintégration du ^{18}F et photon d'annihilation



2 Les différents modules d'un tomographe à émission de positons. La formation de l'image résulte de la détection des deux photons γ de 511 keV émis lors de la réaction d'annihilation. Pour y parvenir, des détecteurs élémentaires sont répartis en anneau autour du patient (I). Le circuit électronique accepte la coïncidence si les deux événements arrivent dans une fenêtre temporelle de l'ordre de 10 ns, et si les deux photons ont une énergie voisine de 511 keV (II). La dernière étape (III) est constituée par la reconstruction des données, permettant d'obtenir l'image de la distribution radioactive au sein du patient.

Figure 19 : Principe du tomographe à émission de positons.

La quantification en médecine nucléaire est difficile du fait de la complexité des mécanismes physiques et du caractère aléatoire des désintégrations et de leurs interactions.

La valeur de fixation normalisée ou Standardized Uptake Value (SUV) représente l'index le plus utilisé pour caractériser la fixation du 18fluorodésoxyglucose (^{18}F FDG) en TEP.

La SUV correspond à la fixation du traceur, normalisée par la dose injectée au patient rapportée à la masse du patient (Equation 1). Elle a été utilisée dès 1941 [77] et fut alors désignée sous le nom d'absorption différentielle.

$$SUV = \frac{\text{Fixation dans le tissu d'intérêt (MBq/L)}}{\text{Dose injectée (MBq) / poids (Kg)}}$$

Équation 1 : Calcul de la SUV.

La SUV est une quantité sans dimension (l'organisme étant assimilé à de l'eau, L et kg sont équivalents), dont l'usage fréquent est dû à la simplicité de sa méthode de calcul. Si le radio-traceur se répartissait uniformément dans l'organisme, la SUV serait identique en tout point et égale à 1. Tout écart traduit donc une répartition différente du radio-traceur dans le volume dans lequel il est distribué.

Cette normalisation est imparfaite car il existe de nombreux biais (mouvements du patient, anomalie de correction d'atténuation, protocole de mesure, temps après injection) [78]. La SUV ne représente donc qu'une approximation grossière du métabolisme du traceur. Cependant si l'on considère des données acquises systématiquement de la même façon, reconstruites avec le même protocole, et à partir desquelles la SUV est toujours estimée avec la même méthode, une partie des sources de variabilité des biais est contrôlée. Ainsi ces biais sont similaires dans des conditions relativement reproductibles et les mesures peuvent donc être fiables dans ces conditions normalisées [79].

II. Radio-traceurs

Durant les dernières décennies de nombreux radio-traceurs ont été développés afin de cibler l'hypoxie le plus sélectivement possible. En fonction de leur mode d'action, les traceurs seront classés en trois groupes : les nitroimidazolés, les dérivés du cuivre et les anticorps (Figure 20).

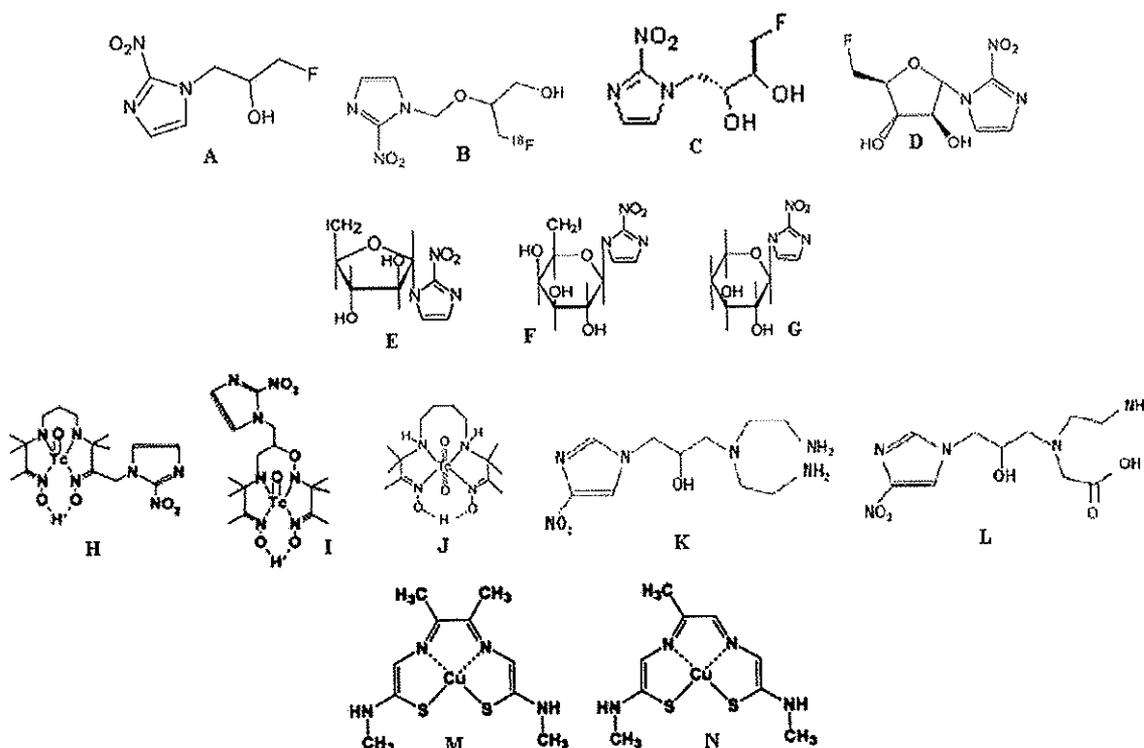


Figure 20 : Traceurs imidazolés fluorés : FMISO (A), FRP170 (B), FETNIM (C), FAZA (D) ; traceurs imidazolés iodés : IAZA (E), IAZG (F), IAZXP (G) ; traceurs technétiés BMS181321 (H), BRU59-21 (I), HL91(J), NIM-DETA (K), NIM-N2-AC2 (L) ; traceurs cuivrés : Cu-ATSM (M), Cu-PTSM (N).

II.A. Nitroimidazolés

L'exploration de l'hypoxie tumorale s'est tout d'abord focalisée sur la famille des nitroimidazolés. Cette famille est connue depuis longtemps dans le domaine de l'hypoxie puisqu'elle avait été étudiée pour ses propriétés radiosensibilisantes (misonidazole, nimorazole), puis utilisée en IHC (pimonidazole, EF5).

II.A.1. Mécanisme de fixation

▪ Réduction du groupement nitro (Figure 21)

Dans le milieu intracellulaire, les molécules du groupe des nitroimidazolés sont susceptibles d'être réduites par de nombreuses enzymes situées dans le cytoplasme, les microsomes et les mitochondries. La nitroréduction n'est pas O_2 dépendante mais se montre,

dans la cellule normoxique, rapidement réversible du fait de l'O₂ ambiant. En effet, la forme réduite se réoxyde pour se retrouver à l'état natif, ce qui lui permet de s'échapper de la cellule. En revanche, dans les cellules hypoxiques, cette réduction est plus durable et aboutit à la formation d'une hydroxylamine dont les produits de dégradation se fixent sur les protéines intracellulaires. Le degré de fixation de ces traceurs, qui s'accumulent dans les cellules hypoxiques dans lesquelles ils restent séquestrés, est donc négativement corrélé à l'oxygénation tumorale. Plus la cellule est hypoxique, plus la captation du traceur est importante.

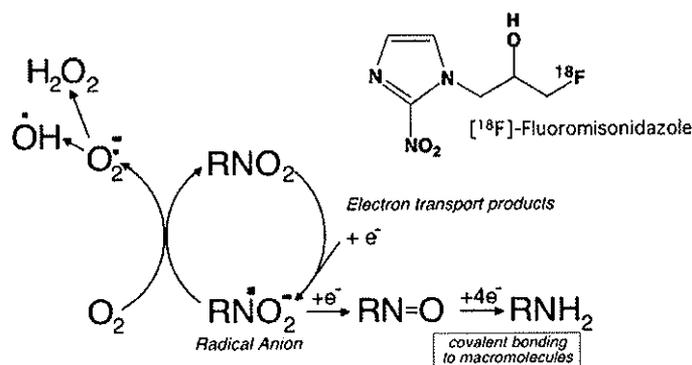


Figure 21 : La structure du fluoromisonidazole, le mécanisme de rétention des nitroimidazolés dans la cellule hypoxique, et sa réoxydation dans le tissu normoxique.

Pour certaines molécules, des mécanismes plus précis ont été décrits. L'accumulation de BMS181321 par exemple, un imidazolé technétié, au sein des cellules tumorales hypoxiques est également le fait d'une réduction enzymatique du groupe nitro, peut-être via la xanthine oxydase [80]. Un phénomène identique pourrait se produire pour le BRU59-21.

▪ Importance de la charge et du potentiel redox

La charge d'une molécule, par son action sur le caractère hydrophile/lipophile de celle-ci, influence directement le coefficient de partage. Il représente la balance hydrophilie/lipophilie d'une molécule. Il est le facteur principal régissant l'entrée de celle-ci par diffusion passive dans une cellule. Plus il est élevé, plus la molécule montrera une lipophilie importante, et plus elle aura de facilité à entrer dans la cellule. Cependant, cette lipophilie est également responsable d'une rétention accrue sur les éléments figurés sanguins. Cette rétention influence le relargage tissulaire qui se trouve diminué ou au moins très ralenti. A l'inverse, une molécule plutôt hydrophile sera immédiatement mise à disposition des tissus, car en solution dans le sang, mais elle pourra difficilement subir la diffusion passive et présentera une importante clairance rénale.

Le misonidazole présente un coefficient de partage sensiblement trop élevé, et la recherche s'est axée sur des molécules plus hydrophiles. Deux nitroimidazolés technétiés,

neutres, ont été étudiés : un dérivé boré de dioxime technétée (^{99m}Tc -BATO-nitroimidazole), et un dioxime technétée diaminé, les complexes dioximes étant assez spécifiques des cellules hypoxiques [81]. Le premier présente une lipophilie encore trop élevée responsable de sa fixation sur les membranes hydrophobes. Cette fixation indésirable ne perturbe cependant pas, selon les auteurs, la réduction enzymatique en l'absence d' O_2 .

Riche *et al.* [82] comparent la fixation de trois composés nitroimidazolés comportant tous un groupe chélateur pour le ^{99m}Tc : cyclam, oxocyclam et dioxocyclam. Ils sont différemment chargés, l'un positif, l'autre négatif, le dernier étant neutre (Figure 22). Les auteurs explorent l'influence de la charge du radio-traceur sur sa capture par la cellule hypoxique.

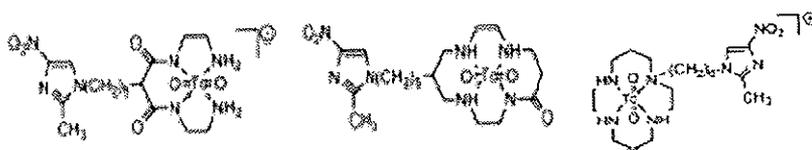


Figure 22 : Structures du cyclam, de l'oxocyclam et du dioxocyclam.

Ce travail est conduit chez des rats maintenus en atmosphère soit normoxique, soit hypoxique. Le traceur est administré en bolus. Les résultats ne montrent pas de différence significative de captation sous hypoxie ou normoxie. Les clairances rapides des composés chargés s'expliquent facilement par leur manque de lipophilie et donc leur incapacité à traverser la membrane cellulaire par diffusion passive. Par contre, l'absence de fixation du composé neutre est plus surprenante. Elle signifie que le composé a subi une fixation puis une élimination cellulaire rapide, par absence de réduction enzymatique. L'explication provient du potentiel d'oxydoréduction du traceur, trop proche de celui des enzymes susceptibles d'assurer sa réduction, telle que la succinate déshydrogénase. Cette étude démontre donc le rôle fondamental du potentiel d'oxydoréduction tant au niveau de la cellule que du traceur.

▪ Autre mécanisme

Récemment [83], un autre dérivé dioxime, le HL91, couplé au $^{99m}\text{TcO}_3^+$, a montré une bonne fixation au niveau tumorale *versus* tissu sain. Ce composé ne comporte pourtant pas de groupe nitroimidazole, il est d'ailleurs le seul non nitroimidazolé à présenter une spécificité pour les tissus hypoxiques.

II.A.2. Structure

A partir de la structure du misonidazole, différents composés ont été développés dans le but d'optimiser son coefficient de partage. En effet, de nombreuses études montrent l'impact de l'important caractère lipophile du traceur. Pour quelques traceurs, le noyau nitroimidazolé est remplacé par un autre pharmacophore bioréductible, nitroaromatique ou N-oxyde.

Un des premiers composés nitrimidazolés étudiés est donc le misonidazole sur lequel est greffé un atome de ^{18}F , ^{77}Br , ^{123}I ou encore ^{131}I pour des expériences *in vitro*. ^{77}Br ou ^{123}I sont utilisés en TEMP alors que le ^{18}F permet une analyse en TEP. Le misonidazole, initialement étudié pour ses propriétés de radiosensibilisant, ne fut pas développé en tant que tel à cause de sa lipophilie trop importante responsable de sa toxicité à dose efficace. En tant que radio-traceur, couplé au ^{18}F , les concentrations-cible attendues sont très inférieures et le problème de neurotoxicité disparaît. La forte lipophilie du $^{18}\text{FMISO}$ présente cependant des conséquences en termes de cinétique de fixation. Le traceur va être longuement retenu dans le compartiment sanguin, ce qui nuit à l'obtention de rapport tumeur/bruit de fond de qualité et oblige à l'acquisition d'images tardives, à 3 ou 4 heures post injection minimum. Le $^{18}\text{FMISO}$ fait partie des traceurs nitroimidazolés dits de première génération.

Pour pallier les problèmes engendrés par une lipophilie trop importante, des composés de deuxième génération ont été synthétisés sur la base des nitroimidazolés. Il s'agit de dérivés azomycine, souvent couplés à différents isotopes de l'iode, mais également au ^{18}F . Ces produits plus hydrophiles présentent une clairance sanguine plus rapide qui permet d'observer de bien meilleur rapport de fixation tumeur/sang ou tumeur/bruit de fond. Nous reprendrons cela dans la partie préclinique et clinique.

La recherche s'est également focalisée sur des traceurs nitroimidazolés technétiés de l'hypoxie permettant la localisation des tumeurs à l'aide d'une gamma-caméra classique. Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ présente en effet de nombreux avantages : faible coût, bonne disponibilité et obtention aisée à partir d'un générateur, période idéale de 6,02 heures et énergie adaptée de 140 keV. La problématique du marquage au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ est par contre liée à la chimie du technétium, car à l'inverse des halogènes (F, Br...), il nécessite l'incorporation sur la molécule vectrice d'un groupement chélateur capable de capturer et de retenir l'atome de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Ce chélateur peut être un propylène amine oxyme (PnAO), un diaminodithiols (DADS), des cyclams ou encore un cœur tricarbonyl. Il peut cependant modifier les propriétés physico-chimiques du composé, avec en premier lieu le coefficient de partage [81]. Des traceurs de structure différente, type dioxime avec le HL91 par exemple, ont été développés dans le but de mieux maîtriser ce paramètre.

II.A.3. Traceurs

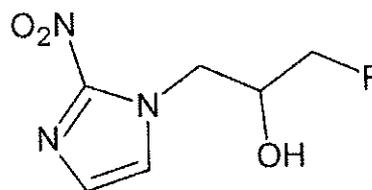
II.A.3.a. Traceurs fluorés

• $^{18}\text{FMISO}$

La connaissance du misonidazole, ou 2-nitroimidazole, en tant que radiosensibilisant remonte aux années 60. Il fut vite délaissé à cause de son importante neurotoxicité. Chapman eut le premier l'idée de le recycler comme traceur de l'hypoxie. En 1981, il réalise la synthèse de $^{14}\text{CMISO}$ [84] dans le but de créer un nouvel outil d'étude des cellules hypoxiques viables, de la biologie et de la cinétique tumorale. Les concentrations de traceur nécessaires pour cela sont en outre insuffisantes pour observer une éventuelle toxicité. Enfin, sa présence au sein des cellules tumorales se montre sans conséquence sur leur métabolisme. Mais avec ce nouveau type de traceur, la localisation et l'évaluation de l'étendue d'une tumeur deviennent accessibles aux techniques d'imagerie isotopique.

Par la suite, de nombreuses tentatives de synthèse de composés apparentés eurent lieu [85, 86] pour finalement aboutir à celle du $^{18}\text{FMISO}$. Ce produit fit alors l'objet de très nombreuses études précliniques et cliniques afin de déterminer ses aptitudes à devenir un bon marqueur de l'hypoxie tumorale.

En effet, dès 1987, le misonidazole fluoré se montre plus stable et moins lipophile que son homologue bromé, mais l'adjonction de l'atome de fluor 18 au sein du cycle nitroimidazole ralentit sa captation cellulaire. Son tropisme pour les cellules viables hypoxiques est démontré, ainsi que son accumulation importante à quatre heures post injection [1]. La capacité du $^{18}\text{FMISO}$ à mesurer l'hypoxie tumorale par des techniques d'imagerie non invasives est clairement établie par des travaux comme celui de Dubois [87]. Il évalue l'hypoxie du rhabdomyosarcome de rat par IHC, avec les marqueurs pimonidazole et CA9, et par TEP à l'aide du $^{18}\text{FMISO}$. Ces deux techniques montrent des résultats équivalents avec une distribution hétérogène de l'hypoxie, une corrélation positive entre les volumes de fixation de $^{18}\text{FMISO}$ visualisés en TEP, et ceux de pimonidazole et de CA9 issus de l'autohistoradiographie. Il est enfin considéré comme le « gold standard » par West en 2005 [88]. De multiples études précliniques et cliniques ont ensuite investigué ses performances, son métabolisme, sa pharmacocinétique...



- Etudes précliniques

L'hypoxie est un phénomène commun au développement tumoral, quelle que soit l'origine de la tumeur ou la nature du tissu qui l'héberge. Wyss étudie le comportement du $^{18}\text{FMISO}$ vis à vis de nombreux types tumoraux chez la souris. La fixation de $^{18}\text{FMISO}$ sur

l'ensemble de ces modèles vient confirmer le caractère ubiquitaire de l'hypoxie. Elle se montre également hétérogène au niveau inter et intratumoral. Cependant, il n'est pas observé de corrélation avec la taille de la tumeur ou la quantité de radio-traceur injectée. La comparaison des fixations de $^{18}\text{FMISO}$ et ^{18}FDG révèle par ailleurs une corrélation entre les zones hypoxiques et le métabolisme du glucose [89].

Le co-marquage $^{18}\text{FMISO}$ - ^{18}FDG se retrouve dans un travail très récent mettant en lumière l'avantage potentiel du recours au $^{18}\text{FMISO}$ pour pallier le manque bien connu de spécificité du principal traceur TEP, le ^{18}FDG . Liu étudie en 2009 la biodistribution, la pharmacocinétique, et l'imagerie TEP de ces radio-traceurs sur des souris à la fois porteuses de sarcome et d'inflammation. A 3 jours post injection d'essence de térébenthine, l'inflammation est nettement objectivée à l'imagerie TEP au ^{18}FDG . A cette date, on observe à 3 heures post injection des radio-traceurs, des ratios tumeur/inflammation de 4,57 pour $^{18}\text{FMISO}$ contre 1,73 pour ^{18}FDG . La fixation significativement supérieure du $^{18}\text{FMISO}$ au niveau tumoral démontre ainsi sa spécificité importante notamment par rapport au ^{18}FDG . Au vu de cette spécificité, l'auteur suggère que $^{18}\text{FMISO}$ peut servir, de façon complémentaire au ^{18}FDG , à l'évaluation de l'efficacité de thérapeutiques telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie [90].

Malgré cela, la littérature montre une certaine hétérogénéité. Bentzen, par exemple, publie des résultats discordants. Ses travaux sur des sarcomes humains, au sein desquels il tente de détecter l'hypoxie via l'imagerie TEP au $^{18}\text{FMISO}$ et par électrode polarographique à O_2 , ont montré l'inefficacité de l'imidazolé à cibler l'hypoxie. L'auteurs a alors conclu que l'évaluation de l'hypoxie tumorale ne paraissait pas faisable par imagerie au $^{18}\text{FMISO}$ [91]. A l'inverse, l'équipe de Sorensen, qui a exploré deux types de carcinomes murins avec ces deux techniques, publie pour chacune d'elles des résultats homogènes et superposables. Sorensen montre donc que la distinction entre zone hypoxique viable et zone de nécrose est tout à fait réalisable par imagerie TEP au $^{18}\text{FMISO}$. La fixation moindre relevée dans le modèle de carcinome épidermoïde pourrait être due à la répartition des zones hypoxiques beaucoup plus disparate que celle observée dans le carcinome mammaire de cette étude [92]. Enfin, $^{18}\text{FMISO}$ est tout de même reconnu comme la référence [93], voir même comme le « gold standard » pour la mesure de l'hypoxie [94].

- Etudes cliniques

L'éventuelle influence du type tumoral, ou de la nature de la lignée cellulaire qui compose la tumeur, sur la fixation du $^{18}\text{FMISO}$ fait l'objet d'intenses recherches, et la littérature est là encore hétérogène. Par exemple, l'existence de zones hypoxiques au niveau

de différentes tumeurs cérébrales ainsi que les relations qui peuvent exister entre l'hypoxie et la fixation de ^{18}F FDG ou de marqueurs moléculaires tels que Ki67 ou VEGFR1, ont été investiguées par Cher en 2006 [95]. Ses résultats montrent une fixation du ^{18}F MISO dans tous les gliomes de haut grade, à l'inverse de ceux de bas grade, faisant du ^{18}F MISO, un marqueur de l'hypoxie à valeur pronostique pour le traitement des gliomes. Une relation significative est de plus retrouvée entre ^{18}F MISO ou ^{18}F FDG et l'expression de Ki67 et VEGFR1, ce qui montre que le caractère prolifératif des cellules FDG(+) mais aussi de celles FMISO(+). Cela suggère qu'une cellule qui présente un déficit d'oxygénation n'entre pas forcément dans un état de latence, mais peut au contraire se montrer très active.

La valeur prédictive de la fixation du ^{18}F MISO pour les rechutes post chimiothérapie des patients atteints de cancers tête et cou, ou pulmonaires non à petite cellule, a été étudiée par Eschmann en 2005 [96]. Les SUV ainsi que le ratio tumeur/muscle ont été relevés à 4 heures post injection. Une corrélation n'a été mise en évidence que pour le cancer tête et cou car tous les patients ayant rechuté présentaient une SUV > 2. Les ratios tumeur/muscle sont également corrélés avec le risque de rechute de cancer tête et cou, mais aussi pulmonaire cette fois, pour des valeurs de 1,6 et 2 respectivement. L'analyse qualitative des résultats permet de séparer les patients en 3 groupes selon leur courbe temps/activité : clairance rapide, clairance intermédiaire et accumulation. Les auteurs observent des rechutes pour 5 des 6 patients présentant une accumulation du traceur, en comparaison avec les 5 sur 8 classés « intermédiaires » ou encore avec le 0 sur 4 des sujets à clairance rapide. Cette étude montre donc que la cinétique de ^{18}F MISO peut être prédictive de la réponse à la radiothérapie. Une courbe temps/activité type accumulation, une forte SUV ainsi que d'importants ratios tumeur/muscle et tumeur/médiastin sont très fortement évocateurs d'une réponse incomplète aux traitements et pourraient être pris en compte pour sélectionner les patients devant bénéficier de thérapies intensifiées.

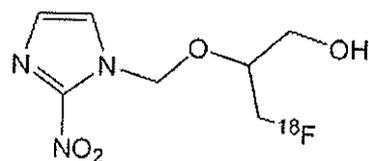
▪ *Traceurs marginaux*

Divers autres traceurs fluorés, moins connus, ont été développés comme le rapporte Wiebe [97]. Le fluoronorméthoxymisonidazole et le fluoronorhydroxymetronidazole sont deux radio-traceurs présentant, d'après Mathias *et al.*, des fixations fonction de l'étendue de l'hypoxie et des distributions semblables à celles observées avec le ^{18}F MISO. Le fluoropropyl-2-nitroimidazole, qui existe également bromé (bromopropyl-2-nitroimidazole), et le fluoroctyl-2-nitroimidazole présentent une lipophilie importante.

▪ FRP170

Comme nous l'avons déjà expliqué, la lipophilie d'un traceur revêt une grande importance. Des nitroimidazolés au comportement plus hydrophile, tels que le FRP170 ou le ^{18}F -EF3, ont été synthétisés et évalués.

Kaneta rapporte son expérience avec le RP170, qu'il évalue chez le volontaire sain et chez des sujets atteints de cancer pulmonaire. Ce traceur montre une élimination rénale



rapide démontrant le caractère fortement hydrophile de ce composé. La fixation précoce de ^{18}F FRP170 est importante chez les malades, et très faible chez les volontaires sains. A 30 min post injection, les valeurs de SUV, des rapports tumeur/muscle et tumeur/sang n'ont que très peu varié. Le ^{18}F FRP170 démontre une cinétique rapide avec une fixation précoce et un faible bruit de fond [98].

▪ ^{18}F -EF3 et ^{18}F -EF5

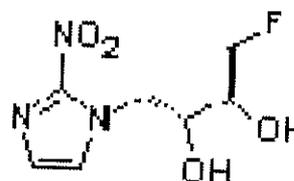
^{18}F -EF3 est un autre radio-traceur plus hydrophile que ^{18}F FMISO. Il démontre ce caractère lors d'une étude menée sur un modèle de fibrosarcome murin en atmosphère normoxique ou hyperoxique. ^{18}F -EF3 montre en effet une élimination sanguine plus rapide et préférentiellement urinaire. Une augmentation temps-dépendante de la radioactivité est de plus relevée au sein des organes excréteurs tels que les reins et la vessie. Avec le ^{18}F FMISO, la lipophilie plus importante induit une augmentation de la radioactivité relevée au niveau du tissu sain au temps tardif, qui est responsable d'un bruit de fond accru. Ces traceurs présentent donc tous deux des profils semblables en termes de pharmacocinétique, mais la spécificité du ^{18}F FMISO se trouve un peu diminuée aux temps tardifs [99].

