

N° d'ordre : 3934

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **SEBASTIEN LAVIELLE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

**SYNTHÈSE DE MOLECULES FLUOREES POUR LE  
DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEL OUTIL DE NANO IMAGERIE.  
APPLICATION A L'IMAGERIE DE L'ANGIOGENESE  
PATHOLOGIQUE.**

Soutenue le 17 décembre 2009

Après avis de :

Mme Marie-Claire Lasne  
Mr Michel Vidal

Professeur Université Caen Basse-Normandie  
Professeur Université Paris Descartes 5

*Rapporteur*  
*Rapporteur*

Devant la Commission d'examen formée de :

Mr Bernard Lavielle	<i>Président</i>
Mme Marie-Claire Lasne	<i>Rapporteur</i>
Mr Michel Vidal	<i>Rapporteur</i>
Mr Andreas Bikfalvi	<i>Examineur</i>
Mr Frédéric Dollé	<i>Examineur</i>
Mr Gérard Déléris	<i>Directeur de thèse</i>
Mme Karine Gionnet	<i>Directeur de thèse</i>

# Tables des matières

## LISTE DES FIGURES, DES SCHEMAS ET DES TABLEAUX

## LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ANGLICISMES

## INTRODUCTION GENERALE

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le processus angiogénique.....	19
1.1. L'angiogenèse.....	19
1.1.1. Développement et mécanismes de l'angiogenèse .....	19
1.1.2. Switch angiogénique lors de processus cancéreux.....	21
1.1.3. Angiogenèse tumorale.....	23
1.2. Régulateurs de l'angiogenèse .....	25
1.2.1. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse physiologique.....	26
1.2.2. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse tumorale .....	26
1.2.3. Structure du VEGF .....	27
1.3. Récepteurs du VEGF .....	28
1.4. Autre marqueur de l'angiogenèse tumorale : les intégrines .....	30
1.4.1. Rôles des intégrines.....	30
1.4.2. Structure de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ .....	30

1.4.3.	Ligands spécifiques de l'Intégrine $\alpha_v\beta_3$ .....	32
2.	Imagerie médicale .....	32
2.1.	Evolution de l'imagerie médicale.....	32
2.2.	Imagerie de l'angiogenèse tumorale.....	33
2.2.1.	Angiographie.....	34
2.2.2.	Ultrasonographie .....	37
2.2.3.	Microscopie biphotonique intravitale.....	39
2.2.4.	Imagerie par Résonance Magnétique ou IRM.....	41
2.2.5.	Imagerie radionucléaire.....	44
2.2.5.1.	Imagerie TEMP.....	45
2.2.5.2.	Imagerie TEP .....	48
2.2.5.2.1.	Métabolisation du glucose et du FDG.....	52
2.2.5.2.2.	Traceur de l'angiogenèse tumorale.....	56
3.	Analyses du fluor 19 .....	58
3.1.	Le fluor 19.....	58
3.1.1.	Historique de la chimie du fluor.....	58
3.1.2.	Propriétés et effets du fluor .....	59
3.2.	Méthodes de détection du fluor.....	60
3.2.1.	Dosage colorimétrique .....	60
3.2.2.	Dosage potentiométrique.....	61
3.2.3.	Spectrométrie de masse d'ions secondaires ou SIMS.....	61
3.2.4.	Microsonde nucléaire : analyses par faisceaux d'ions .....	62
3.2.4.1.	Principe .....	63

3.2.4.2. Techniques d'analyses .....	64
3.2.4.2.1. PIXE.....	64
3.2.4.2.2. PIGE.....	66
4. Analyse par faisceaux d'ions complémentaire : technique RBS.....	68

## RESULTATS ET DISCUSSION

1. Détection du FDG par analyses par faisceaux d'ions .....	72
1.1. Détermination des paramètres expérimentaux .....	72
1.1.1. Fonction d'excitation et section efficace.....	74
1.1.2. Quantification du fluor .....	75
1.1.3. Limite de détection et limite de quantification de la PIGE .....	76
1.2. Etude préliminaire de quantification du FDG dans des cellules en culture .....	78
1.2.1. Quantification du FDG par PIXE dans des cellules en culture .....	78
1.2.2. Quantification du FDG par PIGE dans des cellules en culture .....	80
1.2.3. Détection multiélémentaire .....	81
1.2.4. Bilan de l'étude de faisabilité.....	84
1.3. Etude de la biodistribution du FDG dans un tissu.....	86
1.3.1. Modèle biologique.....	86
1.3.2. Quantification du FDG dans des échantillons de CAM et des coupes tumorales	88
2. Traceurs polyfluorés du métabolisme du glucose .....	93
2.1. Etude structure activité.....	94

