



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 14239

**To cite this version :**

Meunier, Solène. *Étude préliminaire in vivo du ciblage diagnostique et thérapeutique des tumeurs endocrines du pancréas chez la souris swiss nude par des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques vectorisées par un analogue de la gastrine (mg-ionp-dy647)*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 134 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

**ETUDE *IN VIVO* DU CIBLAGE DIAGNOSTIQUE ET  
THÉRAPEUTIQUE DES TUMEURS ENDOCRINES DU  
PANCRÉAS CHEZ LA SOURIS SWISS NUDE PAR DES  
NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER  
SUPERPARAMAGNÉTIQUES VECTORISÉES PAR UN  
ANALOGUE DE LA GASTRINE (MG-IONP-DY647)**

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**MEUNIER Solène**

Née, le 4 septembre 1989 à SOISY-SOUS-MONTMORENCY (95)

---

**Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

---

**JURY**

IDENT :

**Janick SELVES**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ESSEURS :

**Isabelle RAYMOND-LETRON  
Alexandra DEVIERS**

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

BRE INVITE :

**Véronique GIGOUX**

Chargée de recherche à l'INSERM

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. Alain MILON

PROFESSEURS CLASSE  
EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1°  
CLASSE

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2°  
CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*

- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

#### **1.1.1.1 PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## **2 MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

<b>MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)</b>
----------------------------------------------------

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### 2.1.1 MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*
- Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

## **REMERCIEMENTS**

**A notre Présidente de jury de thèse,**

**Madame le Professeur Janick Selves,  
Professeur de la Faculté de Médecine de Toulouse  
Anatomie pathologique**

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de notre jury de thèse.  
Nous vous prions d'accepter nos hommages respectueux.

**A notre jury de thèse,**

**A Madame le Docteur Isabelle Raymond-Letron,  
Maître de Conférences Hors classe à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Anatomie pathologique**

Qui a fait le pari d'accepter la direction et l'encadrement de ce travail,  
Pour sa disponibilité, son aide précieuse, son enthousiasme,  
Veuillez trouver l'expression de notre sincère reconnaissance.

**A Madame le Docteur Alexandra Deviers,  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Anatomie, Imagerie médicale**

Qui nous a fait le plaisir d'accepter de participer à notre jury de thèse,  
Nous vous adressons notre sincère gratitude.

**A Madame le Docteur Véronique Gigoux, membre invité,  
Chargée de Recherche à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale**

Qui nous a proposé ce travail et guidé tout au long de sa réalisation,  
Pour m'avoir accueillie pendant ces quelques mois de travail expérimental, ses  
conseils avisés, son aide de tous les instants  
Pour m'avoir permis de sauter à pieds joints dans le domaine de la recherche,  
Très sincères remerciements.

**A tous ceux sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour ou pu aboutir,**  
**A Daniel Fourmy**, pour son accueil dans cette équipe où je me sens si bien,  
**A Hubert Lulka**, pour son aide patiente et ses grands talents de bricoleur,  
**A Christine Delage, Sophie Legonidec et Denis Calise**, pour leurs performances techniques,  
**A Darine, Marie-Julie, Pascal et Sadek**, pour leurs conseils et leur bonne humeur,  
**A l'équipe des physiciens**, pour leur aide précieuse dans ce travail,  
**Aux préparatrices de l'équipe d'anatomie pathologique de l'ENVT**, pour la préparation  
des nombreux échantillons

**A ma famille,**

**A ma Maman**, dont le souvenir a inspiré chaque instant de cette thèse. Merci de m'avoir  
appris à toujours exiger le meilleur de moi-même, merci de m'avoir transmis ces valeurs qui  
font ce que je suis aujourd'hui.

**A toi, Papa**, merci de m'avoir permis de réaliser le rêve d'être vétérinaire, merci d'être  
toujours là si discrètement au moment opportun, merci de croire en moi plus que je ne le fais  
moi-même. Si je te rend le centième de ce que tu m'as donné, ce sera déjà beaucoup.

**A Adèle**, son immense talent artistique, notre complicité de petites filles que j'espère ne pas  
avoir trop perdue avec le temps, **et Antonin**, le Roger Federer de la famille, mon petit frère  
qui a déjà beaucoup trop grandi.

**A Mamé**, merci pour tous ces souvenirs d'enfance à Jacoumar, merci pour ta gentillesse et tes  
petites attentions, merci d'être toujours aussi fière de moi. Il me manque les mots pour  
exprimer tout ce que je voudrais te dire, mais je sais que tu devineras.

**A Papé**, à toute l'admiration que j'aurai toujours pour toi, même s'il est trop tard pour le dire,  
à l'éclat si particulier qu'on voyait dans tes yeux quand tu nous parlais de sciences et qui - je  
crois - m'a donné envie de m'y plonger, à ton amour touchant et pudique pour tous ceux qui  
t'entouraient.

**A Bruno**, merci de m'avoir aidée à devenir qui je suis aujourd'hui, notamment d'avoir poussé  
pour moi la porte du lycée Henri IV. C'est rare, un tonton comme toi.

**A Mamie Josette et Papy Marcel**, chez qui on est toujours aussi bien accueilli, pour les  
Noëls en famille au coin de la cheminée ou les barbecues de l'été.

**A toute la famille Meunier**, que je ne vois pas aussi souvent que je le voudrais,

**A Thibaut**, merci d'avoir grandi à mes côtés pendant ces huit ans, de m'avoir fait tour à tour rêver, sourire et pleurer. J'ai pris un chemin un peu différent de celui que nous avons partagé ensemble, mais il ne me reste aujourd'hui que les bons souvenirs. A toi aussi j'espère...

**A Claire**, à ton sourire et ta belle « folie », à tes pâtisseries de l'impossible, à nos irréalistes projets de voyage au bout du monde, à ta façon si jolie de croquer la vie à pleines dents.

**A Delphine**, merci de deviner si bien ce qui me passe par la tête. J'aimerais réduire les kilomètres qui nous séparent, tu me manques beaucoup depuis Toulouse.

**A Alice, Anaïs, Anne-Laure, Chloé, Fanny, Florence, Florian, Guillaume, Ludovic, Nathan, Johanna, Jaufret, Aurélie**, à notre complicité au collège ou au lycée.

**A Stefanie**, à notre amitié franco-allemande qui, je l'espère, durera encore longtemps.

**A Mylène**, une belle rencontre de prépa.

**A Elodie**, du Bout du Monde au Tommys, avec (ou sans !) GPS, merci de glisser de la magie dans nos vies depuis 6 ans, **Elsa**, « parce qu'on n'a pas le cul sorti des ronces, ma bichette », comme on se le dit lors de nos longues conversations au téléphone et qui me font tellement de bien cette année, **Claudia**, à ta la classe à l'état pur qui m'impressionne toujours autant, et à nos repas improvisés en A5 entre deux étages du bâtiment D, à **Louise**, à tes doigts de fée, tes risottos délicieux, tes randonnées improvisées dans la neige, ton talent pour tous nous réunir, Promis on ne s'oublie pas ?

**A Alban**, et ses milliers de kilomètres au compteur pour faire du poney, **Amélie**, avec qui j'aurais aimé partager plus de temps, **Anthia**, et sa mémoire de poisson rouge, **Antoine**, et ton talent pour l'ouverture des boîtes de conserves, **Audrey**, et nos discussions de vipères au troisième étage du bâtiment D, **Aurélie**, perdue en équine mais qu'on n'oublie pas, **Aurélien**, pour nous faire rire en toutes circonstances, **Caroline et Thibault**, surtout pour notre A5 ensemble, **Darty** et tes shorts par tous les temps, **Elise**, une de mes premières rencontres à l'école, **Emilie**, qui aurait définitivement dû rester à Toulouse pour l'internat, **Jennifer**, pour ta gentillesse et ton sourire à toute épreuve, **Laurence**, pour une vraie amitié à côté de laquelle j'aurais regretté de passer, **Marie**, et ses looongues histoires, **Marion**, et nos soirées bières avec le plus beau chat du monde sur les genoux, **Mailys**, et son incontournable punch, **Manue**, et nos trajets en TER, **Salim**, et tes chocolatinnes si réconfortantes du matin après la nuit de garde, **Simon**, et son accent aveyronnais qui me rappelle mes racines, le **Jungle Touch**, et votre hangar. Vous faites partie de la plupart de mes souvenirs d'école, et j'espère que ce n'est pas fini !

**A Paul et Franck**, que j'admire toujours autant.

**A mes 15 co-internes**, et à cette belle année qui ne fait que commencer.

**Aux A4 et A5** qui me donnent envie de me lever un peu plus tôt le matin pour les retrouver en clinique, vous êtes au top !

**A mes poulots**, les meilleurs !

**A tous ceux du monde vétérinaire qui m'inspirent et ont jeté sur moi un regard trop bienveillant**. S'il n'y avait qu'une personne à citer, ce serait toi, **Marie-Laure**. Et s'il n'y avait qu'un seul mot à dire, ce serait merci. Du fond du cœur. Tout simplement.



**Aux vétérinaires et ASV de la clinique de l'Artel**, merci de m'avoir confié les clefs de chez vous et de m'avoir permis d'y faire mes premières armes de vétérinaire.

**A Hélium**, parce que tu es si mignon, surtout quand tu fais des bêtises...

**A tous ceux que je n'ai pas cités mais qui comptent...**

A vous tous merci de remplir ma vie de jolis souvenirs ! Ce n'est pas si fréquent mais si j'ai les yeux pleins de larmes en finissant ces lignes c'est que je vous aime trop fort pour le dire assez souvent.

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	10
TABLE DES ANNEXES .....	11
TABLE DES ABBREVIATIONS .....	12
INTRODUCTION.....	13

### **PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **1 Les tumeurs endocrines : un groupe hétérogène de tumeurs rares représentant un challenge diagnostique et thérapeutique .....**

1.1 Définition, propriétés communes et classification .....	20
1.1.1 Définition et propriétés communes .....	20
1.1.2 Différentes classifications pour les TE-GEP .....	22
1.2 Epidémiologie.....	23
1.2.1 Dans l'espèce humaine .....	23
1.2.2 Chez les Carnivores domestiques.....	25
1.3 Diagnostic – pronostic .....	25
1.3.1 Tumeurs gastro-entéro-pancréatiques .....	25
1.3.2 Tumeurs endocrines dérivées du neuroectoderme .....	29
1.4 Modalités thérapeutiques actuellement disponibles pour les tumeurs neuroendocrines	30
1.4.1 Chirurgie.....	30
1.4.2 Traitement médical des symptômes dus à l'hypersécrétion hormonale.....	31
1.4.3 Chimiothérapie .....	33

#### **2 Le récepteur CCK2 : un récepteur membranaire de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, impliqué dans la carcinogenèse tumorale et surexprimé dans de nombreuses cellules tumorales .....**

2.1 Structure du RCCK2.....	38
2.2 Deux ligands naturels et de nombreux ligands synthétiques .....	40
2.2.1 Gastrine .....	40
2.2.2 Cholecystokinine .....	41
2.3 Fonctionnement du RCCK2 .....	42
2.3.1 Généralités sur le fonctionnement des RCPG .....	42

2.3.2	Données expérimentales sur le fonctionnement du RCCK2.....	43
2.4	Distribution tissulaire du RCCK2.....	44
2.5	Implications physiologiques de la gastrine, de la CCK et du RCCK2.....	45
2.5.1	Au niveau du système digestif.....	45
2.5.2	Au niveau du système nerveux central.....	46
2.6	Implications pathologiques de la gastrine, de la CCK et du RCCK2.....	46
2.6.1	Rôle dans la carcinogenèse digestive.....	46
2.6.2	Surexpression dans certains tissus tumoraux.....	49
2.6.3	Présence de variants du RCCK2.....	49
2.6.4	Utilisation comme cible diagnostique et thérapeutique.....	51
<b>3</b>	<b>Les nanoparticules : de nouveaux agents diagnostiques et thérapeutiques.....</b>	<b>53</b>
3.1	Définition - propriétés.....	53
3.2	Biodistribution.....	55
3.2.1	Adressage passif.....	55
3.2.2	Adressage actif par vectorisation des nanoparticules.....	57
3.2.3	Synthèse.....	57
3.2.4	Localisation intracellulaire.....	58
3.3	Dégradation et toxicité.....	59
3.3.1	Dégradation.....	59
3.3.2	Toxicité.....	59
3.4	Intérêt diagnostique et thérapeutique.....	60
3.4.1	Utilisation des nanoparticules en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). 60	
3.4.2	Utilisation thérapeutique des nanoparticules.....	61

## **PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE**

<b>1</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>66</b>
1.1	Nanoparticules non vectorisées.....	66
1.2	Préparation des nanoparticules vectorisées.....	66
1.3	Cultures cellulaires.....	68
1.4	Modèles tumoraux <i>in vivo</i> pour l'étude de la biodistribution.....	68
1.5	Détection des nanoparticules par fluorescence.....	70
1.6	Détection du fer sur des coupes histologiques par la coloration de Perls.....	70
1.7	Mesure de la relaxométrie des tumeurs et des organes d'intérêt.....	71
1.8	Régression tumorale par hyperthermie.....	71

<b>2</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>73</b>
2.1	Résultats préliminaires .....	73
2.1.1	Choix des cellules pour la réalisation des xénogreffes.....	73
2.1.2	Ciblage des xénogreffes par des nanoparticules faiblement vectorisées.....	75
2.2	Etude de la biodistribution des nanoparticules vectorisées chez la souris swiss nude porteuse d'une xénogreffe intra-pancréatique ou sous-cutanée de glucagonome de hamster 77	
2.2.1	Réalisation des xénogreffes.....	77
2.2.2	Etude de la biodistribution des nanoparticules vectorisées .....	79
2.3	Etude de la régression tumorale suite à l'application d'un champ magnétique alternatif à des souris porteuses d'une xénogreffe après administration intraveineuse de nanoparticules vectorisées .....	92
2.3.1	Effet du traitement sur l'état général des souris .....	93
2.3.2	Température atteinte lors du traitement au champ magnétique alternatif .....	93
2.3.3	Effet du traitement sur le volume tumoral .....	94
<b>3</b>	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>97</b>
3.1	Validation du modèle expérimental.....	97
3.1.1	Choix du modèle animal .....	97
3.1.2	Choix du type de xénogreffe .....	97
3.1.3	Choix de la voie d'administration des nanoparticules .....	98
3.1.4	Choix des techniques de détection des nanoparticules.....	99
3.2	Optimisation du ciblage des tumeurs de glucagonome de hamster par les MG-IONP-DY647 .....	101
3.2.1	Résultats obtenus dans cette étude .....	101
3.2.2	Perspectives d'amélioration de la furtivité et de la capacité de ciblage des nanoparticules .....	103
3.3	Hyperthermie .....	105
3.3.1	Effet sur l'état clinique des animaux.....	105
3.3.2	Régression tumorale.....	106
3.3.3	Injection systémique ou intra-tumorale.....	108
3.4	Limites - Perspectives.....	108
	CONCLUSION .....	105
	BIBLIOGRAPHIE .....	106

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 : Potentiel syndrome MEN chez un chien
- Figure 2 : Fréquence relative des différentes tumeurs endocrines (TE) en fonction de leur localisation, d'après une étude rétrospective sur 50 000 TE entre 1973 et 2007
- Figure 3 : Marquage immunohistochimique positif à la chromogranine A (CgA) d'un paragangliome thyroïdien humain
- Figure 4 : Imagerie conventionnelle des TE-GEP
- Figure 5 : Résultats de scintigraphie des récepteurs de la somatostatine à l'Octreoscan®
- Figure 6 : Formules chimiques développées de l'octreotide et du lanreotide
- Figure 7 : Incidence et densité de 13 RCPG dans 3 types de TE
- Figure 8 : Représentation schématique du gène et de la protéine du récepteur CCK2 humain
- Figure 9 : Contrôle de la sécrétion de la gastrine par les cellules G
- Figure 10 : Transduction du signal et désensibilisation du RCPG
- Figure 11 : Incidence et niveau d'expression du RCCK2 dans différents cancers
- Figure 12 : Représentation schématique d'un nanovecteur tripartite
- Figure 13 : Synthèse de la biodistribution des nanoparticules
- Figure 14 : Formule de calcul du SAR
- Figure 15 : Représentation schématique de la méthode de nanoconjugaison utilisée pour obtenir les MG-IONP-DY647
- Figure 16 : Spectres d'absorption et d'émission du fluorochrome DY647
- Figure 17 : Injection de la suspension de nanoparticules au niveau de la veine jugulaire
- Figure 18 : Schéma du magnétomètre VSM
- Figure 19 : Bobine électromagnétique et système d'anesthésie permettant l'application du champ magnétique alternatif pour le traitement par hyperthermie des souris
- Figure 20 : Internalisation des nanoparticules dans différentes lignées cellulaires
- Figure 21 : Ciblage *in vitro* par des nanoparticules faiblement vectorisées
- Figure 22 : Coloration à l'hémalum-éosine d'une tumeur sous-cutanée
- Figure 23 : Coloration à l'hémalum-éosine d'une tumeur intra-pancréatique macroscopiquement adhérente à la rate
- Figure 24 : Réaction de Perls positive de 2 tumeurs intra-pancréatiques
- Figure 25 : Réaction de Perls positive du rein et du poumon de souris traitées aux nanoparticules
- Figure 26 : Images en épi-fluorescence *in vivo* d'une souris porteuse d'une xénogreffe intra-pancréatique 24h après injection des nanoparticules et *ex vivo* des organes après dissection
- Figure 27 : Images en épi-fluorescence *ex vivo* des tumeurs intra-pancréatiques et des organes d'intérêt
- Figure 28 : Mesures VSM pour la tumeur et le foie
- Figure 29 : Comparaison des méthodes de détection des nanoparticules dans la tumeur
- Figure 30 : Comparaison des méthodes de détection des nanoparticules dans le foie
- Figure 31 : Evolution de la température corporelle des souris pendant l'application du champ magnétique
- Figure 32 : Volume tumoral et aspect macroscopique des tumeurs suite au traitement
- Figure 32 : Stratégies d'adressage actif d'agents diagnostiques et thérapeutiques

Tableau 1 : Classification OMS des tumeurs neuroendocrines (TE)

Tableau 2 : Traitement des tumeurs endocrines

Tableau 3 : Options de chimiothérapie des tumeurs endocrines

Tableau 4 : Caractéristiques des nanoparticules fournies par le fabricant

Tableau 5 : Répartition des souris pour l'étude de la biodistribution

Tableau 6 : Répartition des souris pour l'essai de régression tumorale

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1 : Formulaire de dépôt du protocole expérimental

Annexe 2 : Informations sur les souris « nude »

Annexe 3 : Réalisation des xénogreffes

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique  
ARN : Acide ribonucléique  
CCK : Cholecystokinine  
CgA : Chromogranine A  
CMT : Carcinome médullaire de la thyroïde  
DMF : Diméthylformamide  
ECL : Enterochromaffin-like  
EPR effect : Enhanced permeation and retention effect  
GIST : Gastrointestinal stromal tumor  
GRK : Kinase couplée aux RCPG  
HCl : Acide chlorhydrique  
IFN- $\alpha$  : Interféron alpha  
INSERM : Institut nationale de la santé et de la recherche médicale  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
IVIS : In vivo imaging system  
LAR : Long acting release  
MDR : Multi-drug resistance  
MEN : Néoplasie endocrine multiple  
MG : Minigastrine  
MG-IONP-DY647 : SPION-minigastrine-DY647  
MTT : (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl) tetrazolium bromide]  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PEG : Polyéthylène glycol  
PRRT : Peptide receptor radionuclide therapy  
RCCK2 : Récepteur à la cholecystokinine 2  
RCCKA : RCCK – Alimentary  
RCCK B : RCCK - Brain  
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G  
RES : Système réticulo-endothélial  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium  
RT-PCR : Reverse transcriptase – Polymerase chain reaction  
SAR : Specific absorption rate  
SPION : Nanoparticule superparamagnétique d'oxyde de fer  
SPM : Système des phagocytes mononucléés  
TE : Tumeur endocrine  
TE-GEP : Tumeur endocrine gastro-entéro-pancréatique  
TEP : Tomographie par émission de positons  
UA : Unité arbitraire  
VIP : Peptide vasoactif intestinal  
VSM : Vibrating sample magnetometer (magnétomètre à échantillon vibrant)

## INTRODUCTION

Le domaine de la cancérologie, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, se trouve actuellement confronté à de très nombreuses limites diagnostiques et thérapeutiques.

Les tumeurs endocrines, notamment, sont diagnostiquées tardivement dans la moitié des cas, ce qui implique la présence de métastases. Or la seule thérapie efficace pour ces tumeurs repose sur la chirurgie, qui n'est curative qu'en l'absence d'extension locorégionale ou générale.

Nombre de ces tumeurs présentent la particularité de sur-exprimer des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui régulent, directement ou indirectement, l'ensemble des processus physiologiques de l'organisme. Des ligands peptidiques radiomarqués sont actuellement utilisés pour le diagnostic par scintigraphie et la radiothérapie des tumeurs endocrines, en ciblant spécifiquement le récepteur à la somatostatine, largement surexprimé par ces tumeurs. De nouveaux analogues radiomarqués ciblant d'autres RCPG sont actuellement en cours d'évaluation préclinique et clinique. C'est notamment le cas des analogues de la gastrine et de la cholecystokinine, deux ligands du récepteur CCK2. Ce RCPG exerce une action proliférative dans plusieurs cancers gastriques et se trouve surexprimé dans de nombreuses tumeurs endocrines. Il constitue donc une cible de choix pour le diagnostic et la thérapie de ces tumeurs.

Parallèlement aux radio-ligands, la médecine s'intéresse actuellement au développement des nanotechnologies. Les nanoparticules possèdent en effet des propriétés intrinsèques uniques qui en font de potentiels outils très puissants pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la chimiothérapie ciblée et la thérapie par hyperthermie. De nombreuses équipes de recherche tentent aujourd'hui d'optimiser les propriétés physico-chimiques des nanoparticules afin d'améliorer leur biodistribution. En ajoutant un ligand ou un anticorps à la surface des nanoparticules, on peut théoriquement les adresser de façon spécifique aux cellules tumorales surexprimant leur récepteur. Cette stratégie s'appelle la vectorisation, et représente une technologie d'avenir pour le diagnostic et la thérapie des tumeurs endocrines.



Cette thèse de doctorat vétérinaire constitue une étude préliminaire *in vivo* s'inscrivant dans le cadre d'un travail de développement d'un nouvel agent diagnostique et thérapeutique pour les tumeurs endocrines surexprimant le récepteur RCCK2. Le premier objectif consiste à analyser l'efficacité du ciblage par des nanoparticules magnétiques vectorisées par de la gastrine de cellules tumorales de glucagonome de hamster *in vivo* chez des souris xénotreffées. Le second objectif est d'utiliser ces nanoparticules magnétiques comme agent anticancéreux pour induire une régression tumorale par hyperthermie, induite en soumettant les souris traitées par des nanoparticules à un champ magnétique alternatif.

La première partie sera consacrée à une étude bibliographique afin de synthétiser l'épidémiologie, le diagnostic et la gestion thérapeutique des tumeurs endocrines, de présenter le récepteur RCCK2 qui fera l'objet de l'étude expérimentale, et de faire le point sur les connaissances actuelles concernant les nanoparticules. Il s'agit de l'ensemble des notions à maîtriser avant d'entreprendre une étude expérimentale.

La seconde partie présentera l'étude menée chez la souris. Les résultats seront présentés puis discutés, après avoir détaillé le protocole mis en place.

### **3 Les tumeurs endocrines : un groupe hétérogène de tumeurs rares représentant un challenge diagnostique et thérapeutique**

#### **3.1 Définition, propriétés communes et classification**

##### **3.1.1 Définition et propriétés communes**

Les tumeurs endocrines forment un groupe hétérogène de tumeurs exprimant des protéines de structure et synthétisant, stockant et excréant des produits hormonaux communs aux neurones et aux cellules endocrines. Malgré leur relative rareté, les tumeurs endocrines représentent un challenge diagnostique et thérapeutique majeur. Elles font donc actuellement l'objet de nombreuses études.

Comme leur nom l'indique, ces tumeurs se développent aux dépens de glandes endocrines (telles que l'hypophyse, la thyroïde ou les surrénales) ou de populations de cellules endocrines disséminées au sein de différents organes (dont le tube digestif, le poumon et le pancréas) (Baudin, Ducreux 2008).

Cette définition englobe des tumeurs provenant de deux origines embryologiques distinctes : le neuroectoderme et l'endoderme. Parmi les tumeurs dérivant du neuroectoderme, on citera le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) et les phéochromocytomes ou les paragangliomes. Les tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques (TE-GEP) dérivent quant à elles de l'endoderme. Localisées à la fois au niveau du tractus gastro-intestinal et du système bronchopulmonaire, elles sont d'un pronostic globalement plus défavorable que les tumeurs du premier groupe (Baudin, Ducreux 2008).

Elles apparaissent de manière sporadique ou dans un contexte de néoplasie endocrine multiple (MEN). Il s'agit d'un syndrome héréditaire autosomique dominant donnant lieu à

l'apparition de plusieurs tumeurs neuroendocrines chez un même patient. On distingue trois formes selon les tissus atteints.

Plusieurs cas compatibles avec ce syndrome ont été rapportés dans la littérature vétérinaire concernant l'espèce canine principalement, avec notamment un carcinome médullaire de la thyroïde bilatéral, un phéochromocytome uni- ou bilatéral et, moins fréquemment, une hyperplasie ou un adénome de la parathyroïde associés chez un même animal (Proverbio et coll., 2012).



Figure 1 : Potentiel syndrome MEN chez un chien (Proverbio, 2012).

La photographie de gauche montre l'invasion du lobe thyroïdien gauche par une masse de grande taille, multinodulaire, avec des zones d'hémorragie et de nécrose. L'analyse histopathologique est compatible avec un carcinome folliculaire. Au centre, le testicule est atteint par un adénome interstitiel multilobulé avec de larges zones hémorragiques. A droite, la nécropsie a mis en évidence une large masse mésentérique (flèche) adhérente à l'intestin grêle et à la capsule rénale (deux têtes de flèche), compatible avec un carcinome cortico-surrénalien.

Les tumeurs endocrines présentent des caractéristiques communes telles qu'une grande variété des grades histologiques et une capacité de sécrétion hormonale. Leur diagnostic s'appuie sur une multiplicité des marqueurs biologiques les caractérisant. L'imagerie scintigraphique fonctionnelle occupe également une place prépondérante. L'hypervascularisation généralement rencontrée chez ces tumeurs est un vecteur de qualité de l'imagerie conventionnelle (Baudin, Ducreux 2008).

On distingue les tumeurs dites « fonctionnelles » qui s'accompagnent d'un syndrome clinique de sécrétion hormonale, des tumeurs dites « non fonctionnelles ». La majorité des insulinomes se classe parmi les tumeurs fonctionnelles. Ils sont caractérisés par une hyperinsulinémie chronique, même en situation d'hypoglycémie (Frilling et coll., 2012).

Les tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques montrent en général une évolution lente, malgré l'existence de tumeurs très agressives. La présentation clinique et les caractéristiques biologiques (invasion locale, potentiel métastatique) des TE-GEP varient de façon considérable selon le site anatomique, les cellules d'origine et les produits sécrétés (Frilling et coll., 2012).

### 3.1.2 Différentes classifications pour les TE-GEP

Plusieurs classifications des tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques ont été successivement développées pour l'espèce humaine. Aucune n'étant exhaustive, il est nécessaire d'utiliser plusieurs approches, afin de bien caractériser la tumeur lors du diagnostic et d'appliquer une démarche thérapeutique adéquate.

Le tableau 1 ci-dessous présente une synthèse de la classification OMS 2010 actuellement en vigueur.

Groupe	Caractéristiques
Groupe 1a	TE histologiquement bien différenciée : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumeur le plus souvent non fonctionnelle</li> <li>- Absence d'invasion de la lamina propria</li> <li>- Absence de métastases</li> <li>- &lt; 1 cm de diamètre</li> <li>- Ki-67 &lt; 2%</li> </ul>
Groupe 1b	Carcinome NE bien différencié : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumeur fonctionnelle</li> <li>- Invasion de la lamina propria</li> <li>- Possibles métastases, invasion de la vascularisation</li> <li>- &gt; 2cm de diamètre</li> <li>- Ki-67 &gt; 2%</li> </ul>
Groupe 2	Carcinome NE histologiquement peu différencié : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumeur fonctionnelle</li> <li>- Invasion de la lamina propria</li> <li>- Possibles métastases, invasion de la vascularisation</li> <li>- Ki-67 &gt; 30%</li> </ul>

Tableau 1 : Classification OMS des tumeurs neuroendocrines (TE)

La classification des TE-GEP était initialement basée sur l'embryologie, avec une distinction des tumeurs dérivées de l'intestin antérieur (néoplasies du larynx, du thymus, des bronches, de l'œsophage, de l'estomac, du pancréas et du duodénum supérieur) ; moyen

(tumeurs se situant du duodénum inférieur au côlon ascendant) et postérieur (tumeurs du côlon descendant et du rectum). On peut aussi différencier par le siège de la tumeur : ainsi 2/3 des TE-GEP se trouvent dans le tractus gastro-intestinal et 1/4 dans système bronchopulmonaire. Enfin, on peut prendre en compte l'histologie : dans la grande majorité des cas, les TE-GEP sont bien différenciées.

Une classification particulière existe pour les tumeurs endocrines gastriques, classées en gastrine-dépendantes (type 1 ou 2) ou indépendantes (type 3). Les premières sont dérivées des cellules ECL et apparaissent dans le cadre d'une hypergastrinémie. Celle-ci est soit secondaire à une gastrite atrophique chronique (type 1, qui représente 80% des tumeurs gastrine-dépendantes), soit liée à un gastrinome (type 2) (Baudin, Ducreux 2008).

## **3.2 Epidémiologie**

### **3.2.1 Dans l'espèce humaine**

#### ***3.2.1.1 Tumeurs endocrines gastro-entéropancréatiques (TE-GEP)***

Les tumeurs endocrines gastro-entéro-pancréatiques sont des tumeurs rares, qui représentent 0,5% de l'ensemble des tumeurs. Plusieurs études rapportent une augmentation rapide de leur prévalence, très certainement du fait d'une nette progression des méthodes de détection. Les récentes avancées en termes d'imagerie, notamment, permettent désormais un diagnostic plus précoce et plus complet. (Frilling et coll., 2012).

Les TE-GEP sont majoritairement situées au niveau du tractus digestif (60,9%). Le second site concerné est le système pulmonaire (27,4%) ; puis des localisations beaucoup moins fréquentes sont rapportées, comme les ovaires, les testicules, le système hépato-biliaire et le pancréas (Modlin et coll., 2003).

Au niveau du tractus digestif, les TE-GEP se situent principalement au niveau du gros intestin et de l'intestin grêle (80%), puis de l'estomac et du pancréas (Frilling et coll., 2012). On trouve ainsi 30,8% de ces tumeurs dans l'intestin grêle, 26,3% dans le rectum, 17,6% dans le côlon, 12,1% dans le pancréas, 8,9% dans l'estomac et enfin 5,7% dans le caecum. Elles représentent le deuxième cancer du tractus digestif, après le cancer du côlon.

Les tumeurs pancréatiques sont les plus agressives. Elles peuvent être responsables de syndromes d'hypersécrétion hormonale spécifiques en fonction du type cellulaire atteint (insulinome en cas d'atteinte des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, glucagonome si les cellules  $\alpha$  de ces mêmes îlots sont touchées,...) (Frilling et coll., 2012; Lawrence et coll., 2011).

Les fréquences relatives des différentes tumeurs endocrines sont synthétisées dans la figure 2.

### Fréquence et localisation des tumeurs endocrines

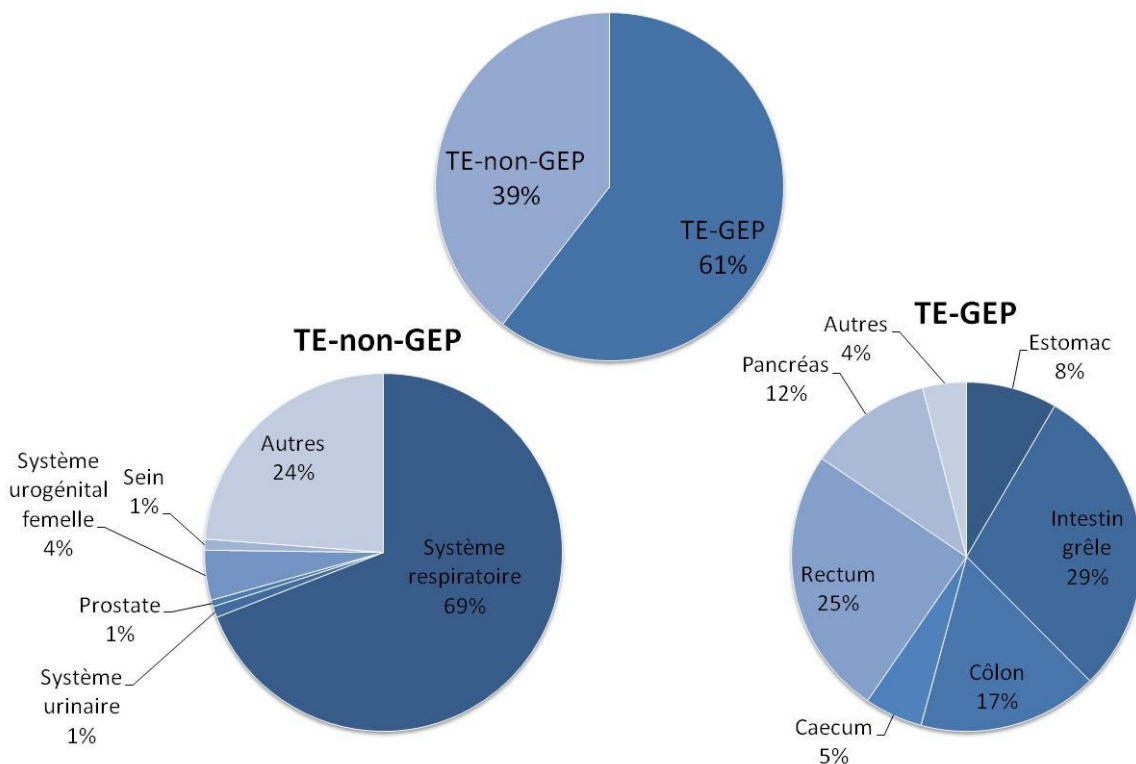


Figure 2 : Fréquence relative des différentes tumeurs endocrines (TE) en fonction de leur localisation, d'après une étude rétrospective menée sur 50 000 TE entre 1973 et 2007 (Frilling et coll., 2012)

#### 3.2.1.2 Tumeurs endocrines dérivées du neuroectoderme

Le carcinome médullaire de la thyroïde se présente sous forme sporadique dans 75% des cas et sous forme héréditaire, dans le cadre des MEN, dans les 25% restants. Cette tumeur se développe à partir des cellules parafolliculaires synthétisant la calcitonine, une hormone impliquée dans l'homéostasie calcique. Des métastases aux nœuds lymphatiques locorégionaux ou à distance sont présentes dans 50% des cas au moment du diagnostic, ce qui

est associé à un pronostic négatif. Ces métastases à distance intéressent principalement le foie, mais aussi les poumons, et plus rarement les os. Les CMT sont le plus souvent des tumeurs fonctionnelles (Brauckhoff et coll. 2004).

Le phéochromocytome est une tumeur rare dérivant des cellules chromaffines de la médullosurrénale sécrétant les catécholamines. Il peut se développer à tout âge, sans prédisposition sexuelle, et apparaît sporadiquement ou dans le cadre d'un syndrome héréditaire comme les MEN. Quatre-vingts à quatre-vingt-cinq pourcents de ces tumeurs se développent au niveau des glandes surrénales, mais 15 à 20% sont d'origine extra-surrénalienne. Ces dernières prennent le nom de paragangliome. Un taux de métastases de 3 à 36% au moment du diagnostic est rapporté selon les études. De même que les CMT, les phéochromocytomes sont essentiellement des tumeurs fonctionnelles (Tsirlin et coll., 2014).

### **3.2.2 Chez les Carnivores domestiques**

Les quelques données épidémiologiques précises disponibles pour les TE-GEP chez les Carnivores domestiques concernent essentiellement les tumeurs fonctionnelles, révélées notamment par un syndrome de Cushing. La prise en charge diagnostique et thérapeutique est généralement plus réduite que pour l'espèce humaine. Les données disponibles sont donc moins nombreuses, notamment en termes d'analyse histopathologique précise.

## **3.3 Diagnostic - pronostic**

### **3.3.1 Tumeurs gastro-entéro-pancréatiques**

Malgré un réel progrès des connaissances, le diagnostic des TE-GEP est généralement tardif, le plus souvent au stade métastatique ou après une importante invasion locale. Il intervient ainsi 5 à 7 ans en moyenne après le début des signes cliniques. Le diagnostic des tumeurs fonctionnelles, moins fréquentes, est plus précoce du fait du syndrome d'hypersécrétion hormonale (Frilling et coll., 2012).

Suite à une suspicion clinique, le diagnostic définitif fait intervenir à la fois des techniques d'imagerie et d'histopathologie. La détermination du profil hormonal de la tumeur

constitue enfin un point important afin d'affiner la prise en charge du patient ; il est possible de doser de façon sensible et spécifique de nombreux produits des cellules des TE-GEP.

Les signes cliniques sont le plus souvent non spécifiques et équivoques, hormis dans le cas des hypersécrétions hormonales.

### **3.3.1.1 Histologie**

Le diagnostic histologique de tumeur endocrine repose sur des arguments histologiques et immunohistochimiques. Au faible grossissement, on remarque une architecture lobulaire ou trabéculaire avec un stroma très vascularisé. Au fort grossissement, les cellules apparaissent monomorphes, de taille moyenne, avec un noyau à chromatine fine et un cytoplasme abondant (Baudin, Ducreux 2008).

Parmi les marqueurs biologiques spécifiques et intéressants dans le cadre des TE-GEP, on s'intéressera principalement au dosage de la chromogranine A (CgA) dans le plasma ou le sérum. Il s'agit d'une glycoprotéine hydrosoluble stockée dans les vésicules de sécrétion des cellules endocrines. Sa fonction précise est inconnue, mais elle constitue actuellement le meilleur marqueur biologique pour le diagnostic des TE-GEP. Le dosage de la CgA donne une valeur élevée dans approximativement 90% des TE-GEP, fonctionnelles ou non, surtout si elles sont bien différenciées. Les valeurs maximales sont atteintes pour les TE iléales et celles associées à un contexte de MEN de type I.