Plus récemment, le ratio tumeur/sang et la distribution du ^{18}F -EF3 ont été de nouveau comparés à ceux du ^{18}F FMISO sur un modèle de rhabdomyosarcome de rat. ^{18}F -EF3 montre une clairance sanguine plus rapide que celle du ^{18}F FMISO, ce qui confirme les résultats de Mahy. Les 2 traceurs présentent également des clairances tissulaires supérieures aux clairances tumorales, aboutissant à une augmentation du ratio tumeur/sang avec le temps post injection. Cependant, dans cette étude, la fixation de ^{18}F -EF3 se montre inférieure à celle du ^{18}F FMISO à 2 heures post injection. Elle devient équivalente à 4 heures. Chaque traceur présente une fixation indépendante du volume tumorale, et une distribution hétérogène au sein des tumeurs explorées. ^{18}F -EF3 apparaît donc comme un nouveau traceur potentiel de l'hypoxie tumorale, sans démontrer pour l'heure de supériorité significative par rapport au ^{18}F FMISO faisant encore office de référence [100].

Un proche parent de ^{18}F -EF3, ^{18}F -EF5, a été étudié par Komar en 2008, en tant que traceur de l'hypoxie tumorale chez 15 patients présentant des cancers tête et cou. Il a obtenu des résultats encourageants nécessitant toutefois d'autres investigations [101].

▪ ^{18}F FETNIM

La course à l'hydrophilie, ou au moins à une lipophilie diminuée, a conduit les chercheurs à la synthèse d'un autre 2-nitroimidazole fluorés, le 18 fluoroerythronitroimidazole (^{18}F FETNIM). Yang décrit le premier en 1995 la synthèse de ce radio-traceur. Il montre sur un modèle animal de tumeur mammaire que les rapports tumeur/muscle et tumeur/sang sont significativement supérieurs pour ^{18}F FETNIM *versus* ^{18}F FMISO à 4 heures post injection [102]. Ses découvertes amenèrent d'autres équipes à étudier ce marqueur, et notamment sa stabilité et sa pharmacocinétique.



Ainsi, Lehtio rapporte une première phase de captation de ^{18}F FETNIM fonction du flux sanguin dans les cancers tête et cou avec un délai maximum de captation tumorale *versus* musculaire (tumeur/muscle = 4) supérieur à 3 heures dans la limite des délais rapportés pour le ^{18}F FMISO. Une corrélation inverse est montrée entre la réponse tumorale et la survie post radiothérapie et l'augmentation du flux sanguin tumoral, suggérant un intérêt potentiel du ^{18}F FETNIM pour l'évaluation de l'hypoxie tumorale comme un bio-indicateur de la réponse à la radiothérapie [103].

Grönroos confirme ces résultats en 2001 lors d'étude de cinétique au sien de tumeur chez le rat, et de métabolisme dans le plasma humain et canin. Il apparaît que ^{18}F FETNIM se montre relativement stable chez le rat et dans le plasma. De plus son élimination urinaire rapide sous forme inchangée confirme son importante hydrophilie. Les auteurs montrent enfin que sa fixation est temps-dépendante [104].

Il réitère ses expériences en 2004, et compare les biodistributions de ^{18}F FETNIM et ^{18}F FMISO dans le tissu sain et au sein de carcinomes mammaires, chez la souris, en atmosphère normoxique et hyperoxique. Les résultats des autoradiographies à 2 heures post injection montrent un rapport tumeur/muscle significativement supérieur en condition normoxique. La fixation de ^{18}F FETNIM apparaît plus importante que celle de ^{18}F FMISO mais sans significativité statistique. La fixation sur le tissu sain n'est en revanche que peu influencée par le traitement au carbogène. Au final ^{18}F FETNIM apparaît plus spécifique que ^{18}F FMISO qui montre une fixation significativement supérieure dans le tissu sain [105].

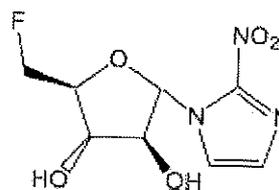
• $^{18}\text{FETA}$

Le 18 fluoroétanidazole ($^{18}\text{FETA}$) est encore un composé proche de $^{18}\text{FMISO}$ et de $^{18}\text{FETNIM}$, dit de première génération, dont Tewson *et al.* décrivent la synthèse en 1997 [106]. $^{18}\text{FETA}$ est stable dans le plasma et se distribue correctement au sein des tissus explorés. Barthel le valide comme marqueur de l'hypoxie sur plusieurs modèles tumoraux murins. Le rapport tumeur/muscle à 60 minutes est positivement corrélé avec le pourcentage de pO_2 tissulaire inférieure à 5 mmHg, et l'inhalation de carbogène diminue sa fixation qui se montre en revanche indépendante de l'activité de la nitroréductase. Enfin la rétention supérieure de $^{18}\text{FETA}$ dans certaines tumeurs (HT1080/1-3C) reflète leur faible densité vasculaire et leur faible pO_2 tissulaire. $^{18}\text{FETA}$ apparaît donc comme un bon candidat pour l'imagerie TEP de l'hypoxie tumorale [107].

• $^{18}\text{FAZA}$

Les années 2000 voient l'apparition de radio-traceurs imidazolés de deuxième génération. Ceux-ci ne sont plus réellement imidazolés mais leur structure azomycine reste proche. Le but recherché est de nouveau l'optimisation du coefficient de partage du traceur. Très souvent iodée, cette famille de traceurs comporte cependant un représentant fluoré, le $^{18}\text{fluoroazomycine arabinoside}$ ou arabinofuranoside ($^{18}\text{FAZA}$).

Une des premières études dont $^{18}\text{FAZA}$ fit l'objet comparait sa fixation à celle du $^{18}\text{FMISO}$. Les résultats se révélèrent équivalents au temps précoce, jusqu'à 100 minutes, mais la fixation de $^{18}\text{FMISO}$ devint supérieure à trois heures. La clairances sanguine, des viscères et des muscles plus rapides de $^{18}\text{FAZA}$ démontrèrent son hydrophilie [108].



Ces résultats en demi-teinte nécessitaient d'autres investigations. Les ratios tumeurs/sang de $^{18}\text{FAZA}$ et de $^{18}\text{FMISO}$ ont donc de nouveau été étudiés, par Piert, dans trois types de tumeurs murines différentes [109]. Ceux de $^{18}\text{FAZA}$ furent 2 à 4 fois supérieurs à ceux du $^{18}\text{FMISO}$. L'explication réside dans la clairance sanguine très rapide du $^{18}\text{FAZA}$. Busk montrent de plus une corrélation positive entre les distributions de $^{18}\text{FAZA}$ et d'un marqueur de l'hypoxie, le pimonidazole, une hétérogénéité de fixation de ce marqueur correspondant à la distribution des zones de faible oxygénation, et une corrélation inverse entre les localisations de $^{18}\text{FAZA}$ et d'un marqueur de perfusion [110].

Piert compare à nouveau $^{18}\text{FMISO}$ et $^{18}\text{FAZA}$ pour vérifier la corrélation négative entre l'oxygénation tissulaire et la fixation de $^{18}\text{FAZA}$. L'étude a été menée *in vivo* chez la souris porteuse de tumeurs EMT6 et AR42J. La fixation de $^{18}\text{FAZA}$ présente d'important ratio tumeur/bruit de fond en comparaison avec $^{18}\text{FMISO}$, avec une clairance sanguine et une

élimination des tissus sains plus rapide. Il retrouve ainsi ses précédents résultats. $^{18}\text{FAZA}$ pourrait permettre, après de plus amples investigations, d'améliorer les stratégies thérapeutiques, soit pour augmenter l'oxygénation tumorale, soit pour tirer partie du déficit d' O_2 avec l'administration de TPZ par exemple [111]. Busk démontrent enfin que chez la souris, le $^{18}\text{FAZA}$ peut être un marqueur de l'hypoxie pour certaines tumeurs abdominales et thoraciques de taille importante [110].

Enfin l'évaluation de thérapeutique anti-angiogénique peut être une indication intéressante de ce type de radio-traceur. L'étude de Solomon s'inscrit dans cette optique. Il a évalué l'activité d'un inhibiteur de l'EGFR, gefitinib ou IRESSA[®], à l'aide de l'imagerie nucléaire au $^{18}\text{FAZA}$ pour montrer chez l'animal que cet ITK est responsable d'une diminution de l'hypoxie intratumorale [112].

II.A.3.b. Traceurs iodés

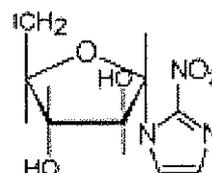
Les isotopes de l'iode sont très employés pour le marquage de traceurs de l'hypoxie. Certains, tels que l'iode 124, sont émetteurs de positons, donc utilisables en TEP, d'autres comme l'iode 123 émettent un photon simple et permettent une acquisition en gamma-caméra classique. Dans le domaine de l'évaluation de l'hypoxie, tous les radio-traceurs iodés appartiennent à la deuxième génération, c'est-à-dire que ce sont des dérivés de l'azomycine. Ils ont été développés surtout à partir des années 90, mais sont également l'objet de recherche actuellement.

▪ IAZP

Les iodoazomycinepyranosides radiomarqués, ou $^{123}\text{I-IAZP}$ et $^{125}\text{I-IAZP}$, furent parmi les premiers traceurs iodés synthétisés et étudiés. Ces composés permirent notamment à l'équipe de Mannan, qui travaillait sur la souris porteuses de tumeurs EMT6, de relever un ratio tumeur/sang de 13,9 à 24 heures post injection, soit le plus important rapporté à cette date pour un 2-nitroimidazolé. IAZP a montré une élimination rapide supérieure à 97 % en 24 heures, avec une faible activité résiduelle thyroïdienne, et une absence de toxicité chez la souris. Ces observations confirment l'avantage de l'hydrophilie de l'azomycine et démontrent qu'IAZP peut devenir un candidat pour l'imagerie gamma de l'hypoxie tumorale [113].

▪ $^{123}\text{IAZA}$

Par la suite, IAZP fut délaissé au profit du IAZA ou iodoazomycine arabinoside. Ce dernier était marqué à l'iode 123, émetteur gamma. Il donna lieu à plusieurs études dont les résultats



permirent de faire progresser la philosophie du marquage de l'hypoxie tumorale à des fins d'imagerie. A l'image de Cher *et al.*, qui ont montré une fixation du ^{18}F MISO dans tous les gliomes de haut grade spécifiquement [95], Parliament étudie l'influence du type tumoral sur la fixation de son traceur. Il administre donc ^{123}I AZA à des patients atteints de tumeurs d'origines diverses, et observe la fixation du traceur pour trois types tumoraux sur les dix étudiés. Outre des niveaux de radioactivité acceptables au niveau des organes, il rapporte à 18-24 heures post injection des rapports tumeurs/bruit de fond de 2,3 pour le cancer pulmonaire, 1,9 pour l'histiocytome et 3,2 pour des métastases cérébrales de carcinome pulmonaire. Cette étude montre donc la faisabilité de l'imagerie de l'hypoxie tumorale par gamma-caméra classique, mais surtout l'impact du type tumoral sur la fixation du traceur, ^{123}I AZA dans cette étude [114].

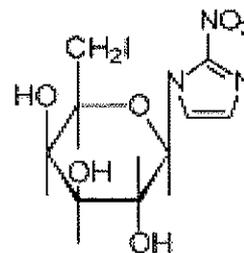
Plus tard, une nouvelle étude chez l'homme mit en évidence le rôle prédictif potentiel de la fixation de ^{123}I AZA dans différents cancers tels que des cancers épidermoïdes, des carcinomes et des cancers tête et cou. Urtasun montre en effet la perte de contrôle à trois mois des tumeurs fixant ce marqueur [115]. Ces résultats en accord avec ceux de Parliament confirment la potentialité de ^{123}I AZA à devenir un agent important de l'imagerie de l'hypoxie tumorale.

Enfin, un dernier type d'iodoazomycine arabinoside, son anomère β également couplé à ^{123}I , a été synthétisé en 2003 par l'équipe de Kumar [116].

▪ IAZG ou IAZGP

Après une dizaine d'année d'expérimentation, IAZA cède à son tour sa place à un dérivé iodoazomycine très proche, l'iodoazomycinegalactoside. L'arabinoside est donc remplacé par un galactoside. IAZG a été étudié marqué à trois isotopes de l'iode : ^{124}I , ^{125}I et ^{131}I .

Zanzonico [117] a conduit une étude intéressante qui cherche d'une part à établir ^{124}I IAZG dans son rôle de marqueur de l'hypoxie tumorale, et qui explore, d'autre part, l'impact de la taille des tumeurs, qu'il catégorise en fonction de leur poids, sur leur statut d'oxygénation. Il étudie pour cela des modèles murins de tumeur mammaire et de fibrosarcome où il compare les fixations de ^{124}I IAZG et ^{18}F MISO. Les animaux sont donc classés en fonction de la taille des tumeurs qu'ils présentent : les tumeurs « petites » de 80 à 180 mg et plutôt bien oxygénées, et les « grandes » de plus de 300 mg assez hypoxiques. Douze d'entre eux, comportant les plus petites tumeurs, ont reçu du ^{18}F FDG pour faciliter la



visualisation de celles-ci. Une analyse histologique et la mesure de la pO_2 par microélectrode à O_2 ont également été réalisées pour caractériser les tumeurs.

Les grandes tumeurs présentent une bonne fixation de ^{18}F MISO et de ^{124}I AZG à la différence des plus petites ne fixant que ^{18}F FDG. Cela s'explique par le fait que les plus petites tumeurs sont moins hypoxiques. La mesure de pO_2 vient confirmer, indiquant que les régions où règne une pO_2 inférieure à 2,5 mmHg représentent 28 % seulement des tumeurs de petites tailles contre 67 % des plus grosses.

En termes de fixation, le bon comportement, déjà connu, du ^{18}F MISO est retrouvé dès les premières heures post injection (1, 3, 4, 6 et 8 heures post injection). ^{124}I AZG montre également une très forte fixation mais avec une cinétique plus lente, à partir de 24 - 48 heures, lorsque le bruit de fond a beaucoup diminué. Il en résulte, au sein des tumeurs de grande taille, un rapport de fixation tumeur/muscle significativement plus élevé pour ^{124}I AZG, avec 17 % de fixation à 24 - 48 heures, que pour ^{18}F MISO à 3 - 6 heures, avec 5 à 10 % de fixation. Ce travail démontre donc le potentiel de ^{124}I AZG comme marqueur de l'hypoxie tumorale, moyennant différentes modalités d'imagerie (acquisition beaucoup plus tardive).

Cependant, la littérature met en évidence une grande hétérogénéité dans les résultats des différentes études. Les travaux de Schneider *et al.*, qui avaient observé [118] des ratio tumeur/muscle et tumeur/sang optimaux de 23 et 9,9 respectivement, à 6 heures post injection, d'une part, et ceux de Riedl *et al.* [119] montrant la supériorité de ^{18}F MISO d'autre part, remettent en cause non seulement la pharmacocinétique de ce traceur, mais aussi sa capacité à marquer l'hypoxie tumorale.

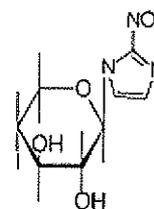
La capacité de ^{124}I AZGP, ou iodoazomycinegalactopyranosyl (autre dénomination de IAZG), à détecter l'hypoxie tumorale a également été étudiée par Riedl sur un modèle de tumeur hépatique chez le rat. L'oxygénation tumorale était mesurée par une électrode à fibre optique, et l'administration de ^{124}I AZGP était concomitante de celles de pimonidazole et d'EF5 faisant office de référence. Les auteurs ont montré que les régions fixant ce marqueur étaient compatibles avec les niveaux d'hypoxie donnés par les électrodes [120]. Ils ont également déterminé que l'imagerie TEP était optimale à 6 heures post injection, rappelant les résultats de Schneider avec ^{124}I AZG.

Parmi les paramètres pouvant interagir avec la fixation d'un marqueur au sein des cellules, l'activité spécifique du marqueur a été évoquée, et donc investiguée. En effet, IAZGP a été successivement couplé avec les isotopes 123, 124, 125 et même 131 de l'iode, lui conférant une activité spécifique de 10 à 90 MBq/mL maximum dans les différents travaux dont il a fait l'objet. Suehiro a quand à lui publié [121] une étude portant sur ce marqueur, ^{131}I AZGP, qu'il a produit avec une activité spécifique 100 à 1000 fois supérieure à celles

relevées dans les précédentes publications. Son but était d'évaluer l'influence que pourrait avoir cette augmentation de l'activité spécifique sur la cinétique de captation cellulaire, la biodistribution et la localisation microrégionale intratumorale de ce traceur. ^{131}I IAZGP à faible et à forte activité spécifique sont donc ici comparés *in vitro* sur cellules HCT8 et HT29, et *in vivo* sur un modèle murin de tumeur HT29. Les résultats apparaissent strictement identiques quelle que soit l'activité spécifique du radio-traceur. *In vitro*, en termes de cinétique de captation cellulaire, ils sont similaires et dépendants du niveau d'hypoxie. *In vivo*, la biodistribution est équivalente. L'autoradiographie réalisée *ex vivo* révèle enfin une localisation intratumorale hétérogène tout à fait comparable à celles des autres marqueurs exogènes et endogènes de l'hypoxie. Au final, l'activité spécifique n'apparaît pas comme un facteur influençant la cartographie de l'hypoxie *in vivo*.

▪ IAZXP

^{124}I -IAZG fit enfin l'objet d'une étude singulière dans laquelle il était comparé à l'iodoazomycine xylopyranoside ou IAZXP, marqué aux iodes 125 et 131. Les résultats amenèrent Iyer à conclure que ces marqueurs pouvaient servir à investiguer les changements d'oxygénation tumorale, qu'ils soient spontanés ou induits, ce qui sous entend une possible application dans l'évaluation de thérapeutiques anti-angiogéniques par exemple [122].

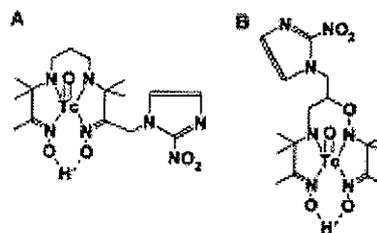


II.A.3.c. Technétium

Nous venons de traiter des radio-traceurs essentiellement utilisables en TEP, excepté quelques isotopes de l'iode. Le recours au technétium remonte à une quinzaine d'années environs. Les chercheurs souhaitaient exploiter les avantages de ce métal : faible coût, obtention aisée à partir d'un générateur, période confortable de 6,02 heures et énergie adaptée de 140 keV. L'inconvénient cependant reste la problématique du marquage liée à la chimie du technétium, car ce dernier nécessite la présence d'un chélateur pour marquer la molécule vectrice. Malgré cela, les marqueurs technétiés présentent des résultats intéressants.

▪ BMS181321 et BRU59-21

Le premier 2-nitroimidazolé technétié étudié, le BMS181321 (A), a montré une fixation *in vitro* sur des cellules hypoxiques de cerveau, cœur et tumeur de modèles animaux. Il a ainsi prouvé qu'un radio-traceur technétié pouvait cibler des régions hypoxiques, mais a également mis



en évidence ses nombreuses limites [80]. D'une part il est instable et se décompose dans les solutions salines. D'autre part sa lipophilie importante, qui permet son passage à travers la BHE pour visualiser une hypoxie cérébrale par exemple, peut être responsable d'une faible clairance sanguine pénalisant l'imagerie cardiaque ou tumorale. Cette lipophilie entraîne enfin un retard à l'élimination avec un temps de présence hépatique et intestinal augmenté.

BRU59-21 (B) représente la seconde génération de 2-nitroimidazolés technétiés. Il diffère du précédent par la substitution d'un groupement méthylène par un oxygène, ainsi que par la position du chélateur. Ces modifications structurales seraient responsables d'une meilleure stabilité chimique, d'une diminution du coefficient de partage, c'est-à-dire d'un abaissement de la lipophilie, le tout résultant en une baisse du niveau de radioactivité hépatique [123]. Il montre une meilleure potentialité pour l'imagerie de l'hypoxie myocardique [124]. Il a été évalué et comparé au BMS181321 sur un modèle d'hypoxie tumorale *in vitro*, sur cellules de hamster chinois incubées sous conditions hypoxiques ou normoxiques, et chez la souris. La comparaison s'est montrée à l'avantage de BRU59-21, avec un marquage sensiblement meilleur, une stabilité *in vitro* cinq fois supérieure, et surtout un abaissement du coefficient de partage [125].

Au sein des cellules de hamster chinois, le profil de fixation de BRU59-21 se montre similaire à celui de BMS181321, avec un rapport de concentration intracellulaire/extracellulaire relativement constant sous aérobiose, mais multiplié par 5 après 4 heures sous anaérobiose. L'accumulation de BRU59-21 est quantitativement inférieure à celle de BMS181321, ce qui traduit la différence de lipophilie entre les deux marqueurs. Le différentiel hypoxie-aérobie reste cependant en faveur du BRU59-21.

Après injection intraveineuse chez la souris, BRU59-21 montre une clairance sanguine, une pénétration dans tous les tissus, et une élimination du foie et de l'intestin rapides. Au niveau tumoral, il subit une élimination constante à la cinétique cependant inférieure à l'élimination sanguine et tissulaire. Il en résulte un rapport tumeur/bruit de fond en augmentation constante. La concentration de BRU59-21 est là aussi inférieure à celle de BMS181321 quel que soit le tissu considéré, mais sa clairance sanguine beaucoup plus rapide permet l'obtention de meilleures images. Son élimination intestinale reste importante, similaire à celle de BMS181321, pouvant interférer avec une imagerie de tumeur abdominale. L'injection de nitro-L-arginine, ayant la propriété d'accroître le niveau d'hypoxie, est responsable d'une augmentation de radioactivité au niveau tumoral sans modifications des niveaux relevés ailleurs. Cette réponse à la nitro-L-arginine est similaire à celle de BMS181321 [126].

En conclusion, BRU59-21 se montre intéressant comme marqueur de l'hypoxie tumorale, avec cependant une faiblesse au niveau abdominal due à sa lipophilie diminuée mais encore trop importante.

▪ AK2123 cyclam

La lipophilie apparaît donc comme l'inconvénient majeur. L'accent a alors été mis sur ce point pour le développement des futurs traceurs, ce qui aboutit au ^{99m}Tc -cyclam AK2123, à la lipophilie dix fois plus faible que celle du ^{18}F MISO, laissant espérer une neurotoxicité très diminuée comparée à ce dernier [127]. AK2123 est en effet un radiosensibilisant beaucoup moins neurotoxique que le misonidazole *in vivo* [128], et ne présente pas non plus d'effets secondaires graves [129]. Ce produit faisait l'objet d'essai clinique de phase I [130].

AK2123 n'est pas exactement un nitroimidazolé, c'est un nitrotriazolé. Il ne comporte pas intrinsèquement de groupements capables de chélater le technétium, un dérivé cyclam lui a donc été greffé et lui autorise une stabilité à température ambiante de 3 heures.

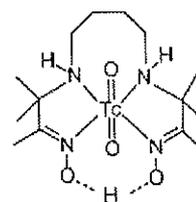
Linder avait montré en 1992 que l'accumulation de BMS181321 au sein des cellules tumorales hypoxiques était le fait d'une réduction enzymatique du groupe nitro, en l'absence d' O_2 [80]. Un phénomène identique pourrait se produire pour ce composé.

Les études de biodistribution montrent qu'il est doublement excrété par les systèmes rénaux et hépatiques. Cependant, l'importance de son excrétion hépatobiliaire rend délicate toute visualisation de tumeur dans la région abdominale, à l'image du BMS181321 ou encore du BRU59-21 [126]. Les résultats obtenus *in vivo* en termes de biodistribution donnent un important rapport tumeur/muscle de 8,5 à 5 heures post injection. Enfin, lors d'une comparaison avec ^{125}I -IAZG, ^{99m}Tc -cyclamAK2123 a montré un rapport tumeur/muscle de 18, contre 20 pour l'IAZG, prouvant ainsi son aptitude à devenir un agent d'imagerie de l'hypoxie tumorale. Son coefficient de partage de 0,1, inférieur à ceux de BMS181321, BRU59-21, IAZG et HL-91, vient encore appuyer ^{99m}Tc -cyclamAK2123 dans cette indication.

▪ HL91

HL91 est un butylèneamine oxime technétié. A l'image de AK2123, ce n'est pas non plus un nitrimidazolé. Il est rapporté que la fixation spécifique des traceurs technétiés au niveau des zones d'hypoxie serait en partie due aux propriétés intrinsèques du ^{99m}Tc [131].

Sa fixation au niveau de cellules hypoxiques *in vivo* et *in vitro*, chez un modèle animal de cancer pulmonaire humain et pour une lignée cellulaire de cancer pulmonaire murin, tous deux connus pour présenter des cellules



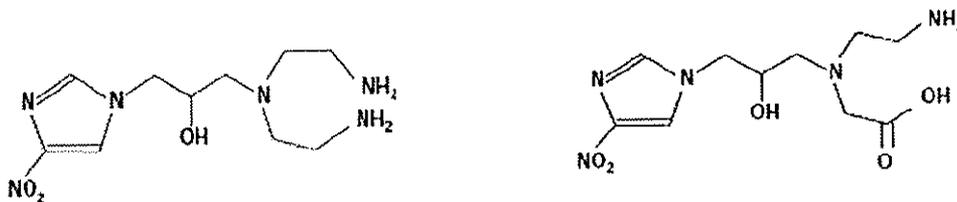
hypoxiques, a été investiguée par Lee *et al.* [132]. Pour favoriser le caractère hypoxique de la tumeur, l'oxygénation est chimiquement réduite par l'adjonction d'hydralazine. A la scintigraphie, les résultats montrent une fixation tumorale significativement supérieure (4 à 16 fois) du $^{99m}\text{Tc-HL91}$ sous conditions hypoxiques. La biodistribution de ce traceur montre une localisation préférentielle au niveau hépatique, et une très faible présence cérébrale. L'adjonction d'hydralazine, qui a augmenté la fixation tumorale de $^{99m}\text{Tc-HL91}$, n'a cependant pas modifié la captation de ce traceur dans les tissus sains, à l'exception du foie. La scintigraphie montre également l'augmentation constante de la fixation avec le temps. L'autoradiographie met en évidence une fixation strictement périphérique du traceur ce qui indique que les cellules hypoxiques se situent surtout en périphérie de la masse tumorale en grande partie composée de cellules nécrosées, ces dernières présentant une localisation centrale.