2.2.	Synthèse du glucose polyfluoré.....	96
2.3.	Etude de la biodistribution du glucose polyfluoré dans un tissu.....	97
3.	Traceur de l'angiogenèse tumorale .....	101
3.1.	Conception de mimes peptidiques ciblant des récepteurs VEGFR-2 .....	101
3.2.	Synthèses de peptides fonctionnalisables.....	103
3.2.1.	Fonctionnalisation de la résine .....	104
3.2.2.	Synthèse du cyclopeptide en phase solide.....	105
3.2.3.	Synthèse du bras polyfluoré .....	107
3.3.	Etude de biodistribution du F13 CBO-P11 .....	109

## CONCLUSION

## PARTIE EXPERIMENTALE

1.	Synthèses.....	118
	Techniques générales .....	118
2.	Préparation des solutions injectables.....	135
3.	Modèles biologiques .....	136
3.1.	Culture cellulaire IGROV1-p .....	136
3.2.	Culture cellulaire U87 .....	137
3.3.	Implantation des cellules U87 dans les embryons de poulet et injection du traceur 137	
4.	Préparation des cibles pour les analyses PIGE.....	138

4.1.	Support d'analyse .....	138
4.2.	Préparation des cibles de suspensions cellulaires IGROV1-p .....	139
4.3.	Préparation des cibles d'échantillons de CAM et de coupes tumorales.....	139
5.	Dispositif expérimental de la ligne microsonde.....	141
6.	Traitement des données .....	143

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Liste des figures, des schémas et des tableaux

Figure 1. Les mécanismes de l'angiogenèse	20
Figure 2. Angiogenèse intussusceptive	21
Figure 3. Switch angiogénique	22
Figure 4. Etapes de l'angiogenèse tumorale	24
Figure 5. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse tumorale	27
Figure 6. Famille des VEGFs et leurs récepteurs	29
Figure 7. Intégrine $\alpha_v\beta_3$	31
Figure 8. Principe du scanner	35
Figure 9. Exemple d'angiographie X	36
Figure 10. Exemple d'utilisation de TDM	36
Figure 11. Schéma de principe de l'échographie	37
Figure 12. Exemple d'utilisation de doppler couleur	39
Figure 13. Principe de la microscopie biphotonique intravitale	40
Figure 14. Exemple d'utilisation de la microscopie biphotonique intravitale	41
Figure 15. Principe de la RMN	42
Figure 16. Exemple d'utilisation de l'IRM	43
Figure 17. Principe de fonctionnement d'un gamma caméra	45
Figure 18. Structure du $^{111}\text{In}$ -DOTA-RAFT-RGD	47
Figure 19. Exemple d'utilisation de la TEMP	47
Figure 20. Désintégration du positon et réaction d'annihilation	49
Figure 21. Nature des évènements enregistrés en coïncidence	51

Figure 22. Transport et métabolisme du glucose	53
Figure 23. Molécule de FDG	54
Figure 24. Transport et métabolisme du FDG	55
Figure 25. Exemple d'utilisation de la TEP	56
Figure 26. Imagerie microPET de souris avec tumeur implantée	57
Figure 27. Principe de la méthode SIMS	62
Figure 28. Analyses par faisceaux d'ions	63
Figure 29. Ligne microsonde de la plate-forme AIFIRA	64
Figure 30. Schéma de principe d'émission X par des particules chargées accélérées	65
Figure 31. Transitions électroniques conduisant à la production d'émission X	65
Figure 32. Principe de la diffusion Rutherford	69
Figure 33. Fonctions d'excitation des photons gamma de 110 et 197 keV	74
Figure 34. Spectre PIXE de cellules IGROV1-p incubées avec du FDG	79
Figure 35. Spectre PIGE de cellules IGROV1-p incubées avec du FDG	80
Figure 36. Spectre PIXE basse énergie du NBS620	82
Figure 37. Spectre PIXE basse énergie d'un échantillon biologique	83
Figure 38. Photographie de capillaires sur un échantillon de CAM et cartographies du fer et du fluor correspondantes	84
Figure 39. Concentration intracellulaire de fluor dans des cellules tumorales	85
Figure 40. Membrane chorio-allantoïdienne de poulet	87
Figure 41. Schéma de découpe de la tumeur de l'échantillon	89
Figure 42. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une CAM exposée au FDG	90

Figure 43. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une coupe tumorale exposée au FDG	-----	91
Figure 44. Molécule de beta-D-glucopyranose	-----	94
Figure 45. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une CAM exposée au glucose Polyfluoré	-----	98
Figure 46. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une coupe tumorale exposée au glucose polyfluoré	-----	99
Figure 47. Structure 3D du VEGF et de la séquence 79-93	-----	102
Figure 48. Site de cyclisation et de fonctionnalisation du CBO-P11	-----	104
Figure 49. Courbe dose réponse du F13 CBO-P11	-----	109
Figure 50. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une coupe tumorale exposée au F13 CBO-P11	-----	110
Figure 51. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une CAM exposé au F13 CBO-P11	----	111
Figure 52. Echantillon de tissu sain développé sur la grille en nylon	-----	139
Figure 53. Récupération d'une tumeur implantée	-----	140
Figure 54. Echantillon de CAM déposé sur une cible en aluminium	-----	140
Figure 55. Dispositif expérimental de la ligne microsonde	-----	142
Figure 56. Chambre d'analyse de la ligne microsonde	-----	142
Figure 57. Spectre PIGE entier d'une coupe tumorale et reconstruction de la zone analysée par Supavisio	-----	143
Figure 58. Spectre RBS d'une coupe tumorale déposée sur un film de polycarbonate	-----	144