Elle indique par ailleurs le risque de récurrence et l'efficacité des traitements mis en place. Une valeur pronostique positive est ainsi attribuée à la diminution du niveau de CgA suite à la mise en place d'un traitement.

Il faut par contre garder en mémoire que des faux-positifs sont possibles en cas de dysfonctionnement rénal ou de traitement à base d'inhibiteurs de la pompe à protons (Modlin et coll., 2010).



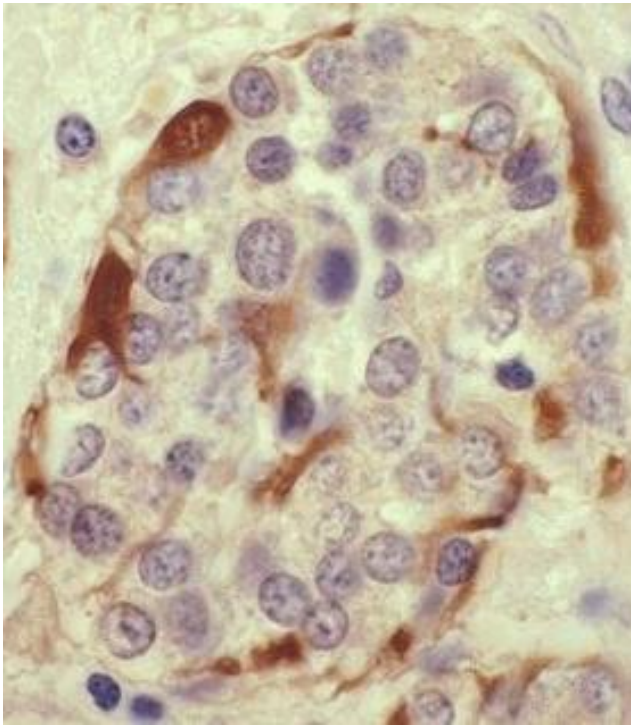


Figure 3 : Marquage immunohistochimique positif à la chromogranine A (CgA) d'un paragangliome thyroïdien humain (LaGuette et coll., 1997)

### **3.3.1.2 Imagerie**

L'imagerie conventionnelle répond au double objectif de dépistage de la tumeur primitive et de réalisation d'un bilan d'extension. Elle s'appuie sur l'échographie, l'endoscopie, la tomodensitométrie ou l'imagerie par résonance magnétique (Tamm et coll., 2007).

L'échographie endoscopique constitue une technique avancée d'imagerie conventionnelle. Elle permet un diagnostic sensible des TE-GEP, notamment des tumeurs pancréatiques dont les insulinomes, qui expriment peu les récepteurs à somatostatine. Une très bonne sensibilité de 87% est ainsi rapportée. L'échographie endoscopique est très utile pour le diagnostic des tumeurs pancréatiques de petite taille (dès quelques millimètres de diamètre). Elle permet de réaliser des cytoponctions à l'aiguille fine ou des biopsies au Trucut® pour la cytologie et le diagnostic immunohistochimique, le staging des TE-GEP avant résection endoscopique, mais aussi la délivrance échoguidée d'agents thérapeutiques (Kim et coll., 2012).



Figure 4 : Imagerie conventionnelle des TE-GEP (Kim 2012).

(A) : Image endoscopique d'une TE-GEP gastrique ; (B) : Image d'échographie endoscopique d'une petite TE-GEP pancréatique, de 6×7mm

L'imagerie conventionnelle atteint néanmoins très rapidement ses limites pour le diagnostic des TE-GEP, ce qui a conduit au développement de plusieurs techniques d'imagerie isotopique.

La scintigraphie des récepteurs de la somatostatine (SRS) est actuellement la technique isotopique de référence pour l'imagerie des TE-GEP bien différenciées exprimant les récepteurs à la somatostatine de type 2. Elle est basée sur le principe suivant : la somatostatine est une hormone polypeptidique exerçant un rôle de régulation le plus souvent négatif par fixation à des récepteurs membranaires (de type 1 à 5 selon le type cellulaire).

La plupart des tumeurs endocrines expriment le récepteur sstr 2, que l'on cible donc à l'aide d'un analogue isotopique de la somatostatine. L'Octreoscan® est actuellement utilisé en routine.

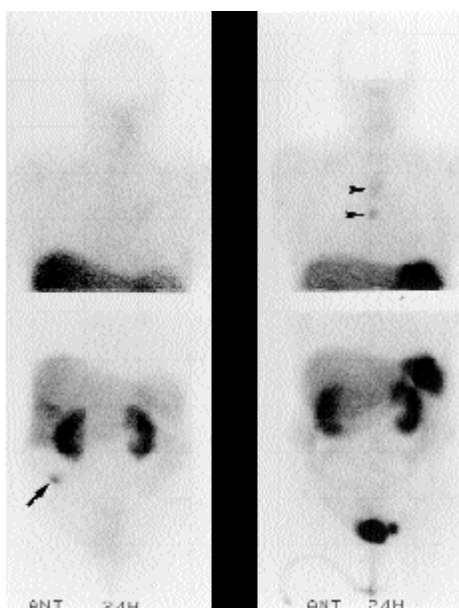


Figure 5 : Résultats de scintigraphie des récepteurs de la somatostatine à l'Octreoscan® (d'après Tenenbaum 2000)

Il s'agit d'un patient ayant présenté un syndrome carcinoïde clinique. La scintigraphie de gauche met en évidence une tumeur (flèche) qui sera retrouvée au niveau de l'iléon. La scintigraphie de droite correspond au suivi de ce patient. On notera des lésions thoraciques (indiquées par les deux têtes de flèche) correspondant à des adénopathies métastatiques.

La tomographie par émission de positons (TEP) est une autre technique d'imagerie isotopique à très fort pouvoir de résolution. Elle constitue l'imagerie isotopique de référence pour les carcinomes endocrines peu différenciés. On utilise un radionucléide isotopique dont le noyau, en excès de protons, se désintègre vers un état stable en émettant un positon. Ce dernier entre en annihilation avec un électron du milieu pour émettre deux photons gamma. Ce sont ces photons gamma qui sont détectés (Baudin, Ducreux 2008).

### **3.3.1.3 Pronostic**

Les facteurs pronostiques suivants ont été validés par des études expérimentales concordantes : la taille de la tumeur lors du diagnostic, la présence de signes d'invasion locale et de dissémination métastatique et l'index mitotique et/ou l'index de prolifération Ki-67. Ce dernier est d'ailleurs utilisé comme déterminant clef du grading des tumeurs endocrines dans la dernière classification de l'OMS (Klöppel et coll., 2014) .

Dans le cadre des TE-GEP gastriques, le type tumoral, la taille et l'histologie sont des facteurs prédictifs essentiels du comportement tumoral. Suite à la détection d'une telle tumeur, il sera important de réaliser un dosage de la gastrine sérique, une biopsie de la tumeur et de la muqueuse gastrique, et un dosage du pH du contenu gastrique. Ceci permettra de classer la tumeur dans l'un des trois types possibles, qui diffèrent par leur pronostic et appellent des approches thérapeutiques différentes.

Les TE-GEP pancréatiques sont souvent des tumeurs malignes. Leur taille est un facteur pronostique important de la progression des tumeurs, qu'elles soient fonctionnelles ou non (Frilling et coll., 2012).

### **3.3.2 Tumeurs endocrines dérivées du neuroectoderme**

Le diagnostic des carcinomes médullaires de la thyroïde est plus simple : suite à la palpation de nodules thyroïdiens, la réalisation d'une cytoponction à l'aiguille fine permet de distinguer le CMT d'une autre tumeur thyroïdienne. Les autres examens complémentaires de choix sont le dosage de la calcitonine basale, le dosage de la calcitonine après stimulation par la pentagastrine et l'imagerie conventionnelle et isotopique, qui permet notamment la recherche de cellules parafolliculaires ectopiques tumorales (Brauckhoff et coll., 2004).

Le diagnostic des phéochromocytomes s'appuie sur la confirmation de l'hypersécrétion hormonale par différents dosages sanguins et la localisation de la tumeur par tomographie par émission de positons ou imagerie par résonance magnétique, chez un patient présentant des signes cliniques compatibles avec ce type de tumeur. Ces derniers sont dus à l'hypersécrétion de catécholamines : migraines, palpitation, anxiété, hypertension, syncopes, faiblesse, fatigue chronique. L'ensemble de ces symptômes étant peu spécifiques, le diagnostic intervient en général tardivement ou de façon fortuite lors de l'exploration d'une autre affection (Tsirlin et coll., 2014).

### **3.4 Modalités thérapeutiques actuellement disponibles pour les tumeurs neuroendocrines**

Au vu de la très grande variété clinique et pronostique des tumeurs neuroendocrines, une approche multidisciplinaire est requise. Il convient désormais d'associer chirurgie, chimiothérapie systémique traditionnelle et médecine nucléaire.

A l'heure actuelle, les traitements médicaux répondent à plusieurs objectifs : contrôle des hypersécrétions hormonales, amélioration ou maintien de la qualité de vie des patients, inhibition de la croissance tumorale, prévention de complications, prolongation de la survie. Ils sont basés sur les analogues de la somatostatine, les inhibiteurs de la pompe à protons, l'interféron, les inhibiteurs mTOR, les inhibiteurs des kinases et la chimiothérapie systémique classique. Au moment du choix du traitement, les cliniciens doivent prendre en compte l'activité hormonale de la tumeur, sa localisation primaire, sa vitesse de croissance et son agressivité, son éventuelle extension à l'ensemble de l'organisme, et le pronostic associé. (Rinke et coll., 2012)

#### **3.4.1 Chirurgie**

Une intervention chirurgicale agressive représente le seul traitement curatif en l'absence de métastases. Au vu du diagnostic souvent très tardif des TE-GEP, il apparaît donc rarement possible d'être curatif en s'appuyant sur la seule chirurgie (Frilling et coll., 2012).

De même, une intervention chirurgicale associée à une exérèse des nœuds lymphatiques locorégionaux est le seul traitement curatif des CMT, en l'absence de métastases. Or, comme précisé dans les paragraphes précédents, 50% des CMT présentent des métastases aux nœuds lymphatiques locorégionaux ou à distance au moment du diagnostic (Brauckhoff et coll., 2004). La gestion des phéochromocytomes non métastastiques est également chirurgicale (Tsirlin et coll., 2014).

Que ce soit pour les TE-GEP ou les tumeurs endocrines dérivées du neuroectoderme, toute intervention chirurgicale doit être réalisée après contrôle d'éventuelles hypersécrétions hormonales dans le cadre des tumeurs dites fonctionnelles, sous peine de faire courir au patient des risques extrêmement élevés lors de l'anesthésie. Ceci est particulièrement vrai pour les phéochromocytomes : un contrôle de la pression artérielle, la prévention du relargage massif de catécholamines induit par l'anesthésie et la chirurgie ainsi que la gestion de la vasoconstriction chronique présente chez les patients atteints sont essentiels pour éviter des complications majeures en chirurgie (Tsirlin et coll., 2014).

### **3.4.2 Traitement médical des symptômes dus à l'hypersécrétion hormonale**

Le traitement médical anti-sécrétoire est un préalable nécessaire à la prise en charge de l'ensemble des tumeurs fonctionnelles. Il peut s'agir d'inhiber la synthèse hormonale elle-même. Les analogues de la somatostatine représentent la famille de médicaments la plus utilisée dans ce but. Il peut également s'agir d'inhiber l'effet périphérique de la sécrétion hormonale, par exemple en employant des inhibiteurs de la pompe à protons dans le cas des gastrinomes. Le processus pathologique à l'origine de l'hyper-acidité gastrique dans le cadre des gastrinomes sera développé par la suite. Le choix du traitement dépend du type tumoral (Baudin, Ducreux 2008).

Les analogues de la somatostatine jouent actuellement un rôle-clef dans la prise en charge des tumeurs endocrines car ils permettent une diminution de l'intensité des symptômes dus à l'hypersécrétion hormonale. Ils exercent également une action sur la limitation de la croissance tumorale et contribuent ainsi à l'amélioration de la qualité de vie des patients.

Pour rappel, la somatostatine est un inhibiteur de l'ensemble des hormones du tractus digestif. Ses récepteurs appartiennent à la famille des RCPG. Il en existe 5 types, partageant 40 à 60% d'homologie, mais médiateurs de différentes voies biologiques.

La plupart des tumeurs provenant de tissus cibles de la somatostatine expriment une forte densité de récepteurs à la somatostatine. Or, la somatostatine exerce un effet cytostatique sur les cellules tumorales, et présente un effet anti-angiogénique. L'idée d'utiliser la somatostatine à des fins thérapeutiques a donc été émise.

Deux problèmes majeurs se sont présentés : la clairance plasmatique de la somatostatine extrêmement rapide, de l'ordre d'une à deux minutes ; et l'existence d'une hypersécrétion rebond suite à l'action de la somatostatine. Des analogues stables et puissants de la somatostatine ont donc été développés : d'abord l'octréotide et le lanréotide, puis des formes retards avec l'octréotide LAR (« long acting release ») actif entre 28 et 42 jours, le lanréotide MP actif 14 jours, l'autogel de lanréotide actif jusque 4 semaines puis le pasiréotide en 2004. Les formules chimiques de l'octréotide et du lanréotide sont présentées dans la figure ci-dessous. Ces molécules permettent une amélioration symptomatique et biochimique chez 80% des patients atteints d'une tumeur sécrétant du peptide vasoactif intestinal (VIPome) ; mais n'ont un effet que dans 50% des cas d'insulinome, type tumoral exprimant peu le récepteur sst2.

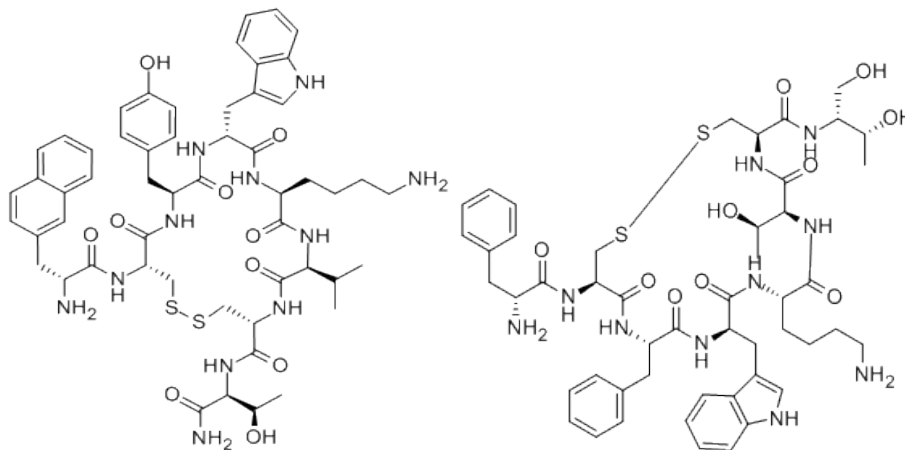


Figure 6 : Formules chimiques développées de l'octréotide et du lanréotide

Ces analogues présentent néanmoins plusieurs inconvénients. Il n'existe pas de formulation *per os*. Ainsi l'octreotide nécessite des injections sous-cutanées plusieurs fois par jour tandis que le lanréotide autogel et l'octreotide LAR s'administrent une fois par mois, par voie sous-cutanée et intramusculaire respectivement. La demi-vie de ces molécules est

relativement courte. Enfin, ces analogues de la somatostatine présentent une immunogénicité non négligeable. Un échappement au traitement est par ailleurs possible en quelques mois, selon un mécanisme actuellement non élucidé. Il est donc aujourd'hui nécessaire de développer de nouveaux agents (Modlin et coll., 2009; Baudin, Ducreux 2008).

Les effets indésirables les plus fréquents, présents dans plus d'un cas sur 100, regroupent des douleurs abdominales avec des crampes, de la constipation, ou à l'inverse de la diarrhée, de la stéatorrhée, des nausées, des vomissements et une irritation voire douleur au site d'injection (Modlin, et coll., 2009).

L'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) diminue aussi l'hypersécrétion hormonale, *via* une liaison spécifique aux récepteurs membranaires, ce qui aboutit à une amélioration du syndrome carcinoïde dans 70% des cas. Il présente cependant plus d'effets secondaires que les analogues de la somatostatine (Rinke et coll., 2012).

### **3.4.3 Chimiothérapie**

Comme précisé dans le chapitre précédent, les analogues de la somatostatine possèdent un faible effet antiprolifératif, avec une stabilisation de la croissance tumorale chez environ la moitié des patients. Une réelle régression tumorale n'est cependant que très rarement observée, dans moins de 10% des cas. Les IFN- $\alpha$  ont eux aussi un effet antiprolifératif par inhibition des synthèses protéiques, immunomodulation et inhibition de l'angiogenèse. Les analogues de la somatostatine et les IFN- $\alpha$  ne sont donc pas des agents chimiothérapeutiques à proprement parler, car ils ne permettent pas une réelle régression tumorale (Rinke et coll., 2012).

Les tumeurs endocrines sont généralement peu chimio sensibles. Deux explications à ce phénomène ont été avancées. La première est que les cellules des TE-GEP présentent généralement un faible index mitotique ; or les agents chimiothérapeutiques visent principalement des cellules se multipliant très rapidement. La seconde est que les cellules des TE-GEP expriment de façon importante des gènes de résistance aux médicaments MDR-1 codant pour des protéines d'efflux, dont la glycoprotéine P (Mitry et coll., 1999; Kaltsas et coll., 2004).

Pour les carcinomes neuroendocrines G3 de la classification OMS 2010, c'est-à-dire les tumeurs très malignes, peu différenciées, avec un fort index mitotique, le traitement de référence associe cisplatine et etoposide. Un taux de réponse de 40 à 65% est rapporté selon les études mais la durée de réponse est limitée : 8 mois de médiane. La médiane de survie atteint 20 mois maximum. La toxicité inclut nausées et vomissements de grade 3 à 4 (incidence de 40% dans une étude rétrospective menée sur 52 patients), neutropénie sévère (60%), aplasie fébrile (16%), anémie et thrombocytopénie sévères (12%) et alopécie chez l'ensemble des patients traités (Mitry et coll., 1999).

Pour les tumeurs neuroendocrines G1 ou G2 de la classification OMS 2010, c'est-à-dire des tumeurs bien différenciées, le traitement de référence pour les tumeurs extra-pancréatiques associe streptozocine et 5-fluorouracile et/ou doxorubicine. Le taux de réponse moyen est d'environ 40% selon les dernières études réalisées, mais toutefois supérieur aux autres options thérapeutiques, dont la thérapie ciblée. Le traitement de référence pour les tumeurs pancréatiques associe le temozolomide et la capecitabine, avec un taux de réponse atteignant 70%. Ce dernier reste toutefois à considérer avec précaution, au vu du faible nombre de patients de l'étude de référence (Rinke et coll., 2012).

Les inhibiteurs des protéines kinases, notamment l'everolimus et le sunitinib, sont le traitement médical de choix pour les tumeurs endocrines pancréatiques.

Concernant le carcinome médullaire de la thyroïde, plusieurs options sont disponibles : administration d'un analogue de la somatostatine (octreotide), thérapie par radioligand, irradiation externe, et chimiothérapie systémique dont inhibiteurs de la tyrosine kinase. Une chimioembolisation des métastases hépatiques à l'aide de lipiodol et d'épirubicine permet un traitement systémique du CMT (Brauckhoff et coll., 2004).

Le traitement médical actuellement recommandé pour le phéochromocytome associe le cyclophosphamide, la vincristine et la docarbazine. Il permet une régression tumorale et une maîtrise du syndrome d'hypersécrétion dans 50% des cas. Le sunitinib serait aussi une option envisageable (Tsirlin, et coll., 2014).



Les tableaux 2 et 3 ci-après présentent une synthèse des options thérapeutiques envisageables en première et seconde intention, ainsi qu'un certain nombre de nouvelles thérapies en cours d'évaluation préclinique ou clinique. Rappelons que le traitement médical des hypersécrétions doit être envisagé en toute première ligne.

<b>Type tumoral</b>	<b>Traitement de 1ère intention</b>	<b>Thérapies adjuvantes et en cours d'étude</b>
<b>TE G1 ou G2</b> (TE bien différenciées)	<b>Résection chirurgicale</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- seul traitement curatif des TE localisées bronchiques, de l'appendice, du rectum, du pancréas ou du duodénum</li> <li>- envisageable au stade métastatique si complications ou échappement au traitement antisécrétoire</li> </ul>	Chimiothérapie Radiothérapie Nouvelles thérapies
<b>TE G3</b> (TE peu différenciées)	<b>Chimiothérapie</b>	Nouvelles thérapies
TE avec localisation hépatique prédominante	Embolisation Occlusion transitoire de l'artère hépatique Chimio-embolisation	
TE avec localisation osseuse douloureuse, cutanée ou cérébrale	Radiothérapie externe	
<b>CMT</b>	<b>Résection chirurgicale</b> de la tumeur +/- NL loco-régionaux (seul traitement curatif)	Octréotide Thérapie par radioligand Chimiothérapie
<b>Phéochromocytome</b>	<b>Résection chirurgicale</b>	Chimiothérapie Radiothérapie Analogues radioactifs de la somatostatine

Tableau 2 : Traitements des tumeurs endocrines (d'après Baudin et coll., 1999; Brauckhoff et coll., 2004; Tsirlin et coll., 2014)

Type tumoral	Chimiothérapie de 1 <sup>ère</sup> ligne	Chimiothérapie de 2 <sup>nde</sup> ligne / en cours d'évaluation
TE G1 ou G2	Streptozocine + 5-FU +/- doxorubicine	Dacarbazine +/- épirubicine + 5-FU Temozolomide +/- bevacizumab, thalidomide, capecitabine
TE G3	Cisplatine + étoposide	Paclitaxel + carboplatine + étoposide Capecitabine + oxaliplatine Carboplatine + vincristine + étoposide Cisplatine + irinotécan Témozolomide
TE pancréatiques	Adriamycine + streptozocine	Everolimus Sunitinib
CMT	Inhibiteurs des tyrosine- kinases	
Phéochromocytome	Cyclophosphamide + vincristine + docarbazine	Sunitinib

Tableau 3 : Options de chimiothérapie des tumeurs endocrines (d'après Rinke et coll., 2012)

*Face aux limites de la chirurgie et de la chimiothérapie classique dans le traitement des tumeurs endocrines, de nouvelles thérapeutiques s'avèrent nécessaires. Les tumeurs endocrines sur-expriment à leur membrane un certain nombre de récepteurs, qui constituent autant de cibles potentielles pour un ciblage diagnostique et thérapeutique de ces tumeurs. Ces derniers font actuellement l'objet de nombreuses recherches, et certains agents de ciblage sont déjà utilisés en clinique, notamment ceux ciblant le récepteur à la somatostatine. La figure 7 ci-dessous présente l'incidence et la densité de 13 RCPG dans les tumeurs endocrines de l'intestin moyen, les insulinomes et les gastrinomes. Les tumeurs endocrines constituent donc un modèle d'étude du ciblage des RCPG, car elles les sur-expriment largement.*

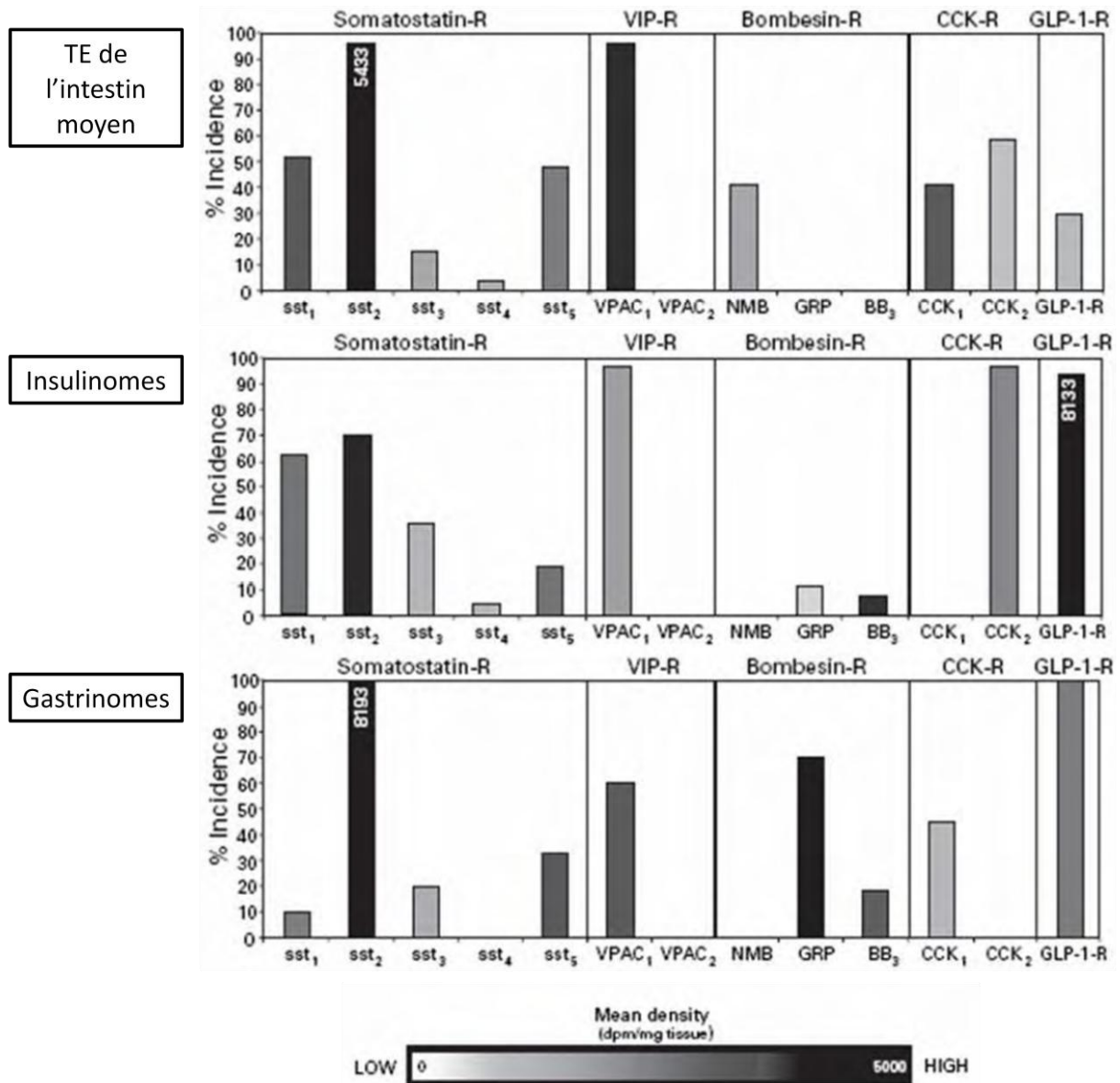


Figure 7 : Incidence et densité de 13 RCPG dans 3 types de TE (Reubi et coll., 2004)  
 (R : récepteur, VIP : vasoactive intestinal peptide ; GLP-1 : glucagon-like peptide ;  
 sst : somatostatine ; VPAC : VIP-pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ; NMB :  
 neuromedin B ; GRP-R : gastrin releasing peptide-receptor ; BB : bombesin)

*Le récepteur CCK2, une piste de recherche prometteuse qui sera explorée dans la partie expérimentale de ce travail, est présenté dans la partie suivante.*

## **4 Le récepteur CCK2 : un récepteur membranaire de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, impliqué dans la carcinogenèse tumorale et surexprimé dans de nombreuses cellules tumorales**

Le récepteur à la cholecystokinine (RCCK) a été découvert pour la première fois en 1978, par des expériences de liaison d'un analogue radiomarqué de la cholecystokinine (CCK) sur des cellules acineuses pancréatiques de rat. Suite à la découverte d'un second récepteur RCCK avec un profil pharmacologique différent dans le cerveau, le premier RCCK, initialement nommé A (pour alimentary) a été renommé RCCK1 et le second, nommé RCCK-B (pour brain), a pris le nom de RCCK2 (Innis et coll., 1980; Sankaran et coll., 1980).

La distribution tissulaire de ces deux récepteurs est différente. Ils présentent par ailleurs des affinités différentes pour les ligands naturels : l'affinité de la CCK sulfatée pour le RCCK1 est 500 à 100 fois supérieure que celle de la CCK non sulfatée ou de la gastrine pour ce même récepteur ; le RCCK2 en revanche lie la CCK, sulfatée ou non, et la gastrine avec une affinité comparable et forte, de l'ordre du nanomolaire (Dufresne et coll., 2006).

Sauf indication contraire, on s'intéressera uniquement au RCCK2 dans la suite de cet exposé, puisque c'est celui qui fera l'objet de l'étude expérimentale.

### **4.1 Structure du RCCK2**

Le RCCK2 est une protéine de 447 acides aminés avec sept segments hydrophobes transmembranaires, dont la représentation schématique est donnée dans la figure 8 ci-après. Il est codé chez homme par un gène localisé sur le chromosome 11 (précisément au locus p15,4) et composé de cinq exons et de quatre introns. Comme indiqué précédemment, le RCCK2 présente une affinité comparable pour la gastrine et la cholecystokinine, et ne distingue que faiblement les différentes gastrines, sulfatées ou non (Dufresne 2006).

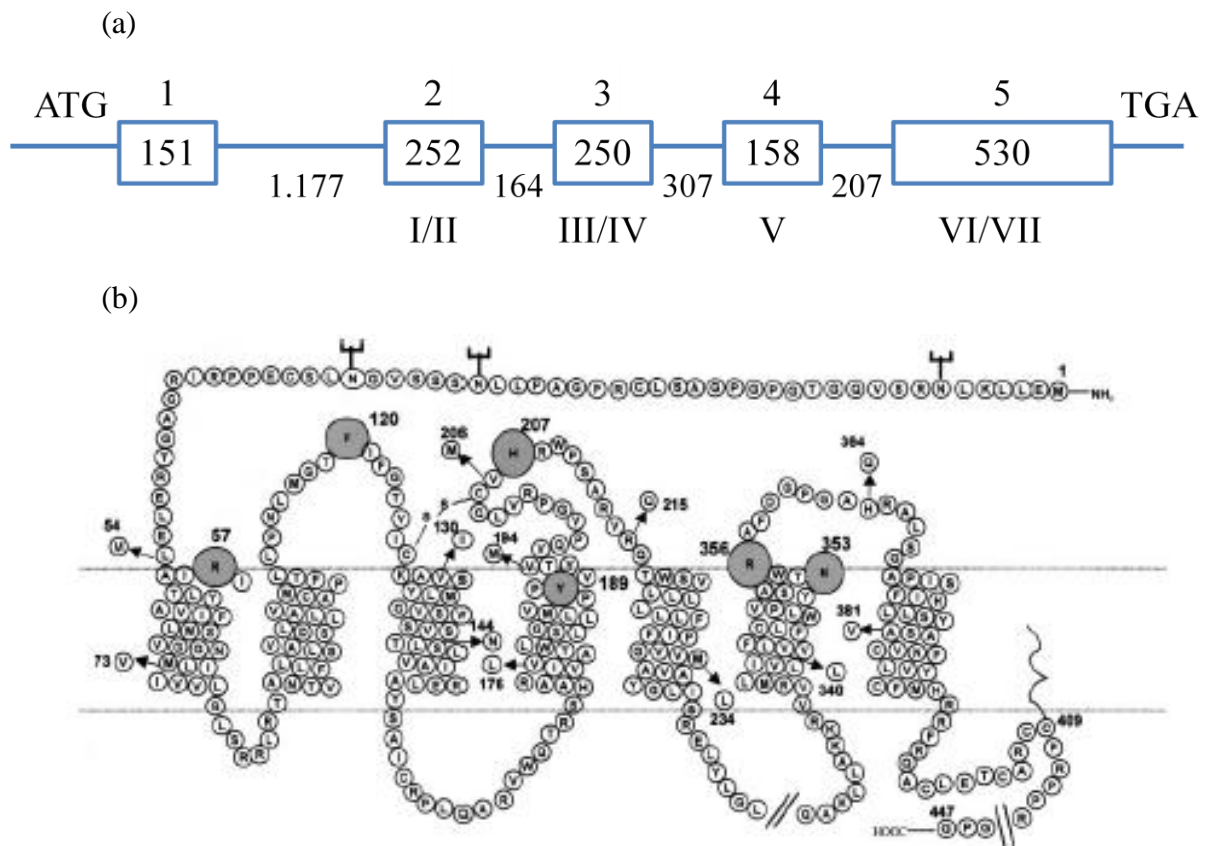


Figure 8 : Représentation schématique du gène et de la protéine du récepteur CCK2 humain. (d'après Langer 2005)

- Représentation schématique du gène du RCCK2 humain localisé sur le chromosome 11. Les cases bleues représentent les exons. Les nombres arabes indiquent le nombre de nucléotides contenus dans les introns et les exons. Les chiffres romains indiquent les domaines transmembranaires codés par les différents exons.
- Représentation schématique de la séquence protéines du RCCK2 humain

Le RCCK2 appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui constitue la plus grande famille de récepteurs transmembranaires chez les Mammifères. Cette particularité biologique est largement exploitée, 30% des médicaments commercialisés ciblant ces récepteurs.

Le RCCK2 partage donc d'abord avec les autres RCPG une structure caractéristique en trois parties. Le domaine N-terminal est extracellulaire et permet la fixation du ligand. Le domaine central composé de sept hélices hydrophobes transmembranaires ancre le récepteur dans la membrane cellulaire. Le domaine C-terminal cytoplasmique permet la transduction du signal intracellulaire *via* l'association à une protéine G.

Le RCKK2 présente également, comme l'ensemble des RCPG, une fonction de transduction des signaux, finement régulée grâce à l'internalisation des récepteurs dans la cellule suite à la fixation de leur ligand.

Si l'implication physiologique des RCPG est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, ceux-ci sont aussi engagés dans de nombreux processus pathologiques. Ils se trouvent notamment surexprimés dans de nombreuses cellules tumorales.

## **4.2 Deux ligands naturels et de nombreux ligands synthétiques**

### **4.2.1 Gastrine**

La gastrine a été isolée pour la première fois en 1964 par Gregory et Tracy à partir de muqueuse antrale de porc (Gregory, Tracy 1964). Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 101 acides aminés subissant plusieurs étapes de modifications post-traductionnelles dont plusieurs clivages, une sulfatation de la tyrosine en position 6 à partir de l'extrémité C-terminale et une  $\alpha$ -amidation carboxyterminale (Dockray et coll., 2004).

La synthèse de la gastrine est assurée chez l'homme par les cellules G de la muqueuse de l'antra pylorique et du duodénum, en réponse au contact du bol alimentaire avec les parois de l'antra pylorique. Elle est inhibée par l'action de la somatostatine, libérée en réponse à l'augmentation d'acidité dans l'estomac.

Une infection du tractus digestif par *Helicobacter pylori* induit une inflammation, elle-même responsable d'un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de somatostatine. Il s'ensuit une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de gastrine, pouvant avoir des implications pathologiques à moyen voire long terme.

Le gène de la gastrine est par ailleurs exprimé dans plusieurs tumeurs gastro-intestinales, dont le carcinome colorectal et le syndrome de Zollinger-Ellison. Ce syndrome clinico-biologique associe des symptômes liés à une hypersécrétion gastrique acide induite par une hypergastrinémie d'origine tumorale (ulcères duodénaux, œsophagite, diarrhée, amaigrissement), des anomalies biologiques caractéristiques (hypergastrinémie et hypersécrétion acide) et un syndrome tumoral (présence d'un ou de plusieurs gastrinomes

dans la paroi duodénale ou au niveau d'un nœud lymphatique de la région duodéno-pancréatique).

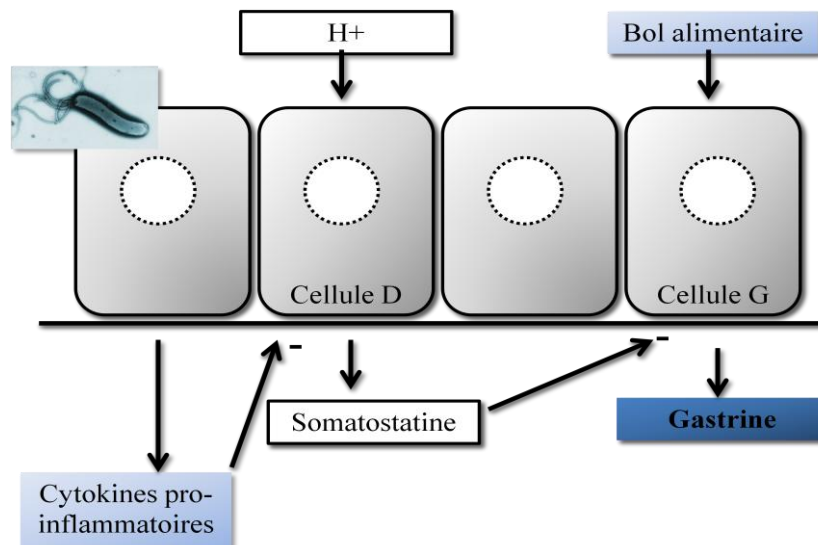


Figure 9 : Contrôle de la sécrétion de la gastrine par les cellules G (d'après Dockray et coll., 2004).

La synthèse et la sécrétion de la gastrine se fait en réponse à une stimulation exercée par le contact du bol alimentaire sur la paroi gastrique, et est inhibée de façon paracrine par la somatostatine libérée par les cellules D. Une infection par *Helicobacter pylori* entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires, qui inhibent la synthèse de somatostatine et favorisent donc une hypergastrinémie.

#### 4.2.2 Cholecystokinine

Isolée en 1968 sous forme d'un peptide composé de 33 acides aminés, la cholecystokinine (CCK), possède le même pentapeptide à l'extrémité COOH (Gly-Trp-Met-Asp-PheNH<sub>2</sub>) que la gastrine mais avec une sulfatation du 7<sup>ème</sup> résidu tyrosine au lieu du 6<sup>ème</sup> pour la gastrine (Noble et coll., 1999).

Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur de 115 acides aminés (la préproCCK), subissant plusieurs étapes de modifications post-traductionnelles : plusieurs clivages et une sulfatation de la tyrosine en position 7 à partir de l'extrémité C-terminale. Plusieurs formes de CCK résultant de modifications post-traductionnelles plus ou moins nombreuses sont ainsi physiologiquement présentes dans le sang : CCK-58, CCK-33, CCK-22, CCK-8 (Rehfeld 2004).