L'hypoxie peut avoir un impact non négligeable sur la captation cellulaire de divers éléments, et notamment les marqueurs utilisés en imagerie. Kinuya a donc cherché quelle pouvait être l'influence de l'hypoxie sur ces phénomènes de captation cellulaire, utilisant pour cela le complexe $^{99m}\text{Tc-HL91}$ comme marqueur de l'hypoxie. Il s'agit là d'une des rares études déterminant l'hypoxie à l'aide d'un marqueur autre que $^{18}\text{FMISO}$. Leur technique de référence pour objectiver la pO_2 tissulaire restait cependant la mesure par microélectrode. Le $^{99m}\text{Tc-sestamibi}$ et le ^{201}Tl jouaient le rôle de marqueur témoin de l'influence de l'hypoxie. Comme ce fut le cas pour l'étude de Lee, l'hypoxie tissulaire a été artificiellement accrue par injection d'hydralazine. Il a vérifié d'une part que l'hydralazine était bien responsable d'une diminution de la pO_2 tissulaire, mais a découvert d'autre part l'influence extrêmement importante que pouvait avoir l'hypoxie sur la fixation de $^{99m}\text{Tc-sestamibi}$ dans le cas présent et donc sur l'interprétation d'un examen scintigraphique. Il rapporte notamment des diminutions de fixation de 30 et 60 % pour le sestamibi et le thallium respectivement. Par contre à l'inverse, ils montrent clairement l'intérêt potentiel du complexe $^{99m}\text{Tc-HL91}$ comme marqueur de l'hypoxie, car ce produit voit sa fixation augmentée de 170 % dans cette étude [133].

$^{99m}\text{Tc-HL91}$ présente donc une fixation intéressante et sélective au niveau des zones tumorales hypoxiques, *in vitro* et *in vivo*. Cette fixation, *in vitro*, est cependant fonction du temps. Elle est identique pour les lignées humaines et animales, et peut être accrue via l'administration d'hydralazine. Cela montrent que $^{99m}\text{Tc-HL91}$ permet non seulement de mettre en évidence l'hypoxique d'une tumeur mais également de la quantifier. D'après Siim *et al.* [134], il peut également servir à l'évaluation de l'efficacité des thérapeutiques anti-angiogéniques.

▪ *NIM-DETA, NIM-N2-Ac2* :

De nombreux composés marqués au technétium ont donc été étudiés (BMS181321, BRU59-21...) [135, 136]. Deux nouveaux traceurs potentiels de l'hypoxie tumorale ont été évalués, le NIM-DETA (gauche) et le NIM-N2-Ac2 (droite), marqués au ^{99m}Tc à l'aide du coeur tricarbonyl $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Le but de cette évaluation était de savoir si la



présence de ce chélateur chargé pouvait être compatible avec un passage intracellulaire, et donc un marquage de l'hypoxie tumorale.

Le NIM-DETA, composé nitroimidazolé technétié, doté d'un très faible coefficient de partage de 0,032, se révèle très hydrophile. Ce caractère est confirmé par des tests de fixation montrant un taux négligeable de pénétration cellulaire (0,09 à 0,63%). Il ne répond par conséquent pas aux critères de sélection d'un traceur. Il a donc été modifié par la greffe d'un groupement carboxyl COO^- en lieu et place du groupement amine NH_2 . Il en résulte une molécule neutre, et non plus chargée, d'où une hydrophilie diminuée et un coefficient de partage relevé qui se rapproche de ceux de $^{18}\text{FMISO}$ et $^{18}\text{FETNIM}$. La fixation cellulaire importante (jusqu'à 2,5%) vient confirmer les résultats attendus selon le coefficient de partage.

Le $^{99m}\text{Tc-NIM-N2-Ac}$ est un dérivé 4-nitroimidazole stable sur 24 heures, aussi bien en solution à température ambiante, que dans du sérum humain ou murin à 37°C . Il montre une fixation cellulaire non négligeable avec fixation préférentielle dans les cellules hypoxiques. Des tests supplémentaires sur d'autres lignées cellulaires moins sensibles aux conditions expérimentales seraient intéressants pour confirmer les résultats de ce nouveau candidat potentiel au marquage de l'hypoxie tumorale [137].

▪ *Complexe tricarbonyl-4-nitrobenzyl technétié*

Les traceurs technétiés découverts présentent tous des potentialités intéressantes, mais aucun n'est parvenu à s'imposer en tant que référence parmi les marqueurs de l'hypoxie. Pour cette raison, l'équipe de Giglio, en 2008, a cherché à synthétiser un nouveau radio-traceur technétié de l'hypoxie tumorale [138]. Un pharmacophore bioréductible, le 4-nitrobenzyl, a été associé à un chélateur tricarbonyle permettant la fixation du technétium. Ce produit a

ensuite testé d'abord chez la souris saine, puis sur d'autres souris porteuses de sarcome, connu pour présenter des tumeurs à haut degré d'hypoxie.

Chez la souris saine, la biodistribution montre une clairance rapide de ce complexe, avec une élimination à la fois hépatobiliaire et urinaire. Le modèle de sarcome montre une faible fixation, probablement due à la faible lipophilie du produit. Cependant, la clairance sanguine étant relativement rapide, le rapport tumeur/muscle devient intéressant dès 2 heures post injection.

Ce marqueur présente donc de bonnes dispositions, avec une lipophilie moyenne et une bonne stabilité. Sa synthèse permet une pureté radiochimique supérieure à 90%. Cependant, et malgré le rapport tumeur/muscle favorable dès 2 heures post injection, la fixation tumorale reste insuffisante pour la réalisation d'image. Ce travail qui ouvre une nouvelle voie de synthèse, ne doit donc être considéré que comme un point de départ dans la réalisation d'un nouveau marqueur technétié de l'hypoxie tumorale.

Le chélateur tricarbonyle est à nouveau étudié dans un travail ne remettant pas en cause sa présence, indispensable, au sein du complexe technétié, mais plutôt sa position, au moins l'influence que pourrait avoir celle-ci sur les propriétés du complexe. Cette étude explore également les potentialités d'un produit conçu sur la base d'un 5-nitroimidazole non substitué, non encore connues. Madhava, qui effectue ce travail sur un modèle murin, ne montre pas d'avantage significatif à utiliser le 5-nitrimidazole non substitué plutôt que le même produit substitué, que se soit en termes de rapport tumeur/muscle, de captation ou de fixation tumorale. Le nouveau complexe présente même une lipophilie un peu plus importante responsable d'une diminution de la clairance hépatique, ce qui est dommageable pour l'imagerie abdominale [139].

• Autre marqueur technétié

Yang *et al.* [140] ont synthétisé un marqueur technétié à base de métronidazole, le $^{99m}\text{Tc-EC-MN}$, l'éthylène dicystéine jouant le rôle de chélateur. Ils ont observé chez le rat la distribution de leur traceur au sein de tumeur mammaire. Leurs données sont ensuite comparées aux résultats obtenus avec l'éthylène dicystéine technétiée seule, qui joue le rôle de témoin, le $^{18}\text{FMISO}$ et le $^{131}\text{I-MISO}$. La biodistribution de leur marqueur montre une augmentation des rapports tumeur/sang et tumeur/muscle au cours du temps, alors que $^{99m}\text{Tc-EC}$ connaît une évolution inverse. De plus, les ratios tumeur/muscle de $^{99m}\text{Tc-EC-MN}$ et de $^{131}\text{I-MISO}$ à 2 et 4 heures ne présentent pas de différence significative et sont supérieurs à celui de $^{18}\text{FMISO}$. Les auteurs démontrent ainsi tout le potentiel du métronidazole technétié pour l'imagerie de l'hypoxie tumorale.

La recherche de radio-traceurs technétiés capables de cibler l'hypoxie tumorale n'a pas plus d'une vingtaine d'années. Elle a tout de même permis la découverte de nombreuses molécules dont une dizaine présente des potentialités d'usage diagnostique. HL91 est apparu comme l'une des plus aptes à diagnostiquer l'hypoxie tumorale. Les études le concernant ont permis de mettre en évidence le rôle fondamental de potentiel d'oxydoréduction dans sa rétention cellulaire, ainsi que l'influence du chélateur sur ce potentiel. Il s'est montré capable de mettre en évidence l'hypoxie dans les essais *in vivo* et *in vitro*, mais aussi de la quantifier. Les auteurs ont même envisagé une application dans l'évaluation de traitements anti-angiogéniques. Les travaux de Giglio en 2008 [138] montrent que le domaine des marqueurs technétiés fait toujours l'objet d'actives recherches.

La structure nitroimidazole s'est vue modifiée dans le but d'optimiser son coefficient de partage. Le misonidazole, en effet, présente une importante lipophilie responsable d'un bruit de fond élevé. Une deuxième génération de marqueurs a donc vu le jour, il s'agit de la série des azomycines.

La plupart de ces marqueurs ont montré des capacités dans le marquage de l'hypoxie tumorale. Mais de nombreux facteurs tels que la taille de la tumeur, ou encore sa nature, ont révélé leur impact sur la fixation des radio-traceurs, comme nous en reparlerons dans la partie expérimentale de cette thèse.

Enfin, l'évaluation de thérapeutiques capables d'influencer le statut d'oxygénation d'une tumeur par le biais de marqueurs de l'hypoxie représente une nouvelle application pleine d'avenir.

II.B. Dérivés du CUIVRE

L'exploration de l'hypoxie tumorale s'est tout d'abord focalisée sur la famille des nitroimidazolés. Cependant, leur mécanisme de fixation cellulaire nécessite en général 2 heures au moins pour obtenir un rapport tumeur/bruit de fond correct. De plus la qualité des images restant incertaine, des alternatives à l'emploi des nitroimidazolés dans la détection et l'évaluation de l'hypoxie tumorale ont été recherchées. L'imagerie TEP faisant appel au cuivre constitue une nouvelle avancée [141].

II.B.1. Mécanisme de fixation

Les mécanismes de captation et de rétention cellulaire des composés cuivrés ne sont pas complètement connus. L'entrée dans la cellule pourrait s'effectuer par diffusion passive transmembranaire. L'endocytose a même été évoquée. Dans le milieu intracellulaire, Cu(II)-diacetylbis (N4-méthyl-thiosemicarbazone) ou Cu-ATSM ferait l'objet de réactions

chimiques aboutissant à son accumulation. Fujibayashi [142] propose une réduction de Cu II en Cu I dans les cellules hypoxiques spécifiquement alors que Dearling pense que cette réaction est indépendante du niveau d'O₂, et qu'elle a lieu dans toutes les cellules (Figure 23). Selon ce dernier, le niveau d'oxygénation jouerait sur la réoxydation du composé en Cu II, permettant son élimination des cellules correctement oxygénées. Dans les cellules hypoxiques, Cu I aurait donc tendance à s'accumuler.

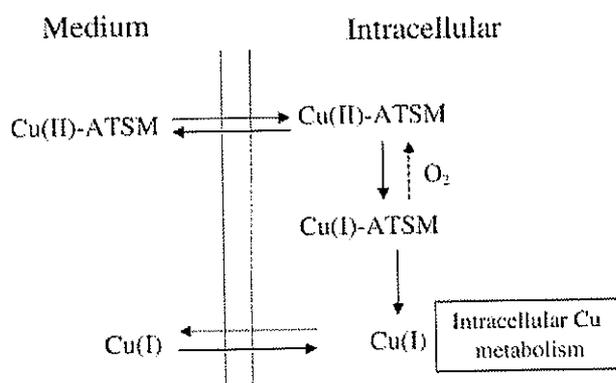


Figure 23 : Modèle de la capitation et de la rétention de ⁶⁴Cu dans les cellules au contact de ⁶⁴Cu-ATSM.

Burgman [143] propose un tout autre mécanisme de rétention. Il postule qu'après sa réduction, le cuivre serait incorporé au stock de cuivre cellulaire. Cette hypothèse présente l'avantage d'expliquer l'hétérogénéité de la fixation de Cu-ATSM en fonction du type de tumeur : en effet, le transport intracellulaire du cuivre nécessite des transporteurs spécifiques tels que Ctrl, ATP7A et B, décrits par Harris [144]. Or, la population de ces transporteurs varie selon le type cellulaire de la tumeur, et détermine donc le niveau de rétention que présentera la tumeur. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les cellules surexprimant ATP7B présentent un très faible niveau basal de cuivre avec d'importants phénomènes d'efflux.

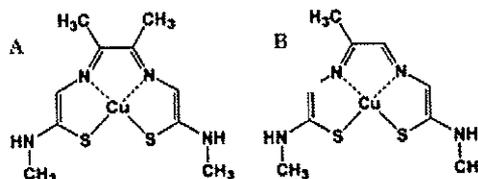
II.B.2. Structure

Différents composés à base de cuivre ont été proposés car cet élément présente plusieurs isotopes émetteurs de positon et pourrait donc être utilisé en imagerie TEP. Ces isotopes ne présentent cependant pas des périodes (quelques minutes à quelques heures) permettant de se passer d'un générateur.

Nucléide	Demi-vie (min)	Emission	Parcours moyen tissulaire du β (mm)
^{60}Cu	23,4	β^+ (93%) capture e^- (7%)	4,4
^{61}Cu	204,5	β^+ (62%) capture e^- (38%)	2,6
^{62}Cu	9,7	β^+ (98%) capture e^- (2%)	6,6
^{64}Cu	761,9	β^+ (19%) capture e^- (41%) β^- (40%)	1,4/0,95
^{67}Cu	89280	β^- (100%)	0,61

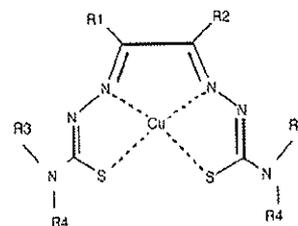
Tableau 1 : Demi-vies et modes de désintégration des principaux isotopes du cuivre.

Le traceur de perfusion sanguine Cu(II)-pyruvaldehyde-bis (N4-méthylthiosemicarbazone) ou Cu-PTSM (B) sert de modèle pour le développement des traceurs hypoxie spécifiques. C'est un composé de faible poids moléculaire, à la conformation plane, et dont la lipophilie permet un bon passage transmembranaire par diffusion passive. Il se trouve piégé dans la cellule, certainement via un mécanisme faisant appel à une réduction mitochondriale de Cu II en Cu I. Pour cibler l'hypoxie, le principe était d'avoir un composé au faible potentiel redox, ne pouvant qu'être réduit dans un environnement très réducteur, comme une cellule hypoxique par exemple.



Le Cu-ATSM (A), fut l'un des premiers marqueurs de l'hypoxie cellulaire étudiés car il présentait une forte perméabilité membranaire et un faible potentiel redox. Myerson [145] montre la captation rapide et la rétention spécifique de ce produit dans les cellules hypoxiques.

Dearling [146] a tenté de déterminer la structure de bis-thiosemicarbazone la plus sélective de l'hypoxie cellulaire en 1998. Il a synthétisé 13 composés différents, proposant diverses combinaisons de méthyle, éthyle, phényle et autres radicaux, dont il observait la fixation *in vitro* sur des lignées cellulaires de tumeur mammaire murine maintenues en atmosphère hypoxique ou normoxique pendant une heure. Il conclut de ses manipulations que le caractère sélectif du ciblage de l'hypoxie reposait sur le potentiel d'oxydoréduction, lui-même dépendant principalement des groupements alkyle et cétone. La lipophilie reste bien sur une propriété indispensable au bon passage intracellulaire du marqueur. Les groupements alkyles, principaux radicaux déterminant le potentiel redox, altèrent cependant la lipophilie du composé. Il est donc nécessaire de réaliser le meilleur compromis, suffisamment lipophile pour entrer dans la cellule, mais présentant un potentiel d'oxydoréduction suffisamment bas pour ne subir de réduction qu'au sein de cellules hypoxiques. Cu-ATSM, qui apparut comme la meilleure molécule, fut donc choisi pour la réalisation de la plupart des études.



Un avantage supplémentaire du cuivre est qu'il possède de nombreux isotopes permettent une application tant diagnostique que thérapeutique (Tableau 1). Obata montre que Cu-ATSM a le potentiel pour être un agent de radiothérapie interne, à condition d'utiliser des isotopes émetteurs β^- tels que ^{64}Cu ou ^{67}Cu , car il est capable de cibler les cellules tumorales hypoxiques résistantes aux traitements conventionnels. De plus, l'émission β^- ayant une portée dans l'eau de plusieurs centaines de microns, elle peut atteindre les cellules cancéreuses adjacentes, renforçant l'effet anticancéreux.

II.B.3. Biodistribution

La biodistribution de Cu-ATSM fait l'objet d'observations consensuelles dans la littérature (Lewis, Yuan). Une fixation précoce est observée avec un maximum à 1 minute post injection dans le cerveau et le cœur. A 40 minutes post injection, cette fixation diminue d'un facteur 3. Les reins présentent la même courbe de fixation avec une diminution plus faible à 40 minutes. Inversement, elle augmente graduellement au niveau hépatique pendant la durée de mesure, ce qui semble confirmer les hypothèses concernant le métabolisme du Cu-ATSM : élimination précoce rénale suivie d'une métabolisation hépatique. Au niveau tumoral on observe un maximum à 10 minutes post injection, avec une relative stabilité au delà. Matsumoto rapporte une localisation particulière au niveau nasal.

Le métabolisme de Cu-ATSM apparaît beaucoup plus lent chez l'homme que chez le rat, comme le décrit Laforest sur une série de 5 patients. Il peut donc être souhaitable d'employer un isotope de faible demi-vie tel que le ^{60}Cu (23 minutes) de façon à ne pas visualiser le tractus digestif lors de l'élimination du produit [147].

II.B.4. Etudes *in vitro* et pré-cliniques

Cu-ATSM a montré ses aptitudes et prouvé son efficacité au fur et à mesure des travaux le concernant.

Il fut tout d'abord étudié sur des tissus hypoxiques tels que le myocarde, et non des tissus néoplasiques. L'isotope 62 du cuivre a donc été utilisé pour évaluer l'impact de l'hypoxie cellulaire sur la rétention du Cu-ATSM au sein du myocarde de rat. ^{62}Cu -ATSM a démontré sa rétention dans le tissu hypoxique d'une part, mais également son élimination sous normoxie ou même en cas de réoxygénation. De plus, le recours au thallium 201, marqueur de la perfusion myocardique, permet d'appuyer l'hypothèse que cette dernière conditionne la délivrance de ^{62}Cu -ATSM aux tissus, et donc sa fixation [142]. Par la suite, sa fixation fut comparée à celle du ^{11}C -Acétate autre marqueur de perfusion tissulaire. Les résultats se montrèrent clairement à l'avantage de ^{62}Cu -ATSM : dans les régions de faible

fixation de l'acétate, une fixation disproportionnée de $^{62}\text{Cu-ATSM}$ est observée en comparaison avec les autres régions, pour lesquelles la fixation de l'acétate est normale [148]. Par contre, chez les rats présentant une occlusion massive du myocarde, aucune fixation n'était observée, ce qui suggère de nouveau que la perfusion sanguine est nécessaire à la délivrance du marqueur au tissu.

Fujibayashi montre donc que $^{62}\text{Cu-ATSM}$ est apte à marquer les cellules hypoxiques mais nécessite pour cela une perfusion correcte assurant sa mise à disposition.

Les liens entre la fixation de $^{64}\text{Cu-ATSM}$ et le taux d' O_2 furent précisés par les études de Lewis [149]. Sur une lignée cellulaire murine de cancer mammaire, la fixation de $^{64}\text{Cu-ATSM}$ fut inversement proportionnelle à la pression partielle d' O_2 , avec un pic à 10 minutes post injection. Ces résultats se renouvelèrent lors d'expériences sur un modèle de gliosarcome murin, dont l'oxygénation était modulée soit par administration d'hydralazine, soit par inhalation d' O_2 à 100%. La cinétique se montrait encore plus rapide, avec un pic de fixation à 80 secondes. *In vivo* une bonne corrélation est retrouvée entre la fixation de $^{64}\text{Cu-ATSM}$ et le taux d' O_2 tissulaire, déterminé au moyen d'électrodes à O_2 [150]. Lewis poursuit ses investigations, toujours chez le rat, mais il attend cette fois qu'une zone de nécrose se développe à l'issue de la période hypoxique. Il observe une nouvelle fois la fixation très supérieure de $^{64}\text{Cu-ATSM}$ en zone ischémique. Mais après que la nécrose se soit installée, il ne rapporte aucune fixation de $^{64}\text{Cu-ATSM}$, montrant ainsi que l'hypoxie, mais aussi la viabilité du tissu sont indispensables à la bonne fixation de ce marqueur, ce qui n'est pas sans rappeler le mode de fixation du $^{18}\text{FMISO}$ [151]. Enfin, il compare $^{64}\text{Cu-ATSM}$ au $^{18}\text{FMISO}$ *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales EMT6 exposées à différentes concentrations d' O_2 . Les résultats montrent une fixation augmentée des 2 marqueurs lorsque la pression tissulaire d' O_2 diminue, mais il met surtout en évidence la fixation bien supérieure du ^{64}Cu *versus* ^{18}F avec une fixation du $^{18}\text{FMISO}$ qui s'élève à 10 % de celle du $^{64}\text{Cu-ATSM}$. Ces fixations sont d'ailleurs significativement différentes à 1 heure post injection, ce qui n'est plus le cas à 2 heures, suggérant une cinétique plus rapide du $^{64}\text{Cu-ATSM}$.

Lewis montre donc toute la capacité de $^{64}\text{Cu-ATSM}$ pour marquer l'hypoxie mais également la rapidité de sa cinétique, sur son modèle d'étude.

Par la suite, différentes lignées cancéreuses ont été étudiées chez le rat, R3327-AT (tumeur prostatique murine) et FaDu (carcinome humain). O'Donoghue compare les distributions et l'évolution de la fixation dans le temps de $^{64}\text{Cu-ATSM}$, $^{18}\text{FMISO}$, pimonidazole et Hoechst-33342, un marqueur fluorescent de perfusion. Il obtient des résultats divergeant en termes de distribution et de cinétique, montrant une corrélation imparfaite avec la concentration cellulaire d' O_2 . Il conclut que, d'une part, le type cellulaire de la tumeur revêt

une importance particulière pour la fixation des marqueurs, mais aussi d'autre part que la faible perfusion sanguine des zones hypoxiques pourrait être en partie responsable d'une cinétique ralentie [152].

Une expérience similaire a été menée pour explorer la distribution microscopique de l'hypoxie en comparant ^{18}F -EF5 avec des autoradiographies au ^{64}Cu -ATSM sur 3 lignées cellulaires différentes, un gliome, un adénocarcinome mammaire et un fibrosarcome. A 1 heure post injection, une corrélation est retrouvée entre ^{64}Cu et ^{18}F -EF5 chez le gliome et l'adénocarcinome, avec un meilleur contraste du ^{64}Cu -ATSM *versus* ^{18}F MISO sur ces images précoces. La comparaison avec le pimonidazole ou CA9 en IHC fournit des résultats similaires. La fixation de ^{64}Cu -ATSM ne s'est vue augmentée dans le fibrosarcome qu'au niveau des zones correctement perfusées, mises en évidence par le marqueur fluorescent Hoechst. Ceci conduit à penser, comme l'avait conclu Fujibayashi, que le flux sanguin représente le mécanisme dominant responsable de la distribution de ^{64}Cu -ATSM, dans ce type de tumeur. La fixation du cuivre au sein du fibrosarcome, lorsqu'elle eut lieu, s'est montrée bien plus intense que dans les autres types de tumeurs. Les résultats, significatifs, donnaient la SUV du fibrosarcome supérieure à celle du gliome, elle-même supérieure à celle de l'adénocarcinome. Le potentiel d'oxydoréduction très bas du type cellulaire du fibrosarcome aurait sa part de responsabilité dans la fixation plus élevée de ^{64}Cu -ATSM, malgré un niveau d'hypoxie équivalent aux autres. Le niveau de ce potentiel s'explique car le fibrosarcome est une tumeur montrant un important métabolisme responsable d'une forte consommation de glucose [153]. A l'image du mécanisme de fixation des nitroimidazolés, le potentiel d'oxydoréduction de la cellule joue donc un grand rôle dans la rétention du ^{64}Cu -ATSM. L'influence du type cellulaire est une nouvelle fois démontrée. La spécificité tumorale de la fixation du ^{64}Cu -ATSM va être démontrée une fois de plus par Matsumoto dans une étude sur un modèle de carcinome murin [154].

^{64}Cu -ATSM sert enfin de marqueur de l'hypoxie dans l'étude de Tanaka [155] qui comparait les fixations de ^{64}Cu -ATSM et ^{18}F FDG, chez la souris, sur quatre types de tumeur : LLC1, Meth-A, B16 et colon26. Il a montré que, quelle que soit l'origine de la tumeur, il y avait : une corrélation négative entre la fixation de ^{64}Cu -ATSM et la densité vasculaire (corrélation positive pour le ^{18}F FDG) ; une corrélation positive entre la fixation de ^{64}Cu -ATSM et le nombre de cellules apoptotiques (corrélation négative pour le ^{18}F FDG) ; une absence d'accumulation du cuivre, comme du ^{18}F FDG, un centre de la tumeur où règne la nécrose ; des zones de fixation différentes pour les deux marqueurs. Ses résultats montrent que la tumeur est organisée en couches successives en regard de la fixation des radio-traceurs : le centre nécrotique ne présente pas de fixation ; la couche intermédiaire, avec une forte densité

vasculaire, une importante prolifération cellulaire et peu de cellules apoptotiques, correspond à la zone de fixation du ^{18}F FDG ; la couche la plus externe faiblement vascularisée, avec des cellules en arrêt de cycle en phase G0 ou G1, et quelques cellules apoptotiques, où se fixe le ^{64}Cu -ATSM. Il montre donc qu'au sein d'une même tumeur coexistent plusieurs phénotypes cellulaires, pouvant être différenciés par des traceurs tels que le ^{18}F FDG ou le ^{64}Cu -ATSM. La tumeur étant formée par une seule lignée cellulaire, les différents phénotypes doivent provenir de l'adaptation des cellules tumorales aux conditions délétères (hypoxie, malnutrition). Or, les radio et chimiothérapies sont efficaces contre les cellules normoxiques en division des tumeurs malignes, mais beaucoup moins contre les cellules hypoxiques ayant bloqué leur cycle. L'étude de Tanaka implique donc que les cellules qui fixent le ^{18}F FDG sont sensibles aux traitements, à l'inverse de celles fixant le cuivre, montrant de ce fait toute l'importance que pourrait jouer ^{64}Cu -ATSM dans le choix de la stratégie thérapeutique à adopter.