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des principaux isotopes émetteurs de positons utilisés en TEP -----	49
Tableau 2 : Analyses du standard CaF <sub>2</sub> -----	77
Tableau 3 : Energie des photons X des éléments constitutifs du NBS620 -----	82
Tableau 4 : Concentration en fluor des échantillons sains et tumoraux exposés aux solutions de FDG -----	91
Tableau 5 : Concentration en fluor des échantillons sains et tumoraux exposés à la solution de glucose polyfluoré -----	99
Tableau 6 : Concentration en fluor des échantillons sains et tumoraux exposés aux solutions de F13 CBO-P11 -----	111
Schéma 1 : Synthèse du glucose polyfluoré -----	96
Schéma 2 : Obtention de la résine Fmoc-Glu(2-CITrt)-OAll -----	105
Schéma 3 : Synthèse du CBO-P11 en phase solide -----	106
Schéma 4 : Obtention du TEG bifonctionnalisé -----	107
Schéma 5 : Intégration de la chaîne polyfluoré sur l'espaceur TEG -----	108
Schéma 6 : Obtention du traceur F13 CBO-P11 -----	108

## Liste des abréviations et des anglicismes

AIFIRA :	applications interdisciplinaires de faisceaux d'ions en région Aquitaine
ARN :	acide ribonucléique
CAM :	chorioallantoic membrane, membrane chorio-allantoïdienne
CCM :	chromatographie sur couche mince
CT :	computed tomography
DCM :	dichlorométhane
DIEA :	N,N-diisopropyléthylamine
DMF :	N,N-diméthylformamide
EDTA :	ethylenediaminetetraacetic acid
FDG :	2-fluoro-2-désoxy-D-glucose
FGF-2 :	fibroblast growth factor-2
Fmoc :	9-fluorénylméthoxycarbonyle
GLUT :	glucose transporter
HBTU :	O-(1H-benzotriazole-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HMBC :	heteronuclear multiple bond correlation
HOBt :	N-hydroxybenzotriazole
HPLC :	high performance liquid chromatography
HSQC :	heteronuclear single quantum correlation
INSEE :	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

IRM :	imagerie par résonance magnétique
IRM-DCE :	dynamic contrast enhanced
MALDI :	matrix-assisted laser desorption/ ionization
NMP :	N-methyl-2-pyrrolidone
Pbf :	2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle
PBS :	phosphate buffered saline
PDGF :	platelet derived growth factor
PIGE :	particle induced $\gamma$ -ray emission
PIXE :	particle induced X-ray emission
PVDF :	polyvinylidene fluoride
PyBOP :	benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphate
RBS :	Rutherford backscattering spectrometry
RMN :	résonance magnétique nucléaire
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute Medium
RTK :	récepteurs à activité tyrosine kinase
SIMS :	spectrométrie de masse d'ions secondaires
SPPS :	synthèse peptidique en phase solide
TAF :	tumor angiogenic factor
TDM :	tomodensitométrie
TEMP :	tomographie d'émission monophotonique
TEP :	tomographie par émission de positons
TFA :	acide trifluoroacétique
THF :	tétrahydrofurane

TMS : triméthylsilane

Trt : trityle

VEGF : vascular endothelial growth factor

## **Introduction générale**

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans l'UMR CNRS 5084 CNAB et plus particulièrement au sein du Groupe de Chimie Bio-Organique, situé à l'Université *Victor Segalen* Bordeaux 2.

Cette unité de recherche développe trois thèmes de recherches : Chimie pour le Vivant, Cosmochimie/Datation/Géochimie Environnementale, et Environnement/Chimie Nucléaire. L'activité du laboratoire de Chimie Bio-Organique porte sur la synthèse de molécules originales à finalité thérapeutique ainsi que sur la conception et l'évaluation de systèmes permettant d'imager l'angiogenèse tumorale.

L'angiogenèse est le phénomène qui conduit à la création de nouveaux vaisseaux sanguins. C'est un processus physiologique normal, que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire. Mais c'est aussi un processus pathologique, primordial dans la croissance des tumeurs malignes et dans le développement des métastases. Les thérapies antiangiogéniques constituent à ce jour l'un des domaines les plus prometteurs pour le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses. L'obtention de systèmes sélectifs de vectorisation d'agents d'imagerie ou d'agents thérapeutiques est donc un enjeu majeur dans la recherche médicale.