Contrairement à la gastrine, la CCK est synthétisée par plusieurs types cellulaires : les cellules I des cryptes de la muqueuse duodénale, certaines cellules corticotrophes et mélanotrophes de l'hypophyse et certaines cellules de la médullo-surrénale. C'est l'arrivée du chyme dans le duodénum qui déclenche la production de CCK par les cellules I (Rehfeld et coll., 2004).

## **4.3 Fonctionnement du RCCK2**

### **4.3.1 Généralités sur le fonctionnement des RCPG**

Le fonctionnement du RCCK2 est d'abord celui d'un RCPG : la liaison d'un agoniste permet la transduction de l'information du stimulus extracellulaire vers un second messager intracellulaire par couplage aux protéines G hétérotrimériques. Différentes voies de signalisation intracellulaire, impliquées dans des processus physiologiques variés, sont alors activées.

La liaison d'un agoniste initie également des processus impliqués dans la désensibilisation du RCPG, c'est-à-dire la perte progressive du signal cellulaire induit par un récepteur lors d'une stimulation répétée. Il s'agit d'un phénomène de régulation essentiel contrôlant finement la durée de l'activation et empêchant les effets toxiques dus à une stimulation excessive.

L'endocytose des RCPG permet de moduler ce phénomène de désensibilisation. La voie majeure repose sur la clathrine. D'autres voies secondaires entrent aussi en jeu selon le RCPG et le type cellulaire, comme celle basée sur la cavéoline.

Suite à son internalisation, le récepteur est envoyé dans une structure vésiculaire nommée endosome précoce. Il entre ensuite dans une voie de recyclage rapide à la membrane, d'une durée de quelques minutes, dans une voie de recyclage lent en plusieurs heures ou se trouve dégradé dans les lysosomes. Deux classes de RCPG sont ainsi définies, les RCPG de classe A qui suivent la voie de recyclage rapide, et ceux de classe B qui sont recyclés par la voie lente ou dégradés dans les lysosomes (Scott et coll., 2004 ; Bruix et coll., 2001).



Le fonctionnement d'un RCPG est résumé dans la figure 10 suivante :

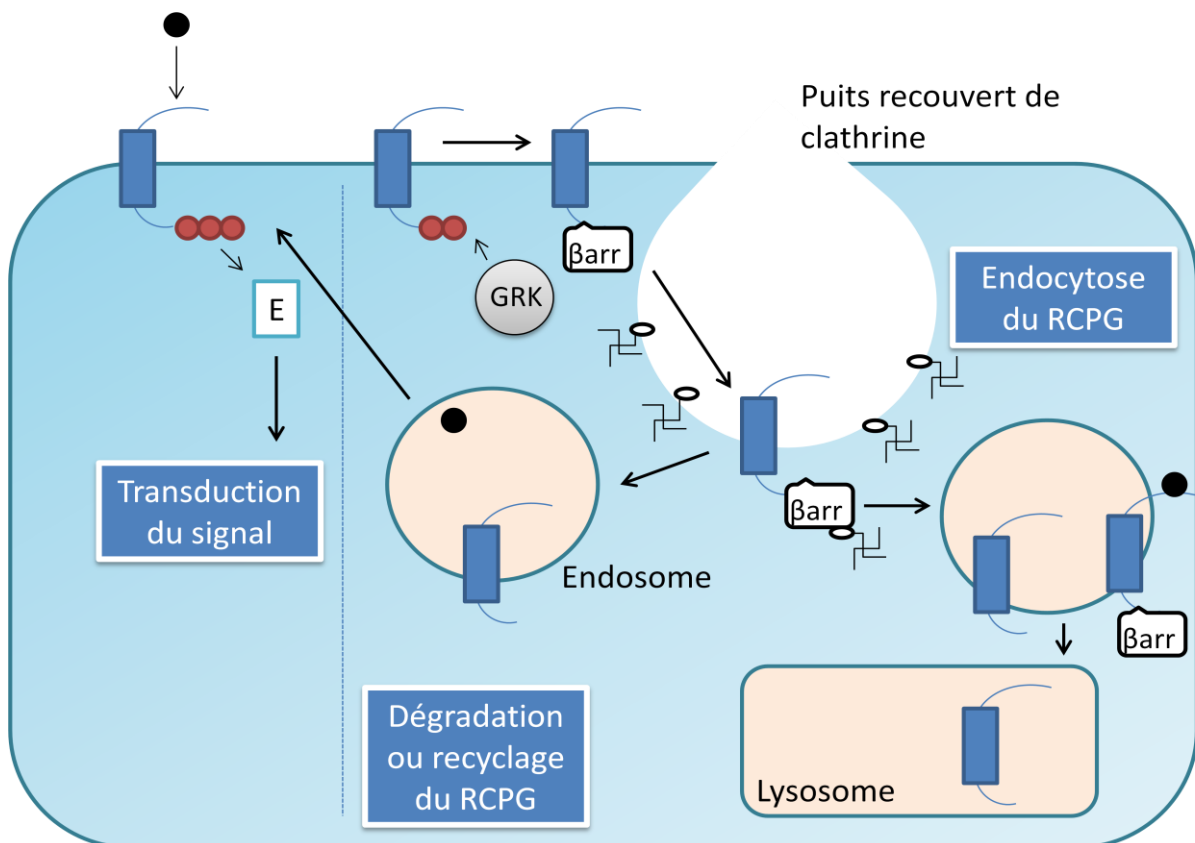


Figure 10 : Transduction du signal et désensibilisation du RCPG

Suite à la fixation de son ligand, le RCPG interagit avec une protéine G trimérique capable d'activer des effecteurs cellulaires (E). Le RCPG est ensuite rapidement phosphorylé par une kinase spécifique (GRK). Cette phosphorylation conduit à une altération du couplage RCPG-ligand ou à la translocation depuis le cytosol de protéines découplantes, les  $\beta$ -arrestines ( $\beta$ -arr). Ces dernières cumulent trois rôles : permettre le découplage RCPG-protéines G, induire l'internalisation des RCPG par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et constituer un « échafaudage moléculaire » pour la formation de complexes de transduction indépendants des protéines G hétérotrimériques. Suite à son internalisation, le RCPG est soit recyclé à la membrane après découplage d'avec son ligand, soit dégradé dans un lysosome (modifié d'après Scott et coll., 2004).

#### 4.3.2 Données expérimentales sur le fonctionnement du RCCK2

L'internalisation du RCCK2 suite à sa stimulation par un agoniste, la CCK ou la gastrine, est massive, 92% des récepteurs étant internalisés, avec conservation de la liaison ligand-récepteur. (Pohl et coll., 1997) Ce phénomène est dépendant à la fois de la clathrine et de la dynamine, comme l'ont montré des études expérimentales utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces deux protéines. L'extrémité C-terminale du RCCK2 possède une

importance majeure pour le recrutement des  $\beta$ -arrestines. Les RCCK2 internalisés sont dégradés dans des lysosomes, ce qui en fait des membres de la classe B des RCPG (Magnan et coll., 2010).

#### **4.4 Distribution tissulaire du RCCK2**

Des expériences d'autoradiographie du récepteur *in vitro* ont montré que le RCCK2 est majoritairement présent au niveau des cellules pariétales et des cellules entérochromaffin-like (ECL) de la muqueuse fundique chez l'homme (Reubi et coll., 1997).

La localisation du RCCK2 dans le pancréas endocrine humain reste encore controversée selon les études (Dufresne et coll., 2006). L'une d'entre elles associant RT-PCR, autoradiographie et microscopie confocale avait conclu à la présence de RCCK2 au niveau des cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans du pancréas. 95% des cellules exprimant le RCCK2 étaient ainsi des cellules  $\alpha$  (Saillan-Barreau et coll., 1999). Une autre étude rapportait la présence de RCCK2 au niveau des cellules à somatostatine. (Dufresne et coll., 2006)

Le type de RCCK majoritaire au niveau du pancréas exocrine varie selon les espèces. Contrairement à la souris, chez laquelle seul le RCCK1 est exprimé au niveau des cellules acineuses pancréatiques, une étude menée chez l'homme a mis en évidence une expression d'ARN messenger du RCCK2 trente fois supérieure à celle de l'ARNm du RCCK1. Les niveaux d'ARNm des deux récepteurs sont cependant très faibles, ce qui peut expliquer l'absence de mise en évidence des RCCK par autoradiographie dans plusieurs études (Dufresne et coll., 2006). La présence du RCCK2 au niveau des cellules acineuses pancréatiques, en quantité plus importante que le RCCK1, a pu être détectée par autoradiographie dans l'ensemble des dix échantillons de tissus pancréatiques humains normaux constituant les contrôles d'une étude portant sur l'expression des récepteurs aux hormones digestives par des adénocarcinomes pancréatiques. Les acinis pancréatiques ont donc le potentiel d'exprimer le RCCK2 (Tang et coll., 1997).

En conclusion, le RCCK2 est le RCCK majoritaire au niveau du pancréas humain. Il est principalement exprimé au niveau des îlots de Langerhans et faiblement exprimé au niveau des cellules acinaires pancréatiques et des cellules canalaire (Reubi et coll., 2003).

Le RCCK2 est en revanche absent au niveau de la vésicule biliaire, où seul RCCK1 est exprimé (Tang et coll., 1996).

Au niveau du système nerveux central, une forte densité de RCCK2 au niveau du cortex, des bulbes olfactifs et du noyau accumbens a été mise en évidence par autoradiographie (Noble et coll., 1999).

Pour finir, la présence du RCCK2 est rapportée au niveau des glandes surrénales, du rein, et de certaines fibres musculaires lisses. La présence d'ARNm été mis en évidence par des Northern blot ou des RT-PCR, et celle du récepteur par immunohistochimie (Dufresne et coll., 2006).

## **4.5 Implications physiologiques de la gastrine, de la CCK et du RCCK2**

### **4.5.1 Au niveau du système digestif**

Au niveau du système digestif, les RCCK2 sont exposés à la fois à la gastrine et à la CCK mais la concentration plasmatique de la gastrine est 5 à 10 fois plus élevée que celle de la CCK. La gastrine est donc considérée comme le ligand endogène majeur à ce niveau. Les effets de la CCK sont majoritairement médiés par RCCK1, et ne seront donc pas développés ici (Dockray, et coll., 2004).

Au niveau stomacal, la gastrine stimule la sécrétion d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales de l'estomac *via* deux mécanismes. Le mécanisme majeur consiste en une stimulation indirecte. La gastrine se fixe aux cellules ECL, qui libèrent alors de l'histamine. Cette dernière permet une activation paracrine des cellules pariétales, d'où une sécrétion d'acide chlorhydrique. L'histamine assure en retour une régulation du nombre de cellules ECL et de l'expression des gènes codant pour l'histamine dans ces cellules. Un mécanisme mineur s'ajoute, par lequel la gastrine agit directement par fixation au RCCK2 des cellules pariétales. Quand le pH stomacal atteint 2, la sécrétion de gastrine est inhibée par la somatostatine (Dockray et coll., 2004).

La gastrine joue par ailleurs un rôle trophique pour la muqueuse gastrique. Elle contrôle la prolifération, la différenciation et la maturation de nombreux types cellulaires de l'estomac (Johnson et coll., 1988).

Au niveau pancréatique, la fixation de la gastrine et de la CCK au RCCK2 entraîne la libération de glucagon. La gastrine joue un rôle dans la croissance et la différenciation du pancréas fœtal par fixation au RCCK2 (Saillan-Barreau et coll., 1999; Dufresne, 2006).

#### **4.5.2 Au niveau du système nerveux central**

La CCK est le neuropeptide le plus abondant du système nerveux central, notamment dans les aires corticales et dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques (Rehfeld 2004). Elle est impliquée chez l'homme dans la modulation de nombreuses fonctions centrales comme l'anxiété, la dépression, la psychose, la cognition et la nociception (Noble, Wank, Crawley, Bradwejn, Seroogy, Hamon, Roques 1999).

### **4.6 Implications pathologiques de la gastrine, de la CCK et du RCCK2**

#### **4.6.1 Rôle dans la carcinogenèse digestive**

Selon un faisceau concordant de preuves expérimentales, la gastrine et la CCK agissent comme des facteurs de croissance et d'invasion tumorale *via* leur fixation au RCCK2. Cependant, les rôles de la gastrine, de la CCK et de leur récepteur dans la carcinogenèse chez l'homme ne sont pas totalement élucidés.

##### ***4.6.1.1 Carcinogenèse gastrique***

La carcinogenèse gastrique répond à un modèle multifactoriel dans lequel l'environnement joue un rôle majeur. Une infection chronique par *Helicobacter pylori*, une bactérie Gram négatif flagellée microaérophile très communément rencontrée dans l'estomac

humain, est connue pour déclencher la carcinogenèse gastrique (Dufresne, 2006). Tout processus inflammatoire intéressant l'estomac peut être à l'origine d'une hypergastrinémie. Lorsque celle-ci évolue sur une longue durée, elle est associée à une prolifération et une hyperplasie des cellules ECL. A terme, le développement de carcinoïdes malins est possible (Watson et coll., 2006).

Une étude menée sur des lignées cellulaires tumorales et des pièces d'exérèse chirurgicale humaines a montré qu'une forte proportion de tissus gastriques tumoraux exprime le RCCK2. Ce récepteur répond de façon significative à la gastrine, mais aussi à un des précurseurs de la gastrine (Lee et coll., 2005). La présence de gastrine et du RCCK2 a été mise en évidence par immunohistochimie dans des échantillons de carcinomes gastriques de type intestinal ainsi que dans des stades précancéreux (gastrite atrophique, métaplasie intestinale et dysplasie épithéliale). La co-expression de la gastrine et du RCCK2 par les cellules tumorales, présente dans la moitié environ des adénocarcinomes gastriques, est associé à un pronostic négatif (Zhou et coll., 2004).

Le niveau d'expression du RCCK2 dans les cellules tumorales gastriques est très variable, selon différentes études basées sur des expériences de RT-PCR, d'immunohistochimie et d'autoradiographie. Il peut d'ailleurs être inférieur à celui rapporté pour le tissu gastrique sain. Cependant l'augmentation de l'expression du RCCK2 serait un marqueur très précoce de carcinogenèse gastrique. Elle apparaît en effet avant l'augmentation de l'expression de la gastrine (Rai et coll., 2012).

De plus, la quantité d'ARN messager de la gastrine dans les cellules tumorales est corrélée avec la progression tumorale et la présence de métastases (Zhou et coll., 2004).

La gastrine semble donc être un facteur de croissance important dans la carcinogenèse gastrique (Henwood et coll., 2001; Zhou et coll., 2004). Elle a en effet un effet anti-apoptotique dans les cellules tumorales (Rai et coll., 2012).

L'existence d'une boucle de régulation autocrine-paracrine gastrine-RCCK2 a été suggérée par certains travaux (Henwood et coll., 2001; Zhou et coll., 2004). Si cette hypothèse était confirmée, il serait possible de développer des thérapies basées sur des antagonistes du RCCK2, afin de couper cette boucle de régulation et de limiter le développement des carcinomes gastriques et la progression des métastases.

#### **4.6.1.2 Carcinogenèse colorectale**

Dans un tissu sain, le RCCK2 n'est pas exprimé au niveau colorectal.

Plusieurs études menées *in vitro* et chez la souris ont montré que les précurseurs de la gastrine agissent comme facteurs de croissance pour la muqueuse normale et pour le carcinome du côlon. Ils accélèrent le début du développement du carcinome colorectal en stimulant la prolifération cellulaire, mais également en promouvant la survie des cellules tumorales, leur migration et l'angiogenèse tumorale (Rai et coll., 2012; Aly et coll., 2004).

De fortes concentrations sanguines de précurseurs de la gastrine ont été mises en évidence chez des patients atteints d'un cancer colorectal, avec toutefois de fortes différences interindividuelles, ce qui pose la question d'un possible rôle de ces formes de gastrine dans la carcinogenèse colorectale. La possibilité de transposer à l'espèce humaine les résultats démontrés dans différentes lignées cellulaires tumorales et chez la souris reste néanmoins à démontrer. De plus, il est possible que les précurseurs de gastrine se fixent à un autre récepteur que le RCCK2 (Fourmy et coll., 2011).

#### **4.6.1.3 Carcinogenèse pancréatique**

Comme expliqué précédemment, la gastrine et la CCK ont un effet trophique sur le pancréas, notamment par augmentation des synthèses protéiques. La CCK est par ailleurs un facteur de croissance puissant pour les cancers pancréatiques humains (Smith et coll., 1990). Le RCCK2 est exprimé dans certaines lignées cellulaires tumorales pancréatiques (De Weerth et coll., 1999), bien que des expériences d'autoradiographie n'aient pas permis de le détecter dans plusieurs adénocarcinomes ductaux pancréatiques (Tang et coll., 1997). L'expression de la gastrine et du RCCK2 est nettement plus importante dans l'adénocarcinome pancréatique que dans le tissu pancréatique normal, indiquant une possible boucle de régulation autocrine basée sur la gastrine (Smith et coll., 1998).

Un modèle de souris transgéniques *ElasCCK2* exprimant le RCCK2 humain dans ses acini pancréatiques a été développé par une équipe de recherche. On retrouve chez ces souris des perturbations de l'homéostasie tissulaire aboutissant à un cancer pancréatique dans 15% des cas. Il s'agit de la première étude *in vivo* reliant carcinogenèse pancréatique et expression du RCCK2, suggérant par ce fait un rôle majeur de ce récepteur (Clerc et coll., 2002).

## 4.6.2 Surexpression dans certains tissus tumoraux

Le RCCK2 est surexprimé dans de très nombreux cancers chez l'homme, avec une place prépondérante des tumeurs endocrines. Au niveau extra-digestif, le RCCK2 est exprimé avec une incidence et une densité très fortes dans les carcinomes médullaires de la thyroïde ; avec une forte incidence et une densité moyenne dans les cancers du poumon à petites cellules ; avec une incidence moyenne mais une forte densité dans les léiomyosarcomes. Au niveau digestif, le RCCK2 est très fréquemment exprimé dans les tumeurs endocrines, notamment dans la quasi-totalité des insulinomes. Il est aussi présent en très forte densité dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). Les tumeurs endocrines et les GIST sont donc deux cibles de choix pour le ciblage du RCCK2 (Reubi et coll., 2007). Le graphique 11 résume l'incidence et le niveau d'expression du RCCK2 dans différents cancers humains.

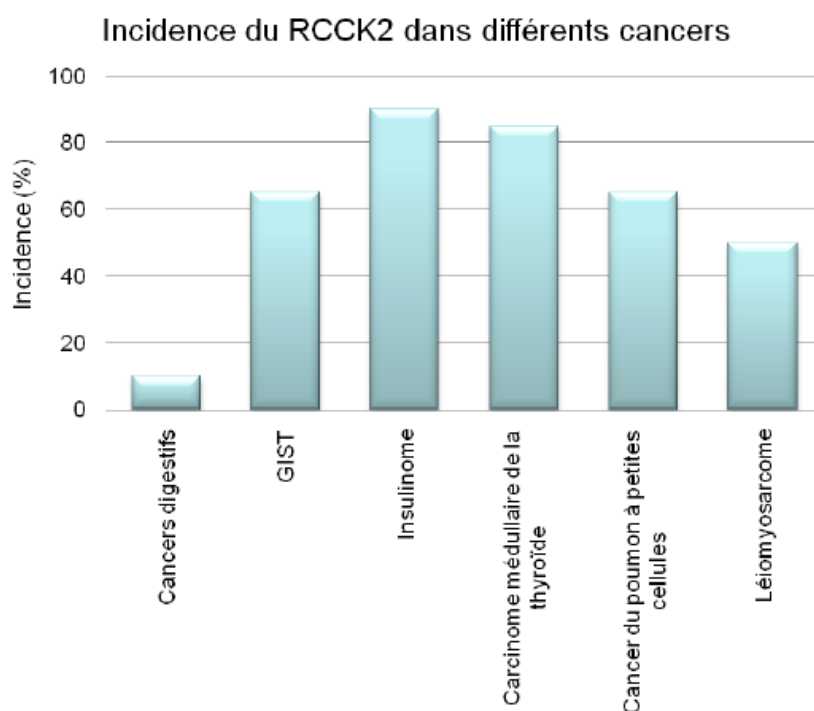


Figure 11: Incidence et niveau d'expression du RCCK2 dans différents cancers (Reubi, 2007)

## 4.6.3 Présence de variants du RCCK2

Plusieurs études rapportaient une inadéquation entre la quantité d'ARN messager et le nombre de RCCK2 à la membrane des cellules tumorales. Ceci suggérait la présence de variants d'épissage dans ces cellules. Ces variants possèdent une structure différente, donc

une fonction possiblement différente. Ils possèdent peut-être une importance pathophysiologique, information à prendre en compte pour réaliser une thérapie ciblée sur les récepteurs.

Le premier variant d'épissage identifié possède une extrémité N-terminale tronquée. Il présente une baisse d'affinité pour la gastrine et la CCK d'un facteur 10 par rapport à la forme sauvage et remplace cette forme sauvage dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome gastrique (Miyake et coll., 1995).

Un autre variant avec une activité constitutive présent dans les cellules tumorales du côlon humain mais pas dans le tissu sain adjacent à la tumeur, nommé CCK2Ri4sv a ensuite été mis en évidence (Hellmich et coll., 2000).

Il existe un troisième variant d'épissage, nommé  $\Delta E2$ -CCK2R, présentant seulement 5 domaines transmembranaires. Il est exprimé de façon concomitante avec la forme sauvage du récepteur dans plusieurs tissus tumoraux humains. Séquestré dans le réticulum endoplasmique quand il est exprimé par les cellules COS, il est caractérisé par une absence de fonction. Cependant, il diminue l'activité du RCCK2 sauvage en le séquestrant dans ce même réticulum endoplasmique. Sa caractéristique est d'être exprimé en quantité beaucoup plus importante que les autres variants jusque-là identifiés. Il compte en effet pour 6% du nombre de RCCK2, contre 1% pour l'ensemble des autres variants.



#### 4.6.4 Utilisation comme cible diagnostique et thérapeutique

La surexpression du RCK2 dans certains types tumoraux fait de ce récepteur une cible de choix pour le diagnostic et la thérapie ciblés de ces pathologies.

Pour réaliser un diagnostic et une thérapie ciblés sur la surexpression d'un récepteur protéique, des critères cliniques et moléculaires entrent en jeu. Les patients définis comme éligibles pour ce type de thérapie sont atteints de tumeurs avec de multiples métastases non opérables, souffrent de tumeur au cerveau, ou ont présenté un échec de réponse aux autres thérapies déjà envisagées. Au niveau moléculaire, une expression suffisante du récepteur dans la tumeur d'origine et les métastases, de préférence de façon homogène, est nécessaire. L'existence d'un ligand spécifique avec une forte affinité pour le récepteur est la dernière condition requise (Reubi et coll., 2005).

L'ensemble de ces considérations a ouvert la voie à l'utilisation de peptides radiomarqués, analogues de récepteurs exprimés par certains types cellulaires tumoraux, à des fins diagnostiques, mais aussi thérapeutiques grâce à la thérapie par radio ligand (PRRT). Ces peptides radiomarqués présentent de nombreux avantages : une synthèse relativement simple, une forte affinité et spécificité pour le récepteur ciblé, une clairance généralement rapide et une accumulation marquée dans le tissu tumoral par rapport au reste de l'organisme. Plusieurs applications cliniques de PRRT ont montré une bonne réponse tumorale ainsi qu'une survie plus longue, avec une meilleure qualité de vie, des patients atteints de tumeurs endocrines notamment (Rai et coll., 2012).

Le premier ciblage réalisé avec succès au moyen d'analogues radiomarqués était basé sur le récepteur à la somatostatine, surexprimé dans un certain nombre de tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques. Il est depuis utilisé sous le nom d'Octreoscan® (Reubi et coll., 2005).

Un ciblage du RCK2 surexprimé dans le carcinome médullaire de la thyroïde a déjà été réalisé au moyen d'une minigastrine radiomarquée, ce qui prouve sa faisabilité. Un risque de néphrotoxicité lié à la radioactivité avait cependant été observé (Behr, et coll., 2002).

La rétention rénale s'est avérée être due à la présence de 5 acides glutamiques dans la séquence de la gastrine. De nouveaux analogues de gastrine, dépourvus de cette séquence, ont

été développés, permettant une nette diminution de la rétention rénale mais aussi une baisse du marquage de la tumeur (Bébé et coll., 2005).

*Le développement de nouveaux agents de ciblage est donc nécessaire. Les nanotechnologies constituent une option actuellement largement explorée, et seront détaillées dans la partie suivante.*

## **5 Les nanoparticules : de nouveaux agents diagnostiques et thérapeutiques**

Les nanotechnologies, et tout particulièrement les nano-vecteurs injectables par voie intraveineuse, représentent des options d'avenir pour le diagnostic précoce et non invasif de lésions cancéreuses, précancéreuses et des métastases, ainsi que pour la délivrance ciblée de médicaments ou molécules cytotoxiques et la thérapie par hyperthermie. L'efficacité du traitement est très largement augmentée, les effets secondaires réduits et l'observance des traitements améliorée par cette technique (Duguet et coll., 2006; Ferrari, 2005).

### **5.1 Définition - propriétés**

Les nanoparticules sont définies par la norme ISO TS/27687 comme des nano-objets dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique. Leur taille varie de quelques nanomètres de diamètre pour les quantum dots et les nanoparticules magnétiques, à plusieurs dizaines de nanomètres pour les liposomes. Cette taille est donc comparable à celle des virus et des protéines, notamment les récepteurs membranaires. Ceci leur confère la capacité de traverser les membranes biologiques et d'interagir directement avec les molécules intracytoplasmiques. Les nanoparticules de diamètre inférieur à 10 nanomètres possèdent de plus une propriété physique supplémentaire, le superparamagnétisme. Il s'agit d'une phase magnétique particulière apparaissant avec l'agitation thermique, et qui n'existe donc pas dans l'état fondamental. Le fort rapport surface/masse des nanoparticules est particulièrement intéressant pour leur fonctionnalisation.

Les nano-vecteurs présentent une composition au moins tripartite, comme le montre la figure 12 ci-après : un matériel constituant le cœur, des agents thérapeutiques et/ou d'imagerie et des modificateurs de surface (Duguet et coll., 2006).

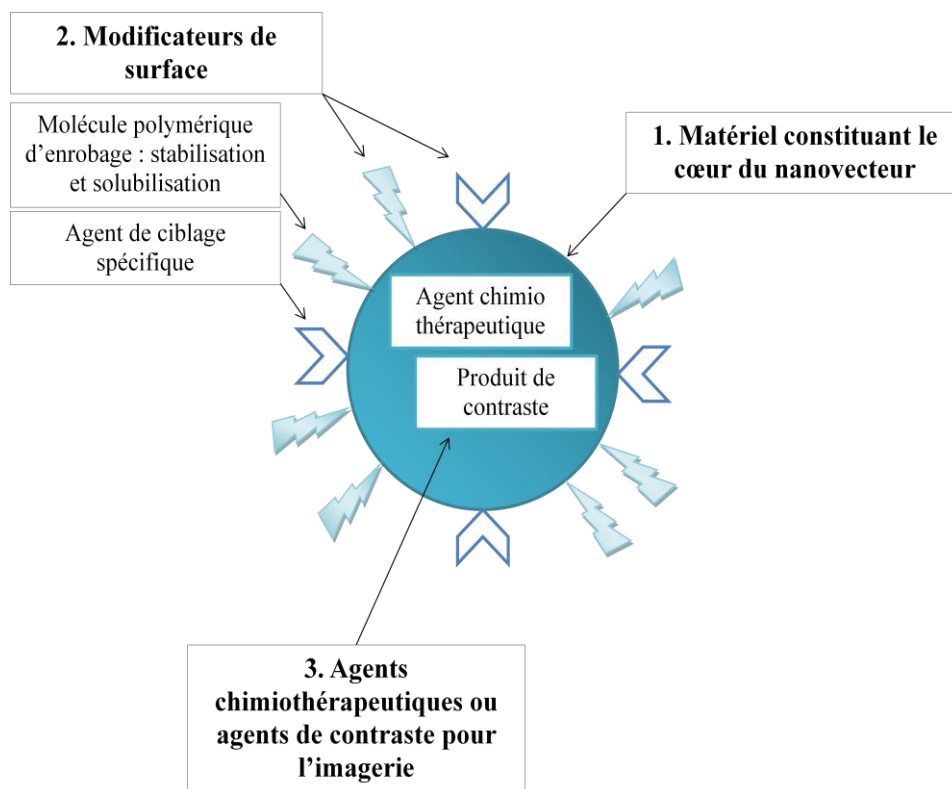


Figure 12 : Représentation schématique d'un nanovecteur tripartite (d'après Frilling et coll., 2012)

Parmi les nanoparticules magnétiques, les nanoparticules d'oxyde de fer ont été introduites au milieu des années 80. Elles sont constituées d'un cœur de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), la forme oxydée plus stable, d'un diamètre compris entre 5 et 20 nm et recouvert d'un polymère hydrosoluble. Elles présentent une bonne stabilité chimique et une très bonne biocompatibilité (Gupta et coll., 2005; Duguet et coll., 2006).

La dernière génération d'agents de contraste est constituée par les nanoparticules super-paramagnétiques d'oxyde de fer (SPIONs). Comme les nanoparticules utilisées dans la partie expérimentale appartiennent à ce groupe, on s'intéressera principalement à ce type de nanoparticules dans la suite de cette synthèse bibliographique.

## 5.2 Biodistribution

La biodistribution dépend en premier lieu des propriétés physico-chimiques des nanoparticules, comme leur taille, leur forme et leurs caractéristiques de surface. Le design des nanoparticules doit donc s'appuyer sur la cible biologique que l'on cherche à atteindre (Jain et coll., 2008; Kettiger et coll., 2013).

Elle dépend également du mode d'administration et des interactions des nanoparticules avec l'environnement physiologique dans lequel elles sont introduites. Toute introduction d'une particule étrangère au corps entraîne une réaction du système immunitaire. Or, pour être efficace *in vivo*, la nanoparticule doit rester suffisamment longtemps dans la circulation sanguine pour atteindre sa cible (Almeida et coll., 2011; Kettiger et coll., 2013).

Les différentes stratégies plus ou moins complexes développées pour adresser les nanoparticules à leur cible *in vivo* sont développées ci-après.

### 5.2.1 Adressage passif

#### 5.2.1.1 Intervention du système des phagocytes mononucléés (SPM)

Suite à leur administration intraveineuse, les nanoparticules sont opsonisées, c'est-à-dire que de nombreuses protéines plasmatiques comme les immunoglobulines, les composants du système du complément, les fibrinogènes et l'albumine s'adsorbent spontanément à leur surface. Cette étape d'opsonisation permet une interaction des nanoparticules avec les récepteurs à la membrane des monocytes circulants et des macrophages résidents du système SPM. Elles subissent alors une endocytose et/ou une phagocytose. Ceci aboutit à leur clairance plasmatique avec une demi-vie plasmatique variant de 1 à 24-36h, selon les propriétés physicochimiques des nanoparticules et la quantité administrée. Les nanoparticules s'accumulent alors dans les organes caractérisés par une haute activité de phagocytose, soit 80-90% dans le foie, 5-8% dans la rate et 1-2% dans la moelle osseuse dans les minutes suivant l'injection intraveineuse. Les tissus présentant une inflammation marquée sont aussi la cible du SPM, et donc des nanoparticules adressées passivement (Monfardini et coll., 1998; Dobrovolskaia et coll., 2008).

La biodistribution par adressage passif est influencée par la taille des nanoparticules. Ainsi les nanoparticules d'un diamètre hydrodynamique inférieur à 6 nm seront rapidement excrétées par les reins, celles d'un diamètre supérieur à 100nm s'accumuleront massivement dans les organes du système réticulo-endothélial (RES) et celles de taille intermédiaire auront une demi-vie plasmatique prolongée (Almeida et coll., 2011; Duguet et coll., 2006).

L'enrobage par des molécules polymériques joue aussi un rôle majeur. Ces dernières sont en effet indispensables pour rendre les nanoparticules biocompatibles et biodégradables. La nature du polymère est un premier facteur important : le dextran, apparenté aux lipopolysaccharides de la surface des bactéries, favorise la reconnaissance par les macrophages et l'adressage aux organes du RES ; le polyéthylène glycol favorise quant à lui la furtivité des nanoparticules (Duguet et coll., 2006). Les charges à la surface sont le second facteur primordial : un enrobage neutre prolonge la demi-vie plasmatique, limite la reconnaissance par SPM et donc l'accumulation dans le foie (Dobrovolskaia et coll., 2008) ; les nanoparticules cationiques ont une clairance plasmatique plus rapide que les nanoparticules anioniques et s'accumulent dans des organes différents (Kettiger et coll., 2013).

En conclusion, plus une nanoparticule est petite, neutre et hydrophile, plus sa demi-vie plasmatique sera longue.

#### ***5.2.1.2 Effet EPR (enhanced permeability and retention)***

L'angiogenèse tumorale, phénomène répondant au besoin accru des cellules tumorales en oxygène et facteurs nutritionnels, perturbe fortement la vascularisation. Les vaisseaux sont anormaux ; les pores des capillaires discontinus présentent une taille supérieure à la normale, pouvant atteindre 600 nm. Ceci permet l'extravasation des nanoparticules et leur accumulation dans l'espace interstitiel, jusqu'à des concentrations 10 à 50 fois supérieures aux tissus sains en un à deux jours (Iyer et coll., 2006). Par ailleurs, le drainage lymphatique est aussi anormal, ce qui contribue à l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur (Morlieras et coll., 2013). La limite majeure existant pour l'utilisation de cet effet EPR en pratique est l'hétérogénéité vasculaire des tumeurs. De plus, l'effet EPR est incapable de promouvoir l'internalisation des nanoparticules par les cellules tumorales.

### **5.2.1.3 Ciblage par aimantation**

Il est possible d'obtenir une concentration des nanoparticules au niveau du site d'intérêt par application d'un champ magnétique externe à fort gradient au niveau de la tumeur au moment de l'injection intra-artérielle ou intraveineuse des nanoparticules magnétiques (Alexiou et coll., 2000).

## **5.2.2 Adressage actif par vectorisation des nanoparticules**

Le premier objectif est de permettre aux nanoparticules d'échapper au SPM. Pour ce faire, on joue sur leur taille, la densité de charges à leur surface et leur balance hydrophilie-hydrophobie lors de leur conception (Dobrovolskaia et coll., 2008).

Comme précisé précédemment, plus une nanoparticule est petite, neutre et hydrophile, plus sa demi-vie plasmatique est longue. Le polyéthylène glycol (PEG) est un polyéther synthétique linéaire neutre et hydrophile créant un champ de répulsion stérique autour de la nanoparticule. Il constitue la molécule la plus efficace pour supprimer l'adsorption des protéines plasmatiques, et donc la reconnaissance par le SPM (Duguet et coll., 2006).

Le deuxième objectif est de cibler spécifiquement un organe ou un tissu en greffant sur la nanoparticule un anticorps, un peptide ou un oligonucléotide dont la cible est présente sur les cellules tumorales d'intérêt (Duguet et coll., 2006).

## **5.2.3 Synthèse**

La figure 13 ci-après résume les étapes successives de la biodistribution des nanoparticules, et les différents obstacles qu'elles doivent franchir avant d'atteindre leur cible.

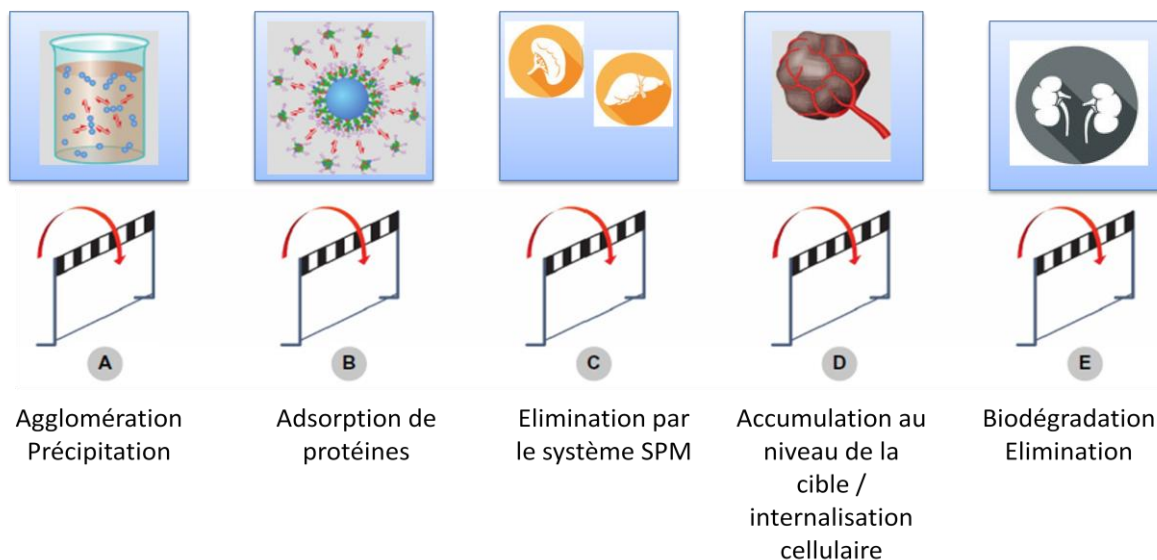


Figure 13 : Synthèse de la biodistribution des nanoparticules (d'après Kettiger, 2013)

Différents processus interviennent successivement suite à l'administration systémique de nanoparticules, et définissent leur devenir *in vivo*. L'agglomération des nanoparticules (A) conduit à une connaissance imprécise de la dose réellement administrée *in vivo* et peut induire une thromboembolie très délétère en favorisant l'accumulation dans les poumons. L'adsorption de protéines (B) peut induire une réaction immunitaire humorale entraînant une toxicité. L'élimination des nanoparticules par le système SPM (C) (foie et rate) accélère leur clairance plasmatique. L'accumulation des nanoparticules au niveau du site cible (D) peut enfin être limitée par une biodégradation trop rapide (E). A l'inverse, une élimination trop longue peut conduire à une toxicité à long terme pour les organes ayant accumulé les nanoparticules.