Ces études précliniques montrent finalement que le Cu-ATSM peut être employé comme marqueur de l'hypoxie au sein de certains types tumoraux. La plupart des études réalisées sont conduites chez la souris, un important travail chez l'homme reste à mener pour affiner l'évaluation de ce produit en pratique clinique.

II.B.5. Etudes cliniques

Les études cliniques sur le Cu-ATSM sont encore très peu nombreuses.

Dehdashti étudie la relation entre l'intensité de la fixation de ^{60}Cu -ATSM et la réponse aux traitements [156, 157]. Il a montré qu'il existe une corrélation entre une forte fixation (rapport tumeur/muscle > 3,5) et la tendance à la récurrence chez des patientes atteintes de cancers du col utérin. De plus, les survies sans progression et globales se trouvent significativement supérieures lorsque ce rapport est < 3,5. Des résultats similaires et significatifs se retrouvent chez 19 sujets présentant un cancer pulmonaire non à petite cellule, ce qui indique que ^{60}Cu -ATSM pourrait non seulement être un bon marqueur de l'hypoxie, mais également un important indicateur pronostique [158]. En comparaison, les SUV obtenues avec le ^{18}F FDG ne permettaient pas de discriminer les patients.

Le Cu-ATSM apparaît donc comme un marqueur à l'avenir prometteur malgré son hétérogénéité de fixation fonction du type tumoral. Si les résultats des études précliniques se montrent relativement variables, ceux des études cliniques permettent en revanche de prédire correctement la réponse aux traitements. Une meilleure compréhension de ses mécanismes de fixation est toutefois nécessaire à l'évaluation de son potentiel comme marqueur de l'hypoxie tumorale.

II.C. Anticorps

En 2003, une autre approche du ciblage de l'hypoxie tumorale est explorée, avec le développement d'anticorps monoclonaux anti CA9, cible déjà utilisée en IHC [159]. Le principe est de marquer l'hypoxie via un mécanisme indirect, reposant sur la présence de protéines induites par l'hypoxie, et non sur la pO_2 intracellulaire. La mise en évidence de la protéine CA9, fréquemment exprimée dans les carcinomes humains et absente du tissu sain, peut potentiellement permettre de détecter l'hypoxie.

II.C.1. M75

L'anticorps utilisé est le M75, marqué à l'iode 125. Les auteurs ont évalué la capacité de ciblage ainsi que la pharmacocinétique de ^{125}I -M75 chez la souris, sur un modèle de carcinome colorectal humain. Ils ont montré que cet anticorps, après administration intraveineuse, cible spécifiquement les cellules exprimant CA9, et que sa distribution intratumorale périnécroscopique est compatible avec la localisation attendue de ces cellules. Ce travail préliminaire démontre la faisabilité d'une nouvelle méthode non invasive de détection de l'hypoxie tumorale, mais nécessite de plus amples investigations avant une utilisation en clinique.

II.C.2. ^{124}I -cG250

Lawrentschuk *et al.*, en 2009 [160], ont également investigué l'hypoxie tumorale par le marquage d'un autre anticorps anti CA9, le cG250, marqué par un émetteur de positon, l'iode 124. A la différence de l'équipe de Chrastina, pour qui il était sous-entendu que les cellules exprimant CA9 étaient hypoxiques, l'équipe de Lawrentschuk a tenté de corréler la fixation de ^{124}I -cG250 à l'hypoxie, et donc d'étudier la relation entre l'expression de CA9 et l'hypoxie, dans un modèle murin de carcinome cellulaire rénale humain. Ils ont préalablement caractérisé l'hypoxie au moyen d'électrode à O_2 qui leur a permis d'observer une pO_2 musculaire de 35 *mmHg* significativement supérieure à la pO_2 tumorale de 5 *mmHg*. Les résultats indiquent une très bonne fixation de ^{124}I -cG250 dans la tumeur signalant la forte expression de CA9 dans le carcinome cellulaire rénale. Aucune corrélation n'est cependant retrouvée entre cette fixation et les paramètres d' O_2 .

Ces derniers résultats signifient que l'expression de CA9 n'est pas corrélée à l'hypoxie dans ce modèle, et appuie l'hypothèse que des lignées cellulaires peuvent déroger aux mécanismes connus d'adaptation à un environnement hypoxique. Ce problème est partiellement résolu en IHC en couplant plusieurs anticorps qui ont des cibles différentes.

Au vu des études menées sur ces nombreux radio-traceurs, il paraît peu probable qu'actuellement un seul d'entre eux permette d'évaluer l'hypoxie dans tous les types de tumeur [91, 95]. En effet, l'hypoxie n'est pas le seul phénomène influençant la fixation du traceur, son accumulation dépendant de paramètres variables selon le type tumoral, comme le pH, l'équipement enzymatique, le potentiel d'oxydoréduction... De plus, les caractéristiques des molécules telles que la taille, la lipophilie ou la charge, interviennent lors de l'entrée dans la cellule.

EVALUATION de L'HYPOXIE TUMORALE par L'IMAGERIE au ¹⁸FMISO sur deux MODELES TUMORAUX chez le RAT

Le recours aux modèles animaux de tumeur solide est indispensable pour étudier la biologie tumorale, et en particulier son caractère hypoxique. La compréhension des interactions tumeur-environnement nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux *in vivo* les plus proches possibles des tumeurs observées en clinique. Plusieurs modèles expérimentaux sont développés par l'équipe EA4021 « Biomolécules et Thérapie Antitumorales ». Pour une expérience préliminaire destinée à explorer la distribution de l'hypoxie au sein des lésions tumorales, nous avons choisi deux modèles tumoraux chez le rat non immunodéprimé : un modèle de cancer pulmonaire et un modèle d'ostéosarcome. En effet ces tumeurs sont décrites pour être hypoxiques. De plus, elles présentent un développement similaire à ce qui est observé chez l'homme et en particulier l'apparition de métastases [161, 162].

Les objectifs de l'étude sont l'évaluation et le suivi de l'hypoxie tumorale dans les deux modèles par imagerie. Nous explorons pour cela la distribution des traceurs ¹⁸FDG et ¹⁸FMISO au sein des tumeurs et des métastases.

I. Matériel et méthode

I.A. Modèle animal

Nous avons étudié dans ce travail deux types de lésions tumorales : des tumeurs pulmonaires d'évolution naturelle, induite par l'administration de deux carcinogènes, et des ostéosarcomes greffés selon deux modalités. Les animaux étaient tous des rats Sprague Dawley mâles, variété OFA, immunocompétents (centre d'élevage Depré, Saint Doulchard, France). Toutes les procédures de soins et les procédures chirurgicales menées chez les rats l'ont été en accord avec le guide de la Communauté Européenne pour l'utilisation des animaux d'expérimentation.

I.A.1. Lésions tumorales pulmonaires

Cette variété de rats a été retenue pour notre étude car ces animaux présentent une incidence faible de 0,7% de cancers pulmonaires spontanés.

Les lésions pulmonaires étaient obtenues chez les rats après exposition de ceux-ci aux carcinogènes que sont le gaz radon radioactif et le tabac. Cette exposition est connue pour induire des adénocarcinomes pulmonaires, des tumeurs épidermoïdes, et de façon plus rare des tumeurs composites et des carcinomes bronchiolo-alvéolaires, mais pas de cancer à petites cellules [163].

Pour l'exposition au radon, les rats étaient placés dans une chambre d'inhalation (Figure 24) permettant le contrôle quantitatif du mélange gazeux à inhaler. La source de radon était constituée d'uranium 238 et de thorium 232. Le radon produit, après dilution adéquate, était dirigé vers les chambres d'inhalation de façon à obtenir une concentration de 1 à 400 MBq/m³.

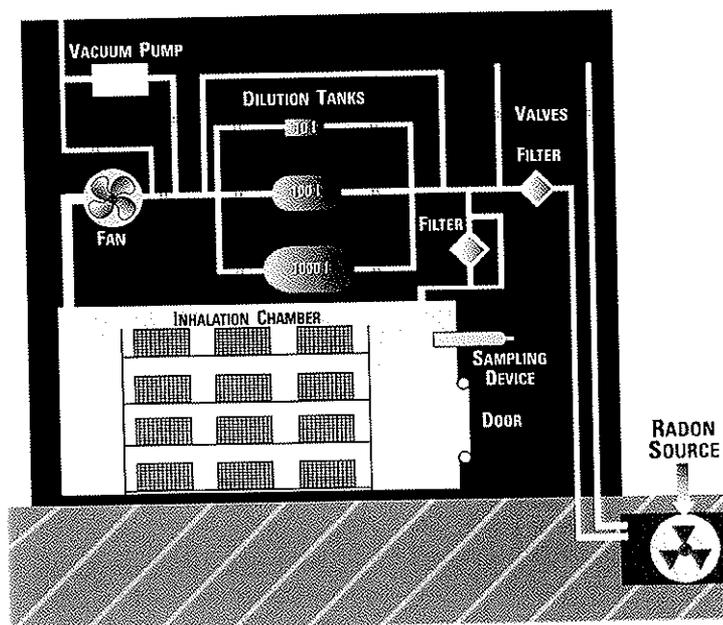


Figure 24 : Schéma simplifié des chambres d'inhalation du radon.

Les doses de radon reçues étaient exprimées en Working Level Months (WLM), qui correspond aux doses cumulées de radon, auxquelles furent exposés les travailleurs des mines d'uranium, et pour lesquels, il a été décrit une augmentation de l'incidence des carcinomes pulmonaires, corrélée à l'exposition au radon [163].

L'exposition au tabac correspondait à un tabagisme passif. La fumée de 15 cigarettes était envoyée, via un système de dépression, jusqu'à la chambre d'inhalation des rats (Figure 24). A l'issue de chaque période d'exposition, un renouvellement de l'air était effectué afin de soustraire les rats à cette atmosphère viciée.

Deux groupes de 25 rats ont été constitués, le premier exposé au radon seul à la dose de 1600 WLM dès l'âge de 9 semaines et pendant 2 mois (rats MC ou MD), le deuxième exposé de la même façon au radon, puis au tabac pendant 350 heures réparties sur deux mois (rats BM). L'apparition de lésions pulmonaires était détectée par des TDM de dépistage sur l'ensemble des rats exposés, et ce de façon périodique. Les rats présentant des nodules pulmonaires ont ensuite été sélectionnés, afin de réaliser les examens TEP avec différents radio-traceurs.

Parmi les rats que nous avons étudiés plus précisément, BM22-1 et 29-3 ont été exposés au radon puis au tabac et MC34-1 au radon seul.

I.A.2. Ostéosarcomes

L'ostéosarcome a été initialement induit par une injection locale de colloïde radioactif à base de Cérium 144 [164-166]. Pour obtenir une greffe tumorale, de petits fragments de tumeur de 50 mm³ étaient échantillonnés à partir d'une aire ostéogénique hyperproliférative et conservés à -80°C. Après décongélation, ces fragments étaient greffés soit en intrafémoral, soit en position paratibiale, après abrasion périostée.

La greffe osseuse a été réalisée le 25/05/2009 sur des animaux âgés de 3 semaines:

- les rats de la série « rouge » ont été greffés en intrafémoral (modèle en cours d'évaluation)

- les rats de la série « noir » ont été greffés en péritibial (modèle déjà publié [164-166]).

De façon générale, les expériences conduites sur les animaux l'ont été sous anesthésie générale avec un mélange gazeux d'isoflurane (AERANE[®], Baxter, Lessines, Belgique).

La croissance tumorale était régulièrement évaluée par palpation et imagerie TDM.

I.B. Traceurs

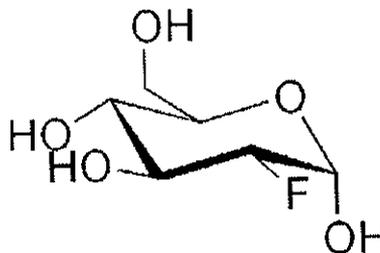
La synthèse de traceurs fluorés nécessite un automate (Figure 25) entièrement commandé à distance et des équipements lourds de radioprotection. Les deux traceurs employés lors de nos travaux sont le fluorodésoxyglucose et le fluoromisonidazole, tous deux marqués par un émetteur de positon : le fluor 18.

Le ¹⁸FDG, médicament radiopharmaceutique déjà commercialisé, a été gracieusement fourni par les laboratoires CYCLOPHARMA, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire - France.

La mise au point de la synthèse du ¹⁸FMISO a été réalisée à Toulouse en collaboration avec l'équipe de l'EA 3033 « Radiopharmaceutique et traitement de l'image » (Laboratoire de Biophysique, 133 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex).

I.B.1. ^{18}F FDG

Le ^{18}F FDG est le traceur le plus utilisé en imagerie TEP en routine clinique. Analogue du glucose, il se fixe spécifiquement dans les cellules en fonction de leur activité métabolique. En bref, il est utilisé comme traceur en oncologie, en marquant les cellules cancéreuses qui consomment plus de glucose que les cellules saines environnantes. En effet les cellules tumorales ont une accélération du métabolisme glucidique et une augmentation du nombre de récepteur de surface au glucose [167].



Le ^{18}F FDG n'est toutefois pas spécifique des cellules néoplasiques. Il cible toutes les cellules en hypermétabolisme glucidique, quelle qu'en soit leur origine : infection, inflammation, activité musculaire... De plus, la captation du ^{18}F FDG varie en fonction du type histologique. Les hépatocarcinomes, les adénocarcinomes de la prostate et les adénocarcinomes mucineux sont connus pour fixer de façon faible ou nulle le ^{18}F FDG.

Depuis la généralisation de l'utilisation clinique du ^{18}F FDG, la recherche s'est intéressée au développement de nouvelles molécules utilisables dans d'autres indications métaboliques comme l'hypoxie cellulaire.

I.B.2. ^{18}F FMISO

Le ^{18}F FMISO est un des marqueurs de l'hypoxie tumorale le plus étudié en imagerie fonctionnelle. Il est le mieux connu et fait d'ailleurs l'objet de 3 PHRC multicentriques français en cours sur les gliomes, l'œsophage et les cancers colorectaux (Registre des essais cliniques français en cancérologie d'après l'INCa en 2009). Comme nous l'avons expliqué plus haut, le ^{18}F FMISO dérive du misonidazole, 2-nitroimidazolé initialement utilisé pour ses propriétés de radiosensibilisant. Sa synthèse fait appel à un automate commandé à distance.

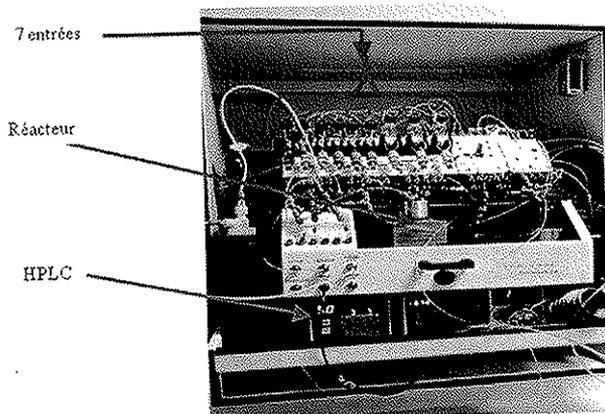


Figure 25 : Automate de synthèse : Synchrom R&D.

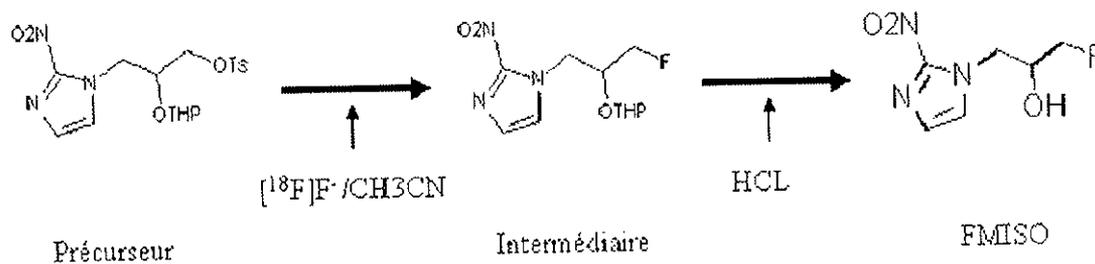


Figure 26 : Principe de synthèse du ^{18}F MISO.

Le précurseur (Figure 26) est le 1-(2'-nitro-1'-imidazolyl)-2-O-tetrahydropyranyl-3-O-toluenesulfonyl-propanediol, l'intermédiaire fluoré le 1-(2'-nitro-1'-imidazolyl)-2-O-tetrahydropyranyl-3-fluoro-propanediol. La dénomination chimique complète du ^{18}F MISO est : [18F] 3-fluoro-1-(2'-nitro-1'-imidazolyl)-2-propanol.

I.C. Le TEP-TDM

Les deux traceurs ^{18}F FDG et ^{18}F MISO étaient étudiés sur un même type de caméra TEP. La TEP-TDM est une combinaison d'une TEP et d'un scanner X ou TDM associés dans une même machine dite machine hybride. Le TDM utilise les rayons X pour analyser les diverses densités des tissus de l'organisme. Les résultats sont donnés sous formes de coupes anatomiques infra-millimétriques. Le TDM permet de faire un repérage anatomique et donne aussi une cartographie des coefficients tissulaires pour calculer des corrections d'atténuation des signaux détectés en TEP. Il est habituel de réaliser de acquisition TDM sans puis après injection de produit de contraste. Dans l'exploration animale, la mise en œuvre de la séquence injectée s'avère particulièrement complexe : mise en place de voie veineuse, injection pendant l'acquisition nécessitant un dispositif commandé à distance et multiplication des injections du radio-traceur et du produit de contraste...

Deux techniques d'imagerie humaine ont donc été utilisées, mais ont été réalisées sur la même machine hybride TEP/TDM Biograph 6 de Siemens Médical imaging systems (Knoxville, Tennessee). Les paramètres d'acquisition ont été optimisés pour l'exploration de petits animaux.

D'un point de vue pratique, l'acquisition se déroulait de la façon suivante. Les rats anesthésiés étaient positionnés en procubitus, recouverts d'une couverture pour maintenir une température optimale. Après un positionnement à l'aide d'un topogramme (50 mA, 80 kV), il était réalisé une acquisition TDM corps entier (130 mAs, 80 kV) en mode hélicoïdal avec un pitch de 0,6 mm en direction cranio-caudale soit une durée d'acquisition de l'ordre de 90 s. Un même type de reconstruction était systématiquement réalisé pour les coupes TDM: en rétroprojection filtrée avec un filtre 80s « very sharp ». Le volume entier des animaux était

reconstruit avec 557 coupes de 0,5 mm d'épaisseur en matrice 512 x 512, visualisées avec une échelle de couleur « Baby abdomen ».

L'imagerie débutait par l'acquisition TDM, puis elle était suivie de l'acquisition TEP. Le temps d'acquisition pour la TEP était de 3 à 4 minutes par champ d'exploration avec un maximum de 2 positions de lit, ce qui correspondait à un temps d'acquisition maximum total de 8 minutes maximum. Les données étaient reconstruites par méthode itérative (8 itérations et 16 subsets) avec un post-filtrage avec un filtre gaussien de 0,1 mm. Les coupes étaient reconstruites en matrice 336 x 336 avec un zoom de 2. Les coupes TEP et TDM étaient fusionnées automatiquement pour visualisation et interprétation.

I.D. Imagerie

I.D.1. Injection

Les injections de radiopharmaceutiques sont réalisées sous anesthésie générale, avec un mélange de 1% à 3% d'isoflurane dans 100% d'O₂ (4 L/min), en intracardiaque directe. Les animaux étaient laissés à jeun au moins 6 heures avant l'administration de ¹⁸FDG, et non à jeun pour les examens au ¹⁸FMISO car ce dernier n'emprunte pas les voies métaboliques de l'énergie pour pénétrer dans la cellule. Les activités injectées à chaque rat étaient de 22 MBq à 37 MBq (600 µCi à 1 mCi). Les boissons étaient laissées accessibles *ad libitum*.

I.D.2. Acquisition au ¹⁸FDG

L'imagerie était réalisée de 2 heures après l'injection du ¹⁸FDG en intracardiaque. Au moment du passage sous caméra les rats étaient anesthésiés avec un mélange de 1% à 3% d'isoflurane (AERANE[®], Baxter, Lessines, Belgique) dans 100% d'O₂ (4 L/min), en utilisant un appareil d'anesthésie Minerve (Ethernay, France).

I.D.3. Acquisition au ¹⁸FMISO

Les rats n'étaient pas laissés à jeun. L'imagerie était réalisée de 2 à 3 heures après l'injection du ¹⁸FMISO. Le passage en caméra était réalisé selon les mêmes modalités que pour le ¹⁸FDG.

II. Résultats

II.A. Différents paramètres

Les tumeurs étaient dépistées par TDM et les examens TEP réalisés uniquement sur les animaux malades sélectionnés. Le suivi longitudinal par TEP a été limité par la disponibilité des radio-traceurs (les synthèses de ^{18}F MISO n'étant réalisées que quelques jours par mois).

Chaque examen TEP fournissait des données métaboliques correspondant à la fixation tumorale du marqueur, qui peut être exprimée en volume métabolique, intensité et distribution. Les images en coupe nous renseignaient sur l'existence et la distribution de l'hypoxie, et l'apport du ^{18}F FDG nous permettait d'apprécier l'activité métabolique de la tumeur. Les paramètres métaboliques ont été comparés aux données anatomiques obtenues en TDM. Les mesures TDM des diamètres et des ellipsoïdes tumoraux nous permettaient d'estimer la cinétique de croissance et le temps de doublement tumoral (TDT).

Les mesures des diamètres étaient effectuées de façon unidimensionnelle, sur les coupes coronales pour les ostéosarcomes et sur les coupes axiales pour les localisations pulmonaires (Figure 37).

La mesure des ellipsoïdes (Equation 2) permet le calcul du volume à partir des trois rayons des trois directions de l'espace (Figures 26 et 27).

La volume est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{4}{3} \times \pi \times R^3 \rightarrow \frac{4}{3} \times \pi \times R_1 \times R_2 \times R_3$$

Equation 2 : Calcul ellipsoïdal du volume tumoral.

L'intérêt d'un calcul de volume à partir de mesure par ellipsoïde tient dans le fait que les tumeurs connaissent en général une croissance anisotrope. Un calcul effectué à partir de données diamétrales impliquerait, pour être représentatif, une croissance isotrope de la tumeur, ce qui n'est pas observé dans notre expérience.

Le temps de doublement :

Nous avons représenté l'évolution du volume en ellipsoïde en fonction du temps. La croissance de type exponentielle est caractérisée par une droite en coordonnées semi-logarithmiques. A partir de cette pente, on peut calculer le TDT, qui correspond au nombre de jours ou de semaines nécessaires pour qu'une tumeur double son volume. Le TDT se calcule à partir de l'équation 3.

$$TDT = \frac{\text{Log } 2}{K}$$

Équation 3 : Calcul du TDT.

K représente la pente de la droite obtenue sur le graphe de l'évolution du volume tumoral en fonction du temps.

Les volumes métaboliques étaient déterminés arbitrairement en ne retenant que les voxels dont l'intensité était comprise entre le SUV_{max} et le $\frac{1}{2}SUV_{max}$ (Figures 27 et 28). Il nous a semblé intéressant de représenter la fraction volumique métabolique correspondant au rapport du volume métabolique sur le volume total tumoral. Pour le ^{18}F MISO, elle représente le pourcentage hypoxique du volume de la tumeur.

Les examens TEP et le recueil des données s'étaient déroulés sans problème sauf le 29 juin, comme cela est signalé dans les tableaux 2 et 3. En effet, le ^{18}F MISO reçu ce jour là présentait une importante hypertonie, provoquant une rétention urinaire chez le rat. La forte activité concentrée au niveau vésical entraînait l'apparition d'artefacts de reconstruction rendant l'interprétation difficile, les mesures des ellipsoïdes et de SUV impossibles.

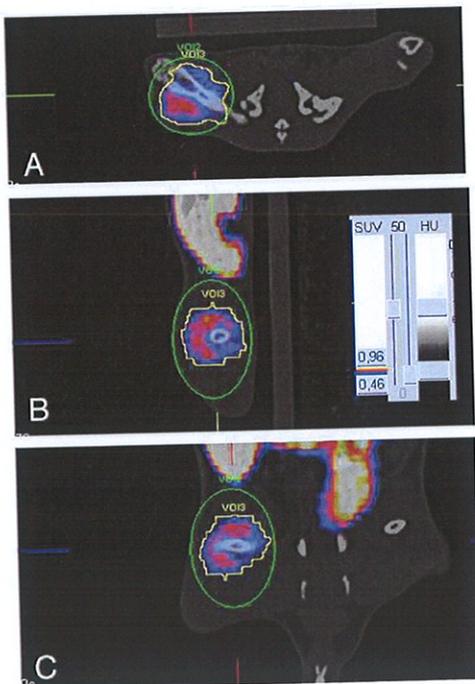


Figure 27 : Mesure du volume tumoral ellipsoïde (en vert) et du volume métabolique (en jaune), du rat 3R. Les échelles de SUV indiquent les SUV_{max} et $SUV_{max}/2$. Coupes transverse (A), sagittale en (B) et coronale en (C).