Au cours du processus angiogénique, l'implication prédominante des facteurs de croissance et la surexpression de leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux font de ces effecteurs des cibles particulièrement intéressantes pour le développement d'agents d'imagerie de l'angiogenèse tumorale.

Depuis la découverte des rayons X par W.C. Röntgen en 1895 et les premières radiographies, l'imagerie médicale a révolutionné la médecine. Les différentes modalités développées ont permis d'avoir un accès immédiat et fiable à des informations inaccessibles par le diagnostic clinique. Au départ, l'imagerie médicale est essentiellement utilisée pour des analyses morphologiques ou fonctionnelles des tissus afin de comprendre le développement et la physiologie des organes vitaux et d'apprécier la présence d'un état pathologique.

Le développement de l'instrumentation, de l'informatique et l'apport majeur de la chimie ont conduit à la mise en place d'une imagerie moléculaire permettant de suivre la distribution d'un traceur ciblant spécifiquement une cible moléculaire. De plus en plus de stratégies se développent pour personnaliser les traitements associés aux nombreuses

pathologies ainsi que pour imager des processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, les voies de transduction de signaux, l'apoptose, l'expression de gènes ou l'angiogenèse. Malgré ces nombreux progrès, les techniques d'imagerie actuelles souffrent d'une sensibilité et/ou d'une résolution trop faibles pour pouvoir définir les contours exacts d'une tumeur ou pour valider l'interaction d'une molécule avec sa cible biologique.

L'évaluation de l'angiogenèse tumorale par ces modalités d'imagerie ne s'effectue que de façon indirecte. Seuls les dysfonctionnements dans la perméabilité vasculaire et les anomalies structurales des vaisseaux tumoraux sont actuellement détectés pour établir l'existence de tumeurs.

Parmi ces modalités d'imagerie, la TEP est actuellement la technique la plus performante pour détecter les tumeurs, elle présente l'avantage de pouvoir imager des radiotraceurs injectés en quantités infimes en raison de sa haute sensibilité. Cependant sa résolution spatiale millimétrique ne permet pas d'accéder à des informations sur la biodistribution cellulaire d'un traceur. Il est donc nécessaire de recourir à une approche multimodale pour recueillir les informations inaccessibles à l'imagerie TEP.

Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation d'une méthode d'analyse élémentaire indirecte possédant une haute résolution spatiale et une bonne sensibilité afin d'imager la biodistribution d'analogues de traceurs TEP à l'échelle micrométrique. Nous avons donc évalué les performances des analyses par faisceaux d'ions pour imager la biodistribution de traceurs du métabolisme du glucose dans des tissus biologiques. Nous avons enfin synthétisé et évalué un nouveau traceur de l'angiogenèse tumorale en fonctionnalisant un agent antiangiogénique développé dans notre laboratoire.

Dans la première partie de ce mémoire, nous présenterons le rôle majeur de l'angiogenèse dans le développement des tumeurs et l'implication du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) au cours de ce processus. Nous traiterons ensuite de l'état d'avancement des différentes modalités pour l'imagerie de l'angiogenèse et la place que pourrait y prendre les analyses par faisceaux d'ions.

La deuxième partie sera consacrée à la présentation des résultats obtenus lors de ce travail de recherche. Un premier chapitre traitera de l'étude de faisabilité de notre approche avec le FDG, principal traceur en imagerie TEP. Le deuxième chapitre portera sur l'étude de

la répartition d'un glucose polyfluoré permettant d'optimiser les paramètres expérimentaux de notre modèle. Le troisième chapitre présentera enfin la synthèse, la fonctionnalisation et l'étude de la biodistribution d'un nouvel agent d'imagerie de l'angiogenèse tumorale.

Une troisième et dernière partie présentera les conditions expérimentales des synthèses chimiques, la préparation des modèles biologiques et des échantillons ainsi que la description des techniques utilisées.

## **Etude bibliographique**

# 1. Le processus angiogénique

Le cancer est la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde occidental. D'après l'INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques), les cancers représentaient la principale cause de mortalité en 2005 (29,5 % des décès en France) devant les maladies cardiovasculaires (28,4 %). Depuis 30 ans, de nombreuses études (plus de 17 000 articles publiés) ont permis d'aboutir à une excellente compréhension du processus angiogénique et de son rôle majeur dans le développement des cancers[1].

En 1971, l'hypothèse prédominante propose qu'une prolifération cellulaire excessive soit suffisante pour le développement d'une tumeur. Judah Folkman est alors le premier à suggérer que cette croissance tumorale est obligatoirement associée à un processus angiogénique[2]. En effet, la croissance d'une tumeur solide est fortement dépendante de la mise en place d'un réseau vasculaire adéquat afin de délivrer les constituants indispensables à la survie des cellules cancéreuses[3]. Le développement de ce réseau se fait soit par le détournement de vaisseaux préexistants soit par la formation *de novo* de vaisseaux tumoraux.