#### 5.2.4 Localisation intracellulaire

La voie dépendante de la clathrine et l'adressage des nanoparticules aux lysosomes semblent être les mécanismes principaux de l'internalisation des nanoparticules d'oxyde de fer. Cependant, la localisation intracellulaire dépend fortement de la présence ou non d'un ligand de vectorisation, dont le choix est primordial. En effet, si le principe actif associé à la nanoparticule se trouve séquestré dans un lysosome, son efficacité *in vivo* peut être réduite. Il convient alors de trouver des stratégies d'adressage à la bonne cible moléculaire.



## 5.3 Dégradation et toxicité

### 5.3.1 Dégradation

La dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer a lieu dans les lysosomes, et contribue finalement au pool ferrique de la cellule (Duguet et coll., 2006; Dobrovolskaia et coll., 2008).

### 5.3.2 Toxicité

En théorie, les particularités intéressantes des nanoparticules, dont leur forte réactivité et leur propension à diffuser à travers les membranes biologiques du fait de leur très petite taille, sont aussi potentiellement sources de cytotoxicité. Elles pourraient ainsi occasionner un dysfonctionnement des composants cellulaires majeurs que sont les mitochondries et l'ADN (Singh et coll., 2010).

Même en l'absence d'une cytotoxicité objectivable, des réponses cellulaires aberrantes, notamment des lésions de l'ADN, un stress oxydatif, un dysfonctionnement de la membrane mitochondriale ou un changement dans l'expression des gènes sont envisageables.

Cette toxicité potentielle pourrait résulter d'une accumulation de fer dans un tissu donné, entraînant une dérégulation de l'homéostasie. Les réponses cellulaires aberrantes citées ci-dessus ou des lésions ADN pouvant induire carcinogenèse à plus long terme, en l'absence de cytotoxicité observable au moment du traitement. Des radicaux oxygénés pourraient aussi être générés (Singh et coll., 2010).

En pratique, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* rapportent une excellente biocompatibilité pour les SPION et une absence d'activation des macrophages suite à l'internalisation des nanoparticules.

La toxicité dépend à la fois des propriétés physicochimiques des nanoparticules, de la dose et du milieu dans lequel elles se trouvent. Ainsi le type de modificateurs de surface, le stade d'oxydation du fer du cœur de la nanoparticule, la force de l'interaction entre les

nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (SPION) et les protéines plasmatiques modulent la toxicité (Karlsson et coll., 2009).

Suite à l'administration de Feridex ®, utilisé pour l'IRM des lésions hépatiques, des douleurs dorsales et une vasodilatation sont rapportées avec une incidence de 2 à 10% des patients (Kim et coll., 2010).

## **5.4 Intérêt diagnostique et thérapeutique**

### **5.4.1 Utilisation des nanoparticules en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)**

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est aujourd'hui largement exploitée comme outil diagnostique. Cette technique d'imagerie tomographique exploite les propriétés magnétiques de la matière vivante pour produire des informations sur la composition moléculaire des organes. Elle s'appuie sur le principe suivant : la matière organique est composée d'une population donnée de noyaux d'hydrogène. Placés dans un champ magnétique externe puissant, ceux-ci atteignent un état d'équilibre. L'administration d'une onde de radiofréquence perturbe cet équilibre, mais les noyaux y retournent spontanément par un processus appelé relaxation, propre à chaque tissu, qui permet l'obtention de l'image IRM.

Les nanoparticules induisent un renforcement du temps de relaxation transversale T2 du fait de leurs propriétés superparamagnétiques. Ce temps T2 mesure la disparition de l'aimantation résultant du fait que les moments magnétiques sont synchrones dans leur rotation dans le plan transversal. L'adressage passif des nanoparticules aux cellules du SPM a déjà été exploité pour l'imagerie des organes à haute activité de phagocytose. Ainsi les ferumoxides (Feridex®) sont utilisés pour l'imagerie du foie et les ferumoxtrans pour celle des tumeurs métastasées aux nœuds lymphatiques ou à la moelle osseuse et des maladies inflammatoires et dégénératives (Jung et coll., 1995).

La vectorisation des nanoparticules offre de nouvelles possibilités en termes d'imagerie, avec la possibilité d'obtenir des images de tout organe dont les cellules seraient spécifiquement ciblées.

## 5.4.2 Utilisation thérapeutique des nanoparticules

### 5.4.2.1 Hyperthermie

La thérapie par hyperthermie est basée sur une sensibilité plus marquée des cellules tumorales et des cellules hypoxiques à des températures de 42-46°C par rapport aux cellules normales. En cas d'augmentation de la température, les protéines cellulaires sont dénaturées et des protéines pro-apoptotiques, telles que les procaspases, sont exprimées. La mort cellulaire survient alors, suite à une cascade d'activation protéique (Duguet et coll., 2006).

Les nanoparticules sont capables de transformer l'énergie électromagnétique en chaleur quand elles sont exposées à un champ magnétique alternatif. La puissance dissipée par la nanoparticule, définissant l'efficacité de la transformation énergétique, est appelée SAR pour « specific absorption rate ». En appliquant un champ magnétique alternatif, après injection de nanoparticules vectorisées, à des patients atteints de tumeur, on pourrait ainsi théoriquement créer un échauffement limité aux cellules tumorales, d'où des effets secondaires moins importants (Cherukuri et coll., 2010).

$$SAR = \frac{\sum C_{pi} m_i \Delta T}{m_{magn} \Delta t}$$

Figure 14 : Formule de calcul du SAR, avec  $C_{pi}$  : capacités calorifiques des éléments du système ;  $m_i$  : masse des éléments du système ;  $\Delta T$  : hausse de température ;  $\Delta t$  : temps de mesure

Le premier essai d'hyperthermie a été conduit en 1957 et consistait en une injection de particules micrométriques d'oxyde de fer  $Fe_2O_3$  au niveau de métastases localisées dans les nœuds lymphatiques. Un échauffement correct était obtenu pour une concentration de 5 milligrammes de particules dans 1 gramme de tissu, et dépendait de la radiofréquence et de l'intensité du champ magnétique appliqué (Gilchrist et coll., 1957).

De nombreux essais *in vitro* et quelques essais *in vivo* chez l'homme et l'animal ont abouti à des résultats encourageants. Un essai clinique majeur a été conduit à l'hôpital de la Charité à Berlin pour le traitement de patients atteints de glioblastome, le cancer cérébral le

plus fréquent et le plus agressif chez l'adulte. Une augmentation modérée de la température intra-tumorale jusque 42-45°C était obtenue après injection de nanoparticules dans la tumeur et application d'un champ magnétique alternatif (fréquence de 100 kHz, amplitude maximale de 20 mT). D'autres essais cliniques similaires sont en cours pour traiter des cancers de la prostate et du pancréas (Johannsen et coll., 2007; Johannsen et coll., 2005)

#### **5.4.2.2 Transport d'agents chimiothérapeutiques**

La chimiothérapie traditionnelle rencontre deux limites majeures: la faible spécificité des agents chimiothérapeutiques induisant une toxicité aiguë importante ; un phénomène de résistance multiple aux médicaments réduisant de façon importante l'efficacité des traitements sur le long terme. Les nanoparticules apportent une réponse à ces deux limites, par fixation d'agents chimiothérapeutiques de façon covalente ou par des interactions hydrophobes. L'agent chimiothérapeutique est alors adressé à la cellule tumorale cible grâce à la vectorisation de la nanoparticule. Il est de plus possible de contrôler la libération du principe actif par application d'un champ magnétique externe oscillatoire.

Ces deux approches peuvent être combinées au sein d'une même nanoparticule afin de renforcer leur puissance thérapeutique.

#### **5.4.2.3 Concept de théranostique**

Le concept de théranostique combine les propriétés diagnostique et thérapeutique au niveau d'une même nanoparticule. Ces agents permettent de s'affranchir des différences de biodistribution et de sélectivité qui existent actuellement entre les agents d'imagerie et de thérapie (Kelkar, Reineke 2011).

Par exemple, des clusters de SPION avec deux modificateurs de surface, le PEG et l'acide folique, ont ainsi été développés. Le PEG est connu pour diminuer l'action du SPM et augmenter la demi-vie plasmatique des nanoparticules, et l'acide folique pour favoriser l'internalisation spécifique dans les tumeurs par interaction avec un récepteur membranaire des cellules tumorales. Une IRM et une hyperthermie par application d'un champ magnétique alternatif ont été réalisées 24 heures après injection de ces SPION par voie intraveineuse à des

souris porteuses de xéno greffes de cellules dérivées de myélome multiple. L'IRM a montré une diminution significative de T2 et un renforcement du contraste au niveau de la tumeur. Suite à l'hyperthermie, une diminution de la taille des tumeurs d'un facteur 10 par rapport aux souris contrôle et une survie nettement améliorée ont été rapportées. Aucune hépatotoxicité ou néphrotoxicité n'étaient détectables après 1 mois. Ces SPION sont donc une option pour le traitement du myélome multiple, qui présente de fréquentes résistances aux agents chimiothérapeutiques (Hayashi 2013).

*Les nanoparticules constituent donc une option d'avenir pour le diagnostic et le traitement de nombreuses tumeurs endocrines surexprimant le récepteur à la cholecystokinine 2 à leur membrane.*

## PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

---

Dans le contexte de développement de nouvelles options thérapeutiques anticancéreuses, un nouvel agent théranostique nommé MG-IONP-DY647 a été développé par l'équipe de recherche EA 4552 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), sous la direction du Docteur Daniel Fourmy. Les nanoparticules d'oxyde de fer servant de base à la préparation de cet agent sont commerciales, leur biocompatibilité a déjà été testée chez la souris. Elles ont été vectorisées par un pharmacophore de 10 acides aminés, la minigastrine, ligand du RCCK2, afin de permettre le ciblage vers les cellules tumorales surexprimant ce récepteur. Elles portent à leur surface un fluorochrome, le DY647, permettant leur détection en fluorescence.

Un ciblage spécifique des cellules INR1-G9-RCCK2 (transfectées de façon stable et surexprimant le RCCK2 à leur surface) par les nanoparticules vectorisées MG-IONP-DY647, ainsi qu'une accumulation de ces dernières dans les lysosomes, ont été démontrés au sein du laboratoire (Sanchez, El Hajj Diab, Connord, Clerc, Meunier, Pipy, Payré, Reasmey P. Tan, Gougeon, Carrey, Gigoux, Fourmy 2014).

Par ailleurs, la capacité des MG-IONP-DY647 à induire la mort cellulaire après exposition à un champ magnétique alternatif a été démontrée *in vitro*. Pour ce faire, des cellules INR1-G9-RCCK2 ont été incubées pendant 24 heures avec des MG-IONP-DY647, puis soumises à un champ magnétique alternatif (fréquence de 275 kHz ; intensité de 40 ou 52 mT) pendant 2 heures. Ce traitement a entraîné une apoptose cellulaire, causant 17% de mort à 40 mT et 36% à 52 mT, 4 heures après la fin du traitement au champ magnétique. Soumises à un champ d'intensité égale à 52 mT, les cellules ont également montré des signes de nécrose. Le test au (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl) tétrazolium bromide (test MTT) permettant de déterminer la survie cellulaire à 24 heures après traitement par le champ magnétique a indiqué 27% de mort à 40 mT et 67% à 52 mT. L'implication des lysosomes dans le processus de mort cellulaire induit par le champ magnétique a été également démontrée (Sanchez et coll., 2014).

Suite à l'obtention de ces résultats *in vitro* encourageants, l'objectif de ce travail de thèse de doctorat vétérinaire est de servir de préliminaire à l'étude préclinique *in vivo* des nanoparticules MG-IONP-DY647.

Cette étude *in vivo* a comme premier objectif d'analyser le ciblage de cellules tumorales INR1-G9-RCCK2 de glucagonome de hamster exprimant le récepteur CCK2 xénogreffées chez la souris swiss nude. Les nanoparticules seront injectées dans la circulation sanguine générale des souris. La détection des nanoparticules est attendue au niveau de la tumeur, ainsi que dans le foie, la rate et le rein (captation des nanoparticules par le système des phagocytes mononucléés (SPM) et élimination urinaire rapportée).

Si le ciblage se révèle qualitativement et quantitativement suffisant, le second objectif est de réaliser un premier essai de nanothérapie ciblée. Il s'agira de déterminer si l'application d'un champ magnétique alternatif après administration de nanoparticules permet d'induire une régression tumorale.

# 1 Matériel et méthodes

## 1.1 Nanoparticules non vectorisées

Les nanoparticules d'oxyde de fer non vectorisées ont été acquises auprès de Genovis (Lund, Suède). Les caractéristiques fournies par le fabricant sont résumées dans le tableau 4 ci-dessous. Elles sont constituées d'un nanocristal d'oxyde de fer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) entouré d'une enveloppe de polyéthylène glycol (PEG) et ont été fonctionnalisées par la présence de plusieurs centaines de groupements amine primaire greffés sur l'enveloppe de PEG, permettant la vectorisation ultérieure des nanoparticules. Leur biocompatibilité a été testée chez la souris. Les nanoparticules sont en solution (environ  $5.10^{14}$  particules dans 1 ml de solution) avec une concentration en fer de 1,5 mg/mL.

NIMT FeOdot PEG-Amine (N1-FA1-020, N1-FA1-050)	
Concentration en fer	1.5 mg/mL
Concentration en oxyde de fer	2.0 mg/mL
Nombre de particules dans 1 mL de solution	$\sim 5.10^{14}$
Concentration molaire de particules	$\sim 0.75 \mu\text{M}$
Nombre de groupes aminés / particule	$\sim 700$
Diamètre du core	$11 \pm 1 \text{ nm}$
Diamètre de la particule incluant les modificateurs de surface	$18 \pm 2 \text{ nm}$
Diamètre hydrodynamique	30 nm
Susceptibilité magnétique	80 emu/g
Relaxivité r2	$400 \text{ mM}^{-1}\text{S}^{-1}$

Tableau 4 : Caractéristiques des nanoparticules fournies par le fabricant

## 1.2 Préparation des nanoparticules vectorisées

Le couplage de 100 molécules de minigastrine (MG) par SPION a été réalisé selon un protocole précédemment décrit (Sanchez et coll., 2014) : un aliquot de SPION (80  $\mu\text{L}$  de SPION à une concentration de 12 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{mL}$ ) a été ajouté à 120  $\mu\text{L}$  de PBS (0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.3, 150 mM NaCl) et soniqué pendant 10 min dans de la glace (Bioblock Scientific 88154). Du NHS-DY647-PEG1 (12  $\mu\text{g}$ ) en solution dans du diméthylformamide



(24  $\mu\text{L}$ ) a été ajouté et laissé à réagir pendant 2 heures à température ambiante. Ensuite, 53  $\mu\text{g}$  d'un ester N-hydroxysuccinimide d'acide 3-maléimidopropionique en solution dans  $\mu\text{L}$  de DMF a été ajouté et incubé pendant 1 heure à température ambiante. De la minigastrine (100  $\mu\text{L}$  dans une solution de 30% de DMF, 70% d' $\text{H}_2\text{O}$  contenant 20  $\mu\text{g}$  de peptide) a été ajouté aux SPION pendant 2 heures. Finalement, les fonctions maléimides libres ont été saturées par ajout d'un excès de cystéine (62  $\mu\text{g}$  dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction). Les nanoparticules MG-IONP-DY647 ont été stockées à  $4^\circ\text{C}$ . Une représentation schématique de cette procédure se trouve dans la figure 15 ci-dessous.

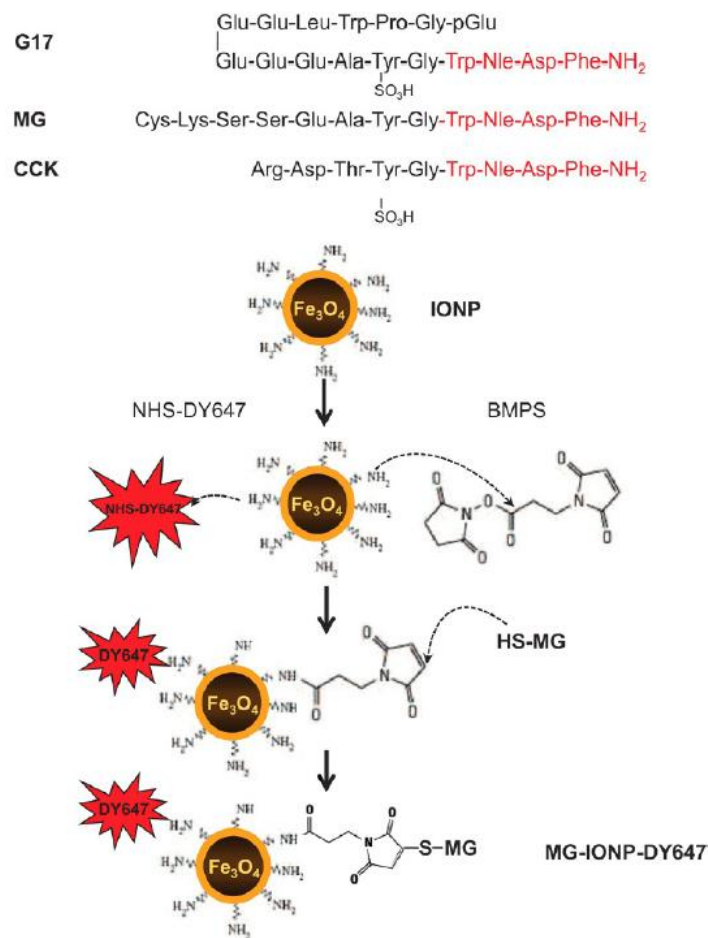


Figure 15 : Représentation schématique de la méthode de nanoconjugaison utilisée pour obtenir les MG-IONP-DY647 (Sanchez et coll., 2014). En haut : structure primaire de la gastrine (G17), réplique synthétique (MG) et cholecystokinine (CCK) utilisées dans cette étude. Les acides aminés en rouge sont communs à la CCK et la gastrine (deux ligands naturels du R<sub>CCCK2</sub>) et correspondent à la région biologiquement active de ces deux peptides. En bas, représentation schématique de la réaction de conjugaison de la MG aux nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer. La couche colorée en jaune représente l'enveloppe de polyéthylène glycol 2000.

Les courbes d'absorption (maximum à 653 nm) et d'émission (maximum à 672 nm) du fluorochrome DY-647 (Dyomics) utilisé pour cette étude sont présentées dans la figure 16.

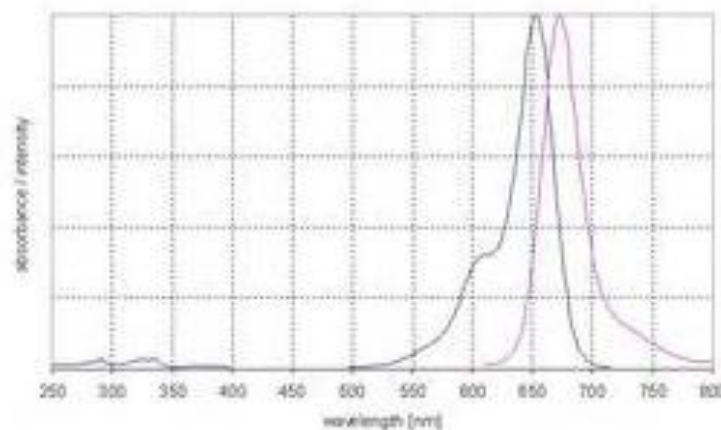


Figure 16 : Spectres d'absorption et d'émission du fluorochrome DY647 (Dyomics)

### 1.3 Cultures cellulaires

Des cellules INR1-G9 issues d'un glucagonome de hamster (tumeur endocrine fonctionnelle des cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans du pancréas) ont été transfectées de façon stable avec un vecteur d'expression codant pour le RCCK2, donnant des cellules INR1-G9-RCCK2. Elles ont été cultivées en milieu RPMI 1640, 10% de sérum de veau fœtal (SVF), complémenté en pénicilline (100 unités/mL) et streptomycine (100 unités/mL) (Invitrogen), dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, et utilisées pour la réalisation de xénogreffes chez la souris.

### 1.4 Modèles tumoraux *in vivo* pour l'étude du ciblage

Toutes les expérimentations effectuées sur les animaux et les conditions d'hébergement ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et le Ministère de la Recherche (voir en annexe le formulaire de dépôt de protocole).

Des souris swiss nude femelles âgées de 4 semaines et pesant environ 20 grammes (Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, France) ont été utilisées dans cette étude, après une semaine d'acclimatation. Ces souris mutantes non consanguines présentent une aplasie du

thymus (d'où une absence de lymphocytes T et une augmentation compensatrice de l'activité des macrophages). Leur phénotype est caractérisé par une absence presque totale du pelage. Comme elles ne montrent pas de rejet de xéno greffes, elles constituent un excellent modèle en cancérologie. Des souris NMRI nude mâles, présentant également une aplasie du thymus, ont également été utilisées dans un second temps.

Après induction d'une anesthésie gazeuse à l'isoflurane 2% (induction dans une cage à isoflurane et relais au masque), les cellules INR1-G9-RCCCK2 ( $5 \cdot 10^6$  cellules/greffe dans 50  $\mu\text{L}$  de PBS) ont été injectées soit dans le parenchyme pancréatique après laparotomie latérale gauche soit par voie sous-cutanée au niveau dorsolombaire à droite. Une injection unique (en un seul point) était réalisée dans les deux cas.

Un suivi clinique journalier et une pesée hebdomadaire ont été réalisés sur la période de 2 à 4 semaines nécessaire au développement des tumeurs. La croissance des tumeurs sous-cutanées a été mesurée trois fois par semaine à l'aide d'un pied-à-coulisse ; leur volume a été calculé à l'aide de la formule suivante :  $\pi/2 \times (a \times b^2)$ , où a représente le grand diamètre et b le petit diamètre de la tumeur.

Une suspension de nanoparticules, vectorisées ou non, (50  $\mu\text{g}$  dans 150  $\mu\text{L}$  de PBS) a été injectée au niveau de la veine jugulaire après anesthésie gazeuse à l'isoflurane 2.5%, comme on peut le voir sur la figure 17 ci-dessous. La suspension a été préparée extemporanément : sonication pendant 6 minutes ayant pour objectif d'annuler les agrégats de nanoparticules, mise en suspension dans le volume de PBS, injection immédiate.

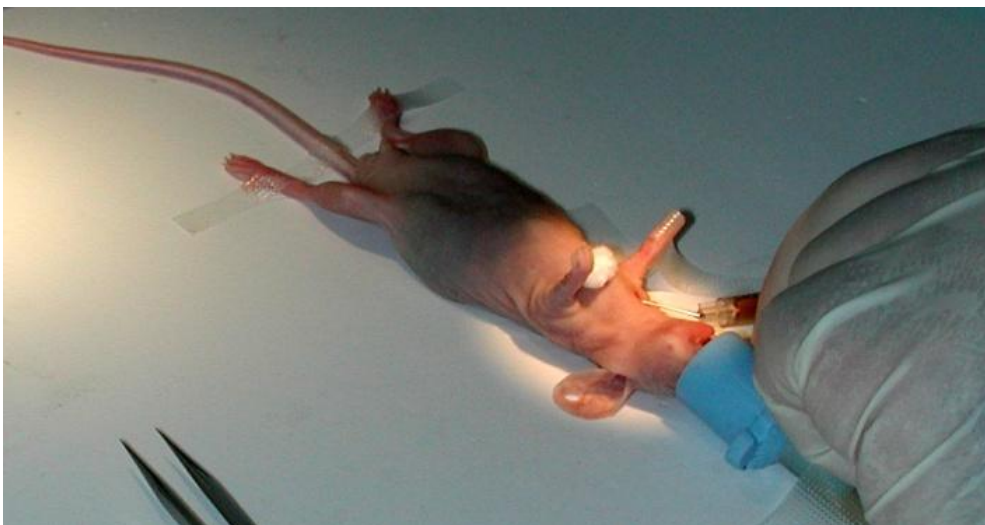


Figure 17 : Injection de la suspension de nanoparticules au niveau de la veine jugulaire (Denis Calise, Microchirurgie expérimentale, GenoToul Anexplo, us006-microchirurgie@inserm.fr)

Les souris ont été sacrifiées 24 heures après injection des nanoparticules par dislocation cervicale après anesthésie générale à l'isoflurane. Les organes d'intérêt (tumeur, foie, rate, rein, estomac, cerveau, poumon) ont été rapidement collectés, fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 24-48 heures puis inclus en bloc de paraffine pour analyse histologique. Les coupes d'organes issues des blocs de paraffine ont été colorées en hémalun-éosine et utilisées pour une analyse histologique, ou ont subi la coloration de Perls afin de détecter leur contenu en oxyde de fer.

## **1.5 Détection des nanoparticules par fluorescence**

Des images des souris entières (deux profils) ont été acquises 24 heures après injection des nanoparticules par épi-fluorescence à l'aide du système IVIS Spectrum® (Caliper Life Sciences). Les souris étaient placées sous anesthésie générale à l'isoflurane 1.5 à 2% pendant toute la durée de l'acquisition. Après le scanner du corps entier, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et autopsiées. Des images des organes d'intérêt (tumeur, foie, rein, rate, estomac, cerveau, poumon) ont immédiatement été acquises. Les constantes d'acquisition étaient les suivantes : excitation à une longueur d'onde de 640 nm, filtre d'émission à 680 nm, durée d'exposition automatiquement adaptée par l'IVIS Spectrum®.

## **1.6 Détection du fer sur des coupes histologiques par la coloration de Perls**

Les sections d'organes fixés au formol ont été incluses en bloc de paraffine. Des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées. Après déparaffinage (bains xylène, alcool, eau), les coupes ont été incubées 20 min dans une solution de ferrocyanure de potassium à 2% (50 cc) contenant 0,5% d'HCl (2 cc d'HCl 37%) préparée extemporanément, lavées à l'eau, puis contre-colorées au rouge nucléaire pendant 5 min. Les coupes ont ensuite été lavées à l'eau, déshydratées (alcool, xylène) et montées. L'oxyde de fer est coloré en bleu par cette méthode.

## 1.7 Mesure de la relaxométrie des tumeurs et des organes d'intérêt

La quantité de nanoparticules accumulée dans la tumeur et les organes connus pour éliminer les nanoparticules (foie, rate, rein) a été déterminée à l'aide d'un magnétomètre VSM (Vibrating Sample Magnetometer) à la température de 300 K, soit 26.85°C. Chaque échantillon a été placé au centre d'un électroaimant et mis en vibration (mouvement sinusoïdal, fréquence de 50 Hz). En réponse à l'excitation par le champ magnétique créé par l'électroaimant, les nanoparticules s'alignent et génèrent un champ magnétique dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité de nanoparticules alignées. L'amplitude du champ magnétique varie de -5 à +5 Tesla durant la mesure afin de déterminer les paramètres magnétiques de l'échantillon. La connaissance des données fournies par le fabricant des nanoparticules permet de déduire la quantité de ces dernières dans l'échantillon. La figure 18 ci-dessous présente un schéma de l'électroaimant.

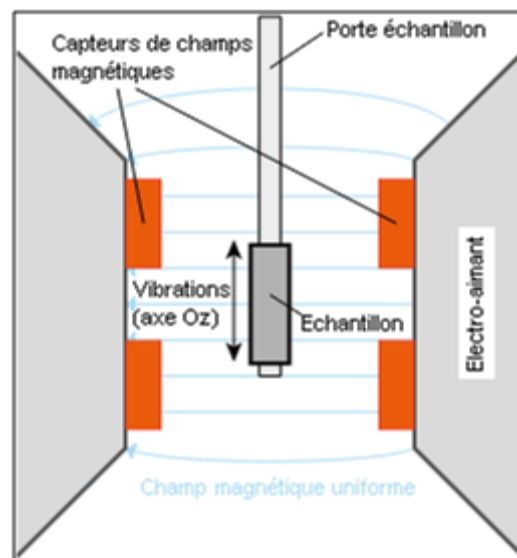


Figure 18 : Schéma du magnétomètre VSM

## 1.8 Régression tumorale par hyperthermie

Après réalisation des xénogreffes intra-pancréatiques comme précisé ci-avant, la taille des tumeurs a été évaluée régulièrement par palpation abdominale et/ou par échographie immédiatement avant l'injection de nanoparticules vectorisées. Les souris ont reçu une injection intraveineuse de 150  $\mu$ L de PBS au niveau de la veine jugulaire (comme décrit

précédemment), ou de nanoparticules vectorisées ou non (50 µg de fer dans 150 µL de PBS) soit au niveau de la veine jugulaire soit par voie intra-tumorale. L'injection intra-tumorale a été réalisée à l'aiguille fine à travers la paroi abdominale, après identification de la tumeur par palpation. Après anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane 2%, les souris ont été soumises au champ magnétique alternatif (intensité de 40 mTesla, durée de 60 minutes), comme on peut le voir sur la figure 19 ci-dessous. La température au niveau de la zone abdominale a été mesurée à l'aide d'une caméra thermique (Testo 885). La température rectale a également été suivie tout au long de la procédure, comme reflet de la température corporelle.

La croissance tumorale a ensuite été contrôlée par palpation abdominale pendant une à deux semaines après l'application du champ magnétique.

Les souris ont été sacrifiées une à deux semaines après l'application du champ magnétique. Les tumeurs ont été prélevées et mesurées au pied-à-coulisse. Le volume tumoral a été calculé à partir de la formule suivante :  $4\pi \times a \times b \times c / 3$ , où a, b et c représentent les trois diamètres de la tumeur. Les organes d'intérêt (foie, rein, rate, estomac, cerveau, poumons) ont également été prélevés afin de réaliser une étude histologique et des clichés en microscopie électronique.



Figure 19 : Bobine électromagnétique et système d'anesthésie permettant l'application du champ magnétique alternatif pour le traitement par hyperthermie des souris porteuses de xénogreffes

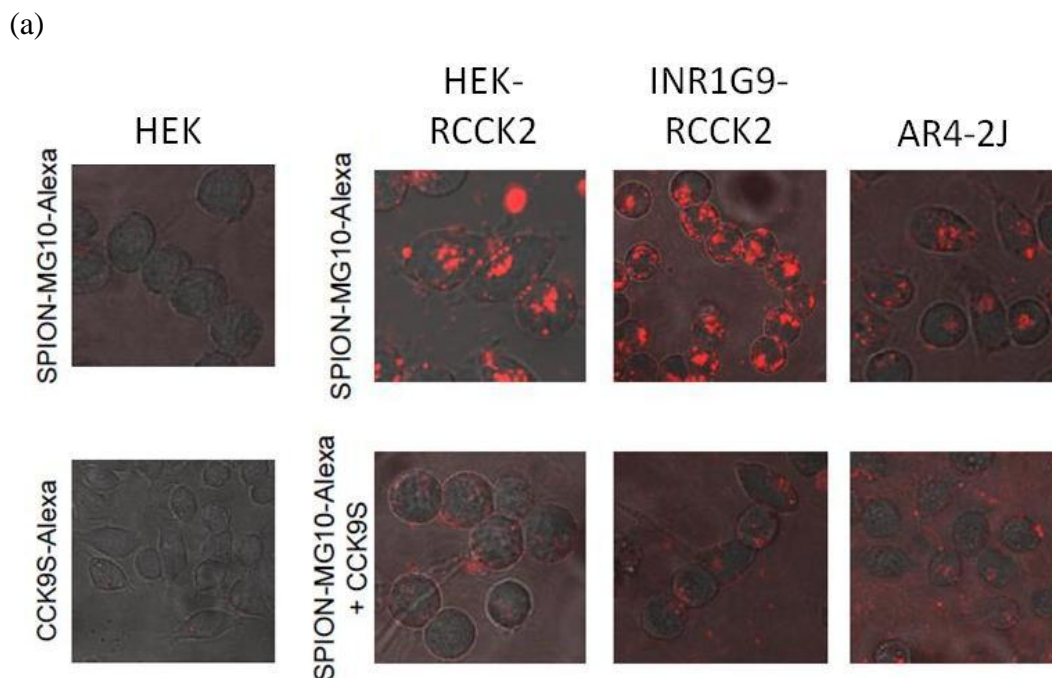
## 2 Résultats

### 2.1 Résultats préliminaires

Les résultats présentés ci-après ont été obtenus dans l'équipe INSERM-EA4552 avec des nanoparticules d'oxyde de fer vectorisées par la minigastrine (MG10) et un fluorochrome, l'Alexa®. La quantité de MG10 à leur surface est cependant nettement inférieure à celle des nanoparticules utilisées dans mon travail de thèse.

#### 2.1.1 Choix des cellules pour la réalisation des xénogreffes

L'internalisation des nanoparticules SPION-MG10-Alexa dans plusieurs lignées cellulaires tumorales a été testée et détectée en microscopie confocale pour l'analyse qualitative et en cytométrie de flux pour la quantification de l'internalisation. Les cellules INR1-G9-RCCK2 et AR4-2J (cellules tumorales pancréatiques de rat issues d'un carcinome chimio-induit par l'azaserine, phénotype acinaire) apparaissaient comme de bons modèles du fait d'une internalisation spécifique du RCCK2. Les cellules INR1-G9-RCCK2 ont finalement été choisies pour l'étude *in vivo* car elles internalisent plus de nanoparticules que les AR4-2J, probablement du fait d'un niveau d'expression du récepteur plus élevé. Une synthèse des résultats obtenus est présentée dans la figure 20.



(b)

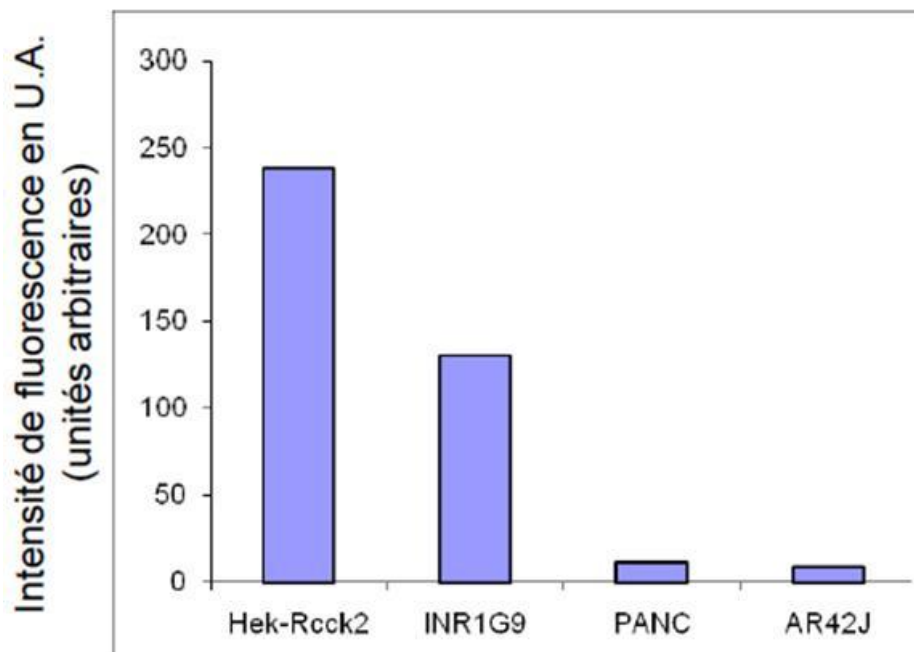


Figure 20 : Internalisation des nanoparticules dans différentes lignées cellulaires

- a) Images en microscopie confocale. Des cellules de différentes lignées cellulaires ont été incubées pendant 3 heures avec des nanoparticules SPION-MG10-Alexa en présence ou en absence de CCK9S, un ligand du RCCK2. avant réalisation des clichés en microscopie confocale. Les cellules HEK ne présentent pas de RCCK2 à leur surface, à l'inverse des HEK-RCCK2 (cellules HEK transfectées avec le RCCK2), des INR1-G9-RCCK2 (glucagonome de hamster) et des AR4-2J (carcinome pancréatique de phénotype acinaire).

Une internalisation des nanoparticules spécifique du RCCK2 est mise en évidence dans les cellules des lignées INR1-G9-RCCK2 et AR4-2J.

- b) Quantification du marquage en cytométrie de flux après incubation des cellules de différentes lignées cellulaires avec des nanoparticules SPION-MG10-Alexa pendant 3 heures.

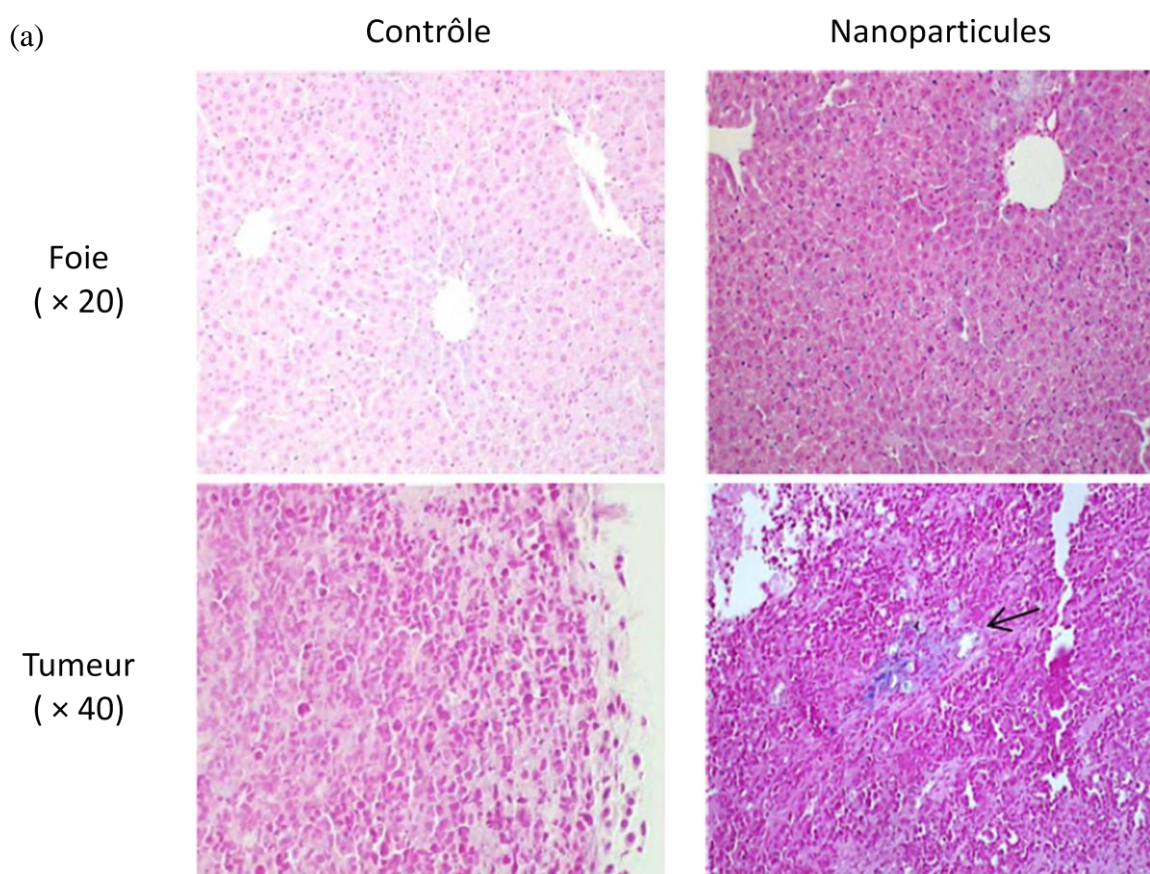
Des xénogreffes ont ensuite été réalisées avec succès chez des souris swiss nude. L'association des résultats *in vitro* et de la capacité des cellules INR1-G9-RCCK2 à induire des tumeurs *in vivo* font de cette lignée cellulaire un bon modèle pour l'étude de la biodistribution et de la régression tumorale induite par l'hyperthermie.