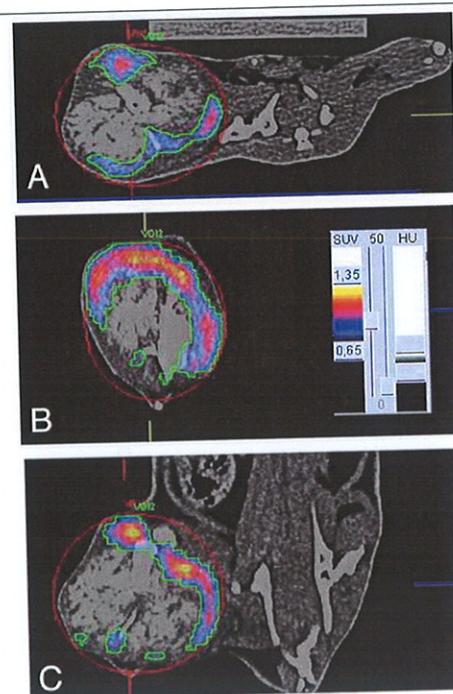


Figure 28 : Mesure du volume tumoral ellipsoïde (en rouge) et du volume métabolique (en vert), du rat 2N. Les échelles de SUV indiquent les SUV_{max} et $SUV_{max}/2$. Coupes transverse (A), sagittale en (B) et coronale en (C).

Les résultats des mesures (diamètre et volume) et SUV sont présentés dans les tableaux 2 et 3.

II.B. Modèle de tumeur pulmonaire

POUMONS	BM 22-1	BM 29-3	MC 34-1	MD 7-3	MD 9-3	MD 15-1
02/04/09 <i>TDM</i>	10,2 mm 0,32 cm ³	nm	nm	nm	nm	2,7 mm
08/04/09 <i>TDM</i>	x	4,85 mm 0,059 cm ³	13,6 mm 0,63 cm ³	nm	nm	3,26 mm
10/04/09 ¹⁸ <i>FMISO</i>	(-) 10,7 mm 0,41 cm ³	x	(+) 15,5 mm 1,04 cm ³	(-) nm	Faux (+) nm	(-) 2,8 mm
17/04/09 <i>TDM</i>	13,2 mm 0,49 cm ³	4,95 mm 0,063 cm ³	17,5 mm 2,07 cm ³	dcd	x	3 mm
22/04/09 ¹⁸ <i>FDG</i>	(+) 13,6 mm 0,65 cm ³	(+) 5,1 mm 0,069 cm ³	(+) 19,8 mm 3,56 cm ³		(-)	(+) 3,8 mm
30/04/09 <i>TDM</i>	15,7 mm 0,85 cm ³	5,3 mm 0,078 cm ³	dcd	x	dcd	dcd
19/06/09 <i>TDM</i>	18,8 mm 1,32 cm ³	5,4 mm 0,082 cm ³	x	x	x	x
23/06/09 ¹⁸ <i>FMISO</i>	Faux (+) 20,7 mm 1,35 cm ³	(-) 5,4 mm 0,082 cm ³	x	x	x	x
29/06/09 ¹⁸ <i>FMISO</i> (Artefact)	(-) 24,1 mm 1,63 cm ³	(-) 5,6 mm 0,092 cm ³	x	x	x	x
03/07/09 ¹⁸ <i>FDG</i>	(+) 25 mm 2,26 cm ³	(+) 6 mm 0,11 cm ³	x	x	x	x

Tableau 2 : Cancers pulmonaires : fixation significative (+) ou non (-), diamètre (mm) et volumes tumoraux (cm³) des lésions primitives pulmonaires, x : non réalisé, dcd : décédé, nm : non mesurable.

Le tableau 2 collige les résultats obtenus avec les animaux présentant une atteinte pulmonaire.

Sur les 6 rats étudiés, 4 ont présenté une tumeur pulmonaire.

L'évolution des diamètres et volumes tumoraux obtenus en TDM était extrapolable en mode de croissance exponentiel. Nous avons rencontré de grandes difficultés pour mesurer le diamètre et le volume de la tumeur du rat BM 22-1 car celui-ci avait développé une atelectasie en aval de la tumeur bronchique. Il était difficile de différencier à l'acquisition TDM, le tissu atelectasique du tissu tumoral surtout en l'absence d'injection de produit de contraste. Nous avons donc effectué nos mesures sur la coupe axiale, en s'aidant des données métaboliques du ¹⁸FDG. A noter que la tumeur présentait une fixation intense et homogène du ¹⁸FDG.

La croissance de la tumeur pulmonaire (MC 34-1) n'est pas illustrée ici mais elle se montre également exponentielle.

Les TDT calculés sont très variables, allant de 5,3 jours pour MC 34-1, jusqu'à 23,9 et 75,9 jours pour BM 22-1 et BM 29-3 respectivement.

D'un point de vue métabolique, nous observons que seul MC 34-1 présentait une fixation du ^{18}F MISO (Figure 29). Les rats BM 22-1 et MD 9-3 fixaient de façon faible et correspondant probablement à des faux positifs d'origine infectieuse. Il est à noter que la seule tumeur hypoxique présentait un TDT bien inférieur aux 2 autres.

Pour le ^{18}F FDG, toutes les tumeurs détectées (n = 4) fixaient fortement le radio-traceur.

La fixation de ^{18}F MISO et de ^{18}F FDG du rat MC 34-1 (le seul fixant le ^{18}F MISO) présentait un caractère hétérogène mais inverse et complémentaire entre les deux traceurs (Figure 29). La comparaison des fixations mettait en évidence une hyperfixation centrale au ^{18}F MISO (le 10 avril) et une hyperfixation périphérique au ^{18}F FDG (le 22 avril) : cela correspond à un « *mismatch* » métabolique.

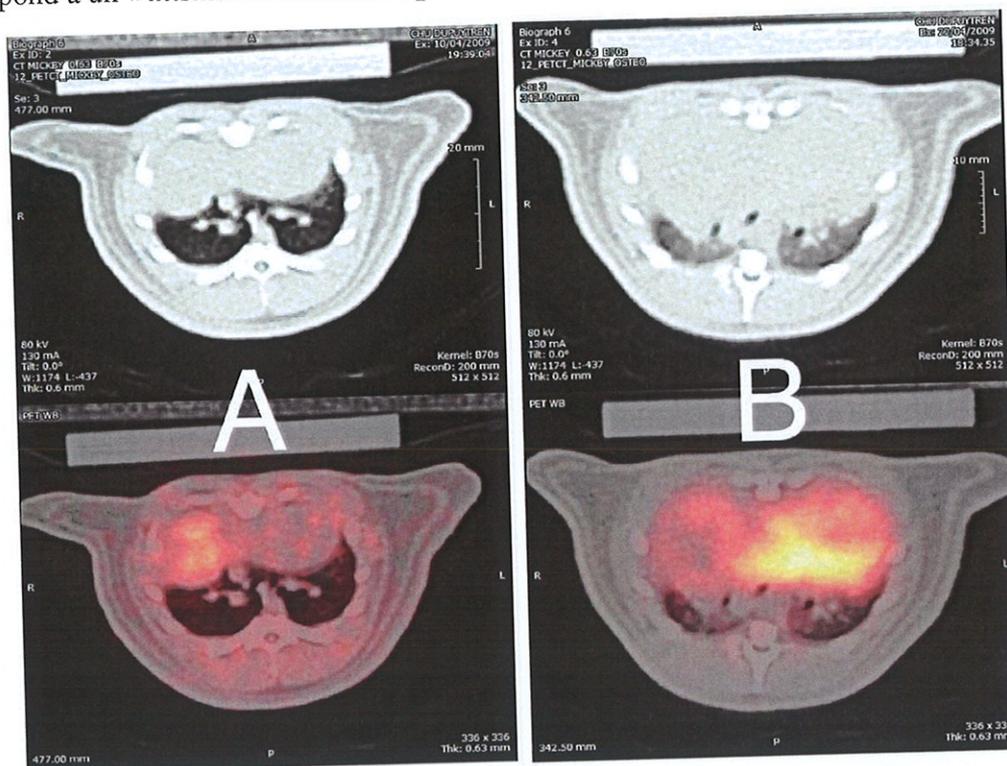


Figure 29 : Rat MC 34-1 : (A) : exploration du 10 avril, TDM en échelle de gris (en haut) et fusion TDM- ^{18}F MISO en échelle de rouge en bas ; (B) même rat exploré le 22 avril en TDM (en haut) et fusion TDM- ^{18}F FDG (en bas).

Au final, pour le modèle de cancer broncho-pulmonaire, il a été noté pour 4 rats sur 6, un développement tumoral à croissance exponentielle, correspondant chaque fois à des tumeurs actives ^{18}F FDG (+), mais faiblement hypoxiques (3/4) ou fortement hypoxique (1/4).

II.C. Modèle d'ostéosarcome greffé

OSTEO	2N	R	2R	3R
05/06/09 ¹⁸ FDG	3,65 cm ³	(-) Palpation -	(+) Palpation +	0,02 cm ³ Limite de mesure
19/06/09 TDM	11,7 cm ³	nm	nm	0,08 cm ³ Limite de mesure
23/06/09 ¹⁸ FMISO	18,9 cm ³ SUV _{max} 0,75 VM 12,34 cm ³ Ratio 65,3 %	(-) nm	(-) nm	8,17 cm ³ SUV _{max} 0,95 VM 2,82 cm ³ Ratio 34,5 %
29/06/09 ¹⁸ FMISO (Artefact)	30,7 cm ³ SUV _{max} 0,9 VM 2 cm ³ Ratio 6,5 %	(-) nm	(-) nm	17 cm ³
03/07/09 ¹⁸ FDG	41,7 cm ³ SUV _{max} 1,35 VM 12,44 cm ³ Ratio 26 %	(-) nm	(-) nm	20,8 cm ³ SUV _{max} 5,1 VM 8,7 cm ³ Ratio 41,8 %
08/07/09 TDM	65,7 cm ³	nm	nm	45,15 cm ³
09/07/09 ¹⁸ FMISO	70,3 cm ³ SUV _{max} 1,3 VM 29,65 cm ³ Ratio 42,2 %	(-) nm	(-) nm	ded

Tableau 3 : Ostéosarcome : fixation significative (+) ou non (-), SUV_{max}, volumes métaboliques (VM), diamètres (mm) et volumes tumoraux (cm³) des lésions primitives d'ostéosarcomes, x : non réalisé, ded : décédé, palpation : résultat de l'examen clinique, nm : non mesurable.

Le tableau 3 présente les résultats obtenus avec les rats avec greffe d'ostéosarcome. Nous constatons que la greffe tumorale a été un succès dans 3 cas sur 4, quelle que soit sa localisation (paratibiale ou intrafémorale). Nous retrouvons des croissances exponentielles comme pour les tumeurs pulmonaires mais avec des TDT très rapides allant de 6,3 à 8,3 jours pour 3R et 2N respectivement. Le graphique 1 (Figure 30) présente les courbes obtenues par la représentation semi logarithmique des volumes tumoraux (cm³) en fonction du temps (j) pour les rats 2N et 3R, tous deux atteints d'ostéosarcomes. Sur ce graphe figurent également les équations de droite avec les pentes de chacune caractérisant le mode exponentiel de la croissance des tumeurs.

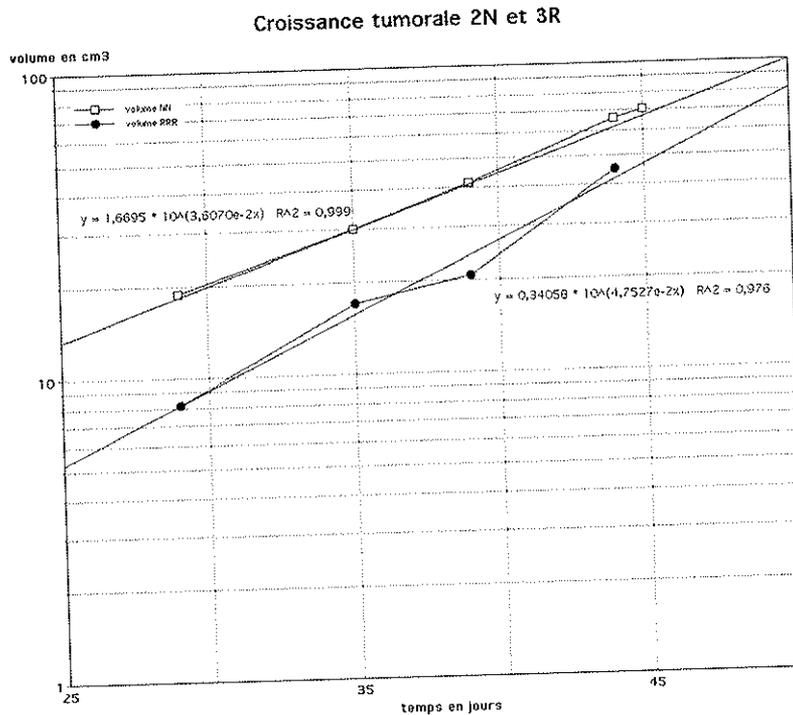


Figure 30 : Représentation semi logarithmique des volumes tumoraux en fonction du temps.

Pour les deux modèles de tumeurs expérimentales, les TDT très variables (de 5 à 76 jours) sont présentés sur l'histogramme 1 (Figure 31).

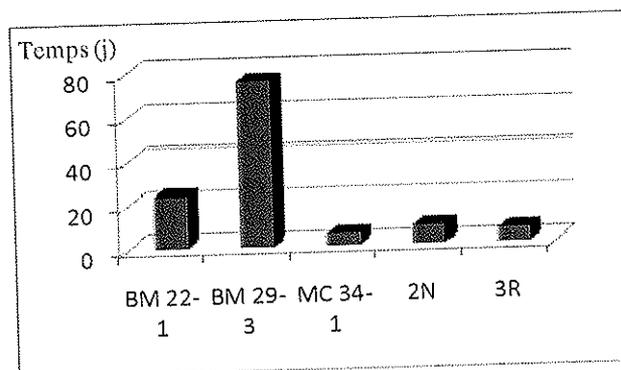


Figure 31 : Temps de doublement tumoraux des rats

L'imagerie fonctionnelle montrait des tumeurs primitives à la fois métaboliques et très hypoxiques c'est à dire ¹⁸FDG (+), et ¹⁸FMISO (+) pour 2 des 3 animaux évolutifs (2N et 3R). La greffe du rat 2R, a montré une croissance très lente n'atteignant jamais une taille suffisante pour être détectable par nos techniques. Elle ne présentait pas non plus de fixation quel que soit le traceur employé, excepté sur le ¹⁸FDG du 5 juin, légèrement positif, mais seulement 10 jours après l'intervention. Ce dernier résultat ne nous permettait cependant pas de différencier une inflammation, d'une infection ou d'une croissance tumorale débutante. De plus, l'os étant

déformé par la greffe elle-même, nous ne pouvions effectuer de mesure ni en TDM, ni en TEP.

Suivi longitudinal par TDM : le rat 3R présentait une lésion d'ostéosarcome à la croissance caractéristique « en feu d'herbe » similaire au développement des ostéosarcomes chez l'homme (Figure 32). A noter son évolution visible sur un suivi régulier d'un mois.

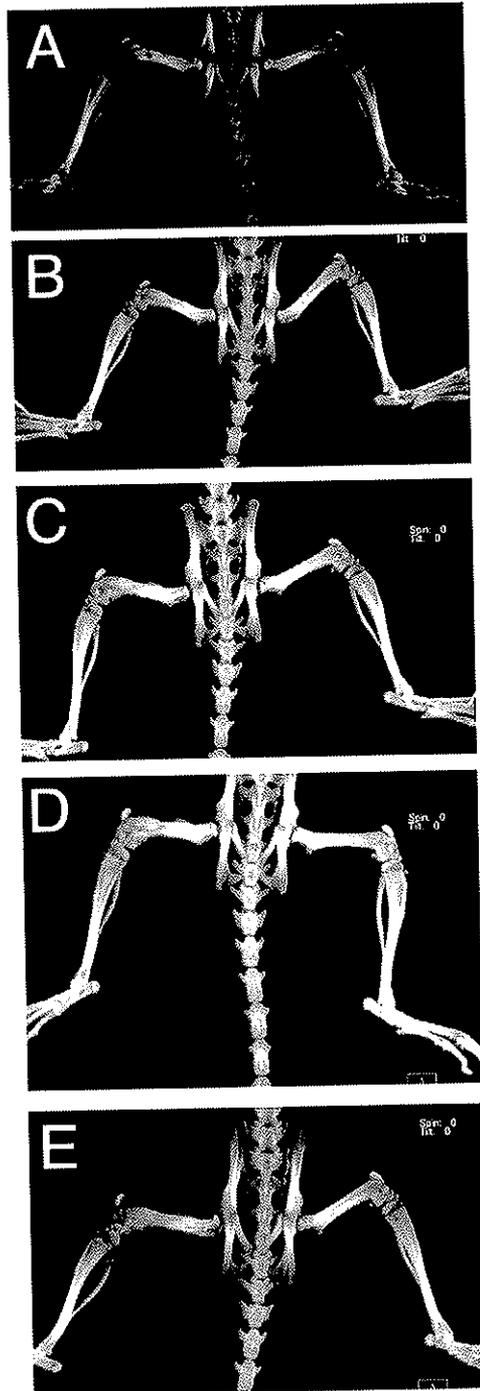


Figure 32 : images en feu d'herbe de la croissance tumorale du fémur droit du rat 3R. (A) 5 juin ; (B) 19 juin ; (C) 23 juin ; (D) 29 juin ; (E) 3 juillet.

Les acquisitions métaboliques répétées avec des TEP, à quelques jours d'écart, permettaient de visualiser l'évolution de la fixation de nos traceurs.

Ainsi, l'évolution de la fixation de ^{18}F FMISO au sein de l'ostéosarcome du rat 2N est représentée Figure 33. La fixation de ^{18}F FMISO, homogène dans un premier temps, devenait très nettement hétérogène et périphérique par la suite, avec une zone centrale de calcification. Les résultats obtenus avec le rat 3R étaient assez semblables. Ils montraient, à 10 jours d'intervalle, une fixation de ^{18}F FMISO initialement hétérogène mais centrée sur l'os, qui évoluait pour devenir complètement périphérique, avec apparition d'ossification centrale. Avec le ^{18}F FDG, des résultats similaires ont été constatés.

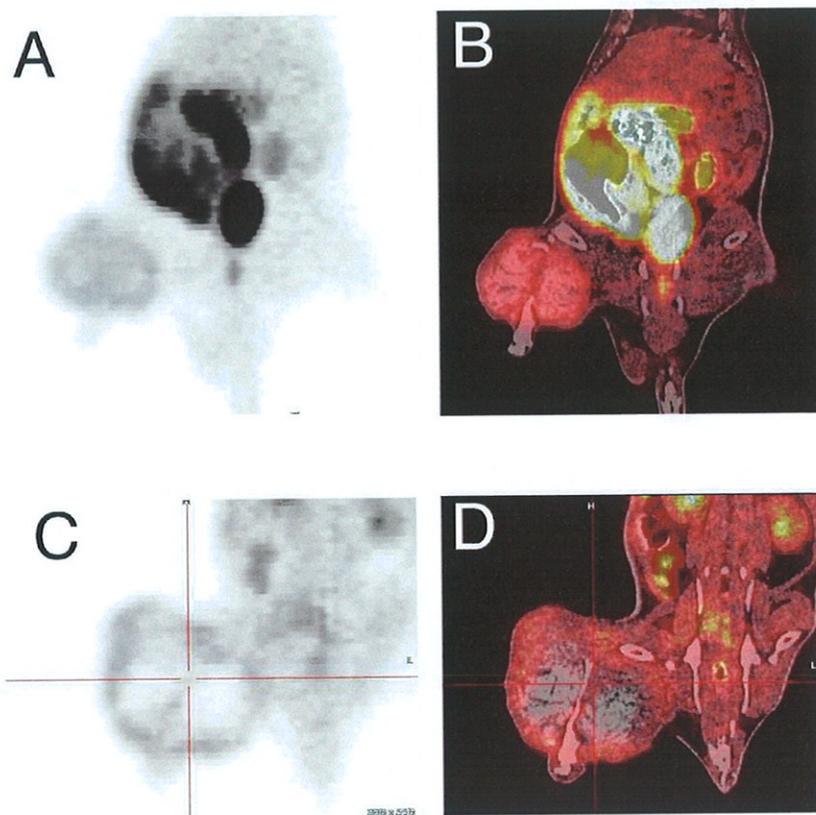


Figure 33 : TEP au ^{18}F FMISO (A) et (C) et fusion (B) et (D) de l'ostéosarcome du rat 2N (A) et (B) : 29 juin ; (C) et (D) : 9 juillet.

Par ailleurs, nous avons cherché à comparer la répartition des deux traceurs, au sein des ostéosarcomes évolués. Les figures 34 et 35 montrent les images de TEP et de fusion avec ^{18}F FDG et ^{18}F FMISO de 4 coupes échantillonnant la tumeur du rat 2N. Nous observons l'importante hétérogénéité de fixation des deux marqueurs qui présentaient une distribution préférentiellement périphérique, la partie centrale étant le siège de nécrose et d'ossification. Les distributions de nos marqueurs apparaissaient globalement superposables : cela correspond à un « *match* » métabolique.

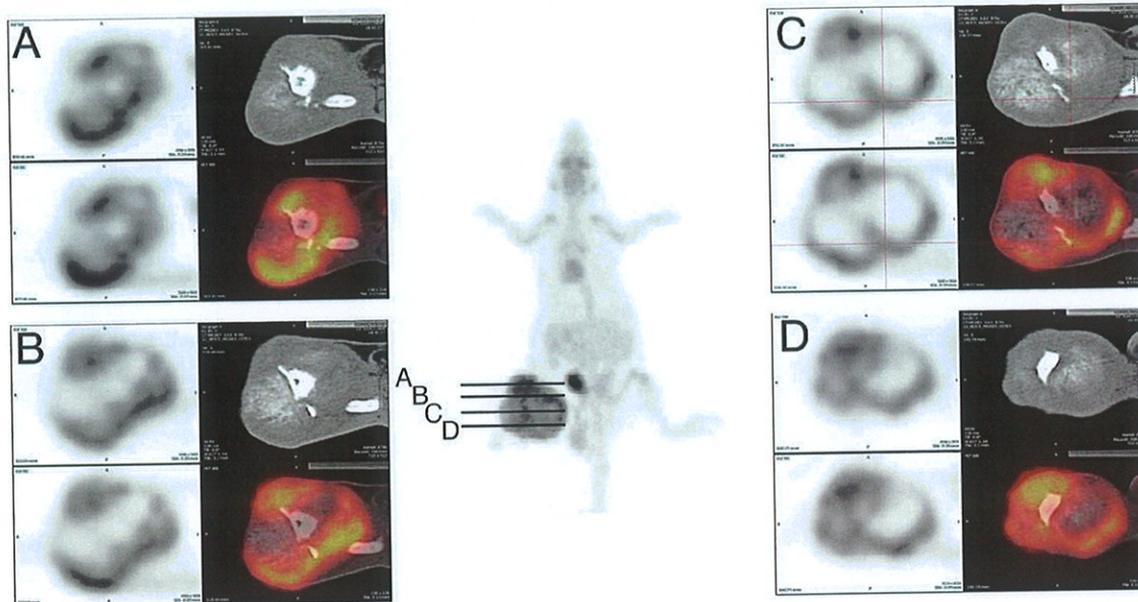


Figure 34 : Echantillonnage tumoral par 4 coupes (A,B,C,D) en TEP et fusion au ^{18}F FDG chez le rat 2N, avec pour chacune les images TEP corrigée en atténuation (haut gauche) non corrigée (bas gauche) TDM (haut droite) et fusion TDM-TEP corrigée (bas droite).

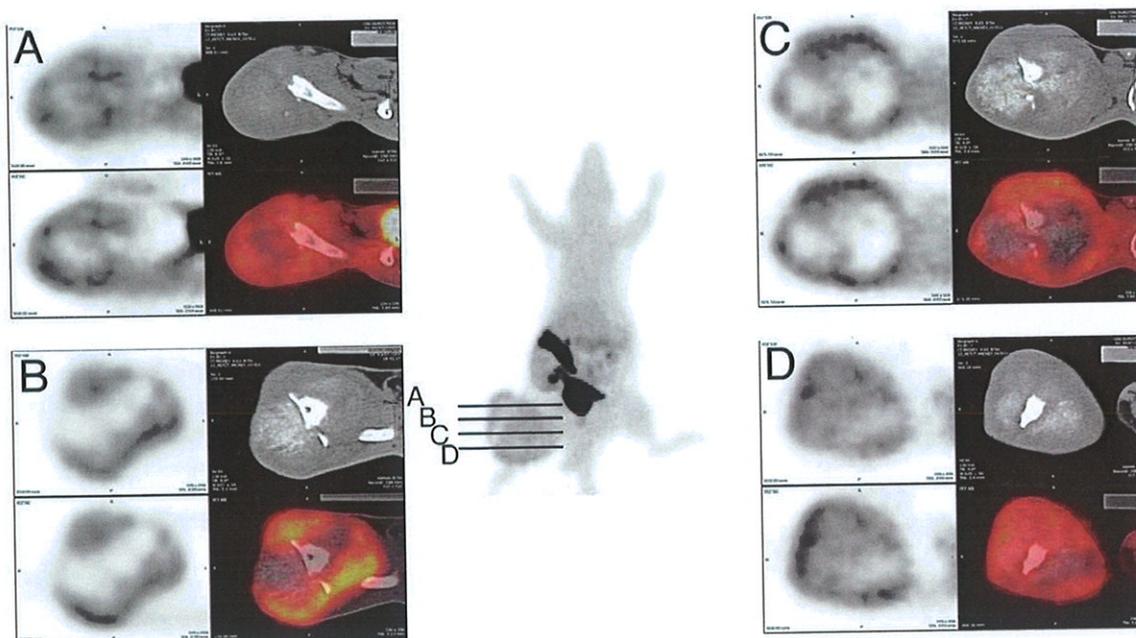


Figure 35 : Echantillonnage tumoral par 4 coupes (A,B,C,D) en TEP et fusion au ^{18}F FMISO chez le rat 2N, avec pour chacune les images TEP corrigée en atténuation (haut gauche) non corrigée (bas gauche) TDM (haut droite) et fusion TDM-TEP corrigée (bas droite).