Avec ce concept novateur, l'angiogenèse est apparue comme une nouvelle cible attractive pour le traitement des tumeurs. Folkman proposa alors qu'en détruisant les vaisseaux irriguant la tumeur, on pourrait la stabiliser voire même stopper la croissance des cellules cancéreuses. L'imagerie et l'inhibition de la néoangiogenèse dans les processus cancéreux et métastatiques constituent donc des thèmes majeurs de recherche en oncologie.

## 1.1. L'angiogenèse

### 1.1.1. Développement et mécanismes de l'angiogenèse

Le réseau vasculaire s'organise dans les phases précoces du développement embryonnaire. Les vaisseaux sanguins sont assemblés à partir de cellules endothéliales primitives qui partagent une origine commune avec les cellules hématopoïétiques[4].

Le développement du système vasculaire se déroule selon deux phénomènes successifs : la vasculogenèse et l'angiogenèse[5]. La vasculogenèse fait appel à la différenciation des cellules endothéliales à partir de cellules progénitrices dénommées

angioblastes et à leur assemblage en un réseau vasculaire primitif. Ce processus se produit aussi bien au cours du développement embryonnaire qu'au cours de l'âge adulte dans des circonstances physiologiques ou lors de pathologies telles que les cancers, par exemple.

L'angiogenèse lui faisant suite, permet l'extension et le remodelage de ce réseau afin d'établir un système circulatoire mature et fonctionnel. Le contrôle moléculaire de l'angiogenèse commence à être mieux connu grâce à des progrès considérables concernant l'identification de gènes codant pour des facteurs de croissance, des récepteurs, des effecteurs ou des facteurs de transcription impliqués dans ce processus et à l'étude de leur mécanisme d'action.

Trois mécanismes fondamentaux ont été identifiés pour l'angiogenèse : l'angiogenèse par bourgeonnement, l'intussusception et la co-optation[6]. Les mécanismes moléculaires de ces différents modes d'angiogenèse sont complexes, puisqu'ils mettent en jeu des signaux autocrines et paracrines (Figure 1)[7].