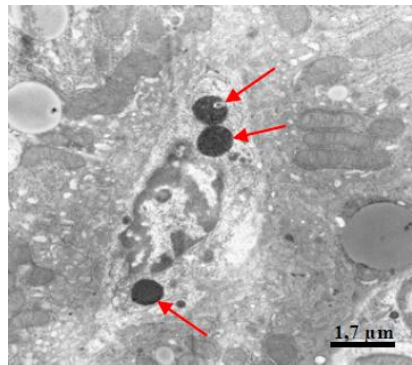
### 2.1.2 Ciblage des xénogreffes par des nanoparticules faiblement vectorisées

Un premier essai de ciblage *in vivo* a été réalisé chez des souris porteuses de xénogreffe sous-cutanée ( $5 \cdot 10^6$  cellules de la lignée INR1-G9-RCCK2 surexprimant le RCCK2 ou de la lignée INR1-G9 ne surexprimant pas ce récepteur) (Sanchez et coll, 2014). Une suspension de nanoparticules vectorisées a été injectée au niveau de la veine jugulaire, et les souris sacrifiées 24 heures après.

Une faible quantité de nanoparticules s'était accumulée au niveau des tumeurs xénogreffées, d'après la visualisation de quelques zones positives à la coloration de Perls (figure 21 a) sur les coupes histologique et l'évaluation d'une quantité de fer de  $4 \text{ ng}/\mu\text{g}$  de protéines déterminée par colorimétrie après coloration de Perls. Aucune différence significative n'était présente entre les tumeurs de cellules INR1-G9-RCCK2 et de cellules INR1-G9 (figure 21 c). Une accumulation par effet EPR (« enhanced permeability and retention effect »), et non spécifique, avait donc été suspectée. Par ailleurs, la quantité importante de nanoparticules dans le foie et la rate indiquaient une intervention importante des macrophages du système SPM. Il apparaissait alors nécessaire d'améliorer à la fois la furtivité et la force de ciblage des nanoparticules. Le nombre de peptides de minigastrine à la surface des nanoparticules a donc été nettement augmenté pour l'étude réalisée ici. Une synthèse des résultats préliminaires obtenus est présentée dans la figure 21 ci-dessous.



(b)



(c)

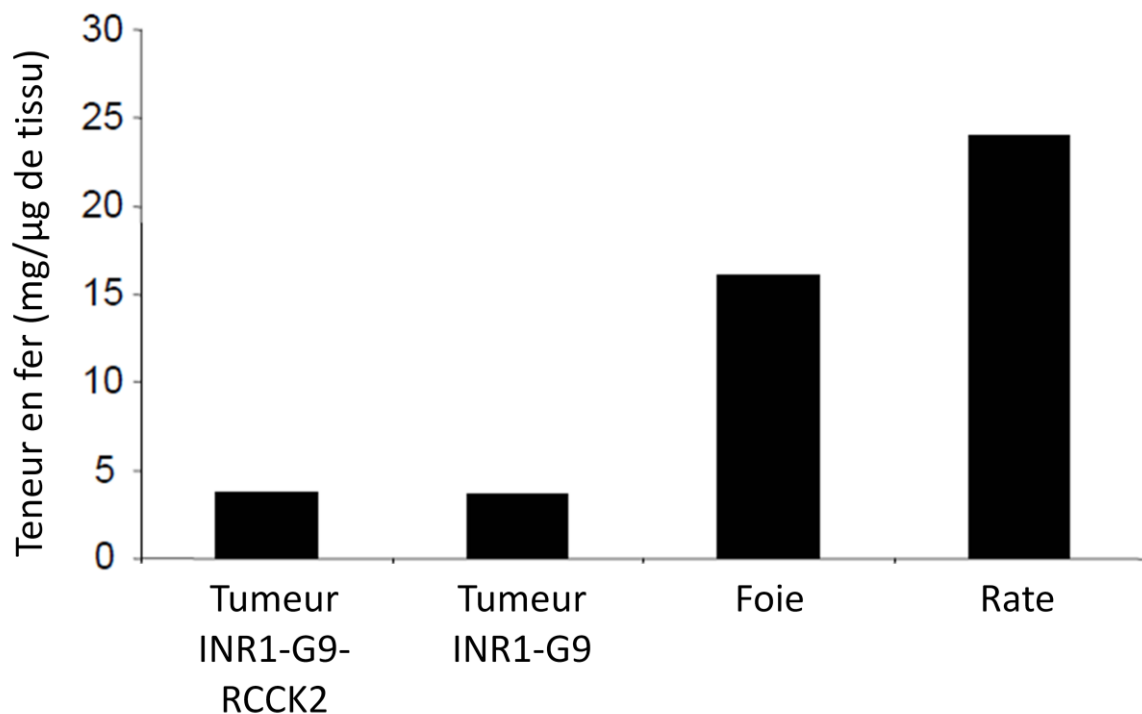


Figure 21 : Ciblage *in vivo* par des nanoparticules faiblement vectorisées

- Coloration de Perls sur des coupes de tumeurs et de foie de souris ayant reçu des nanoparticules vectorisées. Une coloration bleue indique la présence d'oxyde de fer.
- Image d'une cellule de Kupffer ayant internalisé des nanoparticules en microscopie électronique à transmission
- Détermination du contenu en fer de la tumeur et des organes d'intérêt par dosage colorimétrique après coloration de Perls

## **2.2 Etude du ciblage de xénogreffes intra-pancréatique ou sous-cutanée de glucagonome de hamster par des nanoparticules vectorisées chez la souris swiss nude**

La capacité des nanoparticules d'oxyde de fer vectorisées par la minigastrine à cibler les cellules tumorales de glucagonome de hamster surexprimant le récepteur RCK2 a été évaluée *in vivo* chez des souris swiss nude.

### **2.2.1 Réalisation des xénogreffes**

Des xénogreffes de cellules INR1-G9-RCK2 ( $5.10^6$  cellules par greffe, dans 50  $\mu$ L de PBS) ont été réalisées par voie sous-cutanée et intra-pancréatique chez des souris swiss nude et NMRI nude. Les procédures chirurgicales ont été bien tolérées et l'état clinique général des souris est resté bon pendant le développement des tumeurs. Parmi les 48 souris incluses dans cette étude, les xénogreffes ont conduit à l'apparition d'une tumeur de taille exploitable chez 47 animaux (soit une réussite de 98%), après une durée variable de deux à quatre semaines. Contrairement à ce qui était attendu, le développement des tumeurs sous-cutanées s'est révélé plus rapide que celui des tumeurs intra-pancréatiques. Le volume des tumeurs sous-cutanées était d'environ 150 mm<sup>3</sup> après 2 à 4 semaines de croissance tumorale. Une hypertrophie marquée des nœuds lymphatiques axillaires accessoires et/ou sub-iliaques est apparue environ 3 semaines après la chirurgie chez plusieurs souris ayant subi une xénogreffe intra-pancréatique. Elle est compatible en première intention avec une lymphadénopathie réactionnelle post-chirurgicale. Il ne s'agit en effet pas des nœuds lymphatiques drainant la zone abdominale contenant la tumeur.

Le centre de l'ensemble des tumeurs sous-cutanées et intra-pancréatiques apparaît macroscopiquement nettement hémorragique et nécrotique. Au fort grossissement, on visualise sur les coupes histologiques colorées à l'hémalun-éosine de très nombreuses images de mitose et des cellules à noyau anormal (figure 22, ci-dessous). Ces observations, de même que la croissance tumorale explosive chez les souris, indiquent qu'il s'agit de tumeurs particulièrement agressives.

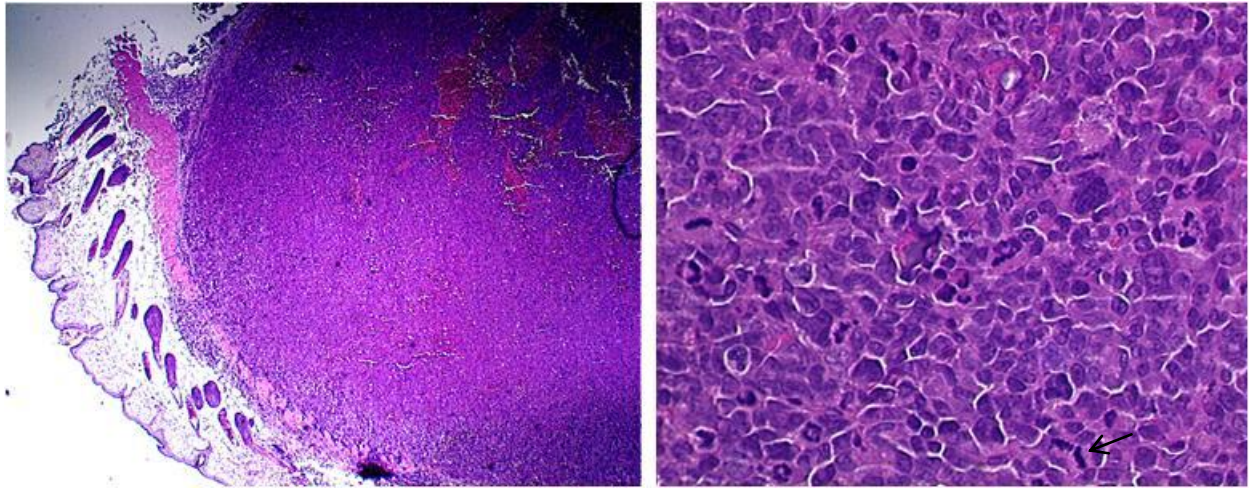


Figure 22 : Coloration à l'hémalum-éosine d'une tumeur sous-cutanée

Le centre de la tumeur (en haut à droite de l'image de gauche) apparaît nettement hémorragique et nécrotique. A plus fort grossissement (à droite), de nombreuses images de mitose sont visibles (flèche), traduisant le caractère très agressif de la tumeur.

Certaines tumeurs intra-pancréatiques sont macroscopiquement adhérentes à la rate, probablement du fait de la péritonite secondaire au développement tumoral. L'étude histologique montre un cordon de tissu conjonctif entre la tumeur et la rate, comme on peut le voir sur la figure 23, ci-dessous.

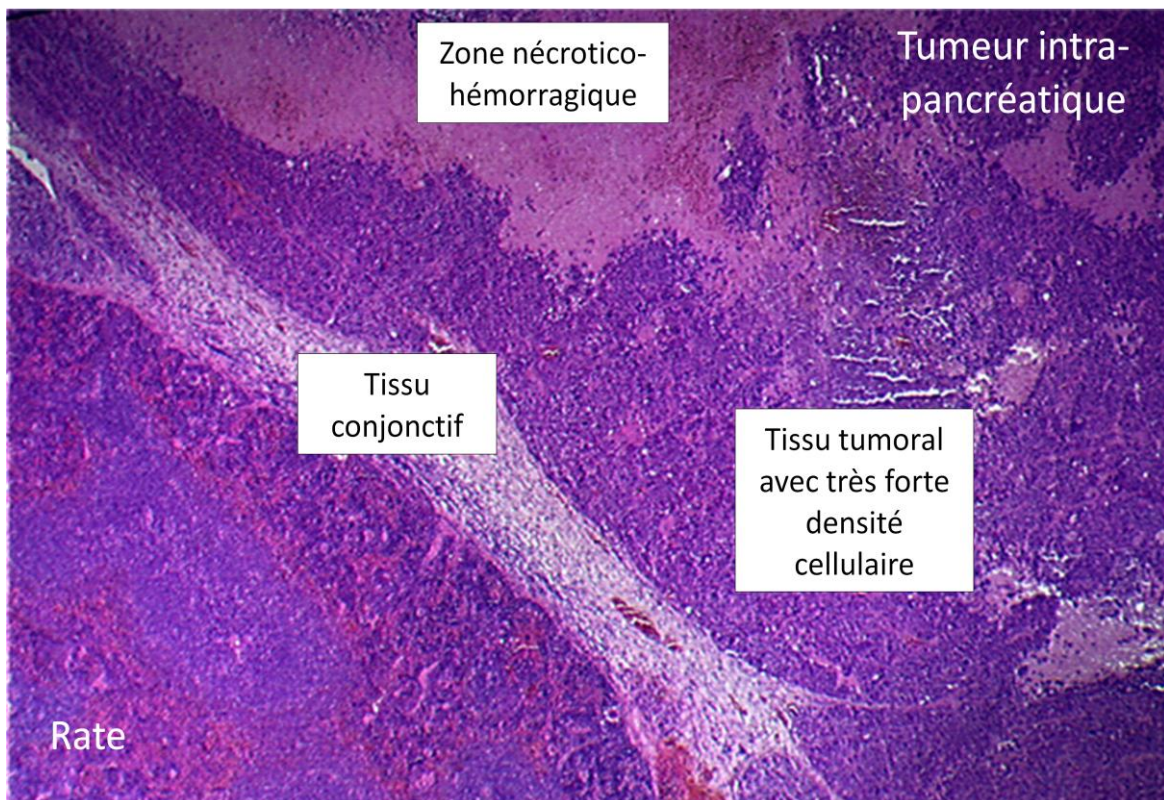


Figure 23 : Coloration à l'hémalum-éosine d'une tumeur intra-pancréatique adhérente à la rate

Des nodules de très petite taille et de couleur blanche, compatibles avec des métastases, ont été mis en évidence au niveau du foie et de la rate de certaines souris. Une analyse histopathologique complémentaire devra être réalisée sur ces organes, ainsi que sur les poumons (autre lieu possible de métastases) et l'estomac (infiltration possible).

### 2.2.2 Etude du ciblage tumoral par les nanoparticules vectorisées

Des nanoparticules, vectorisées ou non (50 µg de fer dans 150 µL de PBS), ont été injectées au niveau de la veine jugulaire de souris swiss nude et NMRI nude porteuses de xénogreffes intra-pancréatiques ou sous-cutanées de cellules de glucagonome de hamster. Les souris contrôle ont reçu une injection de 150 µL de PBS réalisée dans des conditions identiques. 2 lots successifs ont été constitués, chacun comportant plusieurs groupes, comme indiqué dans le tableau 5 ci-dessous. Ces deux lots ont subi la même procédure.

Lot 1

N° de groupe	Xénogreffe	Injection
Groupe 1, n=1	Intra-pancréatique (IP)	PBS
Groupe 2, n=5	IP	Nanoparticules vectorisées (NPv)
Groupe 3, n=2	Sous-cutanée (SC)	PBS
Groupe 4, n=4	SC	NPv

Lot 2

N° de groupe	Xénogreffe	Injection
Groupe 1, n=3	IP	PBS
Groupe 2, n=3	IP	Nanoparticules (NP)
Groupe 3, n=3	IP	NPv

Tableau 5 : Répartition des souris pour l'étude de la biodistribution

Des images en fluorescence des souris ont été acquises 24 heures après injection des nanoparticules.

En outre, les animaux ont été sacrifiés 24 heures après injection et les organes d'intérêt ont été prélevés selon le protocole RITA (Ruehl-Fehlert et coll., 2003). 7 prélèvements ont

ainsi été réalisés : la tumeur (et les éventuelles métastases), le foie, la rate, les reins, les poumons, le cerveau et l'estomac. Le foie et la rate ont été sélectionnés du fait de leur appartenance au système RES, où s'accumulent les nanoparticules non vectorisées de type SPION après avoir été opsonisées par des macrophages. Les reins ont été choisis car une élimination par voie urinaire des nanoparticules d'oxyde de fer est décrite. Le cerveau et l'estomac expriment le RCK2 ; une liaison spécifique des nanoparticules vectorisées y est donc possible, à condition pour le cerveau que ces dernières soient capables de traverser la barrière hémato-méningée. Les poumons ont enfin été choisis dans l'hypothèse de métastases au niveau de cet organe.

Les organes prélevés ont subi une nouvelle acquisition d'image en fluorescence à l'aide du système IVIS Spectrum avant d'être préparés pour la réalisation de coupes histologiques.

Les coupes d'organes prélevés chez les souris ayant reçu une injection de nanoparticules ne présentent aucune modification histologique pouvant indiquer une toxicité immédiate 24 heures après injection par rapport aux souris ayant reçu du PBS.

#### ***2.2.2.1 Détection de la présence d'oxyde de fer dans les organes***

La présence de nanoparticules vectorisées ou non vectorisées injectées chez une souris porteuse d'une xénogreffe intra-pancréatique ou sous-cutanée a été mise en évidence dans la tumeur et les organes d'intérêt par la réaction de Perls sur des coupes d'organes fixés au formol. Cette réaction permet de colorer en bleu les ions ferriques.

La réaction de Perls indique la présence d'oxyde de fer, en quantité variable, dans l'ensemble des tumeurs intra-pancréatiques. Les zones positives semblent correspondre à des cordons de tissu conjonctif, et se situent souvent à la jonction entre le tissu tumoral et le pancréas sain. Des images représentatives sont présentées dans la figure 24.

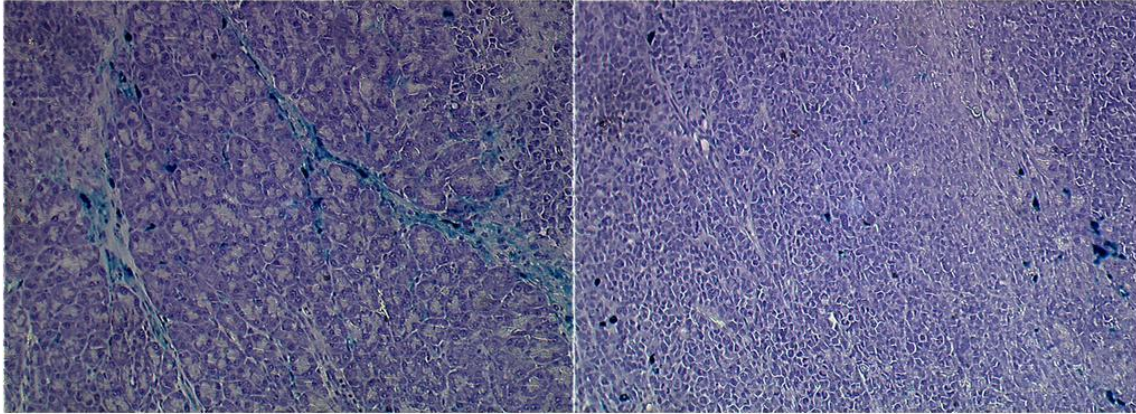


Figure 24 : Réaction de Perls positive de 2 tumeurs intra-pancréatiques

Aucun marquage significatif n'est présent au niveau du foie des souris ayant reçu des nanoparticules. La réaction de Perls est positive pour l'ensemble des rates, qu'elles proviennent de souris témoins ou de souris ayant reçu des nanoparticules. Ceci peut s'expliquer par le fait que la rate est le lieu de dégradation des globules rouges en fin de vie ; l'hémosidérine, la forme oxydée de l'hémoglobine, est donc responsable de la coloration bleue. Ces observations indiquent que les nanoparticules MG-IONP-DY647 sont furtives par rapport au système des phagocytes mono-nucléés.

De rares dépôts granuleux positifs à la réaction de Perls sont visibles au niveau des certaines coupes de rein et de poumon de souris traitées aux nanoparticules vectorisées (figure 25). Ceci n'apparaît chez aucune souris contrôle. Aucun marquage n'est détectable au niveau de l'estomac et du cerveau, que ce soit pour les souris contrôles ou celles ayant reçu des nanoparticules.

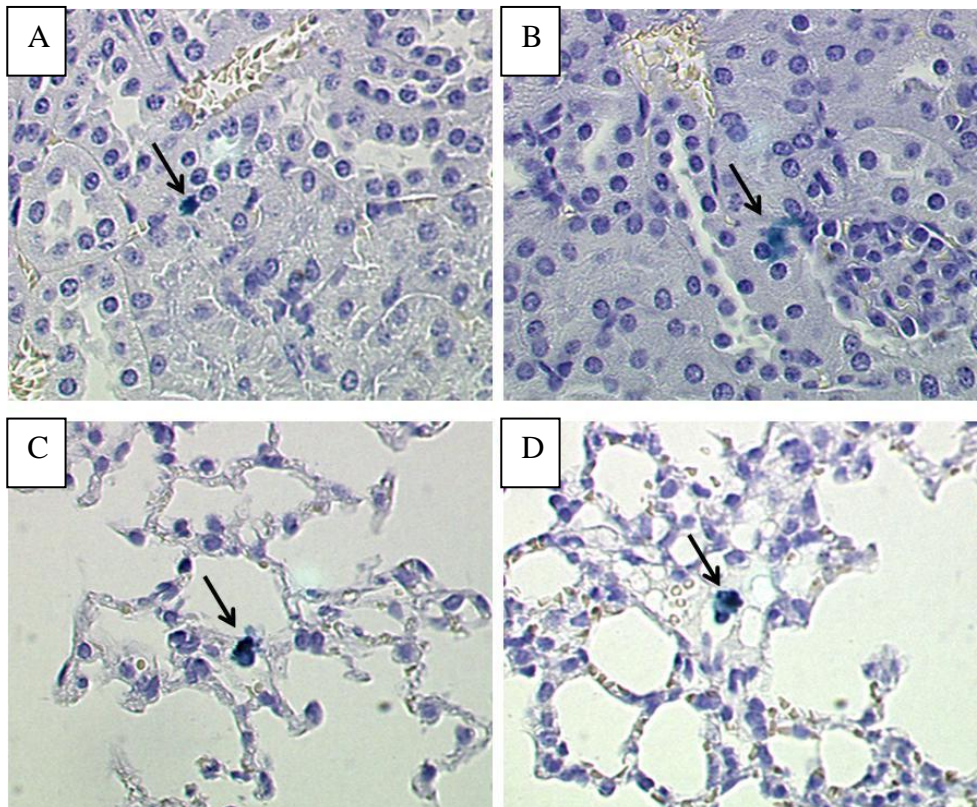


Figure 25 : Réaction de Perls positive du rein (A, B) et du poumon (C, D) de souris traitées aux nanoparticules

Des colorations sur plusieurs coupes espacées des organes devront être réalisées, afin de mieux apprécier la biodistribution tissulaire des nanoparticules.

#### ***2.2.2.2 Détection de la fluorescence des nanoparticules***

Un exemple d'image obtenue par épi-fluorescence pour une souris entière et *ex vivo* après dissection est fourni dans la figure 26 ci-après. La fluorescence apparaît au niveau des yeux et dans une région correspondant au foie lors de l'imagerie de la souris entière. Une fluorescence d'intensité décroissante est notée au niveau du foie, de l'estomac, de la rate, des reins et de la tumeur.



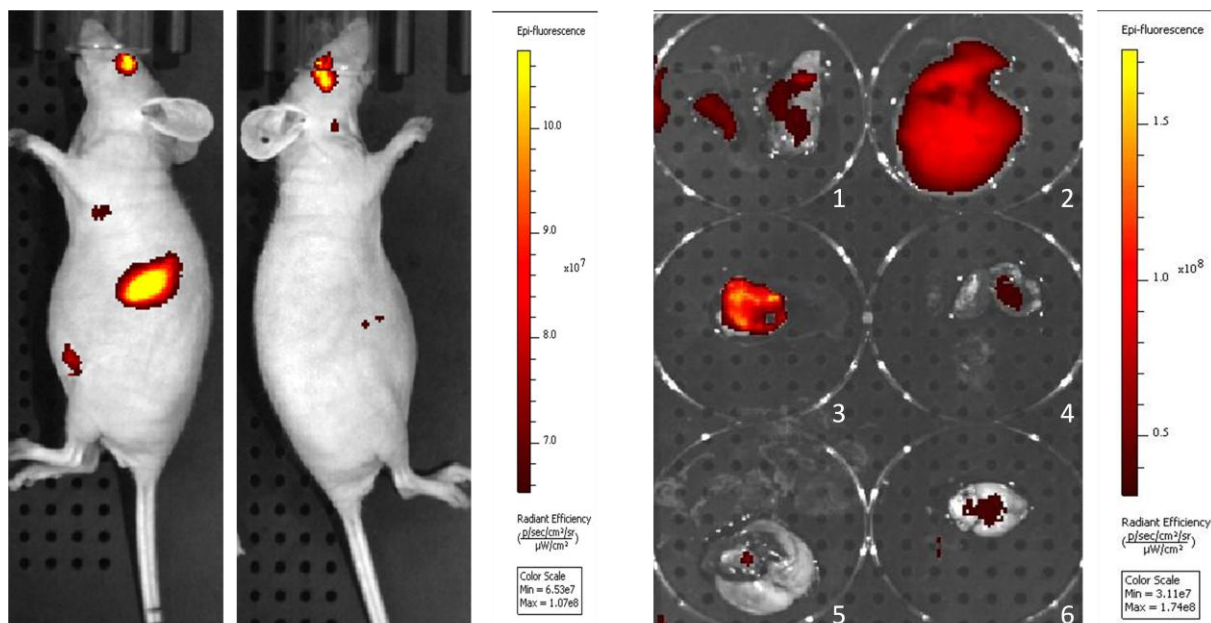


Figure 26 : Images en épi-fluorescence *in vivo* d'une souris porteuse d'une xénogreffe intra-pancréatique 24h après injection des nanoparticules vectorisées (à gauche) et *ex vivo* des organes après dissection (à droite) (1 : rate à gauche et tumeur intra-pancréatique à droite ; 2 : foie ; 3 : estomac ; 4 : reins ; 5 : poumons et cœur ; 6 : cerveau)

Une fluorescence d'intensité importante au niveau du foie et de l'estomac et d'intensité moyenne au niveau des reins est détectée chez l'ensemble des souris du premier lot. Aucune différence significative d'intensité de fluorescence n'existe entre les souris contrôles et les souris ayant reçu une injection de nanoparticules.

Ceci suggère une auto-fluorescence de ces trois organes. Une fluorescence parasite induite par l'alimentation a été confirmée lors de l'étude du second lot : le niveau de fluorescence diminue nettement après lavage de l'estomac au sérum physiologique. Le maximum d'intensité de fluorescence au niveau du foie est localisé dans une zone correspondant à la vésicule biliaire, suggérant une auto-fluorescence de la bile. Ceci a également été confirmé, avec une nette diminution de l'intensité de fluorescence lors de la réalisation de clichés après ablation de la vésicule biliaire. Une auto-fluorescence de l'urine est également suspectée.

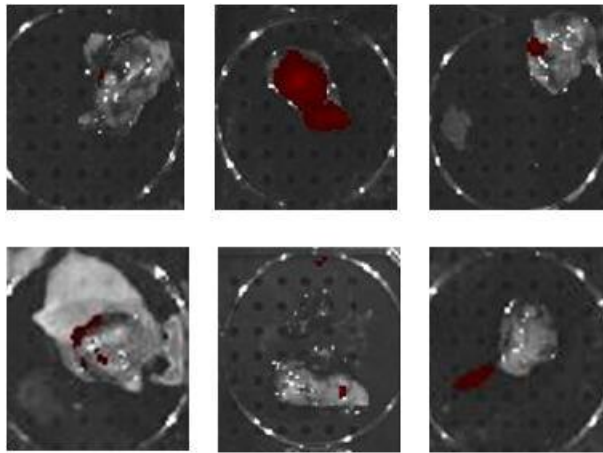
## **Détection des nanoparticules dans les tumeurs sous-cutanées**

Aucune différence de fluorescence n'est visualisable pour les tumeurs sous-cutanées entre les souris contrôles négatifs et celles ayant reçu des nanoparticules vectorisées.

## **Détection des nanoparticules dans les tumeurs intra-pancréatiques**

La figure 27 présente les résultats obtenus en épi-fluorescence pour les 2 lots de souris porteuses d'une xénogreffe intra-pancréatique. L'injection de PBS ou de nanoparticules a été réalisée par voie intraveineuse pour l'ensemble des souris. Pour les histogrammes, la fluorescence basale moyenne mesurée au niveau des organes des souris contrôles (injection de PBS) a été soustraite pour chaque point de mesure. En cas d'obtention d'un résultat négatif, la valeur 0 a été appliquée au point de mesure avant de réaliser la moyenne pour les différents animaux de chaque groupe.

(a)



(b)

Niveau moyen de fluorescence des organes d'intérêt des souris porteuses d'une xénogreffe SC (à gauche) ou IP (à droite) ayant reçu des nanoparticules vectorisées (lot 1)

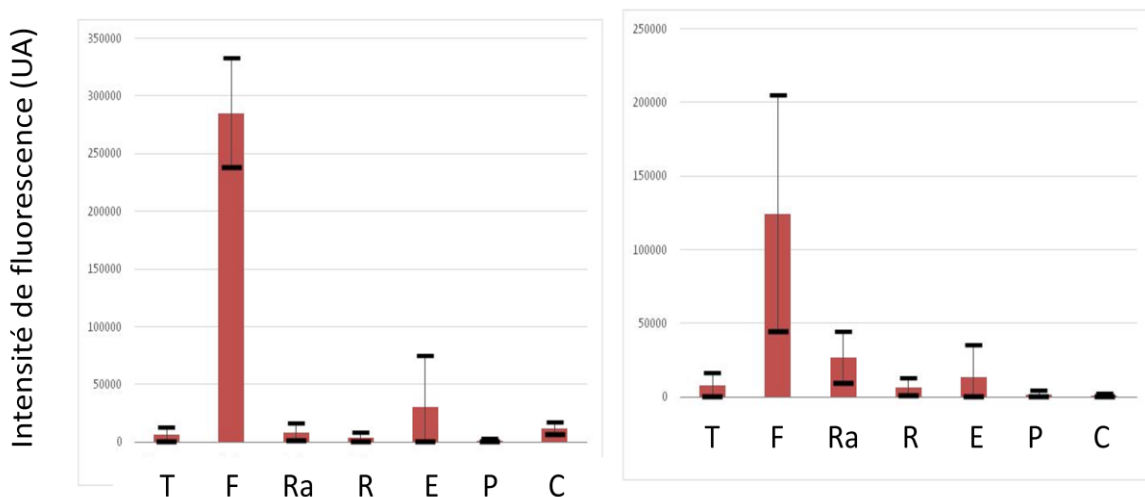
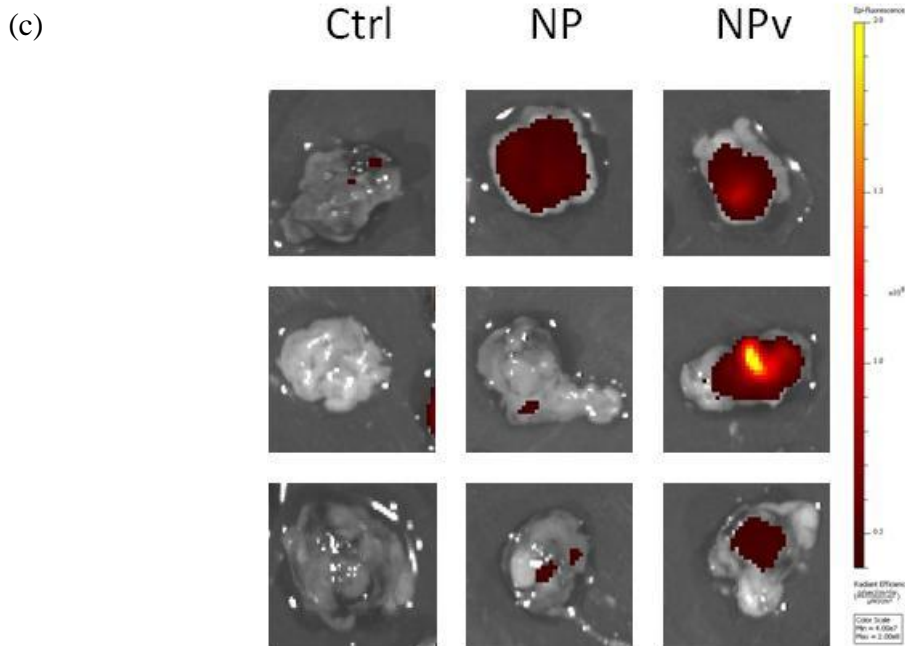


Figure 27 : Epi-fluorescence ex vivo des tumeurs intra-pancréatiques et des organes d'intérêt (a) Tumeurs des 6 souris du 1er lot. La tumeur contrôle se trouve en haut à gauche. (b) Intensité de fluorescence des tumeurs et des organes d'intérêt (T : tumeur, F : foie, Ra : rate, R : rein, E : estomac, P : poumon, C : cerveau)



(d)

Niveau moyen de fluorescence des organes d'intérêt des souris porteuses d'une xénogreffe IP ayant reçu des nanoparticules vectorisées ou non (lot 2)

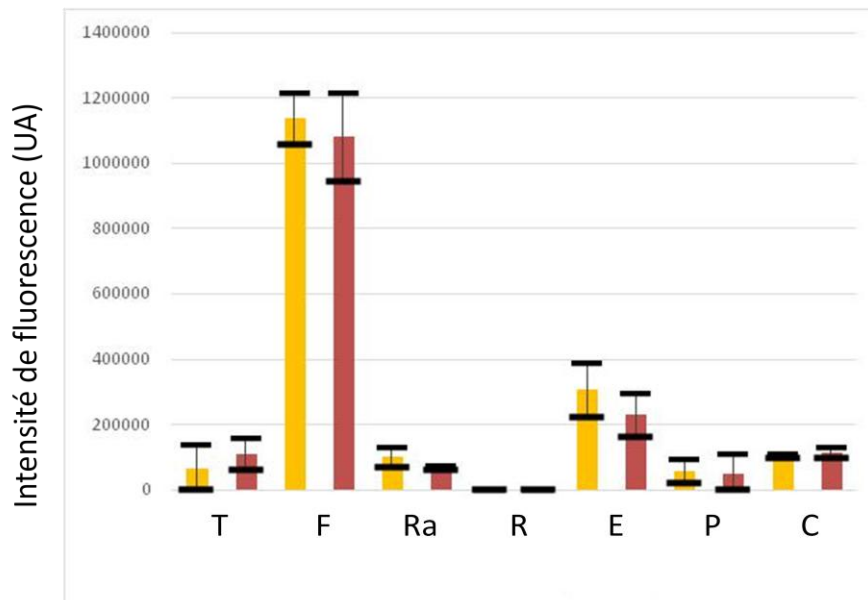


Figure 27 : Epi-fluorescence *ex vivo* des tumeurs intra-pancréatiques et des organes d'intérêt

(c) Tumeurs des 9 souris du 2ème lot

(d) Intensité de fluorescence des tumeurs et des organes d'intérêt (En rouge les nanoparticules vectorisées et en orange les nanoparticules non vectorisées ; T : tumeur, F : foie, Ra : rate, R : rein, E : estomac, P : poumon, C : cerveau)

Aucune fluorescence n'est visible au niveau de la tumeur intra-pancréatique des 4 souris ayant reçu une injection de PBS (souris du groupe 1 du lot 1 et souris du groupe 1 du lot 2, cf. tableau 4). La spécificité de la détection des nanoparticules en épi-fluorescence est donc satisfaisante.

Les 3 souris ayant reçu des nanoparticules non vectorisées (groupe 2 du lot 2, cf. tableau 4) montrent un marquage positif en épi-fluorescence. Les nanoparticules non vectorisées sont donc en mesure d'atteindre la tumeur, possiblement par effet EPR. L'intensité de fluorescence des tumeurs est quantitativement comparable à celle de la rate.

7 souris sur les 8 ayant reçu des nanoparticules vectorisées (4 souris sur 5 du groupe 2 du lot 1 et 3 souris sur 3 du groupe 3 du lot 2, respectivement, cf. tableau 4) montrent un marquage positif en épi-fluorescence. La sensibilité de la détection des nanoparticules en épi-fluorescence est donc également satisfaisante. L'intensité de fluorescence des tumeurs des souris traitées aux nanoparticules vectorisées est supérieure à celle des tumeurs de souris traitées aux nanoparticules non vectorisées. Ce résultat n'est pas statistiquement significatif ( $p > 0.05$ ), probablement du fait du faible nombre de souris incluses dans l'étude.

Qu'elles soient ou non vectorisées, les nanoparticules s'accumulent au niveau du foie de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ , test de Student entre les différents organes). Ce résultat était attendu pour les nanoparticules non vectorisées, puisque les nanoparticules utilisées sont connues pour être captées par les macrophages du système SPM. Ceci indique également que la furtivité des nanoparticules vectorisées ou la force du ciblage pourraient encore être améliorés. Dans le second lot, les nanoparticules vectorisées semblent s'accumuler au niveau de la tumeur, et moins dans le foie et la rate.

L'épi-fluorescence apparaît donc comme une technique permettant de discriminer les souris ayant reçu des nanoparticules avec une bonne sensibilité et spécificité. Une accumulation des nanoparticules par deux mécanismes est suspectée : effet EPR (expliquant la positivité des tumeurs de souris traitées aux nanoparticules non vectorisées) et ciblage actif (expliquant le renforcement d'intensité de la fluorescence des tumeurs de souris traitées aux nanoparticules vectorisées par rapport aux précédentes).

### 2.2.2.3 Mesure de la relaxométrie

Des mesures magnétiques ont été réalisées sur des échantillons de tumeurs et de foie afin de mettre en évidence les nanoparticules de manière sensible et spécifique. Les résultats sont présentés dans la figure 28 ci-après.

Les résultats pour les tumeurs intra-pancréatiques (groupes 1 et 2 du lot 1 ; groupes 1, 2 et 3 du lot 2) sont les suivants.

Un magnétisme a été détecté au niveau de la tumeur chez 2 souris sur les 4 ayant reçu une injection de PBS (2 souris du groupe 1 du lot 2). De même, le foie d'une souris ayant reçu une injection de PBS présente un magnétisme significatif (1 souris du groupe 1 du lot 2).