L'évolution de la fraction volumique métabolique du ^{18}F FMISO est présentée figure 36. Le volume de fixation du ^{18}F FMISO progressait de façon importante. Cependant, la cinétique de sa croissance était plus lente que celle du volume total tumoral. La droite représentant le rapport de ces deux volumes (volume métabolique sur volume total) était donc caractérisée par une pente négative.

Evolution du volume de fixation de ^{18}F MISO du rat 2N

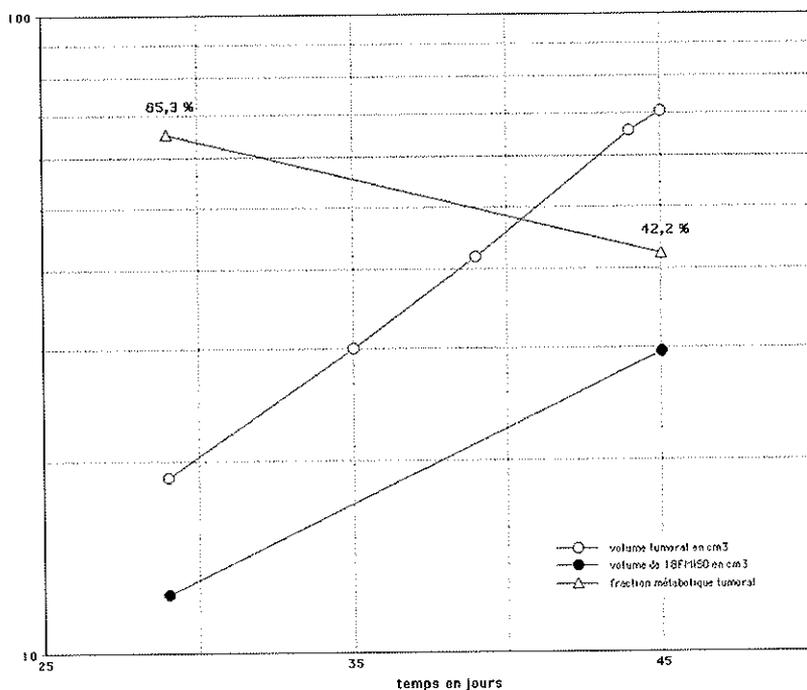


Figure 36 : Evolution de la fraction volumique de ^{18}F MISO chez le rat 2N

En ce qui concerne l'apparition de métastases pulmonaires, nous avons constaté le développement de plusieurs métastases sur le rat 3R. La plus petite, de 3 mm, était négative au ^{18}F FDG, ce qui s'explique aisément car cette dimension est inférieure à la résolution de notre caméra. Celle de grande taille, mesurant 10 mm, était ^{18}F FDG (+). Aucune cependant ne fixait le ^{18}F MISO (Figures 37 et 38). Il est important de signaler que ces images ont été réalisées le 3 juillet, alors que les coupes TDM effectuées 10 jours plus tôt ne montraient aucune lésion détectable.

Sur le rat 2N, nous avons détecté des métastases pulmonaires au TDM, toutes inférieures à 3 mm, donc non visibles à l'imagerie TEP. Pour mémoire, la résolution du TDM est de l'ordre du mm, contre 5 mm pour notre caméra TEP.

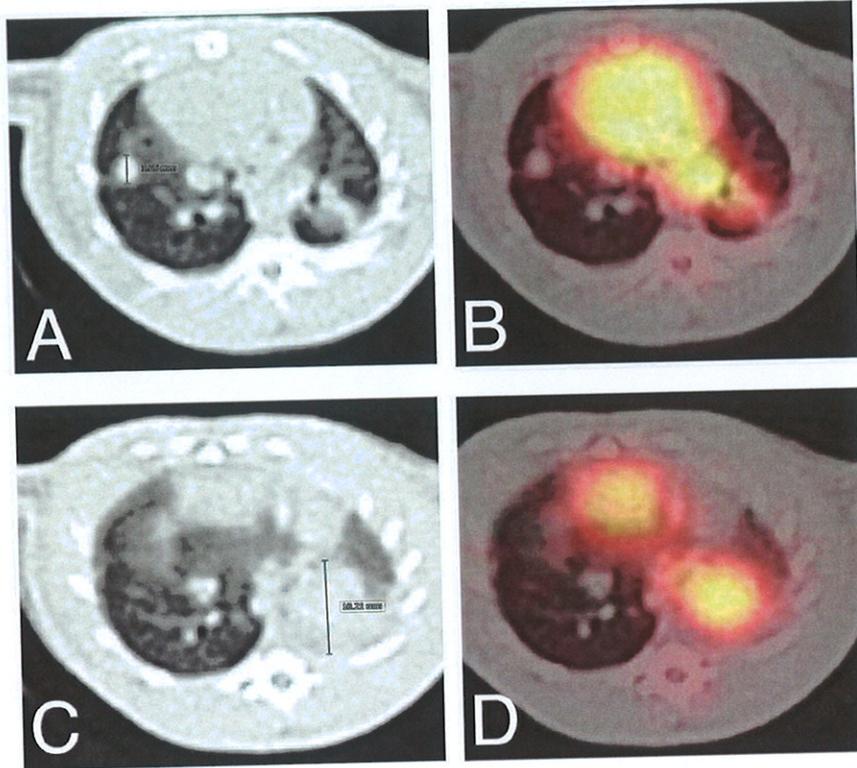


Figure 37 : Métastases pulmonaires chez le rat 3R exploré le même jour : TDM de la métastase droite de 3 mm (A) et TEP au ^{18}F FDG (B), TDM de la métastase gauche de 10 mm (C) et TEP au ^{18}F FDG (D).

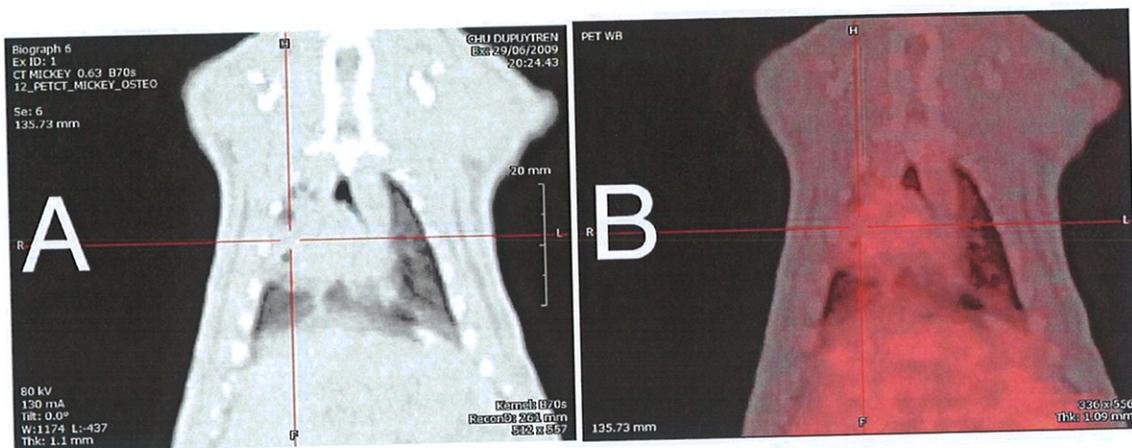


Figure 38 : TDM (A) et TEP au ^{18}F FMISO (B) d'une métastase pulmonaire droite de 15 mm chez le rat 3R.

Au final, pour le modèle d'ostéosarcome greffé, il a été noté pour 2 rats sur 4, un développement tumoral à croissance exponentielle, correspondant chaque fois à des tumeurs actives ^{18}F FDG (+), et fortement hypoxiques ^{18}F FMISO (+).

III. Discussion

III.A. Objectif

La caractérisation de l'hypoxie en cancérologie est une question débattue depuis de nombreuses années, mais avec un regain d'intérêt depuis l'avènement de techniques d'imageries innovantes [90]. L'objectif principal de notre étude était d'une part de déterminer le statut d'oxygénation de nos modèles tumoraux, et d'autre part d'étudier son évolution par une technique d'imagerie non invasive isotopique.

En médecine nucléaire, la TEP permet, à la différence de la TEMP, une quantification assez reproductible avec des résolutions spatiales infra-centimétriques. Le choix d'une machine hybride associant un TDM se justifie comme en routine clinique, en permettant d'associer des renseignements morphologiques aux données fonctionnelles. Parmi les autres techniques d'imagerie non invasives de l'hypoxie, l'IRM BOLD semble prometteuse. Cette technique, non irradiante, est extrêmement résolutive mais nécessite dans l'expérimentation animale des champs très élevés et des antennes d'émission et de réception adaptées aux petits animaux [73, 168-171].

Nous avons choisi le ^{18}F MISO comme marqueur de l'hypoxie, car c'est l'un des plus publiés [1] et il est considéré par certains auteurs comme le gold standard en imagerie de l'hypoxie tumorale [94]. Il est d'ailleurs évalué chez l'homme dans des études prospectives nationales. Enfin, l'EA 3033 « Radiopharmaceutique et traitement de l'image » de Toulouse, qui optimise la synthèse de ce traceur, pouvait nous le fournir dans le cadre de notre collaboration. Comme quelques équipes [89, 95, 172] nous avons utilisé le ^{18}F FDG, traceur métabolique de référence en cancérologie, pour tenter comparer sa fixation avec celle du ^{18}F MISO.

III.B. Modèles

L'évaluation de l'hypoxie en imagerie isotopique a été faite sur des modèles expérimentaux de tumeurs. L'espèce animale retenue a été le rat compte tenu de sa taille. En effet, les modèles développés sur souris, qui sont les plus publiés, sont difficilement explorables avec du matériel non dédié au petit animal. De plus, l'équipe possède une expérience intéressante dans le domaine de modèles expérimentaux tumoraux chez le rat non immunodéprimé et de leur exploration avec du matériel utilisé en routine clinique [161, 165, 173].

Deux modèles expérimentaux sur animaux non immunodéprimés ont été utilisés dans ce travail : un modèle de tumeur pulmonaires proche des cancers broncho-pulmonaires

humains [163], et un modèle d'ostéosarcomes greffé [174]. L'étude de hypoxie a été déjà publiée pour ces deux types de néoplasies [90, 96, 98, 103, 110, 175-178] même si le type le plus décrit reste le cancer de la tête et du cou.

Deux différents modèles de tumeurs hypoxiques ont été retenus en fonction du mode d'obtention de la tumeur: les ostéosarcomes qui sont des tumeurs greffées, correspondant à un clone cellulaire spécifique, et les tumeurs pulmonaires qui sont issues d'une évolution naturelle après l'exposition de carcinogènes (tabac-radon) donnant des histologies différentes. Le mode d'obtention des tumeurs est un facteur important dans l'établissement des relations de la tumeur et de son environnement, tout comme le statut immunitaire de l'animal. La capacité de nos modèles expérimentaux à mimer l'histoire naturelle de ces cancers chez l'homme les rend particulièrement intéressants. Par exemple, le modèle d'ostéosarcome reproduit le pouvoir métastatique pulmonaire des ostéosarcomes humains.

L'imagerie *in vivo* des modèles expérimentaux est d'autant plus intéressante qu'elle permet un suivi longitudinal d'un même animal en limitant le sacrifice des animaux. Des travaux sur de petites cohortes sont donc possibles. L'évolution tumorale peut être étudiée sur une longue période jusqu'à l'apparition de métastases. L'imagerie est donc un outil performant à dans l'étude des modèles des cancers et dans l'évaluation de stratégies thérapeutiques innovantes [173, 174].

III.C. Détection de la tumeur primitive

Pour les tumeurs palpables, il est classique de détecter par l'examen clinique la survenue de la tumeur. Ceci est envisageable pour les ostéosarcomes greffés et ce d'autant que la greffe est implantée sur une patte arrière facilement accessible à l'examen clinique. Cette technique est par contre inapplicable pour les tumeurs profondes comme les tumeurs broncho-pulmonaires. Nous avons utilisé le TDM de façon systématique pour dépister les tumeurs pulmonaires et pour détecter plus rapidement la prise de greffe que la palpation. Une tumeur devient détectable lorsque sa taille dépasse la limite de résolution de la technique (de l'ordre du millimètre). La détectabilité des petites lésions est affectée par les mouvements respiratoires du rat qui ne peuvent être contrôlés, contrairement aux explorations humaines qui sont effectuées en inspiration bloquée. Au vu de nos résultats, pour la détection des ostéosarcomes, le TDM non injecté semble d'un intérêt plus limité. La palpation de la patte greffée reste donc une étape indispensable. Pour détecter un nodule pulmonaire, qui correspond à une masse tissulaire dans un milieu à prédominance aérienne, le TDM est l'examen de référence. Pour une lésion profonde correspondant à un contraste tissu/tissu, le TDM non injecté est peu contributif. Les limites de l'exploration TDM ne sont pas résolues

par l'exploration TEP et l'imagerie fonctionnelle n'a été réalisée qu'à partir du moment où une tumeur primitive était objectivée. Un examen plus précoce n'aurait pas été contributif, la limite de résolution de la caméra TEP utilisée pour cette étude étant de 5 mm. Cette limite a été confirmée lors de plusieurs explorations TEP au ^{18}F FDG. Par exemple, pour le rat 3R, la tumeur primitive mesurée à 1,7 mm au TDM sur l'examen du 5 juin, et la métastase pulmonaire mesurée le 3 juillet à 3 mm ne sont pas détectables au ^{18}F FDG. Le recours à un microTEP [89, 179] devrait permettre d'améliorer la détectabilité avec une résolution du millimètre (de l'ordre du parcours moyen du β^+ du ^{18}F).

III.D. Caractérisation de la croissance tumorale

Nous avons effectué différents types de mesures sur les tumeurs. Les dimensions des tumeurs ont été déterminées en se basant sur les images TDM. Cette technique efficace pour les ostéosarcomes et les nodules pulmonaires simples, a montré ses limites dans un certain nombre de cas. En effet, pour le rat BM 22-1, du fait de l'atélectasie consécutive à l'obstruction bronchique tumorale, la mesure de la tumeur est surestimée. La tumeur ne peut être différenciée du poumon atélectasié. Dans ce cas, notre mesure TDM a été guidée par les images métaboliques au ^{18}F FDG qui ne se fixe que sur la tumeur viable. C'est d'ailleurs une utilisation clinique reconnue du TEP au ^{18}F FDG dans l'évaluation des volumes cibles des tumeur broncho-pulmonaires avant radiothérapie [180].

La mesure du volume nous a permis de déterminer le TDT, facteur caractérisant la croissance de la tumeur, et véritable marqueur de son agressivité.

En théorie, la croissance tumorale est exponentielle pendant la plus grande partie de l'évolution de la tumeur. Si K_p est le taux de prolifération et K_L le taux de perte cellulaire, N , le nombre de cellules tumorales au temps t , est défini par l'équation 4 :

$$N_{(t)} = N_0 \cdot e^{[(K_p - K_L) * t]}$$

Équation 4 : Prolifération cellulaire tumorale.

K_p et K_L sont en général des constantes.

En représentation semi logarithmique, cette croissance se traduit par une droite de pente ($K_p - K_L$).

La cinétique tumorale permet de comprendre l'histoire naturelle des cancers. Il faut en moyenne 30 TDT pour que la tumeur soit détectable (10^9 cellules) et 10 TDT de plus jusqu'à la mort du sujet (10^{12} cellules). Les organes et tissus normaux n'ont aucune croissance, puisque renouvellement et pertes cellulaires s'équilibrent. Les cancers sont caractérisés par un

renouvellement supérieur aux pertes. Il en résulte une prolifération dont la vitesse est variable selon le type de cancer :

- Dans les leucémies, la croissance s'effectue sans contrainte et suit une loi exponentielle, caractérisée par la multiplication par 2 du nombre de cellules à chaque cycle cellulaire.

- Dans les cancers solides, les contraintes physiques, la précarité de la circulation sanguine intratumorale et les pertes cellulaires ralentissent la croissance. On observe alors une courbe de croissance de type Gompertz, lente au début, puis linéaire et ralentie ensuite. En théorie, les métastases croissent régulièrement plus vite que les cancers primitifs.

Avec un faible échantillonnage et un suivi limité, notre étude nous a permis de n'étudier que la partie de croissance exponentielle. Le TDT, constant sur cette partie, a pu être évalué. Il correspond au nombre de jours nécessaires pour que la tumeur double de volume. Plus il est court, plus la tumeur croît rapidement. Le TDT peut être défini par l'équation 5 :

$$\text{TDT} = \log 2 / (K_p - K_L)$$

Équation 5 : TDT à partir des coefficients de prolifération et de perte cellulaire.

Les TDT pour les tumeurs murines se situent typiquement dans une fourchette de 1 à 5 jours, alors que ceux des tumeurs humaines sont de l'ordre de 1 à 3 mois. Nos résultats obtenus chez le rat sont compatibles avec ces données en ce qui concerne les ostéosarcomes (entre 6 et 8 jours de TDT). Pour les lésions pulmonaires, les TDT varient de 5 à 76 jours. Cette hétérogénéité pourrait être le reflet de la diversité histologiques des tumeurs pulmonaires induites par l'exposition aux carcinogènes. A l'heure actuelle, nous n'avons pas encore les résultats des analyses anatomopathologiques des tumeurs pulmonaires.

III.E. Imagerie fonctionnelle

Le TEP au ^{18}F MISO est une méthode non invasive reconnue pour évaluer quantitativement le niveau d'hypoxie dans différentes tumeurs solides telles que les tumeurs cérébrales, pulmonaires et rénales [95, 96] ainsi que dans les sarcomes [90]. Certaines tumeurs dépourvues de l'équipement enzymatique nécessaire à la réduction des nitroimidazolés (et donc du ^{18}F MISO) peuvent être hypoxiques et pourtant, ne pas fixer le ^{18}F MISO. D'après les données de la littérature, les ostéosarcomes et les tumeurs pulmonaires sont connus pour fixer le ^{18}F MISO et sont donc pertinents dans l'étude de l'hypoxie tumorale.

Dans le modèle de sarcome, les greffes réussies ont fixé le ^{18}F MISO, les TDT sont faibles et voisins (6 et 8 jours), et les tumeurs fixent aussi le ^{18}F FDG. L'homogénéité de la greffe tumorale peut expliquer en partie ces concordances.

Dans le modèle de cancer pulmonaire une seule tumeur sur quatre a fixé le ^{18}F MISO.

Dans les deux modèles, les tumeurs qui fixent le ^{18}F MISO sont celles dont le TDT est le plus petit. Autrement dit, les tumeurs les plus agressives semblent les plus hypoxiques. Ce résultat est conforme avec les données de la littérature [4, 22, 23]. Mais de façon surprenante, parmi les tumeurs pulmonaires, la tumeur ^{18}F MISO (-) dont le TDT est le plus long (76 jours), fixe très intensément le ^{18}F FDG. La fixation de ^{18}F FDG ne semble pas toujours être corrélée à la fixation de ^{18}F MISO. Ces résultats devront être pondérés par les résultats de l'analyse histologique des poumons et le nombre des mitoses.

Rat	^{18}F MISO	^{18}F FDG	TDT (jours)
BM 22-1	(-)	(+++)	76
BM 29-3	(-)	(++)	23
MC 34-1	(++)	(+)	5
3R	(+++)	(+++)	6
2N	(+++)	(+)	8

Tableau 4 : Relation entre les fixations des radio-traceurs et les TDT chez nos deux modèles tumoraux.

En étudiant plus finement la répartition volumique de l'activité métabolique des deux traceurs on constate :

- dans le modèle d'ostéosarcome, parallèlement à l'apparition d'ossification dans la zone centrale tumorale visible au TDM et peu métabolique en TEP avec le ^{18}F FDG et ^{18}F MISO, les fixations des deux traceurs se concentrent en périphérie dans les zones de croissance de façon comparable. La fixation de ^{18}F FDG est plus intense que celle de ^{18}F MISO mais avec une répartition superposable [89] : on peut parler de « match » métabolique. Cet aspect de fixation du ^{18}F MISO hétérogène et périphérique a été décrit chez l'homme et dans les tumeurs pulmonaires [181].

- dans le modèle pulmonaire, et à l'inverse de l'ostéosarcome, la seule tumeur hypoxique présente une fixation périphérique du ^{18}F FDG et centrale du ^{18}F MISO. Cette complémentarité de distribution peut être qualifiée de « mismatch » métabolique.

Lorsqu'on parle d'hypoxie en cancérologie, on différencie l'hypoxie aiguë (due à la vascularisation anarchique) de l'hypoxie chronique (de diffusion à distance des vaisseaux). Ces deux hypoxies sont indépendantes mais coexistent au sein de la même tumeur pour donner une hypoxie globale caractérisée selon son intensité. D'après les données de la littérature seule l'hypoxie intermédiaire et intense et donc pour une pO_2 inférieure à 10 mmHg peut être détectée par les radio-traceurs [30, 31]. On peut se demander si notre protocole d'anesthésie (Isoflurane avec 4 l/min d' O_2) ne modifie les conditions d'oxygénation des tumeurs et donc la fixation du ^{18}F MISO. Cet effet pouvant être différents en fonction de la localisation des tumeurs au niveau des poumons qu'on pourrait qualifier d'« effet de diffusion de l' O_2 » par rapport à un autre organe comme la cuisse. Cette question a déjà été soulevée dans un article, sans apporter de réponse tranchée [182]. Quelques expériences ont par contre testé les aptitudes des radio-traceurs de l'hypoxie sous différentes conditions d'oxygénation, par le recours soit à l' O_2 hyperbare, soit à du carbogène normobare qui semble affecter la fixation du traceur [82, 99, 105, 107, 121]. Dans notre étude, il faut souligner que l'impact de l'anesthésie avec un mélange d' O_2 à 4 l/min avec de l'air devrait rester minime, puisque les animaux ont été anesthésiés pendant l'injection (5 min), puis laissés 2 heures en atmosphère ambiante avant d'être ré-anesthésiés pour le passage en caméra (15 min) : soit un total de 20 min sur 2h30 d'expérimentation. A l'avenir, il pourrait être intéressant de réaliser l'expérience avec un anesthésique injectable et une respiration en condition normoxique.

Dans notre expérience, l'« effet de diffusion de l' O_2 » peut aussi être discuté dans l'imagerie fonctionnelle des métastases pulmonaires des sarcomes. En effet, pour le rat 3R, il coexiste une tumeur primitive de la **cuisse** très hypoxiques et des métastases **pulmonaires** non hypoxiques. Cet effet pourrait expliquer en partie la fréquence inférieure des tumeurs hypoxiques dans notre modèle pulmonaire (1/6) par rapport aux modèles d'ostéosarcomes (2/3). Ce résultat mériterait d'être rediscuté à la lumière des résultats histologiques pulmonaires.

Une autre hypothèse pour expliquer cette fixation discordante du ^{18}F MISO entre la métastase et la tumeur primitive pourrait provenir de l'acquisition de phénotypes différents ; Les interactions microenvironnement-tumeur, pression de sélection, émergence de sous population plus agressives ou plus adaptées à des conditions environnementales différentes (pH et pO_2).

Enfin, une autre explication pourrait être la différence de taille qu'avaient la tumeur primitive et les métastases explorées lors du même examen. L'analyse des lésions fixant le ^{18}F MISO dans nos 2 modèles montre une fixation préférentielle sur les plus grandes tumeurs. Ces résultats sont à pondérer. La littérature se montre très hétérogène au sujet des facteurs

d'influence de l'hypoxie et notamment des relations entre taille, volume et hypoxie tumorale. En effet, il est établi de façon consensuelle que l'hypoxie tumorale est un phénomène spatial et temporel hétérogène, qui résulte de la combinaison de plusieurs facteurs, comme les types histologiques, les volumes tumoraux, l'organe ou le tissu hôte, la densité régionale microvasculaire, le flux sanguin et la diffusion de l'O₂ [76]. Les divergences apparaissent lorsqu'il s'agit de mettre en évidence un lien statistique. Pour certains auteurs, il existe une corrélation entre la fraction hypoxique et taille tumorale, dans le cas des sarcomes [183], ou bien entre la pO₂ et le stade des adénopathies cervicales [184]. D'autres, se montrent plus nuancés, expliquant que l'hypoxie présente une grande variabilité au sein des tumeurs, et qu'elle est parfois corrélée avec le stade ou la taille de la tumeur [185]. Mais le plus grand nombre s'accorde à montrer l'absence de toute corrélation entre les taille, stade, volume tumoraux et le statut d'oxygénation [24, 89, 186-188].

Animal	Tumeur	Volume (cm ³)	¹⁸ FDG	¹⁸ FMISO	Concordance
MC 34-1	Primitive	3,6	+	+	Mismatch
	Primitive	20	+	+	Match
3R	Métastase	0,5	+	-	X
	Métastases	0,15	-	-	X
2N	Primitive	70	+	+	Match

Tableau 5 : Comparaison des fixations de ¹⁸FDG et ¹⁸FMISO en fonction des caractéristiques tumorales.