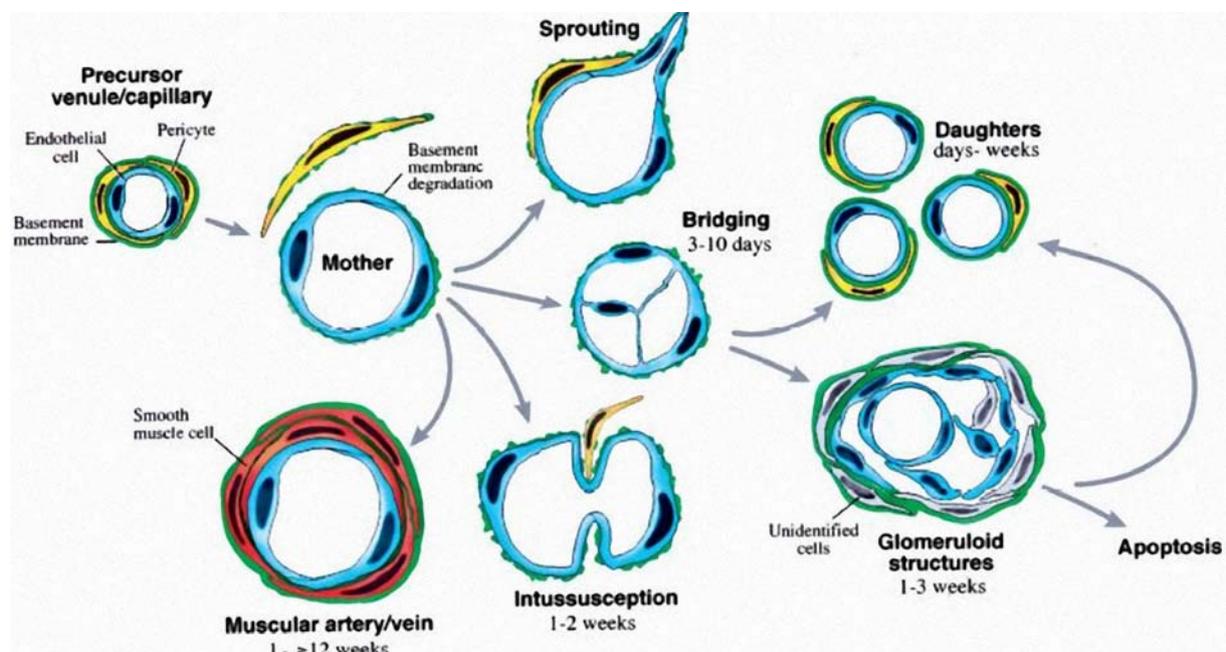


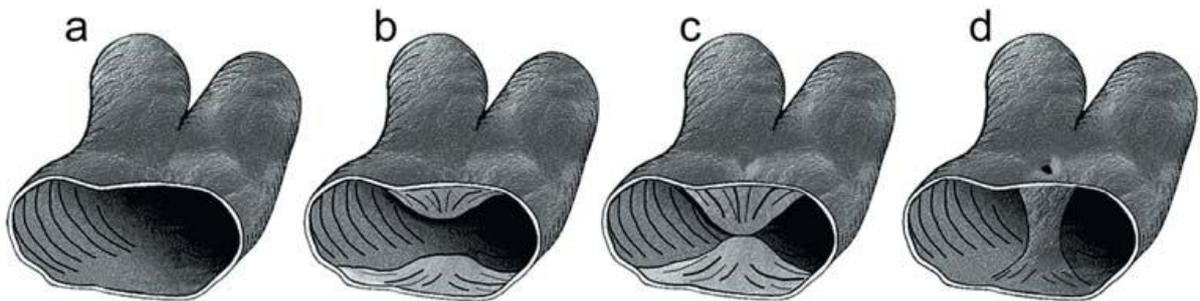
Figure 1. Les mécanismes de l'angiogenèse. (Modifié d'après Pettersson et al. 2000) [7].

Au cours de l'angiogenèse par bourgeonnement ou sprouting (Figure 1)[7], l'activation de cellules endothéliales conduit à la dégradation de la membrane basale et de la

matrice extracellulaire environnante. La migration orientée des cellules endothéliales est suivie d'une phase de prolifération, puis d'une différenciation en structure capillaire. Ce mécanisme s'observe aussi bien pendant l'organogenèse que lors des stades avancés du développement embryonnaire et après la naissance[8].

Lors de la co-optation vasculaire ou bridging (Figure 1), les cellules endothéliales prolifèrent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés. Il a été proposé que la co-optation n'intervient que dans les stades précoces du développement mais le phénomène a aussi été décrit dans des situations diverses telles que des tumeurs primaires ou des métastases[6].

L'angiogenèse intussusceptive correspond à la formation d'un réseau vasculaire par l'insertion de tissu conjonctif constituant des cloisons à l'intérieur d'un vaisseau (Figure 2). Il s'agit d'un moyen rapide et avantageux pour générer des vaisseaux sans dégradation de la matrice extracellulaire. Ce mécanisme est essentiel au cours du développement embryonnaire pour la formation de la microvasculature[9].



**Figure 2. Angiogenèse intussusceptive (Modifié d'après Djonov et al. 2003) [9].**

**a, b : protrusion des parois des capillaires ; c, d : contact et formation d'une colonne**

### **1.1.2. Switch angiogénique lors de processus cancéreux**

Une fois que la mise en place du réseau vasculaire a été effectuée, les vaisseaux sont remarquablement stables. Les cellules endothéliales sont alors quiescentes et ne se renouvellent que tous les 2 ou 3 ans, on parle de phase dormante. Les vaisseaux se divisent et s'accroissent dans des circonstances bien précises telles que dans les fonctions reproductrices

(cycle ovulaire, formation du placenta)[10], la réparation tissulaire (cicatrisation, ulcère), l'inflammation ou l'ischémie tissulaire [11, 12].

Au cours du dérèglement de la croissance cellulaire conduisant à la formation d'une tumeur, les cellules endothéliales formant les capillaires passent alors d'un état dormant à un état actif dit « angiogénique », transition encore appelée « switch angiogénique »[13, 14]. Ces cellules acquièrent ainsi des propriétés de jeunesse qu'elles avaient mises en sommeil : elles sont capables de se diviser, de migrer, d'établir des connections avec les cellules avoisinantes. Elles expriment aussi des facteurs de croissance, des récepteurs de surface, des molécules d'adhésion, des molécules de survie (molécules anti-apoptotiques).

A partir de cellules endothéliales isolées puis cultivées *in vitro*, Folkman a ainsi mis en évidence la production d'un facteur diffusible par les cellules cancéreuses. L'existence de cette molécule spécifique capable de stimuler la croissance, la migration et la différenciation des cellules endothéliales des capillaires a permis de valider ce concept d'angiogenèse tumorale. Cette molécule fut appelée « facteur de l'angiogenèse tumorale » ou TAF (tumor angiogenic factor).

Depuis de nombreux autres modulateurs angiogéniques possédant une action activatrice ou inhibitrice ont été identifiés[15, 16]. Dans les conditions physiologiques, ces modulateurs établissent un équilibre entre les fonctions locales pro- et antiangiogéniques par interaction avec les récepteurs de la surface des cellules endothéliales. En revanche, l'activation d'un processus angiogénique dans une tumeur nécessite une modification de l'équilibre en faveur des facteurs angiogéniques[17](Figure 3).