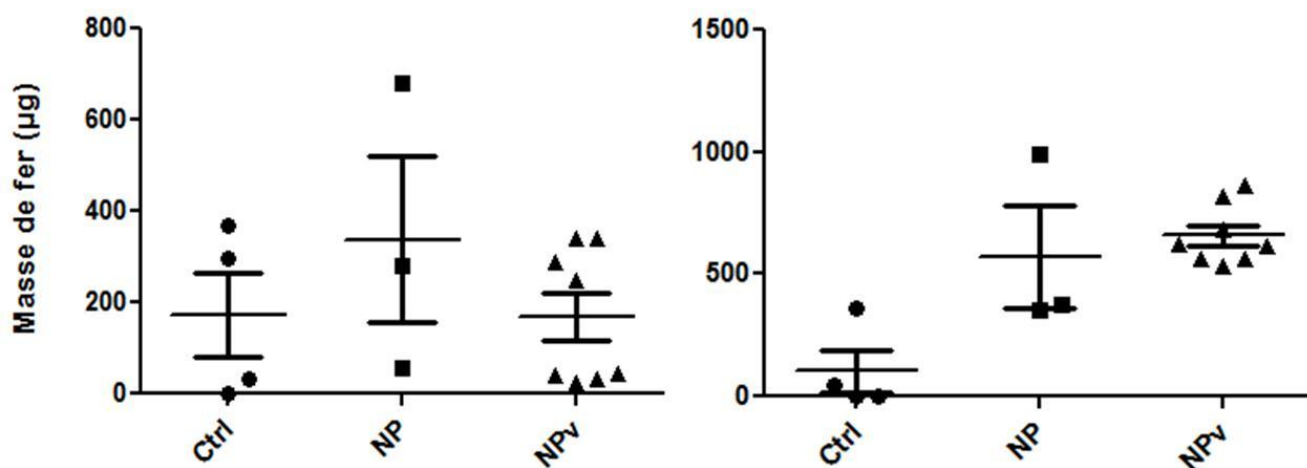
Un magnétisme a été détecté au niveau de la tumeur chez 4 souris sur les 8 ayant reçu des nanoparticules vectorisées (3 souris du groupe 2 du lot 1 et 1 souris du groupe 3 du lot 2). Le foie de toutes les souris ayant reçu des nanoparticules vectorisées (8 au total, 5 souris du groupe 2 du lot 1 et 3 souris du groupe 3 du lot 2) présente un magnétisme positif.

Un magnétisme a été détecté au niveau de la tumeur chez 2 souris sur les 3 ayant reçu des nanoparticules non vectorisées (groupe 2 du lot 3) et au niveau du foie chez les 3 souris de ce même groupe.

Pour les tumeurs sous-cutanées, les deux souris contrôles (groupe 3 du lot 1) ne présentent pas de magnétisme significatif. Soixante-quinze pourcents (3/4) des souris ayant reçu des nanoparticules vectorisées présentent un résultat positif.

(a)

Teneur en nanoparticules des tumeurs (à gauche) et du foie (à droite) des souris ayant reçu une xénogreffe IP



(b)

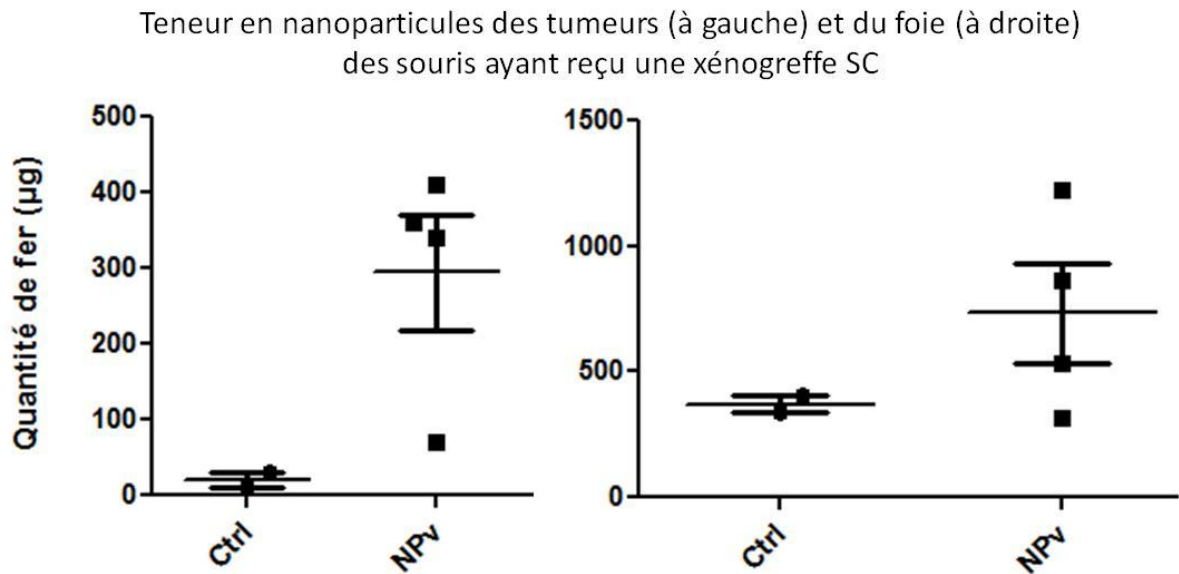


Figure 28 : Mesures magnétiques pour la tumeur et le foie

- Teneur en nanoparticules des tumeurs (à gauche) et du foie (à droite) des souris ayant reçu une xéno greffe intra-pancréatique
- Teneur en nanoparticules des tumeurs (à gauche) et du foie (à droite) des souris ayant reçu une xéno greffe sous-cutanée

La comparaison de la teneur en magnétisme des tumeurs intra-pancréatiques ne montre pas de différence significative entre les trois traitements, probablement du fait de la forte hétérogénéité des résultats obtenus dans chaque groupe. De nouvelles mesures des échantillons de tumeurs de souris traitées aux nanoparticules ayant donné un résultat négatif en magnétisme seront à réaliser, afin de s'assurer qu'il ne s'agisse pas de faux-négatifs (l'échantillon utilisé pour la mesure étant de très petite taille, ce risque est non négligeable).

Une différence significative de magnétisme au niveau du foie existe entre les souris contrôles d'une part, et les souris ayant reçu des nanoparticules (vectorisées ou non) d'autre part ( $p=0.03$  pour la comparaison PBS – NP et  $p=3.7*10^{-5}$  pour PBS – NPv). La mesure du magnétisme au niveau du foie permet donc de discriminer les souris ayant reçu des nanoparticules.

#### 2.2.2.4 Comparaison des différentes méthodes de détection

Les figures 29 et 30 ci-après permettent de comparer les résultats de la détection des nanoparticules dans les tumeurs et le foie par fluorescence et magnétisme.

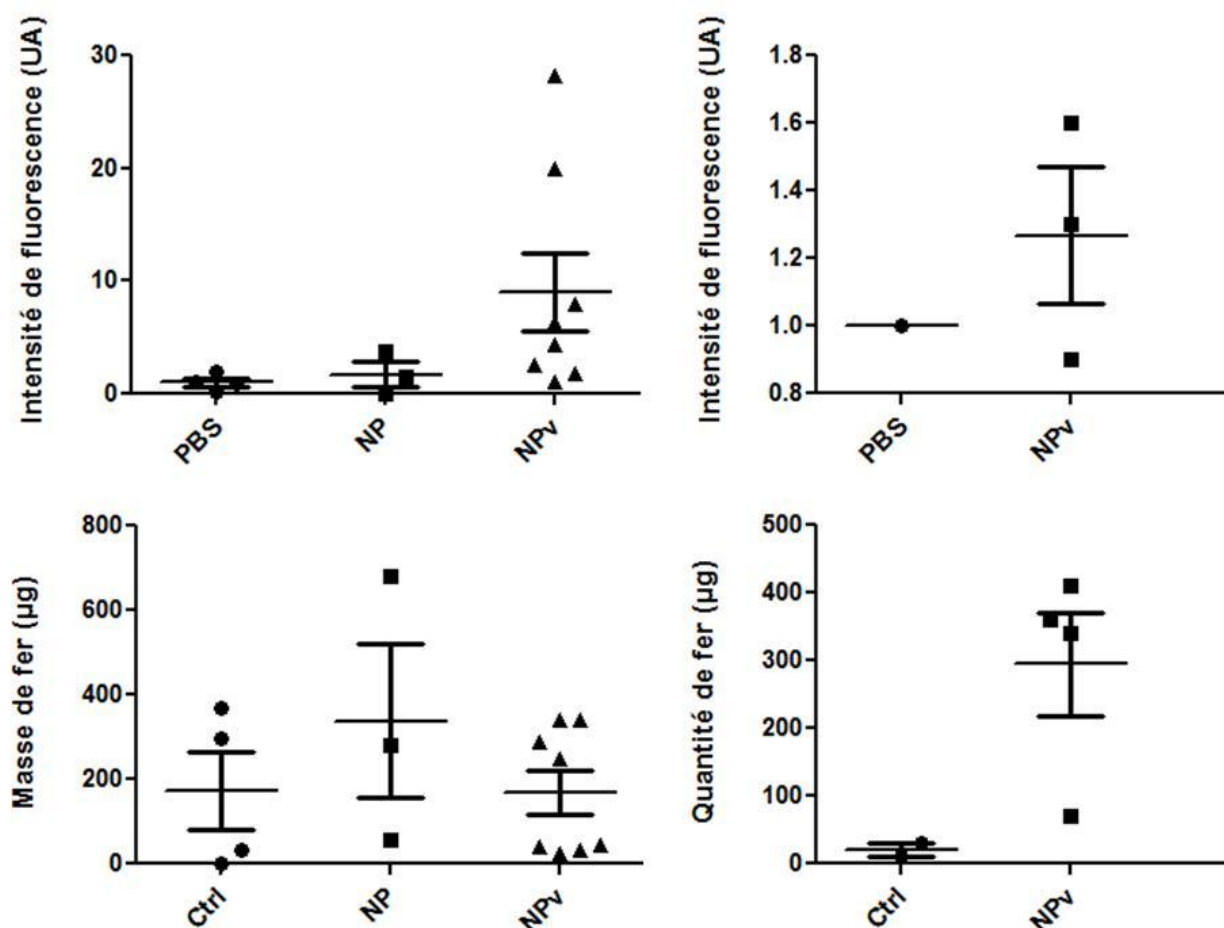


Figure 29 : Comparaison des méthodes de détection des nanoparticules dans les tumeurs  
En haut : détection par fluorescence, en bas : détection par mesures magnétiques  
A gauche : tumeurs intra-pancréatiques, à droite : tumeurs sous-cutanées

Les résultats obtenus par détection de la fluorescence et mesures magnétiques concordent pour 8 souris sur 15 ayant reçu une xéno greffe intra-pancréatique et 2 souris sur 6 ayant reçu une xéno greffe sous-cutanée. Les résultats concordent donc dans 47,6% des cas ; 33% des souris ayant reçu du PBS, 50% des souris ayant reçu des nanoparticules vectorisées et 66% des souris ayant reçu des nanoparticules non vectorisées.

Les deux méthodes permettent une bonne discrimination des deux groupes pour les tumeurs sous-cutanées. Pour les tumeurs intra-pancréatiques, la fluorescence permet une meilleure discrimination des trois groupes que les mesures magnétiques. Ce résultat peut



s'expliquer par le manque de représentativité de l'échantillon soumis aux mesures VSM, en raison de sa petite taille.

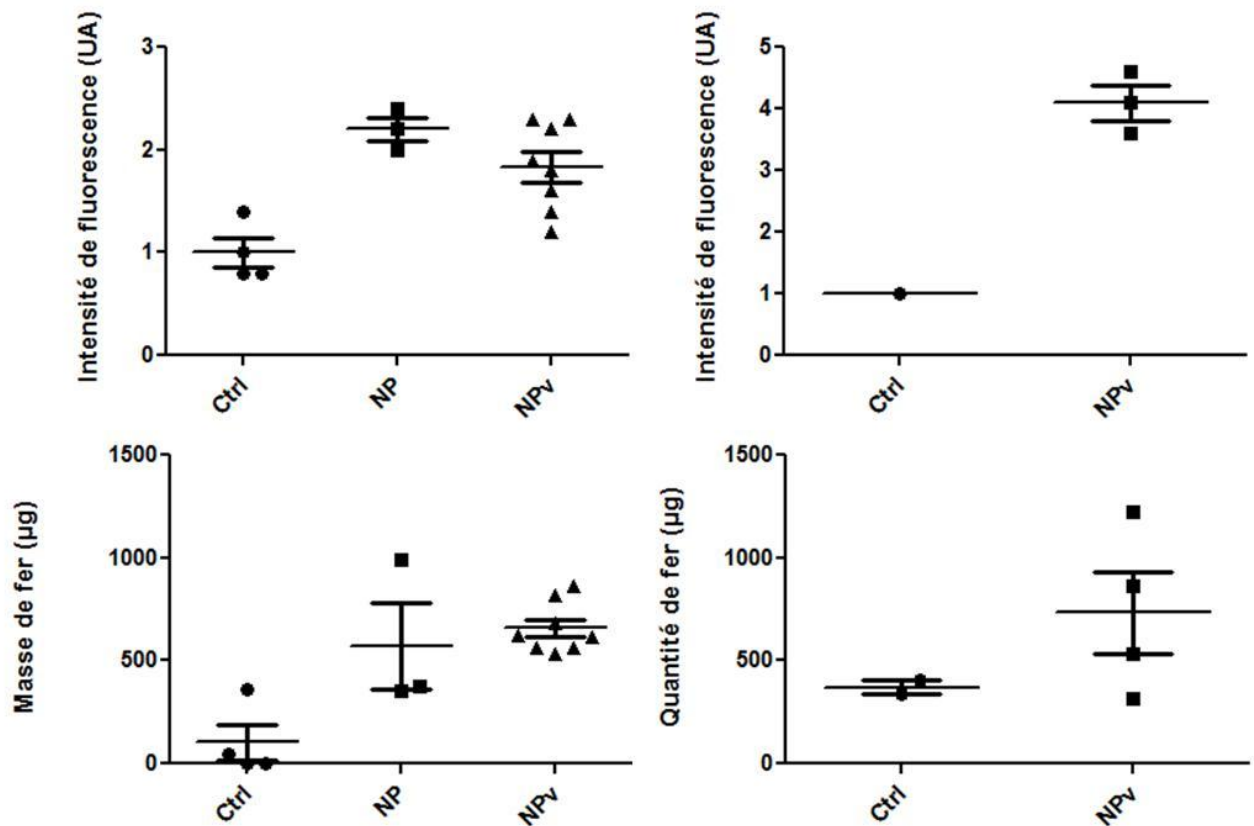


Figure 30 : Comparaison des méthodes de détection des nanoparticules dans le foie

Les souris ayant reçu une injection de PBS et celles ayant reçu des nanoparticules sont discriminées de façon équivalente par la détection en épi-fluorescence et les mesures magnétiques réalisées au niveau du foie.

### 2.3 Etude de la régression tumorale suite à l'application d'un champ magnétique alternatif à des souris porteuses d'une xénogreffe intra-pancréatique après administration intraveineuse de nanoparticules vectorisées

Dans un second temps, la régression tumorale après application d'un champ magnétique alternatif a été évaluée *in vivo*, chez des souris porteuses de xénogreffes intra-pancréatiques. 2 lots successifs ont été constitués. Les différents groupes de chaque lot sont présentés dans les tableaux 6 a (lot 1) et b (lot 2) ci-dessous :

(a) Lot 1

N° de groupe	Injection réalisée		Traitement post-injection
Groupe 1, n=3	IV	PBS	Champ magnétique alternatif
Groupe 2, n=3	IT	NPv	Champ magnétique alternatif
Groupe 3, n=3	IV	NPv	Champ magnétique alternatif

(b) Lot 2

N° de groupe	Injection réalisée		Traitement post-injection
Groupe 1, n=3	IV	PBS	-
Groupe 2, n=3	IV	PBS	Champ magnétique alternatif
Groupe 3, n=3	IV	NP	-
Groupe 4, n=3	IV	NP	Champ magnétique alternatif
Groupe 5, n=3	IV	NPv	-
Groupe 6, n=3	IV	NPv	Champ magnétique alternatif

Tableau 6 : Répartition des souris pour l'essai de régression tumorale

Les injections intraveineuses ont été réalisées au niveau de la veine jugulaire, comme décrit précédemment. (NP : nanoparticules non vectorisées, NPv : nanoparticules vectorisées ; IV : intraveineuse ; IT : intra-tumorale)

. Les souris ont été sacrifiées une semaine après l'application du champ magnétique : les tumeurs ont été prélevées et leur volume a été calculé et comparé au volume prétraitement évalué par palpation abdominale et/ou échographie ; les organes d'intérêt (foie, rate, rein, estomac, cerveau, poumon) ont également été prélevés pour une analyse histologique.

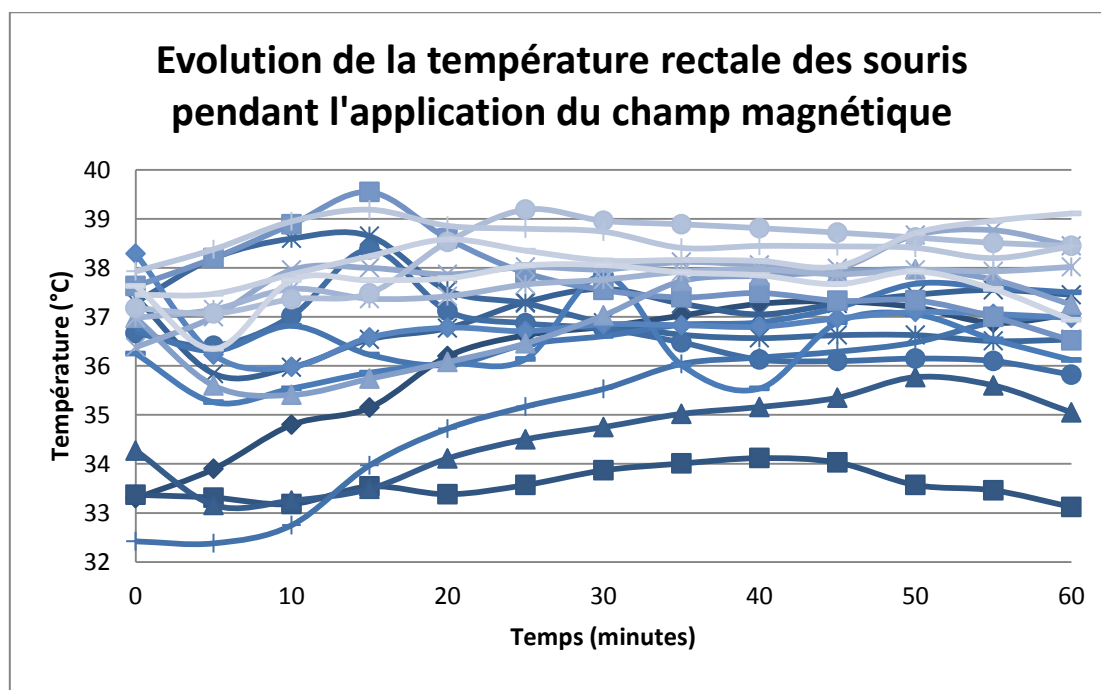
### 2.3.1 Effet du traitement sur l'état général des souris

Aucune modification de l'état général n'a pu être mise en évidence pendant la première semaine suivant l'application du champ magnétique. 2 souris du premier lot (une souris du groupe 1 (injection de PBS en IV et application du champ magnétique) et une souris du groupe 3 (injection de NPv en IV et application du champ magnétique)) ont présenté de l'ascite en quantité importante une semaine après application du champ magnétique.

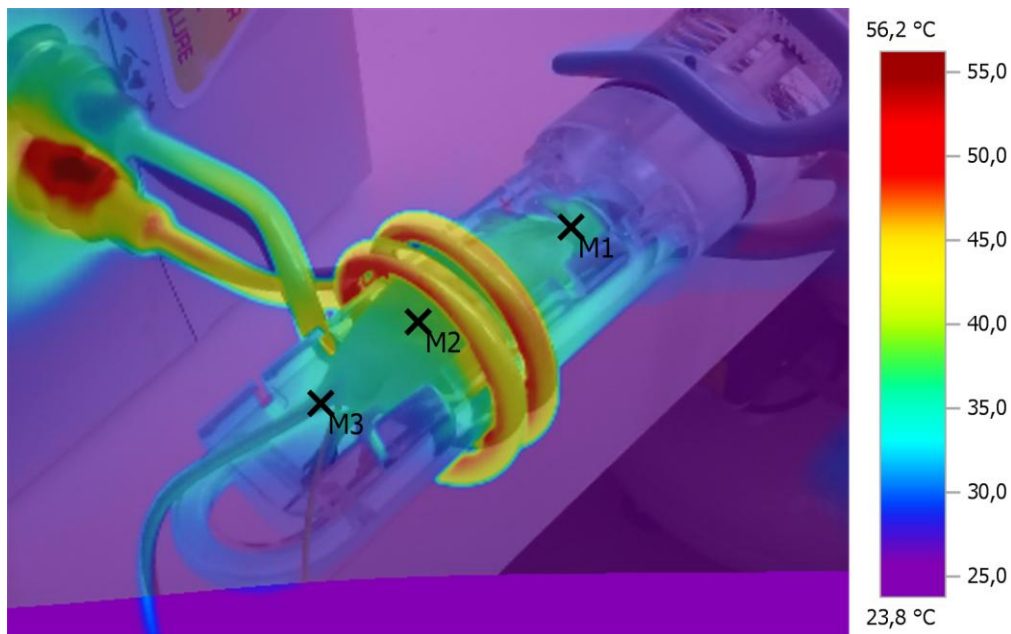
### 2.3.2 Température atteinte lors du traitement au champ magnétique alternatif

La température corporelle des souris est restée dans les valeurs usuelles de l'espèce au cours du traitement, avec des variations importantes entre les individus (entre 33 et 38.7°C). La procédure a été bien supportée par l'ensemble des animaux soumis au champ magnétique. Aucune élévation de température n'a pu être mise en évidence au niveau de la zone abdominale comportant la tumeur par la caméra thermique chez les souris traitées par des nanoparticules, comme chez les souris contrôles. La figure 31 ci-dessous présente une synthèse des valeurs obtenues.

(a)



(b)



Point de mesure	Température (°C)
M1	33.1
M2	34.7
M3	32.1

Figure 31 : Evolution de la température des souris pendant l'application du champ magnétique  
(a) Suivi de la température rectale des 18 souris soumises au champ magnétique (chaque ligne représente une souris)  
(b) Exemple d'image obtenue avec la caméra thermique

### 2.3.3 Effet du traitement sur le volume tumoral

La figure 32 ci-après présente les résultats du traitement sur le volume tumoral.

Pour le lot 1, une différence statistiquement significative de la taille de la tumeur ( $p=0.02$ ) existe entre les souris du groupe 1 (PBS IV, champ magnétique) et celles du groupe 3 (NPv IV, champ magnétique) (figure 32 a). Il semble donc que le ciblage a fonctionné et que les nanoparticules vectorisées sont capables d'induire une régression tumorale. Une tendance à la diminution du volume tumoral après administration de nanoparticules par voie intra-tumorale et traitement au champ magnétique alternatif est notée. L'absence de significativité

statistiquement est probablement liée au faible nombre de souris ainsi qu'à la forte hétérogénéité des volumes tumoraux à l'issue du traitement. Il est possible qu'il y ait eu un biais lors de l'échantillonnage, avec une hétérogénéité des tumeurs au moment du traitement.

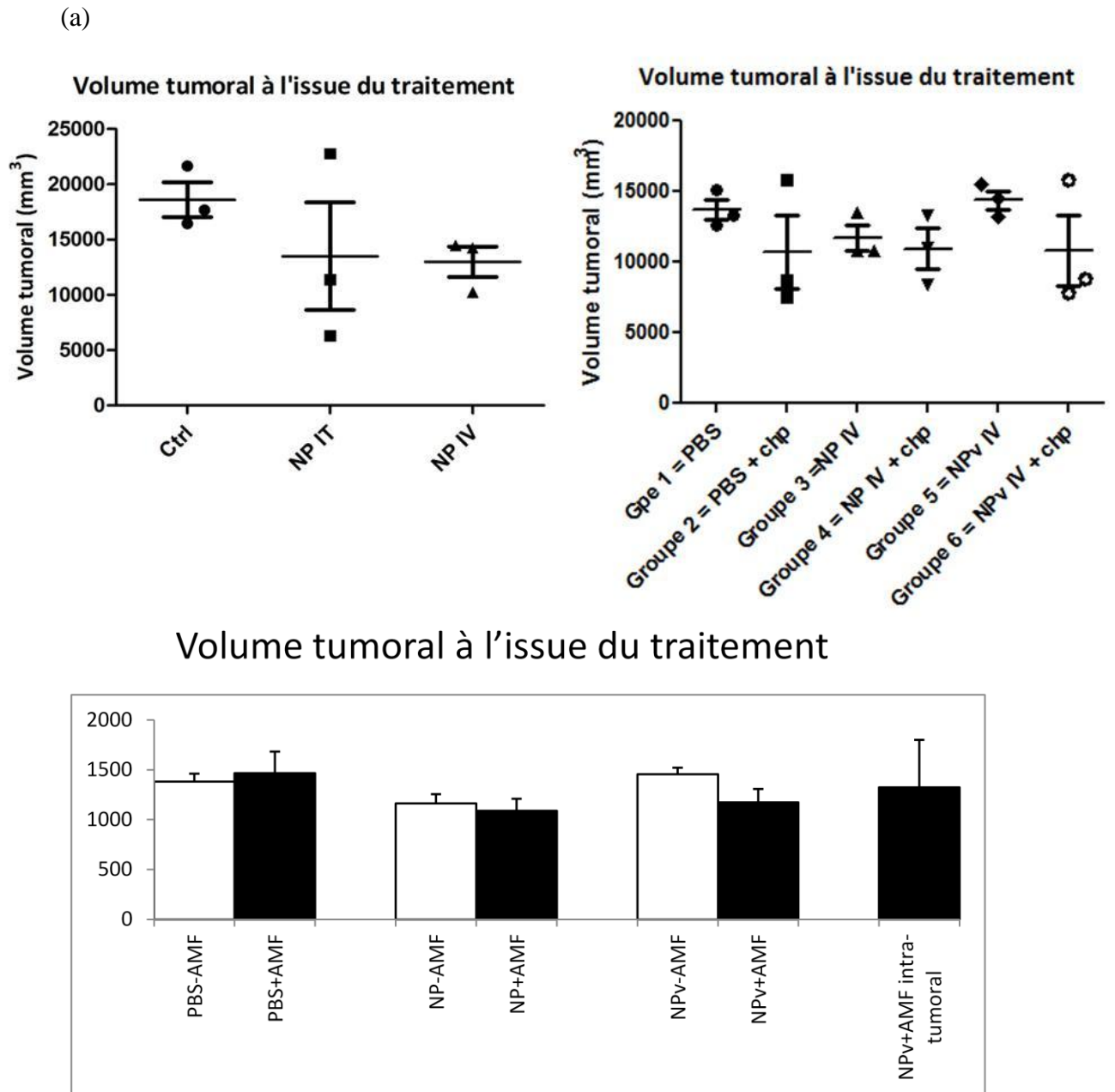
Pour le lot 2, l'hétérogénéité marquée des volumes tumoraux des souris du groupe 2 (PBS, IV, champ magnétique) suggère un biais d'échantillonnage. En effet, les résultats *in vitro* précédemment obtenus dans notre équipe et de nombreuses données bibliographiques *in vivo* indiquent le champ magnétique alternatif n'a pas d'effet sur un organisme non traité aux nanoparticules. Les résultats pour les souris traitées aux nanoparticules sont donc comparés aux résultats des souris du groupe 1 (PBS, IV, absence de champ magnétique) afin d'éviter ce biais.

Les nanoparticules vectorisées n'induisent pas de régression tumorale en l'absence de soumission au champ magnétique, ce qui rejoint les résultats *in vitro*. 2 souris parmi les 3 du groupe 6 (NPv, IV, champ magnétique) présentent des volumes tumoraux plus faibles que les contrôles à l'issue du traitement. Une absence de fonctionnement du ciblage est possible chez la souris n'ayant pas répondu. Les mesures magnétiques sont en cours afin de confirmer/infirmer cette hypothèse.

Le volume tumoral des souris du groupe 3 (NP, IV, absence de champ magnétique) est inférieur à celui des souris du groupe 1 (PBS, IV, absence de champ magnétique), ce qui suggère également un biais d'échantillonnage. Aucune différence significative n'existe entre les souris des groupes 3 (NP, IV, absence de champ magnétique) et 4 (NP, IV, champ magnétique).

En conclusion, les nanoparticules vectorisées administrées par voie intraveineuse ou intra-tumorale semblent être en mesure d'induire une stabilisation de la croissance, voire une régression tumorale.

L'aspect macroscopique des tumeurs s'est également avéré différent entre le groupe contrôle et les deux groupes traités. Les tumeurs des souris contrôles apparaissent plus hémorragiques, nécrotiques, et irrégulières que les tumeurs des souris traitées aux nanoparticules et soumises au champ magnétique. Ces dernières semblent plus homogènes et présentent moins de remaniements.



(b)

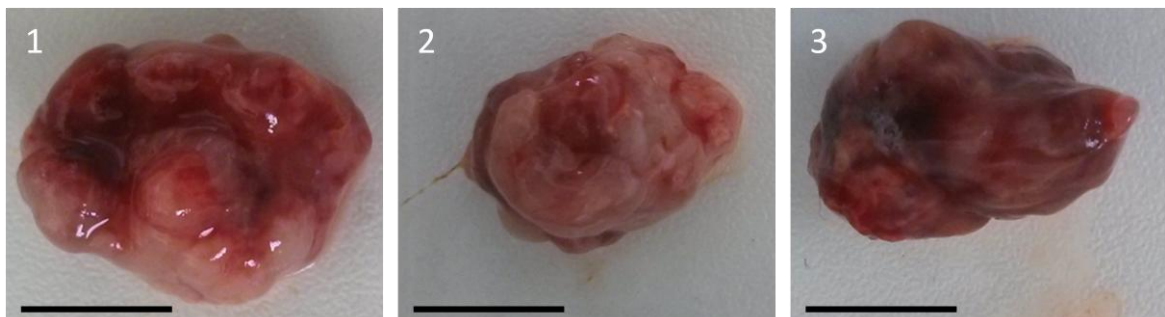


Figure 32 : Volume tumoral et aspect macroscopique des tumeurs suite au traitement

- a) Volume tumoral à l'issue du traitement : lot 1 à gauche et lot 2 à droite ; synthèse
- b) Aspect macroscopique (1 : injection IV de PBS, 2 : injection IT de NP, 3 : injection IV de NPv ; la barre représente 1cm)

## 3 Discussion et perspectives

### 3.1 Validation du modèle expérimental

L'un des premiers objectifs de cette étude préliminaire était de valider le modèle utilisé et de développer différents tests permettant une étude qualitative et quantitative du ciblage tumoral par les nanoparticules après leur administration *in vivo* chez des souris porteuses de xénogreffe.

#### 3.1.1 Choix du modèle animal

Cette étude *in vivo* a été menée sur des souris swiss nude et NMRI nude pour plusieurs raisons. Des données de la littérature, tout d'abord, montrent une bonne tolérance des souris au protocole envisagé. La biocompatibilité des nanoparticules commerciales utilisées a par ailleurs été testée dans cette espèce. Enfin, notre équipe a précédemment validé que le modèle cellulaire utilisé permet de réaliser des xénogreffes chez ces souris dans de bonnes conditions, selon un schéma de croissance tumorale défini. La quasi-totalité des souris xénogreffées dans cette étude ont développé une tumeur de taille appropriée au ciblage puis au traitement 2 à 4 semaines après injection des cellules. Malgré des variations interindividuelles concernant la vitesse de progression tumorale, le schéma de croissance des tumeurs intra-pancréatiques s'est avéré homogène entre les animaux.

#### 3.1.2 Choix du type de xénogreffe

Les résultats positifs des mesures VSM et de la fluorescence *ex vivo* pour les tumeurs intra-pancréatiques indiquent un ciblage de ces tumeurs par les nanoparticules vectorisées. Cependant, les résultats des mesures VSM (positifs) et de la fluorescence *ex vivo* (négatifs) sont discordants pour les tumeurs sous-cutanées. Par ailleurs, les tumeurs sous-cutanées se sont révélées très hétérogènes, que ce soit sur le plan de leur taille ou celui de leur vascularisation. A l'inverse, le modèle intra-pancréatique, qui présente l'avantage d'être orthotopique, était relativement homogène entre les souris, et de croissance plus régulière.

Pour ces deux raisons, le modèle de tumeur intra-pancréatique est apparu plus intéressant que celui de tumeur sous-cutanée, et a été conservé pour la seconde série de ciblage et la régression tumorale.

### **3.1.3 Choix de la voie d'administration des nanoparticules**

#### **3.1.3.1 Voie d'administration validée dans cette étude**

La voie intraveineuse systémique a été choisie pour l'étude du ciblage. Elle permet chez la souris une injection rapide, très peu invasive, tout en garantissant une très bonne qualité lorsqu'elle est réalisée par une personne expérimentée. Ceci était essentiel ici afin d'éviter des faux-négatifs et de répondre aux impératifs actuels de l'expérimentation animale (règle des 3R), impliquant notamment de réduire le nombre d'animaux, et donc de pouvoir analyser toutes les données sans ambiguïté.

Une seconde voie intra-tumorale a été testée lors des essais d'hyperthermie, afin de s'affranchir de la qualité du ciblage, et de pouvoir analyser l'efficacité des nanoparticules à induire une régression tumorale *in vivo*. Le devenir des nanoparticules suite à leur injection au sein de la tumeur n'est cependant pas connu, et rien n'indique de la répartition de ces dernières soit homogène entre les cellules tumorales.

#### **3.1.3.2 Utilisation d'une autre voie d'administration des nanoparticules**

Une nouvelle technique d'hyperthermie reposant sur l'application d'un champ magnétique alternatif après embolisation de nanoparticules au niveau de l'artère hépatique a récemment été décrite pour les carcinomes hépatocellulaires. Ceci repose sur l'observation en angiographie que ces tumeurs reçoivent principalement une vascularisation dérivant du système artériel hépatique, alors que le tissu hépatique sain reçoit la majeure partie de son apport sanguin *via* la veine porte. Une étude appliquant cette technique à des lapins porteurs de xénogreffes a montré un contrôle de la croissance tumorale et des métastases, bien qu'une régression tumorale à proprement parler n'ait pas été observée. Les nanoparticules magnétiques ne se déposaient quasiment pas dans le parenchyme hépatique sain, ce qui permettait de limiter tout effet secondaire indésirable du traitement. La complication majeure



de ce type de traitement consiste en un reflux des nanoparticules dans les artères gastroduodénale et moyenne gastrique. Ceci peut entraîner une nécrose puis une perforation du tube digestif après traitement par hyperthermie (Sun et coll., 2013).

L'administration des nanoparticules dans la circulation générale au niveau de la veine jugulaire pose le problème d'une « dilution » des nanoparticules, et donc d'un ciblage moins quantitatif. Il pourrait donc être intéressant ici de s'intéresser à cette technique d'hyperthermie après embolisation de nanoparticules, et de tenter de la transposer aux tumeurs intra-pancréatiques. Ceci nécessiterait de réaliser auparavant une « cartographie angiographique » puisque cette technique ne peut être applicable que dans le cas où la vascularisation tumorale est suffisamment connue et reproductible entre les individus. Injecter les nanoparticules immédiatement en amont de la vascularisation tumorale permettrait de s'affranchir d'un captage des nanoparticules par le foie, la rate et les reins, et donc d'améliorer nettement leur biodistribution.

### **3.1.4 Choix des techniques de détection des nanoparticules**

Pour étudier le ciblage par les nanoparticules d'oxyde de fer vectorisées par la minigastrine, il est nécessaire de disposer de tests suffisamment spécifiques et sensibles.

Les propriétés superparamagnétiques des nanoparticules ont été exploitées pour mettre en évidence ces dernières dans les organes. Les mesures VSM sont *a priori* plus sensibles et spécifiques que la détection par fluorescence. Cependant, elles sont réalisées sur des fragments de tumeurs d'organes de très petite taille, alors que l'épi-fluorescence est détectée au niveau de l'organe entier. Ceci peut expliquer les discordances observées entre les résultats fournis par les deux techniques. Pour augmenter la représentativité des mesures VSM, la préparation d'homogénats d'organes ou la réalisation de plusieurs mesures pour un même organe sont envisagées pour la suite de l'essai. De nouvelles données expérimentales indiquent également une perte progressive de magnétisme des nanoparticules, notamment quand celles-ci sont internalisées dans des lysosomes. La cinétique et la quantification de la décroissance sont actuellement en cours d'étude. Ceci pourrait engendrer l'obtention de faux-négatifs. La mise en œuvre de cette technique de détection est par ailleurs nettement plus coûteuse et chronophage que la détection de la fluorescence.

Le fluorochrome (DY 647) présent à la surface des nanoparticules ici étudiées a permis d'envisager la détection de ces dernières en épi-fluorescence, à la fois chez les modèles animaux et *ex vivo*. Les résultats obtenus sur souris entières indiquent un net manque de résolution. Une autre méthode de détection, la trans-fluorescence, permet d'obtenir de meilleures images et a été testée chez quelques souris de l'étude (résultats non présentés). Cependant la durée d'acquisition des images se trouve trop augmentée pour permettre une utilisation de cette technique sur de grandes séries d'animaux.

L'auto-fluorescence de l'alimentation et de la bile suggérée par les résultats de notre étude est également à prendre en compte. Il est de plus possible que cela ait engendré des biais dans la comparaison entre les animaux (selon l'importance du dernier repas et le remplissage de la vésicule biliaire). La positivité de 3 tumeurs sur 5 pour les souris du lot 1 ayant reçu une injection de nanoparticules et de 6 tumeurs sur 6 pour celles du lot 2, associée à la négativité des 4 tumeurs contrôles, indique néanmoins que cette technique de détection fonctionne. Un éventuel changement de fluorochrome permettant une meilleure détection des nanoparticules *in vivo* sur animal vivant est envisageable. Il pourrait également être envisagé d'utiliser un fluorochrome pour lequel une détection en immunohistochimie serait possible (par utilisation d'un anticorps anti-fluorochrome).