III.F. Quantification

L'intérêt de l'imagerie isotopique, et en particulier de la TEP, est de permettre une quantification de la concentration radioactive tissulaire. En théorie, l'évaluation de la fixation peut être précisée par une mesure semi-quantitative exprimée en SUV. Le respect de la procédure d'acquisition (délai fixe entre l'injection et l'acquisition, activité injectée, paramètres d'acquisition identiques, conditions de préparation des animaux...) ne suffit pas à garantir l'exactitude des mesures. En effet la glycémie et l'insulinémie sont des facteurs connus pour modifier la quantification de la fixation de ¹⁸FDG. De façon comparable, on peut supposer qu'un certain nombre de paramètres puissent affecter la quantification du ¹⁸FMISO. A l'heure actuelle, seule la pO₂ a été identifiée comme facteur d'influence [82, 99, 105, 107, 121]. D'autre part, les solutions techniques appliquées pour la correction d'atténuation dans une machine TEP clinique n'ont pas fait la preuve de leur efficacité dans l'exploration des petits animaux. Ces techniques utilisées quotidiennement en imagerie clinique, même si elles restent perfectibles, sont pertinentes dans le suivi des patients. Il nous a donc paru légitime de les transposer pour l'exploration animale. Les résultats quantitatifs utilisés principalement pour un suivi longitudinal d'une même tumeur, sont donc à manipuler avec réserve. L'autre intérêt majeur de la quantification est l'évaluation de l'efficacité thérapeutique. En effet,

l'évolution du métabolisme tumorale est une information différente et complémentaire des variations morphologique de la tumeur. L'évaluation thérapeutique de l'hypoxie comme du métabolisme peut bénéficier de l'aide de la quantification à condition de résoudre les problèmes de fiabilité et de reproductibilité [189, 190].

CONCLUSION

La cancérologie bénéficie depuis de nombreuses années des multiples progrès réalisés en imagerie, tant anatomique que fonctionnelle. L'excellente résolution de l'imagerie anatomique permet la détection précoce des tumeurs et la définition précise des rapports anatomiques. En imagerie fonctionnelle, l'essor de la TEP au ^{18}F FDG, par l'exploration du métabolisme glucidique, a amélioré le bilan d'extension initial et la prise en charge thérapeutique des patients. Les limitations de l'imagerie au ^{18}F FDG ont conduit à la mise au point d'autres traceurs ciblant de nouvelles voies métaboliques et, en particulier, l'hypoxie tumorale. Au vu de la littérature, les composés les plus prometteurs de la famille des imidazolés ont été marqués par du fluor 18 (^{18}F FMISO), du cuivre 64 (^{64}Cu -ATSM) ou de l'iode 124 (^{124}I AZG). Le ^{18}F FMISO s'est vite imposé comme la référence, mais ne fait toujours pas l'objet d'une utilisation clinique en dehors de protocoles de recherche.

Notre étude expérimentale de l'hypoxie tumorale avec le ^{18}F FMISO sur deux modèles animaux de cancer a fourni des résultats similaires à ceux de la littérature. Elle a également soulevé de nombreuses interrogations tant pratiques (optimisation des modalités d'acquisition) que fondamentales (métabolisme tumoral). Pour y répondre, de nouveaux protocoles expérimentaux devront être menés à terme.

Dans un proche avenir, l'investigation de l'hypoxie tumorale devrait être validée comme nouveau facteur pronostique et utilisée pour optimiser la thérapeutique. En radiothérapie, la détermination de volume cible devrait être améliorée par la caractérisation de zones hypoxiques au sein des lésions tumorales à la fois pour mieux définir les zones à traiter et/ou pour moduler l'intensité de l'irradiation en fonction des caractéristiques métaboliques tumorales. Dans l'évaluation de la réponse thérapeutique, l'utilisation potentielle de l'imagerie de l'hypoxie dépendra de la pertinence des critères de réponse qui restent à définir. Cette question est d'autant plus d'actualité, qu'il n'y a toujours pas de consensus pour juger l'action des nouvelles thérapeutiques ciblées, comme les anti-angiogéniques, qui sont de plus en plus associés aux chimiothérapies conventionnelles. Dans la prochaine décennie, l'imagerie de l'hypoxie (isotopique ou non isotopique) occupera une place qui dépendra aussi, des résultats et des progrès d'autres techniques concurrentes, notamment dans le domaine de la biologie cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Grunbaum, Z., et al., *Synthesis and characterization of congeners of misonidazole for imaging hypoxia*. J Nucl Med, 1987. **28**(1): p. 68-75.
2. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
3. Bottaro, D.P. and L.A. Liotta, *Cancer: Out of air is not out of action*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 593-5.
4. Teicher, B.A., *Acute and chronic in vivo therapeutic resistance*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(11): p. 1665-73.
5. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
6. Couffinhal, T., et al., *[The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]*. Rev Med Interne, 2001. **22**(11): p. 1064-82.
7. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
8. Iyer, N.V., et al., *Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 149-62.
9. Semenza, G.L., *HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 167-71.
10. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
11. Powis, G. and L. Kirkpatrick, *Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(5): p. 647-54.
12. Brahimi-Horn, C., N. Mazure, and J. Pouyssegur, *Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 1-9.
13. Stroka, D.M., et al., *HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2445-53.
14. Lauzier, M.C., et al., *[HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences]*. Bull Cancer, 2006. **93**(4): p. 349-56.
15. Fontanini, G., et al., *Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(6): p. 861-5.
16. Bikfalvi, A., *Angiogenesis: health and disease*. Ann Oncol, 2006. **17 Suppl 10**: p. x65-70.
17. Yang, J.C., et al., *A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(5): p. 427-34.
18. Demetri G.D., v.O.A.T., Blackstein M., Garrett C., Shah M., Heinrich M., McArthur G., Judson I., Baum C.M. and Casali P.G., *Phase 3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of SU11248 versus placebo in patients following failure of imatinib for metastatic GIST* J Clin Oncol 2005. **23**(16S): p. 4000.
19. Escudier, B., et al., *Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 125-34.
20. Motzer, R.J., et al., *Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(1): p. 16-24.

21. Fayette, J., J.C. Soria, and J.P. Armand, [*Targeting angiogenesis in oncology*]. *Pathol Biol (Paris)*, 2006. **54**(4): p. 199-205.
22. Bottaro, D.P., Liotta, L. A., *Cancer: Out of air is not out of action*. *Nature*, 2003. **423**(6940): p. 593-5.
23. Thomlinson, R.H. and L.H. Gray, *The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy*. *Br J Cancer*, 1955. **9**(4): p. 539-49.
24. Padhani, A., *PET imaging of tumour hypoxia*. *Cancer Imaging*, 2006. **6**: p. S117-21.
25. Brown, J.M., *The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture*. *Cancer Res*, 1999. **59**(23): p. 5863-70.
26. Dewhirst, M.W., R.D. Braun, and J.L. Lanzen, *Temporal changes in PO₂ of R3230AC tumors in Fischer-344 rats*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998. **42**(4): p. 723-6.
27. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
28. Lartigau, E., S. Dewas, and L. Gras, [*The Oxygen effect: an old new target?*]. *Cancer Radiother*, 2008. **12**(1): p. 42-9.
29. Rademakers, S.E., et al., *Molecular aspects of tumour hypoxia*. *Mol Oncol*, 2008. **2**(1): p. 41-53.
30. Wouters, B.G. and J.M. Brown, *Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the "hypoxic fraction" in determining tumor response to fractionated radiotherapy*. *Radiat Res*, 1997. **147**(5): p. 541-50.
31. Ilse J. Hoogsteen, W.J.M.P., Henri A.M. Marres, Paul F.J.W. Rijken, Franciscus J.A. van den Hoogen, Albert J. van der Kogel, Johannes H.A.M. Kaanders, *Erythropoietin receptor is not a surrogate marker for tumor hypoxia and does not correlate with survival in head and neck squamous cell carcinomas*. *Radiotherapy and Oncology*, 2005. **76**: p. 213-218.
32. Vaupel, P. and M. Hockel, [*Hypoxia in cervical cancer: pathogenesis, characterization, and biological/clinical consequences*]. *Zentralbl Gynakol*, 2001. **123**(4): p. 192-7.
33. G. Baillet a, D.G.a., E. Barré a, M.-E. Toubert a, C. Dechaud a, P. Teyton a, E. Le Beau de Hemricourt b, J.-L. Moretti a,* , *Nouveaux traceurs en tomographie par émission de positons : un second souffle pour le ciblage de l'hypoxie tumorale ? médecine nucléaire*, 2008. **32**(12): p. 6.
34. Brahim-Horn, M.C., J. Chiche, and J. Pouyssegur, *Hypoxia and cancer*. *J Mol Med*, 2007. **85**(12): p. 1301-7.
35. Shaw, R.J. and L.C. Cantley, *Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 424-30.
36. Hetz, C., *The UPR as a survival factor of cancer cells: More than folding proteins?* *Leuk Res*, 2009. **33**(7): p. 880-2.
37. Koumenis, C. and B.G. Wouters, "*Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways*. *Mol Cancer Res*, 2006. **4**(7): p. 423-36.
38. Hetz, C., et al., *Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(2): p. 757-62.
39. Lee, A.S., *GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications*. *Cancer Res*, 2007. **67**(8): p. 3496-9.
40. Amellem, O. and E.O. Pettersen, *Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage*. *Cell Prolif*, 1991. **24**(2): p. 127-41.
41. Pallavicini, M.G., et al., *Cell cycle distribution of chronically hypoxic cells and determination of the clonogenic potential of cells accumulated in G₂ + M phases after irradiation of a solid tumor in vivo*. *Cancer Res*, 1979. **39**(6 Pt 1): p. 1891-7.

42. Sciandra, J.J., J.R. Subjeck, and C.S. Hughes, *Induction of glucose-regulated proteins during anaerobic exposure and of heat-shock proteins after reoxygenation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(15): p. 4843-7.
43. Mottram, J.C., *A Factor of Importance in the Radio Sensitivity of tumours*. British Journal of Radiology, 1936. **9**: p. 606-614.
44. Gray, L.H., *The initiation and development of cellular damage by ionizing radiations; the thirty-second Silvanus Thompson Memorial Lecture*. Br J Radiol, 1953. **26**(312): p. 609-18.
45. Cohen-Jonathon E, B.E., McKenna WG., *How does radiation kill cells?* Curr Opin Chem Biol, 1999. **3**: p. 77-83.
46. Nordsmark, M. and J. Overgaard, *Tumor hypoxia is independent of hemoglobin and prognostic for loco-regional tumor control after primary radiotherapy in advanced head and neck cancer*. Acta Oncol, 2004. **43**(4): p. 396-403.
47. Nordsmark, M., et al., *Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study*. Radiother Oncol, 2005. **77**(1): p. 18-24.
48. Wardman, P., *Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2007. **19**(6): p. 397-417.
49. Rosenberg, A. and S. Knox, *Radiation sensitization with redox modulators: a promising approach*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **64**(2): p. 343-54.
50. Overgaard, J. and M.R. Horsman, *Modification of Hypoxia-Induced Radioresistance in Tumors by the Use of Oxygen and Sensitizers*. Semin Radiat Oncol, 1996. **6**(1): p. 10-21.
51. Churchill-Davidson, I., C. Sanger, and R.H. Thomlinson, *High-pressure oxygen and radiotherapy*. Lancet, 1955. **268**(6874): p. 1091-5.
52. Bennett, M., et al., *Hyperbaric oxygenation for tumour sensitisation to radiotherapy*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(4): p. CD005007.
53. Hill, S.A., et al., *Tumour radiosensitization by high-oxygen-content gases: influence of the carbon dioxide content of the inspired gas on PO₂, microcirculatory function and radiosensitivity*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **40**(4): p. 943-51.
54. Sun, X., et al., *Changes in tumor hypoxia induced by mild temperature hyperthermia as assessed by dual-tracer immunohistochemistry*. Radiother Oncol, 2008. **88**(2): p. 269-76.
55. Song, C.W., et al., *Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures*. Int J Hyperthermia, 1996. **12**(3): p. 367-73.
56. Suh J.H., S.B., Nabid A., Kresl J.J., Fortin A., Mercier J.P., Senzer N., Chang E.L., Boyd A.P., Cagnoni P.J., Shaw E., *Phase III Study of Efavoxiral As an Adjunct to Whole-Brain Radiation Therapy for Brain Metastases*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(1): p. 106-114.
57. Nieder C., Z.F.B., Adam M., Molls M., *The role of pentoxifylline as a modifier of radiation therapy*. Cancer Treatment Reviews, 2005. **31**: p. 448-455.
58. Lambin, P., et al., *Accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide (ARCON) in high grade malignant gliomas*. Radiother Oncol, 1997. **43**(3): p. 324.
59. Shenoy M.A., A.J.C., Adams G.E., Michael B.D., Watts M.E., *Time-Resolved Oxygen Effects in Irradiated Bacteria and Mammalian Cells: A Rapid-Mix Study*. Radiation Research, 1975. **62**: p. 498-512.
60. Griffith, O.W. and A. Meister, *Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)*. J Biol Chem, 1979. **254**(16): p. 7558-60.
61. Stone, H.B., et al., *Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. Summary of a workshop held November 19-20, 1992, at the National Cancer Institute, Bethesda, Maryland*. Radiat Res, 1993. **136**(3): p. 422-34.

62. Clark, L.C., Jr., et al., *Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography*. J Appl Physiol, 1953. **6**(3): p. 189-93.
63. Kanwisher, J., *Polarographic Oxygen Electrode*. American Society of Limnology and Oceanography, 1959. **4**(2): p. 210-217.
64. Urbach, F., *Pathophysiology of malignancy. I. Tissue oxygen tension of benign and malignant tumors of the skin*. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **92**(3): p. 644-9.
65. Hockel, M., et al., *Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors*. Semin Radiat Oncol, 1996. **6**(1): p. 3-9.
66. Le, Q.T., *Identifying and targeting hypoxia in head and neck cancer: a brief overview of current approaches*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **69**(2 Suppl): p. S56-8.
67. Guichard, M., et al., *Un suivi non invasif de l'évolution de l'oxygénation des tumeurs par réflectivité différentielle*. J. Opt., 1997. **28**(6): p. 265-269.
68. Orlova, A., et al., *Diffuse Optical Tomography? a method of detection of oxygen saturation of breast tumors*. Radiobiology: Hypoxia and angiogenesis.
69. Seddon, B.M., et al., *Measurement of tumor oxygenation: in vivo comparison of a luminescence fiber-optic sensor and a polarographic electrode in the p22 tumor*. Radiat Res, 2001. **155**(6): p. 837-46.
70. Collingridge, D.R., et al., *Measurement of tumor oxygenation: a comparison between polarographic needle electrodes and a time-resolved luminescence-based optical sensor*. Radiat Res, 1997. **147**(3): p. 329-34.
71. Hicks, R.J., *The role of PET in monitoring therapy*. Cancer Imaging, 2005. **5**(1): p. 51-7.
72. Chao, K.S., et al., *A novel approach to overcome hypoxic tumor resistance: Cu-ATSM-guided intensity-modulated radiation therapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **49**(4): p. 1171-82.
73. Chopra, S., et al., *Comparing oxygen-sensitive MRI (BOLD R2*) with oxygen electrode measurements: A pilot study in men with prostate cancer*. Int J Radiat Biol, 2009. **85**(9): p. 805-13.
74. Foo, S.S., et al., *Functional imaging of intratumoral hypoxia*. Mol Imaging Biol, 2004. **6**(5): p. 291-305.
75. Padhani, A.R., *Where are we with imaging oxygenation in human tumours?* Cancer Imaging, 2005. **5**: p. 128-30.
76. Serganova, I., et al., *Tumor hypoxia imaging*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5260-4.
77. Kenney, J.M.M., Woodard, H.Q., *Tracer studies with radioactive phosphorus in malignant neoplastic disease*. Radiology, 1941. **37**: p. 683-690.
78. Laffon, E., et al., *Feasibility of an SUV normalization to 1 hour after the 18F-FDG injection*. C R Biol, 2006. **329**(7): p. 520-6.
79. Buvat, I., *Les limites du SUV*. Médecine nucléaire, 2007. **31**: p. 165-172.
80. Linder, K.E., et al., *TcO(PnA.O-1-(2-nitroimidazole)) [BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization, and xanthine oxidase-catalyzed reduction*. J Med Chem, 1994. **37**(1): p. 9-17.
81. Linder, K.E., et al., *Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of nitroimidazole--BATO complexes: new technetium compounds designed for imaging hypoxic tissue*. Bioconj Chem, 1993. **4**(5): p. 326-33.
82. Riche, F., et al., *Nitroimidazoles and hypoxia imaging: synthesis of three technetium-99m complexes bearing a nitroimidazole group: biological results*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(1): p. 71-4.
83. Yutani, K., et al., *Applicability of 99mTc-HL91, a putative hypoxic tracer, to detection of tumor hypoxia*. J Nucl Med, 1999. **40**(5): p. 854-61.
84. Chapman, J.D., A.J. Franko, and J. Sharplin, *A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability*. Br J Cancer, 1981. **43**(4): p. 546-50.

85. Jerabek, P.A.D., D.D. Kilbourn, M.R. Welch, M.J., *Synthesis of a fluorine-18 labeled hypoxic cell sensitizer*. J. Nucl. Med., 1984. **25**(5).
86. Jerabek, P.A., et al., *Synthesis and biodistribution of 18F-labeled fluoronitroimidazoles: potential in vivo markers of hypoxic tissue*. Int J Rad Appl Instrum A, 1986. **37**(7): p. 599-605.
87. Dubois, L., et al., *Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by [(18)F]fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry*. Br J Cancer, 2004. **91**(11): p. 1947-54.
88. Koh, W.J., et al., *Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992. **22**(1): p. 199-212.
89. Wyss, M.T., et al., *NanoPET imaging of [(18)F]fluoromisonidazole uptake in experimental mouse tumours*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2006. **33**(3): p. 311-8.
90. Liu, R.S., et al., *Biodistribution, pharmacokinetics and PET Imaging of [(18)F]FMISO, [(18)F]FDG and [(18)F]FAc in a sarcoma- and inflammation-bearing mouse model*. Nucl Med Biol, 2009. **36**(3): p. 305-12.
91. Bentzen, L., et al., *Tumour oxygenation assessed by 18F-fluoromisonidazole PET and polarographic needle electrodes in human soft tissue tumours*. Radiother Oncol, 2003. **67**(3): p. 339-44.
92. Sorensen, M., et al., *Effect of intratumoral heterogeneity in oxygenation status on FMISO PET, autoradiography, and electrode Po2 measurements in murine tumors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **62**(3): p. 854-61.
93. Belkacemi, Y., et al., *[Assessment of tumor radiosensitivity using functional and metabolic nuclear imaging in research and clinical practice. A review]*. Cancer Radiother, 2006. **10**(3): p. 124-33.
94. West, C.M.L.C., N., *The potential of PET to increase understanding of the biological basis of tumour and normal tissue response to radiotherapy*. British Journal of Radiology, 2005. **28**: p. 50-54.
95. Cher, L.M., et al., *Correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in gliomas using 18F-fluoromisonidazole, 18F-FDG PET, and immunohistochemical studies*. J Nucl Med, 2006. **47**(3): p. 410-8.
96. Eschmann, S.M., et al., *Prognostic impact of hypoxia imaging with 18F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy*. J Nucl Med, 2005. **46**(2): p. 253-60.
97. Wiebe, L.I., *PET radiopharmaceuticals for metabolic imaging in oncology*. International Congress Series, 2004. **1264**: p. 53-76.
98. Kaneta, T., et al., *Initial evaluation of dynamic human imaging using 18F-FRP170 as a new PET tracer for imaging hypoxia*. Ann Nucl Med, 2007. **21**(2): p. 101-7.
99. Mahy, P., et al., *Comparative pharmacokinetics, biodistribution, metabolism and hypoxia-dependent uptake of [18F]-EF3 and [18F]-MISO in rodent tumor models*. Radiother Oncol, 2008. **89**(3): p. 353-60.
100. Dubois, L., et al., *[18F]EF3 is not superior to [18F]FMISO for PET-based hypoxia evaluation as measured in a rat rhabdomyosarcoma tumour model*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009. **36**(2): p. 209-18.
101. Komar, G., et al., *18F-EF5: a new PET tracer for imaging hypoxia in head and neck cancer*. J Nucl Med, 2008. **49**(12): p. 1944-51.
102. Yang, D.J., et al., *Development of F-18-labeled fluoroerythronitroimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia*. Radiology, 1995. **194**(3): p. 795-800.
103. Lehtio, K., et al., *Imaging of blood flow and hypoxia in head and neck cancer: initial evaluation with [(15)O]H(2)O and [(18)F]fluoroerythronitroimidazole PET*. J Nucl Med, 2001. **42**(11): p. 1643-52.
104. Gronroos, T., et al., *Pharmacokinetics of [18F]FETNIM: a potential marker for PET*. J Nucl Med, 2001. **42**(9): p. 1397-404.

105. Gronroos, T., et al., *Comparison of the biodistribution of two hypoxia markers [18F]FETNIM and [18F]FMISO in an experimental mammary carcinoma*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004. **31**(4): p. 513-20.
106. Tewson, T.J., *Synthesis of [18F]fluoroetanidazole: a potential new tracer for imaging hypoxia*. Nucl Med Biol, 1997. **24**(8): p. 755-60.
107. Barthel, H., et al., *In vivo evaluation of [18F]fluoroetanidazole as a new marker for imaging tumour hypoxia with positron emission tomography*. Br J Cancer, 2004. **90**(11): p. 2232-42.
108. Sorger, D., et al., *[18F]Fluoroazomycin arabinofuranoside (18FAZA) and [18F]Fluoromisonidazole (18FMISO): a comparative study of their selective uptake in hypoxic cells and PET imaging in experimental rat tumors*. Nucl Med Biol, 2003. **30**(3): p. 317-26.
109. Piert, M.M., H.J. Reichl, G.P. Ziegler, S. Kumar, P. Wiebe, L.I. Schwaiger, M., *Fluorine-18 labeled fluoroazomycin arabinoside (FAZA): imaging murine tumor hypoxia with improved biokinetics*. J. Nucl. Med., 2002. **43**.
110. Busk, M., et al., *Imaging hypoxia in xenografted and murine tumors with 18F-fluoroazomycin arabinoside: a comparative study involving microPET, autoradiography, PO2-polarography, and fluorescence microscopy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **70**(4): p. 1202-12.
111. Piert, M., et al., *Hypoxia-specific tumor imaging with 18F-fluoroazomycin arabinoside*. J Nucl Med, 2005. **46**(1): p. 106-13.
112. Solomon, B., et al., *Modulation of intratumoral hypoxia by the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib detected using small animal PET imaging*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(9): p. 1417-22.
113. Mannan, R.H., et al., *Radioiodinated azomycin pyranoside (IAZP): a novel non-invasive marker for the assessment of tumor hypoxia*. J Nucl Biol Med, 1992. **36**(1): p. 60-7.
114. Parliament, M.B., et al., *Non-invasive assessment of human tumour hypoxia with 123I-iodoazomycin arabinoside: preliminary report of a clinical study*. Br J Cancer, 1992. **65**(1): p. 90-5.
115. Urtasun, R.C., et al., *Measurement of hypoxia in human tumours by non-invasive spect imaging of iodoazomycin arabinoside*. Br J Cancer Suppl, 1996. **27**: p. S209-12.
116. Kumar, P., et al., *Synthesis of 1-beta-D-(5-deoxy-5-iodoarabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (beta-IAZA): a novel marker of tissue hypoxia*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2003. **51**(4): p. 399-403.
117. Zanzonico, P., et al., *Iodine-124-labeled iodo-azomycin-galactoside imaging of tumor hypoxia in mice with serial microPET scanning*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004. **31**(1): p. 117-28.
118. CHAPMAN, R.S.E.E.C.S.M.F.J., *The synthesis and radiolabeling of novel markers of tissue hypoxia of the iodinated azomycin nucleoside class*. Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals 1997. **39**(7): p. 541-557
119. Riedl, C.C., et al., *Tumor hypoxia imaging in orthotopic liver tumors and peritoneal metastasis: a comparative study featuring dynamic 18F-MISO and 124I-IAZG PET in the same study cohort*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(1): p. 39-46.
120. Riedl, C.C., et al., *Imaging hypoxia in orthotopic rat liver tumors with iodine 124-labeled iodoazomycin galactopyranoside PET*. Radiology, 2008. **248**(2): p. 561-70.
121. Suehiro, M., et al., *Radiosynthesis of [(131)I]IAZGP via nucleophilic substitution and its biological evaluation as a hypoxia marker - is specific activity a factor influencing hypoxia-mapping ability of a hypoxia marker?* Nucl Med Biol, 2009. **36**(5): p. 477-87.
122. Iyer, R.V., et al., *A dual hypoxic marker technique for measuring oxygenation change within individual tumors*. Br J Cancer, 1998. **78**(2): p. 163-9.