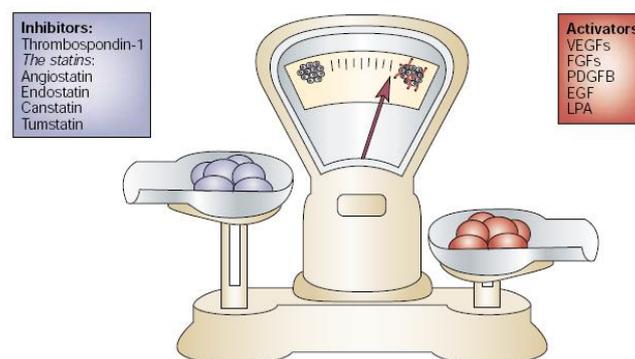


Figure 3. Switch angiogénique. (D'après Bergers et al. 2003) [17].

Ce switch peut être réalisé par ces cellules tumorales de plusieurs façons (Figure 3):

- état d'hypoxie favorisant le maintien du déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques et jouant un rôle majeur dans l'induction de divers facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le PDGF[3].
- activation de certains proto-oncogènes (ras) ou la neutralisation de certains gènes suppresseurs de tumeurs (l'anti oncogène p53, qui régule positivement des facteurs antiangiogéniques et négativement les facteurs pro-angiogéniques, est muté dans près de 50 % des cancers).
- surexpression des facteurs de croissance, soit de façon directe par les cellules tumorales elles-mêmes, soit par le recrutement de cellules hôtes comme les macrophages qui produisent alors leurs propres facteurs angiogéniques.

La combinaison de tous ces processus permet aux cellules tumorales d'induire une néoangiogenèse tumorale et d'entrer dans une phase de croissance exponentielle.

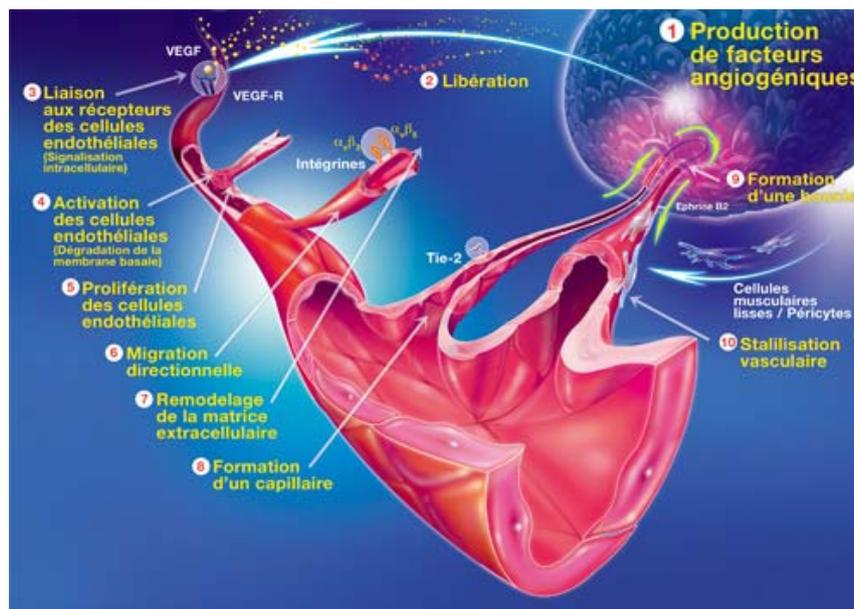
### **1.1.3. Angiogenèse tumorale**

Au stade primitif, un carcinome *in situ* peut persister pendant plusieurs mois voire plusieurs années sans augmentation de son volume. L'oxygène et les nutriments nécessaires à sa survie sont alors apportés par les vaisseaux du tissu normal[18]. Il faut pour cela que des capillaires sanguins soient localisés à moins de 200  $\mu\text{m}$  de la tumeur ce qui correspond à la limite de diffusion de l'oxygène[2, 19].

Au delà de quelques  $\text{mm}^3$ , une tumeur solide ne peut croître sans développer une néovascularisation essentielle pour éviter l'hypoxie et l'apoptose des cellules tumorales[20]. Ces besoins vitaux seront alors assurés par de nouveaux vaisseaux qui viendront irriguer la tumeur et accompagner sa croissance.

Le déroulement de l'angiogenèse tumorale peut être divisé en quatre grandes étapes, chacune faisant intervenir des acteurs cellulaires et moléculaires spécifiques :

- activation des cellules endothéliales par des facteurs angiogéniques qui conduit à la dégradation localisée de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante (phases 1 à 4 de la figure 4) [2, 21, 22].
- prolifération suivie de la migration orientée des cellules endothéliales dans la matrice extracellulaire (phases 5 et 6).
- différenciation des premières cellules qui s'organisent en structures tubulaires avec une lumière et une nouvelle lame basale (phases 7 et 8).
- maturation des vaisseaux qui fait appel au recrutement des cellules péri-endothéliales (cellules musculaires lisses, péricytes)[23]. Avec les phases 9 et 10, on aboutit alors à un réseau vasculaire tumoral fonctionnel (Figure 4, [24]).