La teneur en oxyde de fer de la tumeur et des organes d'intérêt (foie, rate, rein) a également été déterminée par colorimétrie après réalisation d'une coloration de Perls sur des broyat d'organes. Aucune différence significative n'apparaît entre les tumeurs des souris ayant reçu des nanoparticules et celles ayant reçu du PBS. Cette technique n'est donc pas retenue pour la suite de l'étude, en raison de son net manque de sensibilité.

En conclusion de l'étude préliminaire menée ici, et sous réserve de confirmation par les prochaines séries de mesures, l'association de l'épi-fluorescence et des mesures magnétiques permet actuellement l'étude du ciblage tumoral par les nanoparticules avec le maximum de sensibilité et de spécificité. Une différence statistiquement significative entre le groupe contrôle et les souris traitées aux nanoparticules (vectorisées ou non) a été objectivée grâce à ces deux techniques, ce qui constitue un résultat très prometteur.

Un nouvel outil (IRM petit animal) sera prochainement disponible pour le suivi de la croissance tumorale sur souris vivantes et la détection des nanoparticules magnétiques. Cette approche complémentaire permettra une étude cinétique de la biodistribution des

nanoparticules, car des mesures successives à plusieurs heures ou jours d'intervalle chez une même souris seront envisageables.

## **3.2 Optimisation du ciblage des tumeurs de glucagonome de hamster par les MG-IONP-DY647**

Afin d'atteindre leur cible *in vivo*, les nanoparticules doivent franchir des obstacles successifs : rester en suspension dans la solution injectée et la circulation sanguine ; subsister suffisamment longtemps dans la circulation sanguine générale pour atteindre leur cible, donc éviter l'élimination par les organes du système SPM ; s'accumuler en quantité suffisante au niveau de la cible et s'internaliser dans les cellules (Kettiger et coll., 2013).

### **3.2.1 Résultats obtenus dans cette étude**

La formulation des nanoparticules ici utilisées a tenté de répondre à plusieurs de ces objectifs, en s'appuyant sur les nombreuses données de la littérature. La taille, la forme et les caractéristiques de surface (enrobage par du PEG, neutralité de la surface) ont été étudiées pour éviter la reconnaissance par les macrophages du SPM et ralentir la clairance plasmatique. Le nombre de ligands de minigastrine à la surface a été choisi pour optimiser le ciblage et favoriser l'internalisation par interaction avec les récepteurs RCCK2 surexprimés.

La préparation extemporanée de la suspension de nanoparticules avant leur administration chez la souris répondait à l'objectif d'éviter leur agrégation. Cette dernière conduit d'une part à des variations de dose réelle majeures entre les animaux, car les nanoparticules agglomérées sont incapables d'interagir normalement avec le RCCK2 et donc de s'internaliser dans les cellules-cibles. D'autre part, plusieurs études ont rapporté une accumulation des nanoparticules agglomérées au niveau pulmonaire suite à leur injection intraveineuse. Ceci peut induire un phénomène de thromboembolie à risque mortel (Kettiger et coll., 2013). Dans notre étude, l'examen en coloration de Perls des coupes histologiques de poumon des souris ayant reçu des nanoparticules n'a permis de mettre en évidence que quelques petits amas de nanoparticules chez quelques souris. Cette étude sera à compléter par réalisation de coupes sériées dans chaque organe.

Le choix de l'injection au niveau de la veine jugulaire a également été dicté par la volonté de favoriser un bon ciblage tumoral. Il s'agit en effet d'une veine de diamètre important, facilement accessible, permettant la réalisation aisée d'une injection de bonne qualité avec de l'expérience. Les nanoparticules atteignent rapidement le cœur *via* la veine cave crâniale et sont ensuite redistribuées vers l'ensemble des organes. Afin d'assurer une meilleure biodisponibilité des nanoparticules au niveau de la tumeur, une injection intratumorale ou au niveau d'un vaisseau plus proche de cette dernière (notamment) a été envisagée. Ces modes d'administration n'ont finalement pas été choisis, d'une part car leur réalisation posait des problèmes techniques (notamment l'extrême difficulté de réaliser une réparation en cas de lésion du vaisseau), d'autre part car cela s'éloignait de ce qui est attendu pour la suite chez l'homme.

Qu'elles soient ou non vectorisées, les nanoparticules utilisées dans cette étude se sont majoritairement accumulées au niveau du foie, probablement suite à une phagocytose des nanoparticules par les macrophages du système SPM. Ceci peut faire craindre des effets indésirables lors du traitement par hyperthermie magnétique, qu'il conviendrait d'évaluer après traitement, notamment par dosage des paramètres hépatiques lésionnels (PAL pour la cholestase ; ALAT et ASAT pour la cytolyse hépatique) et fonctionnels (bilirubine totale, urée, glycémie, cholestérol,...), comme c'est le cas dans de nombreuses études de toxicité (Weissleder et coll., 1989; Kim et coll., 2010). La présence de nanoparticules dans les organes d'élimination (foie, rate, rein) était attendue, et se trouve confirmée par cette étude.

Les nanoparticules non vectorisées semblent s'accumuler essentiellement dans le foie, puis la rate, et enfin la tumeur, ce qui correspond aux données déjà publiées pour ce type d'agent. La détection en fluorescence de nanoparticules au niveau des tumeurs est compatible avec un effet EPR.

L'intensité de fluorescence semble plus importante dans les 3 tumeurs des souris ayant reçu des nanoparticules vectorisées par rapport aux souris ayant reçu des nanoparticules non vectorisées. Ceci suggère un ciblage spécifique s'ajoutant à l'effet EPR. La vectorisation des nanoparticules par la minigastrine permet une accumulation nettement plus importante dans la tumeur que dans la rate, résultat très positif malgré une quantité importante toujours séquestrée dans le foie.

### **3.2.2 Perspectives d'amélioration de la furtivité et de la capacité de ciblage des nanoparticules**

Il semble donc nécessaire d'améliorer encore la furtivité et la force de ciblage des nanoparticules, malgré les progrès déjà réalisés. Deux stratégies sont alors envisageables : modifier à nouveau les nanoparticules ou tenter de diminuer l'efficacité des cellules de Kupffer du système SPM.

#### **3.2.2.1 Modification des caractéristiques intrinsèques des nanoparticules**

La première stratégie pourrait consister à rajouter à la surface des nanoparticules un agent de ciblage avec de nouvelles propriétés. En effet, malgré une vectorisation des nanoparticules permettant un ciblage spécifique d'un récepteur surexprimé par les cellules tumorales comme le RCCK2, les résultats expérimentaux *in vivo* sont parfois décevants. Une des explications réside dans le fait que les agents diagnostiques et thérapeutiques pénètrent au maximum sur une distance équivalent à cinq diamètres cellulaires à partir des vaisseaux sanguins irriguant la tumeur. L'effet EPR trouve en effet une résistance due à une pression interstitielle très élevée dans les tumeurs (du fait d'un dysfonctionnement du système lymphatique). De nouvelles stratégies de vectorisation ont été proposées pour répondre à ce problème. Elles consistent en des agents capables de cibler des récepteurs membranaires des cellules endothéliales, voire de faciliter la pénétration dans la tumeur (Ruoslahti et coll., 2010). La figure 33 résume l'intérêt de ces nouvelles pistes de recherche.

Il pourrait être intéressant d'ajouter à nos nanoparticules MG-IONP-DY647 un tel agent de ciblage, afin d'assurer un meilleur ciblage et une meilleure diffusion au sein des tumeurs.

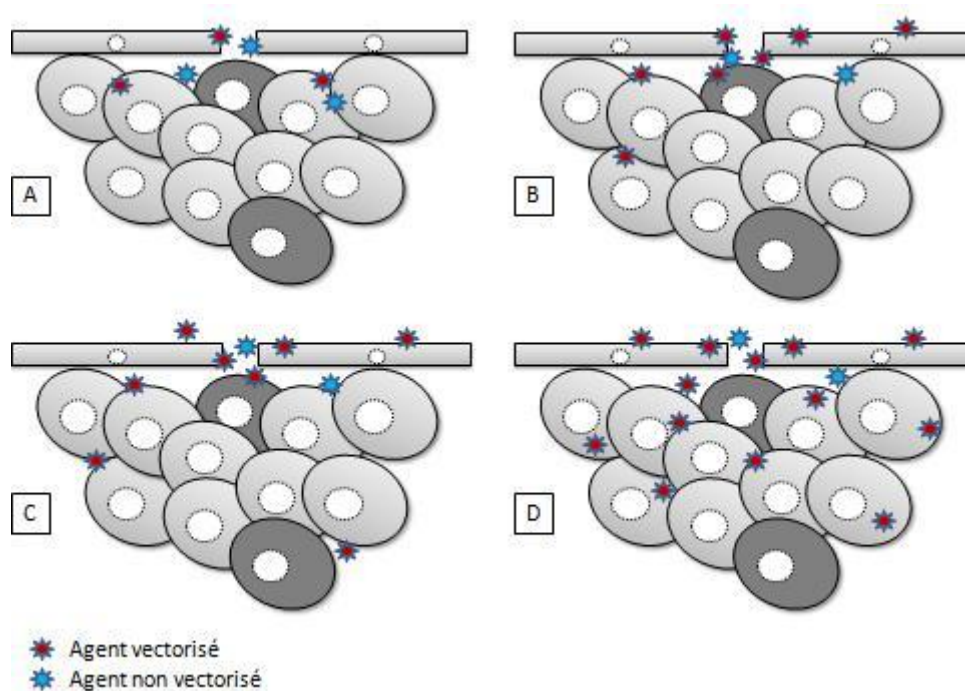


Figure 33 : Stratégies d’adressage actif d’agents diagnostiques et thérapeutiques (d’après Ruoslahti et coll., 2010). (A) : l’accumulation des agents vectorisés ciblant uniquement les cellules tumorales n’est que très légèrement supérieure à celle des agents non vectorisés ; (B) : les agents vectorisés ciblant les vaisseaux tumoraux s’accumulent au niveau de la tumeur, mais leur entrée dans la tumeur repose sur des mécanismes passifs (et notamment le gradient de concentration) ; (C) : les agents ciblant à la fois la vascularisation et les cellules tumorales combinent le pouvoir des deux catégories précédentes ; (D) : les agents de ciblage possédant un pouvoir de pénétration intra-tumorale constituent un système particulièrement puissant.

La limite majeure de cette stratégie réside dans le fait que chaque modification de la surface des nanoparticules est susceptible d’engendrer des modifications de biodistribution, d’efficacité et de toxicité de ces dernières. Afin d’éviter de nouvelles analyses de ces facteurs, l’inhibition du système des phagocytes mononucléés, et en premier lieu des cellules de Kupffer, apparaît comme une solution séduisante.

### 3.2.2.2 Inhibition du SPM

Dans le cadre du développement de nouveaux agents de thérapie génique, plusieurs études rapportent l’utilisation de liposomes encapsulant du clodronate pour dépléter provisoirement le foie en cellules de Kupffer (Schughart et coll., 1999).

Les possibilités de bloquer le système RES ont été étudiées depuis environ 50 ans et plusieurs émulsions huileuses ont prouvé leur efficacité. Au cours d’une récente étude menée

sur des rats, des chercheurs ont montré que l'injection intraveineuse de 2g/kg d'Intralipid 20,0% ®, une solution de nutrition parentérale, permettait de multiplier par 3 environ la demi-vie plasmatique des SPION utilisées et de diminuer de 50% environ l'accumulation dans le foie (Liu et coll., 2013). La voie d'administration et le moment de l'injection (ici réalisée une heure avant l'injection des nanoparticules) restent encore à optimiser, mais ceci constitue un résultat particulièrement encourageant, qu'il pourrait être intéressant d'utiliser pour la suite de nos recherches.

### **3.3 Hyperthermie**

#### **3.3.1 Effet sur l'état clinique des animaux**

Aucune altération de l'état clinique des souris n'a pu être mise en évidence dans la semaine ayant suivi le traitement. Avant de conclure à l'innocuité de ce dernier, une réelle étude de la toxicité des nanoparticules, avant et après soumission des souris au champ magnétique, serait nécessaire. Pour répondre aux impératifs réglementaires avant d'envisager une utilisation chez l'homme, il faut réaliser une étude préclinique pharmacologique et toxicologique. Ceci s'appuie sur une étude cinétique pour un ensemble de paramètres cliniques (état général et poids des souris, aspect macroscopique et poids des organes lors du sacrifice), biologiques et histologiques. Parmi les paramètres biologiques, la numération-formule, les protéines totales et l'albumine permettent d'évaluer d'éventuels phénomènes infectieux et inflammatoires. L'étude de la toxicité au niveau du rein passe par une analyse urinaire, associée au dosage de la créatininémie et de l'urée. Pour évaluer le foie, on s'appuie à la fois sur des paramètres lésionnels (PAL, ALAT, ASAT) et fonctionnels (bilirubine totale, cholestérol, urée, glycémie,...). Le dosage de la LDH permet d'objectiver d'éventuels dommages cardiaques. Enfin, différents tests permettent de mettre en évidence des perturbations du cycle cellulaire, des lésions de l'ADN, un stress oxydatif, une mutagénicité causés par les nanoparticules. Pour les nanoparticules d'oxyde de fer, comme celles utilisées dans cette étude, la quantité de fer accumulée dans chaque organe mérite également d'être quantifiée comme marqueur d'une possible toxicité (Weissleder et coll., 1989; Kim et coll., 2010; Jain et coll., 2008; Liu et coll., 2011).

### 3.3.2 Régression tumorale

Lors d'une étude menée sur 40 souris porteuses de xénogreffes sous-cutanées de cancer du poumon non à petites cellules ayant reçu une injection intra-tumorale de ferucarbotran, une élévation de température jusqu'à 43-45°C a été rapportée 2.5 minutes après la mise en place du champ magnétique. Le ferucarbotran est une solution colloïdale de SPIONs recouverts par du carboxydextran. Les souris de cette étude avaient reçu 150 µL d'une solution à concentration de 27.6 µg Fe/µL, soit 4.2 mg de Fe par tumeur. Le maintien de ce niveau de température pendant 20 minutes a permis une limitation de la croissance tumorale, *via* une nécrose induite par l'hyperthermie (Araya et coll., 2013).

Une seconde étude menée sur des souris porteuses de xénogreffes sous-cutanées de myélome multiple humain a montré une élévation de température d'environ 6°C au niveau des tumeurs 20 minutes après le début du champ magnétique. Les souris avaient reçu une injection intraveineuse à raison de 2.7 mg Fe/kg, soit un total de 5.4 µg de fer pour des souris estimées à 20 grammes (Hayashi et coll., 2013).

Contrairement à ce qui est rapporté dans ces deux références bibliographiques, aucune élévation de température n'a été mise en évidence par notre équipe lors du traitement au champ magnétique alternatif, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

La forte variation de taille tumorale (tumeurs nettement plus petites dans les deux études précédentes), les différents modes d'administration des nanoparticules et les concentrations très variables des suspensions de nanoparticules administrées rendent difficiles les comparaisons entre études.

Par ailleurs, il est possible que la méthode de détection ici utilisée (caméra thermique) ne soit pas la plus appropriée pour détecter une variation de température intra-abdominale. L'utilisation d'une sonde thermique insérée chirurgicalement au centre de la tumeur, comme cela est rapporté dans certaines études (Balivada et coll., 2012), permettrait une détection plus précise d'éventuelles variations de température.

Cependant, il a été démontré *in vitro* dans notre équipe que la soumission de cellules contenant des nanoparticules au champ magnétique alternatif induisait l'augmentation de la production de ROS et la libération d'enzymes lysosomales vers le cytoplasme, même en l'absence d'élévation notable de la température (résultats non encore publiés). L'hypothèse mécanistique est la suivante : les nanoparticules vectorisées s'internalisent par interaction



avec le RCCK2 puis s'accumulent dans les lysosomes ; l'induction du champ magnétique alternatif provoque une élévation locale de température à l'intérieur du lysosome, suffisante pour induire la mort cellulaire selon un processus apoptotique (processus de mort « propre », à l'opposé de la nécrose).

Les nanoparticules vectorisées administrées par voie intraveineuse ou intra-tumorale semblent être en mesure d'induire une stabilisation de la croissance, voire une régression tumorale chez des souris porteuses de xénogreffe intra-pancréatique, sans élévation détectable de la température au niveau de la tumeur. Il est possible que le phénomène décrit ci-dessus soit à l'origine du ralentissement de croissance tumorale observé ici. Il a par ailleurs été démontré que l'hyperthermie induit de la nécrose, autre phénomène qui peut expliquer une moindre croissance des tumeurs. Ce résultat prometteur devra être confirmé par répétition des mesures chez un plus grand nombre de souris, mais pourrait constituer une avancée dans le traitement par hyperthermie des tumeurs endocrines. L'absence d'élévation de température intra-abdominale réduit par ailleurs le risque de toxicité vis-à-vis des organes environnant la tumeur.

La durée du traitement au champ magnétique (60 minutes) a été choisie d'après les résultats obtenus *in vitro*, mais pourrait constituer une limite pour l'utilisation clinique. Il pourrait alors être envisagé de multiplier les injections et le traitement au champ magnétique, afin de réduire la durée de ce dernier. Une étude menée sur 10 souris porteuses de xénogreffes sous-cutanées de mélanome a ainsi rapporté une diminution significative de la taille de la tumeur par rapport au groupe contrôle chez des souris ayant reçu 3 injections de nanoparticules et 3 passages de 10 minutes au champ magnétique pendant 3 jours successifs (Balivada et coll., 2010).

Comme cela a déjà été souligné par d'autres auteurs (Araya et coll., 2013), l'hyperthermie apparaît donc comme un traitement à envisager pour des tumeurs résistantes à la chimiothérapie conventionnelle. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne rapporte une complète suppression tumorale suite à un traitement basé sur l'application d'un champ magnétique alternatif après injection intra-tumorale ou systémique de nanoparticules. Ceci renforce l'intérêt de la possibilité de thérapie multimodale offerte par les nanoparticules, en associant des agents chimiothérapeutiques greffés sur la nanoparticule à un traitement par hyperthermie magnétique. Ainsi, une étude a été menée sur 24 souris porteuses de xénogreffes

sous-cutanées de cellules d'une lignée leucémique myéloïde chronique humaine multi-résistante afin d'évaluer l'intérêt d'une thérapie multimodale. Le meilleur taux d'inhibition (environ 75%) a été obtenu par administration de nanoparticules présentant à leur surface deux agents chimiothérapeutiques et soumission des souris à un champ magnétique alternatif. Les souris ayant reçu des nanoparticules simples et ayant été soumises au champ magnétique ont présenté un taux d'inhibition de 65% environ seulement. Le traitement multimodal s'avérait plus efficace qu'une administration journalière d'agents chimiothérapeutiques, et permettait de répondre à la problématique des tumeurs multi-résistantes (Chen et coll., 2012).

### **3.3.3 Injection systémique ou intra-tumorale**

Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre ces deux groupes dans cette étude. Ceci apparaît comme une nouvelle preuve de l'efficacité du ciblage après administration intraveineuse des nanoparticules vectorisées. La possibilité de réaliser de l'hyperthermie magnétique après administration intraveineuse de nanoparticules semble plus séduisante. Elle permet en effet de cibler une très grande variété de tumeurs, notamment celles atteignant les organes situés en profondeur dans l'abdomen chez l'homme, pour lesquels une injection intra-tumorale n'est pas toujours techniquement réalisable.

## **3.4 Limites - Perspectives**

La principale limite de cette étude réside dans le faible nombre d'animaux inclus. Il sera donc nécessaire de réitérer les mesures présentées ici avant de tirer des conclusions définitives. Il s'agissait dans ce travail de valider un nouveau modèle expérimental en s'attachant à répondre aux règles actuelles d'expérimentation animale, qui préconisent notamment une réduction du nombre d'animaux utilisés.

Le devenir des nanoparticules dans les cellules après administration *in vivo* n'est pas rapporté ici. Des prélèvements ont été réalisés pour une étude en microscopie électronique, mais les résultats ne sont pas encore disponibles. Une accumulation de nanoparticules dans les lysosomes avait été mise en évidence par notre équipe avec la génération antérieure de nanoparticules, et le même phénomène est suspecté ici.

L'étude de la régression tumorale s'est basée sur des critères macroscopiques (aspect et taille des tumeurs). Des colorations immuno-histochimiques permettant de détecter les phénomènes de prolifération cellulaire (Ki-67), de mort cellulaire (apoptose (caspase 3) et nécrose) seraient intéressantes pour comprendre les mécanismes expliquant les modifications de taille des tumeurs suite au traitement, et seront réalisées dans un second temps.

Il pourrait être envisagé de modifier le modèle cellulaire afin qu'il exprime une protéine luminescente (luciférase) ou fluorescente (GFP) permettant de suivre la croissance tumorale avant injection des nanoparticules, afin de réaliser des lots de souris homogènes. Cette approche permettra également de suivre la régression tumorale, après traitement au champ magnétique, sans sacrifice de l'animal.

Différents modèles murins d'inactivation du gène *Men1* ont été développés afin d'étudier l'oncogenèse relative au syndrome MEN1. Les animaux homozygotes meurent au stade embryonnaire, mais les hétérozygotes présentent dès l'âge de 12-13 mois différents types tumoraux compatibles avec ceux décrits chez les patients MEN1 (Bertolino, Tong, Galendo, Wang, Zhang 2003).

Afin d'étudier le rôle de la protéine ménine codée par le gène *Men1* dans l'oncogenèse des différentes tumeurs pancréatiques, différents modèles d'inactivation spécifique de ce gène dans un type cellulaire donné ont été développés. Ainsi, l'inactivation du gène *Men1* dans les cellules  $\beta$  synthétisant l'insuline a conduit au développement d'insulinomes (Bertolino, Tong, Herrera, Casse, Zhang, Wang 2003). Cependant, l'inactivation de ce même gène dans les cellules  $\alpha$  productrices de glucagon a abouti à l'apparition de glucagonomes, mais surtout d'insulinomes et de tumeurs mixtes. Différents processus semblaient expliquer ce résultat inattendu : une trans-différenciation des cellules  $\alpha$  en cellules  $\beta$  ou une régulation paracrine de la prolifération des cellules  $\beta$  par les cellules  $\alpha$  (Lu et coll., 2010; Shen et coll., 2010)

Pour la suite de cette étude, il pourrait être intéressant de travailler avec de telles souris. Ceci permettrait d'une part de s'affranchir de l'étape relativement longue et aléatoire de xénotransgreffe, et d'autre part, de tester notre nouvel agent diagnostique et thérapeutique sur différents types cellulaires tumoraux au sein d'un organisme non immunodéprimé. La première étape consisterait à valider la surexpression du *RCC2* par les cellules tumorales des souris de ces modèles, avant d'envisager leur ciblage *in vivo*.

## CONCLUSION

Ce travail préliminaire a montré la faisabilité de l'étude du ciblage tumoral *in vivo* par des nanoparticules vectorisées et de l'analyse de la régression tumorale suite au traitement par hyperthermie.

Dans cette étude, nous avons par ailleurs mis en évidence une efficacité du ciblage des cellules INR1-G9-RCCK2 *in vivo* par les nanoparticules développées dans notre équipe. Une amélioration de la furtivité et de la force de ciblage seraient encore souhaitables, afin de limiter l'accumulation dans le foie et de majorer au contraire la quantité de nanoparticules dans la tumeur. L'ajout d'un agent de vectorisation à pouvoir de pénétration intra-tumorale est actuellement envisagé.

L'hyperthermie magnétique semble ensuite permettre au moins une stabilisation de la croissance tumorale, et constitue une opportunité thérapeutique intéressante. Le couplage d'un agent chimiothérapeutique à la nano-plateforme déjà développée a été validé *in vitro* par notre équipe et constitue une option dans l'objectif de cumuler les effets pour obtenir une réelle régression tumorale.

Parallèlement aux études permettant d'apporter la preuve de l'efficacité du ciblage, il est important de mettre en œuvre une étude de la toxicité à court, moyen et long terme de ces nanoparticules vectorisées ainsi que leur élimination par l'organisme, avant d'envisager de les utiliser pour des essais précliniques. Ceci devra s'appuyer sur des observations cliniques, biologiques et histologiques précises, afin de s'assurer de l'innocuité de ces agents.

Cette étude constitue donc un préliminaire encourageant à poursuivre la caractérisation *in vivo* de ce nouvel agent diagnostique et thérapeutique que constituent les SPION-MG10-DY647.



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Isabelle RAYMOND-LETRON, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **MELNIER Solène** intitulée « **Etude in vivo du ciblage diagnostique et thérapeutique des tumeurs endocrines du pancréas chez la souris swiss nude par des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques vectorisées par un analogue de la gastrine (MC-IONP-DY647)** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 19 juin 2014  
Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MIEGON

Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Yanick SELVES

Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand MONTHUBERT  
en délégation, la Vice-Présidente du CEVU  
Madame Régine ANDRÉ OUBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.



## BIBLIOGRAPHIE

ALEXIOU, Christoph, ARNOLD, Wolfgang, KLEIN, Roswitha J., PARAK, Fritz G., HULIN, Peter, BERGEMANN, Christian, ERHARDT, Wolfgang, WAGENPFEIL, Stefan and LUEBBE, Andreas S., 2000, Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer research*. 2000. Vol. 60, no. 23, p. 6641–6648.

ALMEIDA, Joao Paulo Mattos, CHEN, Allen L, FOSTER, Aaron and DREZEK, Rebekah, 2011, In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)*. July 2011. Vol. 6, no. 5, p. 815–835.

ALY, Ahmad, SHULKES, Arthur and BALDWIN, Graham S, 2004, Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. July 2004. Vol. 1704, no. 1, p. 1–10.

ARAYA, Tomoyuki, KASAHARA, NISHIKAWA, KIMURA, SONE, NAGAE, IKEHATA, NAGANO and FUJIMURA, 2013, Antitumor effects of inductive hyperthermia using magnetic ferucarbotran nanoparticles on human lung cancer xenografts in nude mice. *OncoTargets and Therapy*. March 2013. P. 237.

BALIVADA, Sivasai, RACHAKATLA, Raja S., WANG, Hongwang, SAMARAKOON, Thilani N., DANI, Raj K., PYLE, Marla, KROH, Franklin O., WALKER, Brandon, LEAYM, Xiaoxuan and KOPER, Olga B., 2010, A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron (0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. *BMC cancer*. 2010. Vol. 10, no. 1, p. 119.

BAUDIN, E. and DUCREUX, M., 2008, *Tumeurs endocrines thoraciques et digestives*. Springer.

BAUDIN, Eric, DUCREUX, Michel, SABOURIN, Jean-Christophe, RUFFIÉ, Pierre, ELIAS, Dominique, DEBAERE, Thierry, BIDART, Jean-Michel, LASSER, Philippe and SCHLUMBERGER, Martin, 1999, Les tumeurs neuro-endocrines gastro-entéropancréatiques. *Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction*. 1 December 1999. Vol. 1, no. 2, p. 165–74.

BÉHÉ, Martin, KLUGE, Gerald, BECKER, Wolfgang, GOTTHARDT, Martin and BEHR, Thomas M, 2005, Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. June 2005. Vol. 46, no. 6, p. 1012–1015.

BEHR, Thomas M and BÉHÉ, Martin P, 2002, Cholecystokinin-B/Gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. *Seminars in nuclear medicine*. April 2002. Vol. 32, no. 2, p. 97–109.

BRAUCKHOFF, M., LORENZ, K., UKKAT, J., BRAUCKHOFF, K., GIMM, O. and DRALLE, H., 2004, Medullary thyroid carcinoma. *Scandinavian journal of surgery*. 2004. Vol. 93, no. 4, p. 249–260.

BRUIX, Jordi, SHERMAN, Morris, LLOVET, Josep M., BEAUGRAND, Michel, LENCIONI, Riccardo, BURROUGHS, Andrew K., CHRISTENSEN, Erik, PAGLIARO, Luigi, COLOMBO, Massimo and RODÉS, Juan, 2001, Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. *Journal of hepatology*. 2001. Vol. 35, no. 3, p. 421–430.

CHEN, Baoan, YANYAN REN and CHEN, Baoan, 2012, Multifunctional magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. *International Journal of Nanomedicine*. May 2012. P. 2261.

CHERUKURI, Paul, GLAZER, Evan S. and CURLEY, Steven A., 2010, Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. March 2010. Vol. 62, no. 3, p. 339–345.

CLERC, Pascal, SAILLAN-BARREAU, Corinne, DESBOIS, Christine, PRADAYROL, Lucien, FOURMY, Daniel and DUFRESNE, Marlène, 2002, Transgenic mice expressing cholecystokinin 2 receptors in the pancreas. *Pharmacology & toxicology*. December 2002. Vol. 91, no. 6, p. 321–326.

DE WEERTH, A, VON SCHRENCK, T, LÖHR, M, MIRAU, S, GRETEN, H and KALTHOFF, H, 1999, Human pancreatic cancer cell lines express the CCKB receptor. *Hepato-gastroenterology*. February 1999. Vol. 46, no. 25, p. 472–478.

DOBROVOLSKAIA, Marina A., AGGARWAL, Parag, HALL, Jennifer B. and MCNEIL, Scott E., 2008, Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*. August 2008. Vol. 5, no. 4, p. 487–495.

DOCKRAY, Graham, DIMALINE, Rod and VARRO, Andrea, 2004, Gastrin: old hormone, new functions. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 5 October 2004. Vol. 449, no. 4, p. 344–355.

DUFRESNE, M., 2006, Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiological Reviews*. 1 July 2006. Vol. 86, no. 3, p. 805–847.

DUGUET, Etienne, VASSEUR, Sébastien, MORNET, Stéphane and DEVOISSELLE, Jean-Marie, 2006, Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (London, England)*. August 2006. Vol. 1, no. 2, p. 157–168.

FERRARI, Mauro, 2005, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews. Cancer*. March 2005. Vol. 5, no. 3, p. 161–171.

FOURMY, Daniel, GIGOUX, Véronique and REUBI, Jean Claude, 2011, Gastrin in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*. September 2011. Vol. 141, no. 3, p. 814–818.e1–3.

FRILLING, A., AKERSTROM, G., FALCONI, M., PAVEL, M., RAMOS, J., KIDD, M. and MODLIN, I. M., 2012, Neuroendocrine tumor disease: an evolving landscape. *Endocrine Related Cancer*. 29 May 2012. Vol. 19, no. 5, p. R163–R185.

GILCHRIST, R. K., MEDAL, Richard, SHOREY, William D., HANSELMAN, Russell C., PARROTT, John C. and TAYLOR, C. Bruce, 1957, Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of surgery*. 1957. Vol. 146, no. 4, p. 596.

GREGORY, R. A. and TRACY, Hilda J., 1964, The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa Part I The isolation of two gastrins from hog antral mucosa. *Gut*. 1964. Vol. 5, no. 2, p. 103–107.

GUPTA, Ajay Kumar and GUPTA, Mona, 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. June 2005. Vol. 26, no. 18, p. 3995–4021.

HAYASHI, Koichiro, 2013, Superparamagnetic Nanoparticle Clusters for Cancer Theranostics Combining Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment. *Theranostics*. 2013. Vol. 3, no. 6, p. 366–376.

HELLMICH, M. R., 2000, Human Colorectal Cancers Express a Constitutively Active Cholecystokinin-B/Gastrin Receptor That Stimulates Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*. 25 July 2000. Vol. 275, no. 41, p. 32122–32128.



HENWOOD, M, CLARKE, P A, SMITH, A M and WATSON, S A, 2001, Expression of gastrin in developing gastric adenocarcinoma. *The British journal of surgery*. April 2001. Vol. 88, no. 4, p. 564–568.

INNIS, Robert B. and SNYDER, Solomon H., 1980, Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980. Vol. 77, no. 11, p. 6917–6921.

IYER, Arun K., KHALED, Greish, FANG, Jun and MAEDA, Hiroshi, 2006, Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*. September 2006. Vol. 11, no. 17-18, p. 812–818.

JAIN, Tapan K., REDDY, Maram K., MORALES, Marco A., LESLIE-PELECKY, Diandra L. and LABHASETWAR, Vinod, 2008, Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. *Molecular Pharmaceutics*. April 2008. Vol. 5, no. 2, p. 316–327.

JOHANNSEN, M, GNEVECKOW, U, ECKELT, L, FEUSSNER, A, WALDÖFNER, N, SCHOLZ, R, DEGER, S, WUST, P, LOENING, S A and JORDAN, A, 2005, Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. November 2005. Vol. 21, no. 7, p. 637–647.

JOHANNSEN, Manfred, GNEVECKOW, Uwe, THIESEN, Burghard, TAYMOORIAN, Kasra, CHO, Chie Hee, WALDÖFNER, Norbert, SCHOLZ, Regina, JORDAN, Andreas, LOENING, Stefan A and WUST, Peter, 2007, Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *European urology*. December 2007. Vol. 52, no. 6, p. 1653–1661.

JOHNSON, L R, 1988, Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiological reviews*. April 1988. Vol. 68, no. 2, p. 456–502.

JUNG, Chu W. and JACOBS, Paula, 1995, Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magnetic resonance imaging*. 1995. Vol. 13, no. 5, p. 661–674.

KALTSAS, Gregory A, BESSER, G Michael and GROSSMAN, Ashley B, 2004, The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocrine reviews*. June 2004. Vol. 25, no. 3, p. 458–511.

KARLSSON, Hanna L., GUSTAFSSON, Johanna, CRONHOLM, Pontus and MÖLLER, Lennart, 2009, Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*. July 2009. Vol. 188, no. 2, p. 112–118.

KELKAR, Sneha S. and REINEKE, Theresa M., 2011, Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjugate Chemistry*. 19 October 2011. Vol. 22, no. 10, p. 1879–1903.

KETTIGER, Helene, SCHIPANSKI, Angela, WICK, Peter and HUWYLER, Jörg, 2013, Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *International journal of nanomedicine*. 2013. Vol. 8, p. 3255–3269.

KIM, Betty YS, RUTKA, James T. and CHAN, Warren CW, 2010, Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*. 2010. Vol. 363, no. 25, p. 2434–2443.

KIM, Michelle Kang, 2012, Endoscopic Ultrasound in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Gut and Liver*. 2012. Vol. 6, no. 4, p. 405. DOI 10.5009/gnl.2012.6.4.405.

LANGER, I., 2005, Evidence That Interspecies Polymorphism in the Human and Rat Cholecystokinin Receptor-2 Affects Structure of the Binding Site for the Endogenous Agonist Cholecystokinin. *Journal of Biological Chemistry*. 12 April 2005. Vol. 280, no. 23, p. 22198–22204.

LAWRENCE, Ben, GUSTAFSSON, Bjorn I, CHAN, Anthony, SVEJDA, Bernhard, KIDD, Mark and MODLIN, Irvin M, 2011, The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. March 2011. Vol. 40, no. 1, p. 1–18, vii.

LEE, Hyeon Kook, LEE, Hyuk-Joon, HUR, Keun, LEE, Hye Seung, KIM, Woo Ho, MICHAELI, Dov, CHOE, Kuk Jin and YANG, Han-Kwang, 2005, Growth effect of gastrin on gastric cancer and its clinical implications for gastric cancer surgery. *Oncology reports*. August 2005. Vol. 14, no. 2, p. 383–388.

LIU, Li, HITCHENS, T. Kevin, YE, Qing, WU, Yijen, BARBE, Brent, PRIOR, Devin E., LI, Wendy F., YEH,

Fang-Cheng, FOLEY, Lesley M., BAIN, Daniel J. and HO, Chien, 2013, Decreased reticuloendothelial system clearance and increased blood half-life and immune cell labeling for nano- and micron-sized superparamagnetic iron-oxide particles upon pre-treatment with Intralipid. *Biochimica et biophysica acta*. June 2013. Vol. 1830, no. 6, p. 3447–3453.

LIU, Tianlong, LI, Linlin, TENG, Xu, HUANG, Xinglu, LIU, Huiyu, CHEN, Dong, REN, Jun, HE, Junqi and TANG, Fangqiong, 2011, Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials*. February 2011. Vol. 32, no. 6, p. 1657–1668.

MAGNAN, R., MASRI, B., ESCRIEUT, C., FOUCAUD, M., CORDELIER, P. and FOURMY, D., 2010, Regulation of Membrane Cholecystokinin-2 Receptor by Agonists Enables Classification of Partial Agonists as Biased Agonists. *Journal of Biological Chemistry*. 14 December 2010. Vol. 286, no. 8, p. 6707–6719.

MITRY, E., BAUDIN, E., DUCREUX, M., SABOURIN, J. C., RUFIE, P., APARICIO, T., LASSER, P., ELIAS, D., DUVILLARD, P. and SCHLUMBERGER, M., 1999, Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *British Journal of Cancer*. 1999. Vol. 81, no. 8, p. 1351.

MIYAKE, A, 1995, A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon. *Biochemical and biophysical research communications*. 8 March 1995. Vol. 208, no. 1, p. 230–237.

MODLIN, I.M., PAVEL, M., KIDD, M. and GUSTAFSSON, B.I., 2009, Review article: somatostatin analogs in the treatment of gastro-entero-pancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumors. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. October 2009.

MODLIN, Irvin M., GUSTAFSSON, Bjorn I., MOSS, Steven F., PAVEL, Marianne, TSOLAKIS, Apostolos V. and KIDD, Mark, 2010, Chromogranin A—Biological Function and Clinical Utility in Neuro Endocrine Tumor Disease. *Annals of Surgical Oncology*. 9 March 2010. Vol. 17, no. 9, p. 2427–2443.

MODLIN, Irvin M., LYE, Kevin D. and KIDD, Mark, 2003, A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*. 15 February 2003. Vol. 97, no. 4, p. 934–959.

MONFARDINI, Cristina and VERONESE, Francesco M., 1998, Stabilization of substances in circulation. *Bioconjugate chemistry*. 1998. Vol. 9, no. 4, p. 418–450.

MORLIERAS, Jessica, DUFORT, Sandrine, SANCEY, Lucie, TRUILLET, Charles, MIGNOT, Anna, ROSSETTI, Fabien, DENTAMARO, Mario, LAURENT, Sophie, VANDER ELST, Luce, MULLER, Robert N, ANTOINE, Rodolphe, DUGOURD, Philippe, ROUX, Stéphane, PERRIAT, Pascal, LUX, François, COLL, Jean-Luc and TILLEMENT, Olivier, 2013, Functionalization of small rigid platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors overexpressing  $\alpha\beta3$ -integrins. *Bioconjugate chemistry*. 18 September 2013. Vol. 24, no. 9, p. 1584–1597. DOI 10.1021/bc4002097.