123. Hoebbers, F.J., et al., *Phase I study to identify tumour hypoxia in patients with head and neck cancer using technetium-99m BRU 59-21*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. **29**(9): p. 1206-11.
124. Johnson, L.L., et al., *Technetium-99m-nitroimidazole uptake in a swine model of demand ischemia*. J Nucl Med, 1998. **39**(8): p. 1468-75.
125. Melo, T., et al., *BRU59-21, a second-generation 99mTc-labeled 2-nitroimidazole for imaging hypoxia in tumors*. J Nucl Med, 2000. **41**(1): p. 169-76.
126. Ballinger, J.R., J.W. Kee, and A.M. Rauth, *In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled 2-nitroimidazole (BMS181321) as a marker of tumor hypoxia*. J Nucl Med, 1996. **37**(6): p. 1023-31.
127. Murugesan, S., et al., *Technetium-99m-cyclam AK 2123: a novel marker for tumor hypoxia*. Appl Radiat Isot, 2001. **54**(1): p. 81-8.
128. Huan, L.C. and B.Y. Hua, *Clinical pharmacokinetic study and sensitive effect of AK-2123*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994. **29**(3): p. 607-10.
129. A.H., G.-A., *Sensitized radiotherapy with both moderate high dose of AK 2123 and external beam radiotherapy combined with hydralazine induced hypoxia*. Radiosensit. Newslett., 1991. **10**: p. 56.
130. Huilgol, N.G., N. Chatterjee, and A.R. Mehta, *An overview of the initial experience with AK-2123 as a hypoxic cell sensitizer with radiation in the treatment of advanced head and neck cancers*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **34**(5): p. 1121-4.
131. Zhang, X., et al., *Cellular accumulation and retention of the technetium-99m-labelled hypoxia markers BRU59-21 and butylene amine oxime*. Nucl Med Biol, 2001. **28**(8): p. 949-57.
132. Lee, B.F., et al., *Accumulation of Tc-99m HL91 in tumor hypoxia: in vitro cell culture and in vivo tumor model*. Kaohsiung J Med Sci, 2008. **24**(9): p. 461-72.
133. Kinuya, S., et al., *Hypoxia-induced alteration of tracer accumulation in cultured cancer cells and xenografts in mice: implications for pre-therapeutic prediction of treatment outcomes with (99m)Tc-sestamibi, (201)Tl chloride and (99m)Tc-HL91*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. **29**(8): p. 1006-11.
134. Siim, B.G., et al., *Scintigraphic imaging of the hypoxia marker (99m)technetium-labeled 2,2'-(1,4-diaminobutane)bis(2-methyl-3-butanone) dioxime (99mTc-labeled HL-91; prognox): noninvasive detection of tumor response to the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4582-8.
135. Chu, T., et al., *Synthesis and biological results of the technetium-99m-labeled 4-nitroimidazole for imaging tumor hypoxia*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(3): p. 747-9.
136. Engelhardt, E.L., et al., *The synthesis and radiolabeling of 2-nitroimidazole derivatives of cyclam and their preclinical evaluation as positive markers of tumor hypoxia*. J Nucl Med, 2002. **43**(6): p. 837-50.
137. Barre E., H.N., De Beco V., Leger G., Verbruggen A., Rattat D., Petitjean O., Moretti J.L., *Etude de deux nouveaux traceurs potentiels de l'hypoxie tumorale*. 2006.
138. Giglio, J., et al., *Preparation and characterization of technetium and rhenium tricarbonyl complexes bearing the 4-nitrobenzyl moiety as potential bioreductive diagnostic radiopharmaceuticals. In vitro and in vivo studies*. Eur J Med Chem, 2008. **43**(4): p. 741-8.
139. Mallia, M.B., et al., *On the isolation and evaluation of a novel unsubstituted 5-nitroimidazole derivative as an agent to target tumor hypoxia*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(19): p. 5233-7.
140. Yang, D.J., et al., *Noninvasive assessment of tumor hypoxia with 99mTc labeled metronidazole*. Pharm Res, 1999. **16**(5): p. 743-50.
141. Wood, K.A., W.L. Wong, and M.I. Saunders, *[(64)Cu]diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone) - a radiotracer for tumor hypoxia*. Nucl Med Biol, 2008. **35**(4): p. 393-400.

142. Fujibayashi, Y., et al., *Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential*. J Nucl Med, 1997. **38**(7): p. 1155-60.
143. Burgman, P., et al., *Cell line-dependent differences in uptake and retention of the hypoxia-selective nuclear imaging agent Cu-ATSM*. Nucl Med Biol, 2005. **32**(6): p. 623-30.
144. Harris, E.D., *Copper homeostasis: the role of cellular transporters*. Nutr Rev, 2001. **59**(9): p. 281-5.
145. Myerson, R.J., et al., *Monitoring the effect of mild hyperthermia on tumour hypoxia by Cu-ATSM PET scanning*. Int J Hyperthermia, 2006. **22**(2): p. 93-115.
146. Dearling JIJ, L.J., McCarthy DW, Welch MJ, Blower PJ, *Redox-active metal complexes for imaging hypoxic tissues: structure-activity relationships in copper(II) bis(thiosemicarbazone) complexes*. Chemical Communications, 1998. **22**: p. 2531-32.
147. Laforest, R., et al., *Dosimetry of 60/61/62/64Cu-ATSM: a hypoxia imaging agent for PET*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005. **32**(7): p. 764-70.
148. Fujibayashi, Y., et al., *Comparative studies of Cu-64-ATSM and C-11-acetate in an acute myocardial infarction model: ex vivo imaging of hypoxia in rats*. Nucl Med Biol, 1999. **26**(1): p. 117-21.
149. Lewis, J.S., et al., *Evaluation of 64Cu-ATSM in vitro and in vivo in a hypoxic tumor model*. J Nucl Med, 1999. **40**(1): p. 177-83.
150. Lewis, J., et al., *Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): An agent for radiotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 1206-11.
151. Lewis, J.S., et al., *Delineation of hypoxia in canine myocardium using PET and copper(II)-diacetyl-bis(N(4)-methylthiosemicarbazone)*. J Nucl Med, 2002. **43**(11): p. 1557-69.
152. O'Donoghue, J.A., et al., *Assessment of regional tumor hypoxia using 18F-fluoromisonidazole and 64Cu(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) positron emission tomography: Comparative study featuring microPET imaging, Po2 probe measurement, autoradiography, and fluorescent microscopy in the R3327-AT and FaDu rat tumor models*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(5): p. 1493-502.
153. Yuan, H., et al., *Intertumoral differences in hypoxia selectivity of the PET imaging agent 64Cu(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)*. J Nucl Med, 2006. **47**(6): p. 989-98.
154. Matsumoto, K., et al., *The influence of tumor oxygenation on hypoxia imaging in murine squamous cell carcinoma using [64Cu]Cu-ATSM or [18F]Fluoromisonidazole positron emission tomography*. Int J Oncol, 2007. **30**(4): p. 873-81.
155. Tanaka, T., et al., *Double-tracer autoradiography with Cu-ATSM/FDG and immunohistochemical interpretation in four different mouse implanted tumor models*. Nucl Med Biol, 2006. **33**(6): p. 743-50.
156. Dehdashti, F., et al., *Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by positron emission tomography with 60Cu-ATSM: relationship to therapeutic response-a preliminary report*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **55**(5): p. 1233-8.
157. Dehdashti, F., et al., *Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by PET with 60Cu-labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)*. J Nucl Med, 2008. **49**(2): p. 201-5.
158. Dehdashti, F., et al., *In vivo assessment of tumor hypoxia in lung cancer with 60Cu-ATSM*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003. **30**(6): p. 844-50.
159. Chrastina, A., et al., *Biodistribution and pharmacokinetics of 125I-labeled monoclonal antibody M75 specific for carbonic anhydrase IX, an intrinsic marker of hypoxia, in nude mice xenografted with human colorectal carcinoma*. Int J Cancer, 2003. **105**(6): p. 873-81.
160. Lawrentschuk, N., et al., *Investigation of hypoxia and carbonic anhydrase IX expression in a renal cell carcinoma xenograft model with oxygen tension measurements and (124)I-cG250 PET/CT*. Urol Oncol, 2009.

161. Monteil, J., et al., *In vivo follow-up of rat tumor models with 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose/dual-head coincidence gamma camera imaging*. Mol Imaging Biol, 2005. **7**(3): p. 220-8.
162. Dutour, A., et al., *Non-invasive imaging correlates with histological and molecular characteristics of an osteosarcoma model: application for early detection and follow-up of MDR phenotype*. Anticancer Res, 2007. **27**(6B): p. 4171-8.
163. Monchaux, G., et al., *Carcinogenic and cocarcinogenic effects of radon and radon daughters in rats*. Environ Health Perspect, 1994. **102**(1): p. 64-73.
164. Jasmin, C., et al., *[An experimental model of osteosarcomas in rats]*. Sem Hop, 1982. **58**(28-29): p. 1684-9.
165. Aubry, K., et al., *FDG-PET/CT of head and neck squamous cell carcinoma in a rat model*. Mol Imaging Biol, 2009. **11**(2): p. 88-93.
166. Charissoux, J.L., et al., *Treatment of experimental osteosarcoma tumors in rat by herpes simplex thymidine kinase gene transfer and ganciclovir*. Anticancer Res, 1999. **19**(1A): p. 77-80.
167. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
168. Hoskin, P.J., et al., *Hypoxia in prostate cancer: correlation of BOLD-MRI with pimonidazole immunohistochemistry-initial observations*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **68**(4): p. 1065-71.
169. Reijnders, K., et al., *Influence of body temperature on the BOLD effect in murine SCC tumors*. Magn Reson Med, 2004. **51**(2): p. 389-93.
170. Landuyt, W., et al., *BOLD contrast fMRI of whole rodent tumour during air or carbogen breathing using echo-planar imaging at 1.5 T*. Eur Radiol, 2001. **11**(11): p. 2332-40.
171. Dunn, J.F. and H.M. Swartz, *Blood oxygenation. Heterogeneity of hypoxic tissues monitored using bold MR imaging*. Adv Exp Med Biol, 1997. **428**: p. 645-50.
172. Dence, C.S., et al., *Autoradiographic and small-animal PET comparisons between (18)F-FMISO, (18)F-FDG, (18)F-FLT and the hypoxic selective (64)Cu-ATSM in a rodent model of cancer*. Nucl Med Biol, 2008. **35**(6): p. 713-20.
173. Dutour, A., et al., *18F-FDG PET SUVmax correlates with osteosarcoma histologic response to neoadjuvant chemotherapy: preclinical evaluation in an orthotopic rat model*. J Nucl Med, 2009. **50**(9): p. 1533-40.
174. Dutour, A., et al., *Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: study in a human-like rat orthotopic tumor*. Mol Ther, 2005. **11**(2): p. 311-9.
175. Groshar, D., et al., *Imaging tumor hypoxia and tumor perfusion*. J Nucl Med, 1993. **34**(6): p. 885-8.
176. Nordmark, M., M. Overgaard, and J. Overgaard, *Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. Radiother Oncol, 1996. **41**(1): p. 31-9.
177. Minn, H., et al., *Effect of nitroimidazole sensitizers on in vitro glycolytic metabolism of hypoxic squamous cell carcinoma*. Acta Oncol, 2000. **39**(2): p. 199-205.
178. Rischin, D., et al., *Hypoxia in head and neck cancer: studies with hypoxic positron emission tomography imaging and hypoxic cytotoxins*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **69**(2 Suppl): p. S61-3.
179. Kim, J.Y., et al., *A simple Cu-64 production and its application of Cu-64 ATSM*. Appl Radiat Isot, 2009. **67**(7-8): p. 1190-4.
180. Shankar, L.K. and D.C. Sullivan, *Functional imaging in lung cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(14): p. 3203-11.
181. Cherk, M.H., et al., *Lack of correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in non-small cell lung cancer assessed by 18F-Fluoromisonidazole and 18F-FDG PET*. J Nucl Med, 2006. **47**(12): p. 1921-6.

182. Moulder, J.E. and S. Rockwell, *Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1984. **10**(5): p. 695-712.
183. Lartigau, E., et al., *Oxygenation of head and neck tumors*. Cancer, 1993. **71**(7): p. 2319-25.
184. Brizel, D.M., et al., *Pretreatment oxygenation profiles of human soft tissue sarcomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994. **30**(3): p. 635-42.
185. Rasey, J.S., et al., *Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [¹⁸F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **36**(2): p. 417-28.
186. Vaupel, P., et al., *Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements*. Cancer Res, 1991. **51**(12): p. 3316-22.
187. Hockel, M., et al., *Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements*. Cancer Res, 1991. **51**(22): p. 6098-102.
188. Fyles, A.W., et al., *Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer*. Radiother Oncol, 1998. **48**(2): p. 149-56.
189. Hellwig, D., et al., *¹⁸F-FDG PET for mediastinal staging of lung cancer: which SUV threshold makes sense?* J Nucl Med, 2007. **48**(11): p. 1761-6.
190. Higashi, K., et al., *¹⁸F-FDG uptake by primary tumor as a predictor of intratumoral lymphatic vessel invasion and lymph node involvement in non-small cell lung cancer: analysis of a multicenter study*. J Nucl Med, 2005. **46**(2): p. 267-73.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	8
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	12
DEVELOPPEMENT TUMORAL	14
I. Propriétés des cellules cancéreuses	14
II. De la lésion précancéreuse au cancer	15
II.A. Initiation	15
II.B. Promotion	15
II.C. Progression	16
III. Invasion tumorale	16
III.A. Modulation de l'expression des molécules d'adhésion	16
III.A.1. Adhésion intercellulaire	16
III.A.2 Adhésion cellule-Matrice Extra Cellulaire (MEC)	17
III.B. Sécrétion d'enzymes protéolytiques	17
III.C. Motilité et migration cellulaire dans la MEC	17
III.D. Capacité d'induction d'angiogénèse	18
IV. Processus métastatique	18
IV.A. Intravasation	18
IV.B. Survie	18
IV.C. Extravasation	18
IV.D. Survie et prolifération cellulaire dans un environnement hétérotopique	19
NEOVASCULARISATION TUMORALE	21
I. Néovascularisation physiologique	22
I.A. Vasculogénèse	22
I.B. Angiogénèse	22
I.C. Artériogénèse	23
II. Néovascularisation pathologique	23
III. HIF1	25
IV. Facteurs de l'angiogénèse, sous la dépendance de HIF	29
IV.A. VEGF	29
IV.B. FGF	29
IV.C. Angiopoïétine 1	29
IV.D. Angiopoïétine 2	30
V. Traitements anti-angiogéniques	30
V.A. Voie du VEGF	31
V.A.1 Anticorps monoclonaux	31
V.A.2. Inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK)	31
▪ <i>Sunitinib</i>	31
▪ <i>PTK/ZK</i>	32
▪ <i>Semaxanib</i>	32
▪ <i>Autres</i>	32
V.A.3. Autres inhibiteurs du VEGF	32
▪ <i>VEGF-Trap (AFLIBERCEPT®)</i>	32
▪ <i>Immunothérapie cellulaire</i>	32
▪ <i>Ribosyme anti-Flt1</i>	32
▪ <i>Aplidine</i>	32
▪ <i>Oligonucléotides antisens</i>	32

V.B. Inhibition de la Cox-2.....	33
V.C. Autres voies d'inhibition de l'angiogénèse	33
V.C.1. Inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse	33
V.C.2. Inhibiteurs de l'EGFR.....	33
V.C.3. Antagonistes des intégrines	33
V.C.4. Divers.....	33
▪ <i>NEOVASTAT</i> [®]	33
▪ <i>Voie de la Raf-1</i>	34
▪ <i>Combretastatin A-4 phosphate</i>	34
▪ <i>Squalamine</i>	34
▪ <i>Thalidomide</i>	34
▪ <i>TNP-470</i>	34
▪ <i>2-méthoxyestradiol</i>	34
▪ <i>Inhibiteurs des histones déacétylases</i>	34
▪ <i>Cytotoxiques conventionnels</i>	34
HYPOXIE TUMORALE.....	36
I. Physiopathologie.....	36
II. Actions moléculaire, cellulaire et conséquences métaboliques.....	37
II.A. Angiogénèse	38
II.B. Action antiapoptotique.....	38
II.C. Effet Warburg	39
II.C. Voie de signalisation.....	39
II.D. Unfolded Protein Response (UPR).....	40
III. Implication dans la chimiorésistance	42
IV. Implication dans la radiorésistance	43
IV.A. Principe de la radiothérapie.....	44
IV.B. Radiorésistance et effet Oxygène	46
IV.C. Radiosensibilisants [48, 49]	47
IV.C.1. Radiosensibilisants oxygène-like	47
▪ <i>L'oxygène</i>	48
▪ <i>Radiosensibilisants électrophiles</i>	50
▪ <i>N-oxydes aromatiques</i>	51
▪ <i>L'oxyde nitrique</i>	52
IV.C.2. Augmentation du stress oxydatif et des dommages de l'ADN	53
IV.C.3. Suppression des substances radioprotectrices	54
IV.C.4. Radiosensibilisation par les pyrimidines halogénées	54
IV.C.5. Altération des mécanismes de réparation de l'ADN.....	55
IV.C.6. Ciblage des protéines de signalisation et des facteurs de croissance	56
EVALUATION de L'HYPOXIE TUMORALE	58
I. Techniques de détection.....	58
I.A. Electrodes polarographiques à O ₂	58
I.B. Réflectivité différentielle ou tomographie optique diffuse (TOD)	59
I.C. Analyses sanguines	60
I.D. Immunohistochimie	60
I.E. Autoradiographie.....	61
I.F. Imagerie <i>in vivo</i>	61
I.F.1. IRM.....	62
I.F.2. Imagerie nucléaire	62
▪ <i>TEMP</i>	63
▪ <i>TEP</i>	63
II. Radio-traceurs.....	66
II.A. Nitroimidazolés.....	66
II.A.1. Mécanisme de fixation.....	66

▪ Réduction du groupement nitro (Figure 21)	66
▪ Importance de la charge et du potentiel redox	67
▪ Autre mécanisme	68
II.A.2. Structure	69
II.A.3. Traceurs	70
II.A.3.a. Traceurs fluorés	70
▪ ¹⁸ FMISO	70
▪ Traceurs marginaux	72
▪ FRP170	73
▪ ¹⁸ F-EF3 et ¹⁸ F-EF5	73
▪ ¹⁸ FETNIM	74
▪ ¹⁸ FETA	75
▪ ¹⁸ FAZA	75
II.A.3.b. Traceurs iodés	76
▪ IAZP	76
▪ ¹²³ IAZA	76
▪ IAZG ou IAZGP	77
▪ IAZXP	79
II.A.3.c. Technétium	79
▪ BMS181321 et BRU59-21	79
▪ AK2123 cyclam	81
▪ HL91	81
▪ NIM-DETA, NIM-N2-Ac2 :	83
▪ Complexe tricarbonyl-4-nitrobenzyl technétié	83
▪ Autre marqueur technétié	84
II.B. Dérivés du CUIVRE	85
II.B.1. Mécanisme de fixation	85
II.B.2. Structure	86
II.B.3. Biodistribution	88
II.B.4. Etudes <i>in vitro</i> et pré-cliniques	88
II.B.5. Etudes cliniques	91
II.C. Anticorps	92
II.C.1. M75	92
II.C.2. ¹²⁴ IcG250	92
EVALUATION de L'HYPOXIE TUMORALE par L'IMAGERIE au	
¹⁸FMISO sur deux MODELES TUMORAUX chez le RAT	94
I. Matériel et méthode	94
I.A. Modèle animal	94
I.A.1. Lésions tumorales pulmonaires	95
I.A.2. Ostéosarcomes	96
I.B. Traceurs	96
I.B.1. ¹⁸ FDG	97
I.B.2. ¹⁸ FMISO	97
I.C. Le TEP-TDM	98
I.D. Imagerie	99
I.D.1. Injection	99
I.D.2. Acquisition au ¹⁸ FDG	99
I.D.3. Acquisition au ¹⁸ FMISO	99
II. Résultats	100
II.A. Différents paramètres	100
II.B. Modèle de tumeur pulmonaire	102
II.C. Modèle d'ostéosarcome greffé	104
III. Discussion	111
	133

III.A. Objectif.....	111
III.B. Modèles	111
III.C. Détection de la tumeur primitive.....	112
III.D. Caractérisation de la croissance tumorale	113
III.E. Imagerie fonctionnelle	114
III.F. Quantification.....	117
CONCLUSION.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	120
SERMENT de GALIEN.....	130
TABLE des MATIERES.....	131
TABLE des FIGURES.....	135
TABLE des TABLEAUX.....	136
TABLE des EQUATIONS.....	137

TABLE des FIGURES

Figure 1 : Néovascularisation tumorale.	24
Figure 2 : Switch angiogénique.	25
Figure 3 : Structure de HIF1 α et HIF1 β	25
Figure 4 : Régulation de HIF1 en présence d'O ₂ (A) ou non (B).	28
Figure 5 : Hypoxie et angiogénèse tumorales.	28
Figure 6 : Néoangiogénèse tumorale.	30
Figure 7 : Métabolismes cellulaires et pO ₂	38
Figure 8 : Possible interaction entre la glycolyse et HIF1 α dans la cellule cancéreuse.	39
Figure 9 : Principaux médiateurs de l'UPR.	40
Figure 10 : Diffusion péri-vasculaire.	43
Figure 11 : Radiorésistance des cellules hypoxiques.	43
Figure 12 : Radiothérapie : mécanisme d'action.	44
Figure 13 : Propriétés du misonidazole.	51
Figure 14 : Mécanisme de fixation de la tirapazamine.	52
Figure 15 : Réduction d'AQ4N.	55
Figure 16 : Electrode de Clark.	58
Figure 17 : Principe de l'immunohistochimie.	60
Figure 18 : Désintégration du ¹⁸ F et photon d'annihilation.	64
Figure 19 : Principe du tomographe à émission de positons.	64
Figure 20 : Traceurs imidazolés fluorés ; traceurs technétiés ; traceurs cuivrés.	66
Figure 21 : La structure et le mécanisme de rétention du fluoromisonidazole.	67
Figure 22 : Structures du cyclam, de l'oxocyclam et du dioxocyclam.	68
Figure 23 : Capitation et rétention de ⁶⁴ Cu-ATSM.	86
Figure 24 : Schéma simplifié des chambres d'inhalation du radon.	95
Figure 25 : Automate de synthèse : Synchrom R&D.	97
Figure 26 : Principe de synthèse du ¹⁸ FMISO.	98
Figure 27 : Mesure du volume tumoral ellipsoïde et du volume métabolique du rat 3R.	101
Figure 28 : Mesure du volume tumoral ellipsoïde et du volume métabolique du rat 2N.	101
Figure 29 : Rat MC 34-1.	103
Figure 30 : Volumes tumoraux en fonction du temps.	105
Figure 31 : Temps de doublement tumoraux des rats.	105
Figure 32 : Images en feu d'herbe de la croissance tumorale du fémur droit du rat 3R.	106
Figure 33 : Ostéosarcome du rat 2N.	107
Figure 34 : Echantillonnage tumoral en TEP et fusion au ¹⁸ FDG chez le rat 2N.	108
Figure 35 : Echantillonnage tumoral en TEP et fusion au ¹⁸ FMISO chez le rat 2N.	108
Figure 36 : Evolution de la fraction volumique de ¹⁸ FMISO chez le rat 2N.	109
Figure 37 : Métastases pulmonaires chez le rat 3R.	110
Figure 38 : Métastase pulmonaire chez le rat 3R.	110

TABLE des TABLEAUX

Tableau 1 : Demi-vies et modes de désintégration des principaux isotopes du cuivre.....	87
Tableau 2 : Cancers pulmonaires	102
Tableau 3 : Ostéosarcome :	104
Tableau 4 : Relation entre les fixations et les TDT.....	115
Tableau 5 : Comparaison des fixations de ¹⁸ F _{FDG} et ¹⁸ F _{MISO}	117

TABLE des EQUATIONS

Équation 1 : Calcul de la SUV.	65
Équation 2 : Calcul ellipsoïdal du volume tumoral.	100
Équation 3 : Calcul du TDT.	101
Équation 4 : Prolifération cellulaire tumorale.	113
Équation 5 : TDT à partir des coefficients de prolifération et de perte cellulaire.	114

BON A IMPRIMER N° 3333

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

L'HYPOXIE TUMORALE : PLACE DE L'IMAGERIE FONCTIONNELLE AU $^{18}\text{FMISO}$

RESUME

Le développement tumoral nécessite l'enchaînement séquentiel de multiples mécanismes. La néoangiogénèse, sous la dépendance du facteur HIF1, assure l'apport nutritif cellulaire. Cette étape-clé de la croissance cancéreuse est cependant imparfaite et parfois responsable de phénomènes hypoxiques. L'hypoxie tumorale est un facteur pronostic fort du développement tumoral et de la réponse au traitement : elle est corrélée à l'agressivité tumorale, au développement de rechutes et de métastases, à la chimio- et radiorésistance.

L'hypoxie peut être explorée par des méthodes invasives ou des techniques d'imagerie *in vivo*. L'imagerie isotopique se développe dans deux directions principales à l'aide de radiotraceurs utilisables en imagerie monophotonique, et surtout biphotonique. Le $^{18}\text{FMISO}$ reste le traceur de référence.

Après une analyse de la littérature nous avons effectué un travail préliminaire expérimental dont l'objectif était l'étude de l'hypoxie par imagerie par Tomographie à Emission de Positons au $^{18}\text{FMISO}$ chez l'animal. Deux modèles tumoraux sur rat immunocompétent, l'ostéosarcome greffé et le cancer pulmonaire induit, ont été suivis et comparés.

Nos résultats montrent l'hétérogénéité de l'hypoxie intra- et inter-individuelle. L'ostéosarcome paraît plus hypoxique, tout comme les tumeurs primitives par rapport aux métastases. Notre travail, malgré ses limites, soulève de nombreuses questions. Quelle est l'influence de la néovascularisation, de la taille tumorale, des facteurs environnementaux... dans l'hypoxie ? L'évaluation de l'hypoxie pourrait permettre une meilleure caractérisation tumorale pour guider la stratégie thérapeutique.

MOTS CLES : *Hypoxie tumorale, $^{18}\text{FMISO}$, TEP, modèle animal.*

TUMOR HYPOXIA: FONCTIONNAL IMAGING WITH $^{18}\text{FMISO}$

ABSTRACT

Tumor development needs numerous sequential mechanisms. HIF1 dependent neoangiogenesis is necessary to carry cellular nutrients. This key-step of tumor growth is imperfect and sometimes responsible for hypoxic phenomena. Tumor hypoxia is an important prognostic factor of cancer development and treatment response. Hypoxia is correlated with tumor aggressiveness, metastasis occurrence, chimio- and radio-resistance.

Hypoxia can be assessed by invasive methods or by imaging modalities. In nuclear imaging, radiolabelled compounds are developed for monophotonic and biphotonic imaging. $^{18}\text{FMISO}$ remains the gold standard for hypoxia imaging.

After literature analysis, we performed an experimental preliminary report on animals to study hypoxia imaging with $^{18}\text{FMISO}$ PET. Two tumor models were developed on immunocompetent rat: osteosarcoma graft and lung cancer induced by radon and tobacco. Our results highlight both intra and interindividual heterogeneity. Hypoxia was higher in osteosarcoma model. $^{18}\text{FMISO}$ uptake was most important in primitive tumor than in metastatic locations. Concerning hypoxia, several points need to be clarified: tumor size and neovascularisation, environmental effect... In the next decade, hypoxia assessment could allow a better tumor characterisation to optimize therapeutic strategy.

KEY-WORDS: *Tumor Hypoxia, $^{18}\text{FMISO}$, PET; animal model.*

PHARMACIE HOSPITALIÈRE - RADIOPHARMACIE
Faculté de Pharmacie
2 Avenue Martin Luther King
87042 LIMOGES CEDEX