NOBLE, Florence, WANK, Stephen A., CRAWLEY, Jacqueline N., BRADWEJN, Jacques, SEROOGY, Kim B., HAMON, Michel and ROQUES, Bernard P., 1999, International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacological Reviews*. 1999.

Vol. 51, no. 4, p. 745–781.

POHL, M., 1997, Ligand-induced Internalization of Cholecystokinin Receptors. DEMONSTRATION OF THE IMPORTANCE OF THE CARBOXYL TERMINUS FOR LIGAND-INDUCED INTERNALIZATION OF THE RAT CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR BUT NOT THE TYPE A RECEPTOR. *Journal of Biological Chemistry*. 18 July 1997. Vol. 272, no. 29, p. 18179–18184.

PROVERBIO, Daniela, SPADA, Eva, PEREGO, Roberta, GRIECO, Valeria, LODI, Matteo, DI GIANCAMILLO, Mauro and FERRO, Elisabetta, 2012, Potential Variant of Multiple Endocrine Neoplasia in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2012. Vol. 48, no. 2, p. 132–138.

RAI, Rajani, CHANDRA, Vishal, TEWARI, Mallika, KUMAR, Mohan and SHUKLA, Hari S., 2012, Cholecystokinin and gastrin receptors targeting in gastrointestinal cancer. *Surgical Oncology*. December 2012. Vol. 21, no. 4, p. 281–292.

REHFELD, Jens F, 2004, Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. December 2004. Vol. 18, no. 4, p. 569–586.

REUBI, J C, WASER, B, LÄDERACH, U, STETTLER, C, FRIESS, H, HALTER, F and SCHMASSMANN, A, 1997, Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B-gastrin receptors in the human stomach. *Gastroenterology*. April 1997. Vol. 112, no. 4, p. 1197–1205.

REUBI, Jean Claude, MÄCKE, Helmut R. and KRENNING, Eric P., 2005, Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *Journal of Nuclear Medicine*. 2005. Vol. 46, no. 1 suppl, p. 67S–75S.

REUBI, Jean Claude, WASER, Beatrice, GUGGER, Mathias, FRIESS, Helmut, KLEEFF, Jörg, KAYED, Hany, BÜCHLER, Markus W and LAISSUE, Jean A, 2003, Distribution of CCK1 and CCK2 receptors in normal and diseased human pancreatic tissue. *Gastroenterology*. July 2003. Vol. 125, no. 1, p. 98–106.

REUBI, Jean Claude, 2007, Targeting CCK receptors in human cancers. *Current topics in medicinal chemistry*. 2007. Vol. 7, no. 12, p. 1239–1242.

RINKE, Anja, MICHL, Patrick and GRESS, Thomas, 2012, Medical Treatment of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers*. 8 February 2012. Vol. 4, no. 4, p. 113–129.

RUOSLAHTI, Erkki, BHATIA, Sangeeta N and SAILOR, Michael J, 2010, Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of cell biology*. 22 March 2010. Vol. 188, no. 6, p. 759–768.

SAILLAN-BARREAU, C., DUFRESNE, M., CLERC, P., SANCHEZ, D., COROMINOLA, H., MORISCOT, C., GUY-CROTTE, O., ESCRIEUT, C., VAYSSE, N. and GOMIS, R., 1999, Evidence for a functional role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in the human fetal and adult pancreas. *Diabetes*. 1999. Vol. 48, no. 10, p. 2015–2021.

SANCHEZ, Claire, EL HAJJ DIAB, Darine, CONNORD, Vincent, CLERC, Pascal, MEUNIER, Etienne, PIPY, Bernard, PAYRÉ, Bruno, TAN, Reasmey P, GOUGEON, Michel, CARREY, Julian, GIGOUX, Véronique and FOURMY, Daniel, 2014, Targeting a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors by magnetic nanoparticles to induce cell death. *ACS nano*. 25 February 2014. Vol. 8, no. 2, p. 1350–

1363.

SANCHEZ, Claire, EL HAJJ DIAB, Darine, CONNORD, Vincent, CLERC, Pascal, MEUNIER, Etienne, PIPY, Bernard, PAYRÉ, Bruno, TAN, Reasmey P., GOUGEON, Michel, CARREY, Julian, GIGOUX, Véronique and FOURMY, Daniel, 2014, Targeting a G-Protein-Coupled Receptor Overexpressed in Endocrine Tumors by Magnetic Nanoparticles To Induce Cell Death. *ACS Nano*. 25 February 2014. Vol. 8, no. 2, p. 1350–1363.

SCHUGHART, K., BISCHOFF, R., HADJI, D. A., BOUSSIF, O., PERRAUD, F., ACCART, N., RASMUSSEN, U. B., PAVIRANI, A., VAN ROOIJEN, N. and KOLBE, H. V., 1999, Effect of liposome-encapsulated clodronate pretreatment on synthetic vector-mediated gene expression in mice. *Gene Therapy*. March 1999. Vol. 6, no. 3, p. 448–453.

SCOTT, Mark G.H., BENMERAH, Alexandre and MARULLO, Stefano, 2004, Endocytose des récepteurs couplés aux protéines G. *médecine/sciences*. 15 January 2004. Vol. 20, no. 1, p. 78–83.

SINGH, Neenu, JENKINS, Gareth J.S., ASADI, Romisa and DOAK, Shareen H., 2010, Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*. 21 September 2010. Vol. 1, no. 0.

SMITH, J P, HAMORY, M W, VERDERAME, M F and ZAGON, I S, 1998, Quantitative analysis of gastrin mRNA and peptide in normal and cancerous human pancreas. *International journal of molecular medicine*. September 1998. Vol. 2, no. 3, p. 309–315.

SMITH, J P, SOLOMON, T E, BAGHERI, S and KRAMER, S, 1990, Cholecystokinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma SW-1990. *Digestive diseases and sciences*. November 1990. Vol. 35, no. 11, p. 1377–1384.

SUN, Hongliang, XU, Linfeng, FAN, Tianyuan, ZHAN, Hongzhi, WANG, Xiaodong, ZHOU, Yanfei and YANG, Ren-jie, 2013, Targeted hyperthermia after selective embolization with ferromagnetic nanoparticles in a VX2 rabbit liver tumor model. *International journal of nanomedicine*. 2013. Vol. 8, p. 3795–3804.

TAMM, Eric P, KIM, E Edmund and NG, Chuan S, 2007, Imaging of neuroendocrine tumors. *Hematology/oncology clinics of North America*. June 2007. Vol. 21, no. 3, p. 409–432; vii.

TANG, C, BIEMOND, I and LAMERS, C B, 1996, Cholecystokinin receptors in human pancreas and gallbladder muscle: a comparative study. *Gastroenterology*. December 1996. Vol. 111, no. 6, p. 1621–1626.

TANG, C., BIEMOND, I., OFFERHAUS, G. J., VERSPAGET, W. and LAMERS, C. B., 1997, Expression of receptors for gut peptides in human pancreatic adenocarcinoma and tumour-free pancreas. *British journal of cancer*. 1997. Vol. 75, no. 10, p. 1467.

TENENBAUM, Florence, 2000, Scintigraphie des récepteurs de la somatostatine (Octréoscan®) : exploration des tumeurs neuro-endocrines (TNE) d'origine digestive. *Médecine Thérapeutique*

*Endocrinologie & Reproduction*. 14 November 2000. Vol. 2, no. 5, p. 423–9.

TSIRLIN, A., OO, Y., SHARMA, R., KANSARA, A., GLIWA, A. and BANERJI, M.A., 2014, Pheochromocytoma: A review. *Maturitas*. March 2014. Vol. 77, no. 3, p. 229–238.

WATSON, Susan A, GRABOWSKA, Anna M, EL-ZAATARI, Mohamad and TAKHAR, Arjun, 2006, Gastrin - active participant or bystander in gastric carcinogenesis? *Nature reviews. Cancer*. December 2006. Vol. 6, no. 12, p. 936–946.

WEISSLEDER, R., STARK, D. D., ENGELSTAD, B. L., BACON, B. R., COMPTON, C. C., WHITE, D. L., JACOBS, P. and LEWIS, J., 1989, Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR. American journal of roentgenology*. January 1989. Vol. 152, no. 1, p. 167–173.  
PMID: 2783272

ZHOU, Jian-Jiang, CHEN, Man-Ling, ZHANG, Qun-Zhou, HU, Jian-Kun and WANG, Wen-Ling, 2004, Coexpression of cholecystokinin-B/gastrin receptor and gastrin gene in human gastric tissues and gastric cancer cell line. *World J Gastroenterol*. 2004. Vol. 10, no. 6, p. 791–794.

## DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES

Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.

Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à : [autorisation-projet@recherche.gouv.fr](mailto:autorisation-projet@recherche.gouv.fr)

Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).

Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5

N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par ..., aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.

### 1. INFORMATIONS GÉNÉRALES

#### 1.1. TITRE DU PROJET :

Ciblage de cellules tumorales par des nanoparticules magnétiques et hyperthermie magnétique chez des souris porteuses de xénogreffes

#### 1.2. Durée du projet :

5 ans

#### 1.3. Date prévue de début du projet :

### 2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

Les objectifs de cette étude consistent à analyser l'efficacité d'un ciblage thérapeutique de cellules tumorales in vivo par des nanoparticules magnétiques, puis à utiliser ces nanoparticules magnétiques comme agents anti-cancéreux pour induire une régression tumorale.

Le premier objectif abordera l'étude de la biodistribution de nanoparticules magnétiques et analysera le ciblage de cellules tumorales INR1-G9 de glucagonome de hamster exprimant le récepteur CCK2 xénotransfectées chez la souris swiss nude. Cette étude fera suite à des résultats *in vitro* encourageants, montrant une accumulation de nanoparticules décorées à leur surface de gastrine (ligand du récepteur CCK2) dans les cellules surexprimant le récepteur CCK2.

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont commerciales, leur biocompatibilité a déjà testée chez la souris. Elles présentent à leur surface un peptide, la gastrine (ligand du récepteur CCK2) pour permettre le ciblage vers les cellules tumorales surexprimant le récepteur CCK2. Elles seront injectées dans la circulation sanguine générale des souris xénotransfectées. La détection des nanoparticules est attendue au niveau de la tumeur, ainsi que dans le foie, la rate et le rein (capture des nanoparticules par le système SPM et élimination urinaire rapportée).

En cas de ciblage qualitativement et quantitativement suffisant, le second objectif consistera à étudier si l'application d'un champ magnétique alternatif peut induire une régression tumorale, comme marqueur d'efficacité de l'approche thérapeutique.

Les souris présentant une xénotransfection et ayant reçu une injection de nanoparticules seront soumises à un champ magnétique (en l'orientant vers la zone à traiter, la tumeur) et l'éventuelle régression tumorale sera analysée les jours suivant le traitement.

Le modèle animal retenu pour cette étude est un modèle murin swiss nude. Un total de 12 souris par mois maximum, soit 150 animaux par an maximum est retenu. Une collaboration avec un laboratoire du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon ayant développé un modèle murin d'inactivation du gène *Men1* est en cours d'élaboration. S'il aboutit, une partie des animaux prévus ci-dessus proviendra de ce nouveau modèle. Ceci permet de s'affranchir de l'étape de xénotransfection et de s'appuyer sur un modèle plus proche de la réalité.

Ce protocole a été développé dans un respect maximal de la règle des 3R mais cette étape *in vivo* s'inscrit logiquement comme la suite des résultats *in vitro* et l'on ne peut pas s'en affranchir à ce stade de recherche. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au maximum et une étape préliminaire de validation du protocole sur un faible nombre d'animaux est prévue. Des points limites concernant l'état général et la croissance tumorale ont été définis, et seront décrits dans la suite de ce document.

### 3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES

#### 3.1. L'établissement utilisateur (EU)

##### 3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :

- o Nom : Zootechnie de Ranguel
- o Numéro d'agrément : C3155507
- o Date de délivrance de l'agrément : 22 Juin 2012
- o Nom et prénom du responsable : BARREIRA Yara
- o Adresse électronique du responsable : yara.barreira@inserm.fr
- o Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU : BAUDELIN Cédric
- o Adresse électronique de ce délégataire : cedric.baudelin@inserm.fr



3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :  
Comité d'éthique de l'US06 / CREFRE : CEEA – 122

3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :

Nombre de responsables :

2

Responsable :

o Nom et prénom : Véronique Gigoux

o Adresse postale (avec le nom du laboratoire) :

EA 4552

INSERM/CHU Rangueil - Bt L3

1 avenue Jean Poulhès

BP 84225

31432 TOULOUSE Cedex 4, FRANCE

o Adresse électronique : veronique.gigoux@inserm.fr

o Téléphone : 05-31-22-41-14

Responsable :

o Nom et prénom : Daniel Fourmy

o Adresse postale (avec le nom du laboratoire) :

EA 4552

INSERM/CHU Rangueil - Bt L3

1 avenue Jean Poulhès

BP 84225

31432 TOULOUSE Cedex 4, FRANCE

o Adresse électronique : daniel.fourmy@inserm.fr

o Téléphone : 05-31-22-41-14

3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

o Nom et prénom : BAUDELIN Cédric

o Adresse postale (avec le nom du laboratoire) :

INSERM UPS / US006 / CREFRE

1 avenue Jean Poulhès 31432 Toulouse Cedex 4

o Adresse électronique : cedric.baudelin@inserm.fr

o Téléphone : 0534633730

3.2. Le personnel

- Compétences des personnes participant au projet :

- |                          |                                                            |                          |     |                          |     |
|--------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------|-----|--------------------------|-----|
| <input type="checkbox"/> | la conception des procédures expérimentales et des projets | <input type="checkbox"/> | oui | <input type="checkbox"/> | non |
| <input type="checkbox"/> | l'application de procédures expérimentales aux animaux     | <input type="checkbox"/> | oui | <input type="checkbox"/> | non |
| <input type="checkbox"/> | les soins aux animaux                                      | <input type="checkbox"/> | oui | <input type="checkbox"/> | non |
| <input type="checkbox"/> | la mise à mort des animaux                                 | <input type="checkbox"/> | oui | <input type="checkbox"/> | non |

### 3.3. Le projet

#### 3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- o justifié du point de vue éducatif ?
- o requis par la loi ?
- o justifié du point de vue scientifique ?

o Informations sur cette justification :

Démontrer l'efficacité d'un ciblage thérapeutique à l'aide de nanoparticules magnétiques présentant à leur surface un ligand capable de reconnaître un récepteur exprimé à la surface des cellules tumorales.

Mettre en évidence une nouvelle approche thérapeutique anti-cancéreuse : la nanothérapie ciblée par application d'un champ magnétique.

#### 3.3.2. Description du projet :

Le premier axe consistera à valider le ciblage de cellules tumorales (xénogreffes) à l'aide de nanoparticules magnétiques présentant à leur surface un ligand reconnaissant un récepteur surexprimé à la surface des cellules tumorales. Cette étude fait suite à des résultats *in vitro* encourageants, montrant une accumulation des nanoparticules comportant de la gastrine à leur surface (ligand du récepteur RCCK2) dans des cellules surexprimant le RCCK2. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont commerciales, leur biocompatibilité a été validée chez la souris. Une étude de la biodistribution des nanoparticules magnétiques au niveau de la tumeur, métastases et de différents organes clefs (foie, rein, rate...) susceptibles de retenir les nanoparticules sera réalisée.

Le deuxième axe consistera à développer des expériences d'application d'un champ magnétique sur les souris xénogreffées et ayant reçu une injection de nanoparticules. Nous évaluerons si l'application du champ magnétique peut induire une régression tumorale, marqueur d'efficacité de l'approche thérapeutique (hyperthermie magnétique).

#### 3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :

Dislocation cervicale

#### 3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

-

#### 3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse, infligées et

l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Hébergement dans des cages de 5 animaux maximum dans un portoir ventilé.

Observation clinique réalisée par le ou les responsable(s) du bien-être des animaux 2 fois par semaine et pesée 1 fois par semaine (perte de poids = indicateur connu de la souffrance chez les souris)

Anesthésie préalable à toute manipulation pouvant induire du stress ou de la douleur

Expérimentation menée sur une courte durée (1 semaine d'acclimatation, 2 semaines après l'injection des cellules tumorales, mise à mort 24h après injection des nanoparticules pour l'étude de la biodistribution ou 2 semaines injection des nanoparticules pour l'étude de la régression tumorale

### 3.4. Les animaux

3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :

Nous avons validé in vitro l'efficacité du ciblage de cellules tumorales exprimant le récepteur CCK2 à l'aide de nanoparticules comportant de la gastrine (ligand du RCKK2 à leur surface. Nous devons maintenant valider l'efficacité de ce ciblage in vivo, afin d'améliorer si besoin la conception de nanoparticules magnétiques qui pourront ensuite faire l'objet de test précliniques ou cliniques, notamment pour le dépistage des tumeurs.

Deuxièmement, nous avons validé que ces nanoparticules constituent in vitro, sur cellules tumorales en culture, un agent anti-cancéreux efficace. Nous devons maintenant valider que cette efficacité est réelle in vivo, sur un modèle murin de xénogreffes.

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

Souris ( <i>Mus musculus</i> )	<input type="checkbox"/>
Rats ( <i>Rattus norvegicus</i> )	<input type="checkbox"/>
Cobayes ( <i>Cavia porcellus</i> )	<input type="checkbox"/>
Hamsters (syriens) ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	<input type="checkbox"/>
Hamsters (chinois) ( <i>Cricetulus griseus</i> )	<input type="checkbox"/>
Gerbilles de Mongolie ( <i>Meriones unguiculatus</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres rongeurs (Rodentia)	<input type="checkbox"/>
Lapins ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	<input type="checkbox"/>
Chats ( <i>Felis catus</i> )	<input type="checkbox"/>
Chiens ( <i>Canis familiaris</i> )	<input type="checkbox"/>
Furets ( <i>Mustela putorius furo</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres carnivores (carnivora)	<input type="checkbox"/>
Chevaux, ânes et croisements (Equidae)	<input type="checkbox"/>
Porcs ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	<input type="checkbox"/>
Caprins ( <i>Capra aegagrus hircus</i> )	<input type="checkbox"/>
Ovins ( <i>Ovis aries</i> )	<input type="checkbox"/>
Bovins ( <i>Bos primigenius</i> )	<input type="checkbox"/>
Prosimiens (prosimia)	<input type="checkbox"/>
Ouistitis et tamarins (par exemple, <i>Callithrix jacchus</i> )	<input type="checkbox"/>
Singe cynomolgus ( <i>Macaca fascicularis</i> )	<input type="checkbox"/>
Singe rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> )	<input type="checkbox"/>
Vervets <i>chlorocebus</i> spp. (généralement soit <i>pygerythrus</i> , soit <i>sabaeus</i> )	<input type="checkbox"/>

Babouins ( <i>Papio spp.</i> )	<input type="checkbox"/>
Saimiris (par exemple, <i>Saimiri sciureus</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres espèces de primates non humains (autres espèces de Ceboidea et Cercopithecoidea)	<input type="checkbox"/>
Singes anthropoïdes (Hominoidea)	<input type="checkbox"/>
Autres mammifères (autres Mammalia)	<input type="checkbox"/>
Poules domestiques ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres oiseaux (autres Aves)	<input type="checkbox"/>
Reptiles (Reptilia)	<input type="checkbox"/>
Grenouilles <i>Rana</i> ( <i>Rana temporaria</i> et <i>Rana pipiens</i> )	<input type="checkbox"/>
Grenouilles <i>Xenopus</i> ( <i>Xenopus laevis</i> et <i>Xenopus tropicalis</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres amphibiens (autres Amphibia)	<input type="checkbox"/>
Poissons zèbres ( <i>Danio rerio</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres poissons (autres Pisces)	<input type="checkbox"/>
Céphalopodes (Cephalopoda)	<input type="checkbox"/>

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :

Des données dans la littérature montrent une bonne tolérance des souris au protocole envisagé et la biocompatibilité des nanoparticules utilisées dans cette espèce.

D'autre part, nous avons antérieurement validé que le modèle cellulaire utilisé (INR1-G9, glucagonome de hamster) permet de réaliser des xénogreffes chez la souris nude dans de bonnes conditions, sans souffrance de l'animal.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?  oui  non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

-

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ?  oui  non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

-

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ?  oui  non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

-

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ?  oui  non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

-

### 3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

- Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)
- Animaux non domestiques non tenus en captivité
- Animaux génétiquement altérés  (  )

#### o Animaux non domestiques non tenus en captivité

Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :

-

Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :

-

Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :

-

#### o Animaux génétiquement altérés

Animaux génétiquement modifiés  oui  non

Si oui :

• Création d'une lignée  oui  non

• Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation  oui  non

o Phénotype non dommageable  oui  non

o Phénotype dommageable  oui  non

Souche mutante autre  oui  non

Si oui :

• Création d'un mutant  oui  non

• Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation  oui  non

o Phénotype non dommageable  oui  non

o Phénotype dommageable  oui  non

### 3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

o Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?

oui  non

Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :

1

Etablissement :

- Nom :  
Charles River
- Adresse postale :  
Charles River Lab France BP 0109 69592 l'arbresle Cedex
- Animaux fournis :  
Souris swiss nude

Si non, justifier scientifiquement l'utilisation d'animaux qui ne proviennent pas d'éleveurs ou de fournisseurs agréés :

-

o Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?  
 oui  non

o Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?  
 oui  non

o Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet ?

1

Etablissement :

- Nom :  
CRCL UMR Inserm 1052 – CNRS 5286
- Adresse postale :  
Centre Léon Bérard Bât. Cheney D - 2ème étage  
28 rue Laënnec 69373 LYON cedex 08
- Animaux fournis :  
Modèle murin d'invalidation du gène Men1

o Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet ?

-

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

o Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?

-

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :

- o Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?  
 oui  non

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :  
1 groupe de 12 souris par mois soit 150 animaux maximum par an

- o Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :  
Nous prévoyons des séries d'une douzaine d'animaux (xénogreffes, injection des nanoparticules, analyse du ciblage ou régression tumorale). Une expérience par mois est envisagée pour le moment.

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier :  
Jeunes adultes

Ce choix se justifie d'une part par la réalisation plus facile de la chirurgie chez de jeunes adultes n'ayant encore qu'une faible couverture graisseuse, et d'autre part par la nécessité de conserver les animaux pendant 1 mois par la suite (2 semaines de croissance tumorale et 2 semaines suite à l'application d'un champ magnétique pour évaluer la régression tumorale)

3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :

Animaux femelles

Ce choix se justifie par la volonté d'éviter un éventuel effet sexe et par les facilités d'hébergement des animaux.

3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Perte de poids de 20% par rapport au poids initial

Nécrose ou ulcération des tumeurs cutanées macroscopiquement visible

Tumeur cutanée atteignant 2 cm<sup>3</sup>

## 4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale.

B - Les recherches transactionnelles ou appliquées menées pour :

- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;  
- l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;  
- le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.

C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.

D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.

E- La recherche en vue de la conservation des espèces.

F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.

G - Les enquêtes médico-légales.

4.2 Nombre de procédures expérimentales :

3

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

Mise en place du modèle de xénogreffes

Xénogreffe de cellules tumorales par injection sous-cutanée ou intra-pancréatique de 5.106 cellules de glucagonome de hamster dans 50µL de PBS après anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane et surveillance macroscopique de l'évolution tumorale pendant 2 semaines

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Développement du modèle de xénogreffes sous-cutanées et intra-pancréatiques.



Des xénogreffes sur souris swiss nude seront réalisées à partir d'une lignée tumorale cellulaire établie, issue d'un glucagonome de hamster (INR1G9). Ces xénogreffes seront soit sous-cutanées, soit intra-pancréatiques, sous anesthésie et avec microchirurgie (dans le second cas).

Anesthésie gazeuse avec induction et maintien à l'isoflurane au masque pendant la durée de l'injection des cellules par voie sous-cutanée ou pendant la laparotomie et l'injection des nanoparticules en intra-pancréatique avec surveillance des fréquences cardiaque et respiratoire et de la température de la souris

(protocole déjà validé par une autre équipe de recherche comme bien supporté par les animaux, avec un réveil sans anomalie après l'intervention et une reprise rapide de l'alimentation et de la boisson ainsi qu'une vigilance et un état clinique général normaux)

Injection des cellules avec une aiguille de diamètre minimal (26G)

Hébergement dans des cages de 4 animaux maximum, dans des portoirs ventilés, avec surveillance clinique journalière par les responsables de l'animalerie et surveillance clinique bi-hebdomadaire avec pesée hebdomadaire par les responsables de la procédure expérimentale pendant les 2 semaines nécessaires à la progression tumorale.

Mesure journalière de la croissance tumorale.

Enrichissement du milieu : constitution d'un groupe conservé du début à la fin de l'expérimentation afin de ménager des interactions sociales ; mise à disposition de textiles pour l'aménagement d'un nid (ceci permettant également de s'assurer de la vivacité des animaux en post opératoire suite à la réalisation de xénogreffes) ; dispositif de distribution de la nourriture en hauteur permettant également l'exploration de la cage lors des phases d'éveil

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :  
2 lots de 6 animaux par expérience

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :  
Pas de prélèvement pour cette procédure

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Euthanasie humanitaire en cas d'anomalie clinique majeure lors du développement tumoral (par exemple nécrose tumorale faisant suite à un développement tumoral anormalement rapide), de tumeur atteignant une taille supérieure à 2 cm<sup>3</sup> ou de signes cliniques sévères non reliés à la procédure expérimentale

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

-

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

-

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

-

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

Préparation du nombre exact de souris nécessaires à la procédure expérimentale n°2  
Evaluation de l'efficacité du ciblage prévue après une première procédure-test effectuée sur 12 animaux porteurs de xénogreffes (4 animaux contrôles et 8 animaux recevant une injection de nanoparticules comme définie dans la procédure n°2) avant mise en place d'une procédure impliquant un plus grand nombre d'animaux

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

o mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

Dans la procédure de vérification du ciblage des tumeurs par les nanoparticules magnétiques (procédure N°2)

o animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

Maintien en vie en attente de la procédure expérimentale n°3, le temps que les tumeurs se développent, soit 2 semaines

o placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

-

#### 4.2.2 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

Ciblage des tumeurs par des nanoparticules magnétiques

Injection de nanoparticules magnétiques vectorisées ou non (50 µg de fer dans 150 µL de PBS) au niveau de la veine jugulaire de souris porteuses de xénogreffes (et éventuellement de souris chez lesquelles le gène Men1 est invalidé (collaboration en cours de discussion)). Mise à mort 24 heures après injection afin d'étudier la biodistribution des nanoparticules vectorisées ou non (suite de la procédure n°1)

Anesthésie gazeuse avec induction et maintien à l'isoflurane au masque pendant la durée de l'injection des nanoparticules

Hébergement dans des cages de 4 animaux maximum, dans des portoirs ventilés (conservation des mêmes groupes de souris)

Mise à mort 24h après injection des nanoparticules par dislocation cervicale suite à anesthésie générale à l'isoflurane

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Préalable nécessaire à la détermination de la biodistribution des nanoparticules

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

6 lots de 2 à 6 souris (3 lots avec xénogreffe sous-cutanée et 3 avec xénogreffe intrapancréatique) / (éventuellement : 3 lots de 2 à 6 souris appartenant au modèle murin d'invalidation du gène Men1 développé par le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon ; collaboration en cours de discussion)

Nous envisageons de réaliser plusieurs lots parmi les souris porteuses de chaque type de xénogreffe (sous-cutanée ou intrapancréatique) / les souris du modèle d'invalidation du Men1 : 1 lot contrôle recevant 150 µL de PBS ; 1 lot contrôle recevant des nanoparticules non vectorisées (50µg de fer dans 150 µL de PBS) (une accumulation dans les organes du système des phagocytes mono-nucléés est attendue par captation par les macrophages ; ce lot permet de différencier un réel ciblage des cellules tumorales par les nanoparticules vectorisées et une accumulation de ces mêmes nanoparticules par simple effet EPR) ; 1 lot recevant des nanoparticules vectorisées (une accumulation dans la tumeur est attendue, ainsi que possiblement dans le foie, la rate et le rein).

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

-

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane au masque

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

-

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

-

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

-

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

Prélèvement et stockage de l'ensemble des organes d'intérêt (foie, rate, reins, poumons, estomac, cerveau, tumeur) et d'un échantillon sanguin des souris mises à mort en vue d'une éventuelle recherche systémique des nanoparticules

Evaluation de l'efficacité du ciblage prévue après une première procédure-test effectuée sur 12 animaux porteurs de xénogreffes (6 animaux contrôles et 6 animaux recevant une injection de nanoparticules) avant mise en place d'une procédure impliquant un plus grand nombre d'animaux

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

o mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

Ensemble des animaux de la procédure expérimentale n°2

o animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

-

o placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

-

#### 4.2.3 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 3 :

Régression tumorale induite par des nanoparticules et application d'un champ magnétique

Cette procédure consistera à étudier la régression tumorale chez des souris swiss nude porteuses de xénogreffes de glucagonome de hamster suite à une thérapie par application de champ magnétique

Le début de la procédure sera équivalente à celle de la procédure N°2 : xénogreffes (5.106 cellules dans 50  $\mu$ L de PBS), croissance tumorale pendant 2 semaines, injection de nanoparticules (50  $\mu$ g de fer dans 150  $\mu$ L de PBS).

L'animal sera ensuite placé sous un champ magnétique, en orientant celui-ci sur la zone tumorale, afin de réaliser une étude de régression tumorale. Les animaux seront suivis quotidiennement (pesée, mesure de la tumeur par échographie à l'aide du Vevo scanner disponible à l'animalerie de Rangueil) et seront sacrifiés une à deux semaines après application du champ magnétique ou en cas de souffrance. Le nombre d'applications du champ et la durée de mesure de la régression tumorale seront à déterminer en fonction des premiers résultats.

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Préalable nécessaire à la détermination d'une régression tumorale induite par l'utilisation de nanoparticules magnétiques et application d'un champ magnétique

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

4 lots de 2 à 6 souris / (éventuellement : 2 lots de 2 à 6 souris appartenant au modèle murin d'inactivation du gène Men1 développé par le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon ; collaboration en cours de discussion)

Nous envisageons 2 lots de souris avec xénogreffes sous-cutanées, 2 lots de souris avec xénogreffes intra-pancréatiques et éventuellement 2 lots de souris du modèle d'inactivation du gène Men1 : 1 lot contrôle recevant 150 µL de PBS et 1 lot recevant des nanoparticules vectorisées (50µg de fer dans 150 µL de PBS).

(Il apparaît ici inutile, voire néfaste pour la souris, d'utiliser des nanoparticules non vectorisées, puisque l'accumulation de celles-ci est attendue dans le foie et la rate ; l'inclusion de nanoparticules non vectorisées dans la procédure expérimentale n°3 n'interviendra que si les résultats de la procédure n°2 montrent un effet EPR majoritaire et une faible accumulation dans les organes du système des phagocytes mononucléés, permettant la réalisation de l'hyperthermie sans risque majeur pour la souris).

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Prélèvement sanguin rétro-orbital unique de 300 µL environ, immédiatement avant la mise à mort par dislocation cervicale

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'anxiété (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane au masque ou après intubation endotrachéale

Arrêt de l'abreuvement une heure avant la procédure et vidange manuelle de la vessie après induction de l'anesthésie afin de limiter les effets délétères possibles du champ magnétique alternatif

Suivi de la température intra-rectale et buccale par sonde optique, et au niveau de la tumeur (si sous-cutanée) par caméra thermique

Hébergement dans des cages de 4 animaux maximum, dans des portoirs ventilés, avec surveillance clinique journalière par les responsables de l'animalerie et surveillance clinique bi-hebdomadaire avec pesée hebdomadaire par les responsables de la procédure expérimentale pendant les 2 semaines nécessaires au suivi de la régression tumorale

Enrichissement du milieu : constitution d'un groupe conservé du début à la fin de l'expérimentation afin de ménager des interactions sociales ; mise à disposition de textiles pour l'aménagement d'un nid (ceci permettant également de s'assurer de la vivacité des animaux en post opératoire) ; dispositif de distribution de la nourriture en hauteur permettant également l'exploration de la cage lors des phases d'éveil

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Arrêt de l'application du champ magnétique si élévation anormale de la température de l'animal

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

-

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

-

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

Prélèvement et stockage de l'ensemble des organes d'intérêt (foie, rate, reins, poumons, estomac, cerveau, tumeur) et d'un échantillon sanguin des souris mises à mort en vue d'une éventuelle recherche systémique des nanoparticules dans un second temps

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

o mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

Ensemble des animaux

o animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

-

o placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

-

4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :

- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES :

légère

modérée

sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie ?  oui  non

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général ?  oui  non

4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager

- De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

## Annexe 2 : Informations sur les souris « nude »

Les souris nude sont caractérisées par une mutation autosomale récessive du gène *Foxn1* codant pour la protéine Forkhead Box N1, localisé sur le chromosome 11. Il s'agit d'un facteur de transcription qui, lorsqu'il est muté, perd son domaine de fixation à l'ADN. Il s'ensuit un blocage de la différenciation des cellules épithéliales du thymus, d'où le phénotype caractéristique de ces souris.

Cette mutation est apparue initialement chez des souris albinos non consanguines dites swiss, d'où l'appellation « swiss nude ». Ces souris sont de poids inférieur à la moyenne des animaux de cette espèce (-20% environ) et ont une durée de vie réduite.

Par la suite, cette mutation a été fixée sur une souche de souris non consanguines NMRI (Naval Medical Research Institute) en raison d'une plus grande viabilité et d'une fertilité plus importante. Les lignées « nude » sont entretenues en accouplant des mâles homozygotes avec des femelles hétérozygotes au phénotype normal (les femelles homozygotes sont incapables d'allaiter les souriceaux).

Les souris nude présentent une aplasie du thymus, d'où une absence de lymphocytes T. Les lymphocytes B sont présents en quantité normale chez les jeunes, puis décroissent dès l'âge de 7 semaines. Elles conservent des cellules T-like, des macrophages et des cellules Natural-Killer, dont l'activité augmente en retour. Une autre caractéristique phénotypique consiste en l'absence de pelage.



Souris swiss nude

(<http://www.janvier-labs.com/par-especes/souris-mutantes/product/nmri-nu.html>)



### **Annexe 3 : Réalisation des xénogreffes intra-pancréatiques**

#### **1. Préparation des cellules**

- Traiter les cellules en culture avec 5mL de trypsine
- Resuspendre dans 10mL de milieu RPMI 10% SVF
- Centrifuger (1000rpm, 5min)
- Compter
- Centrifuger à nouveau (1000rpm, 5min)
- Resuspendre à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  cellules dans 50 $\mu$ L
- Compter
- Placer les échantillons immédiatement dans de la glace

#### **2. Induction d'une anesthésie gazeuse à l'isoflurane** (cage à isoflurane puis relais au masque ; positionnement sur plaque chauffante)

#### **3. Laparotomie sous-costale**

- Nettoyage chirurgical de l'abdomen gauche
- Incision cutanée oblique sur 1cm en arrière des côtes (suivant une ligne partant de la pointe de l'épaule vers le grasset)
- Dilacération du tissu sous-cutané
- Incision de la paroi musculaire sur env. 1cm
- Extériorisation du pancréas et de la rate (traction douce à la pince mousse sur la queue du pancréas)
- Humidification des tissus
- Repérage de la veine splénique et de l'organisation de la vascularisation propre au pancréas de chaque souris
- Injection des cellules dans le corps du pancréas entre les différents vaisseaux, en maintenant une traction douce à la pince mousse sur la queue du pancréas
- Réintégration des organes dans l'abdomen
- Rinçage avec du sérum physiologique tiédi
- Suture musculaire et cutanée (points simples, fil résorbable 6.0)
- Application d'une solution désinfectante type Betadine

NOM : MEUNIER

PRENOM : Solène

**TITRE : ÉTUDE PRÉLIMINAIRE IN VIVO DU CIBLAGE DIAGNOSTIQUE ET THÉRAPEUTIQUE DES TUMEURS ENDOCRINES DU PANCRÉAS CHEZ LA SOURIS SWISS NUDE PAR DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER SUPERPARAMAGNETIQUES VECTORISÉES PAR UN ANALOGUE DE LA GASTRINE (MG-IONP-DY647)**

**RÉSUMÉ** : Les limites diagnostiques et thérapeutiques en cancérologie ont conduit à l'essor de nouveaux agents afin de cibler spécifiquement des tumeurs surexprimant des récepteurs membranaires. Le nanovecteur MG-IONP-DY647 a ainsi été développé afin de cibler les nombreuses tumeurs endocrines surexprimant le RCCK2. L'objectif de ce travail était de déterminer le protocole expérimental destiné d'une part à étudier la biodistribution de ces nanoparticules chez des souris swiss nude porteuses de xénogreffes de glucagonome de hamster, et d'autre part à évaluer l'efficacité d'un traitement par hyperthermie. Un ciblage des tumeurs intra-pancréatiques, ainsi qu'une faible rétention dans le SPM, ont pu être mis en évidence par coloration de Perls (sensibilité et spécificité limitées) et détection de la fluorescence des nanoparticules, et quantifié par des mesures magnétiques. Ces résultats nous ont conduits à initier une éradication tumorale par hyperthermie.

**MOTS-CLÉS** : Biodistribution - Ciblage - Récepteur - Hyperthermie magnétique - Nanoparticules - Tumeurs endocrines - Pancréas - Souris swiss nude

---

**TITLE : PRELIMINARY IN VIVO STUDY OF THE THERNOSTIC TARGETING OF PANCREATIC ENDOCRINE TUMORS IN NUDE MICE BY GASTRIN-LABELED SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES (MG-IONP-DY647)**

**ABSTRACT** : Diagnostic and therapeutic limitations in the field of oncology led to the development of new agents to specifically target tumors overexpressing membrane receptors. The MG-nanovector IONP-DY647 has been developed to target many endocrine tumors overexpressing RCCK2. The objective of this study was to determine the experimental protocol to firstly study the biodistribution of these nanoparticles in swiss nude mice bearing hamster glucagonoma xenografts, and secondly to assess the effectiveness of a hyperthermia treatment. An effective targeting of the intra-pancreatic tumors, and a low retention in the SPM, has been demonstrated by Prussian blue staining (limited sensibility and specificity) and fluorescence detection, and quantified by magnetic measurements. The results led us to initiate tumor eradication by hyperthermia.

**KEYWORDS** : Biodistribution – Magnetic hyperthermia – Nanoparticles – Endocrine tumors – Pancreas – Swiss nude mice