**Figure 4. Etapes de l'angiogenèse tumorale**

Les vaisseaux tumoraux se distinguent des vaisseaux normaux par des anomalies structurelles et fonctionnelles. La vascularisation tumorale résulte d'un processus angiogénique moins finement régulé que le processus physiologique[3, 6].

L'arbre vasculaire normal est un réseau organisé et stable avec une localisation des capillaires bien définie. La perméabilité des capillaires est contrôlée et dépend de la structure de l'endothélium propre au tissu. Le flux sanguin du réseau vasculaire normal est régulé.

En revanche, le réseau vasculaire tumoral est désorganisé, anarchique et instable. Il existe des lacs vasculaires et des zones hémorragiques du fait d'une perméabilité accrue des capillaires. Des shunts artério-veineux s'établissent et induisent un flux sanguin irrégulier et non contrôlé. Enfin, la couverture des capillaires par les péricytes est insuffisante[8].

Le micro-environnement tumoral est donc profondément perturbé par cette vascularisation anormale[25]. Ces anomalies inhérentes au processus angiogénique tumoral représentent donc des cibles moléculaires spécifiques en vue de réaliser un ciblage sélectif des zones tumorales.

## ***1.2. Régulateurs de l'angiogenèse***

Parmi ces cibles moléculaires préférentielles de l'angiogenèse, on retrouve la famille des FGFs, la famille des VEGFs, les angiopoïétines, les métalloprotéases et les activateurs du plasminogène[19]. Des régulateurs négatifs endogènes comme la thrombospondine, l'angiostatine, l'endostatine et le facteur plaquettaire-4 ont également été décrits[26].

Le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2 ou bFGF) a été le premier facteur de croissance identifié possédant une activité angiogène[27]. Il représente le prototype d'une famille de facteurs de croissance liant l'héparine dont l'expression est ubiquitaire. Ce facteur est apparu important au cours de l'angiogenèse par sa capacité à favoriser la prolifération, la migration et l'organisation tubulaire des cellules endothéliales et à induire l'angiogenèse in vitro[28].

Une protéine appelée facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) a ensuite été décrite peu de temps après le FGF-2 et reconnue comme le régulateur clé de l'angiogenèse. Elle possède une capacité supérieure à celle du FGF-2 pour stimuler la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales.

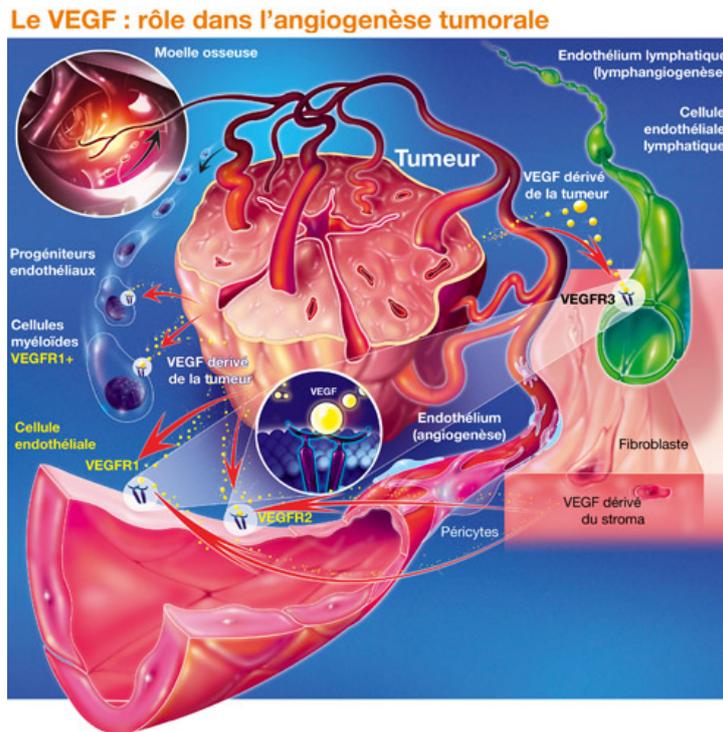
### **1.2.1. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse physiologique**

De nombreuses études ont permis de décrire les multiples fonctions du VEGF[29, 30]. Tout d'abord, l'action biologique du VEGF a été décrite comme étant un facteur de perméabilité vasculaire dont il est le plus puissant inducteur[31, 32]. Il agit par ailleurs comme chémokine pour les monocytes qui sont ainsi recrutés vers les sites d'inflammation. De plus, c'est un mitogène puissant et spécifique des cellules endothéliales vasculaires. Il joue enfin un rôle unique dans la régulation de la croissance de tous types de vaisseaux sanguins lors des processus d'angiogenèse.

### **1.2.2. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse tumorale**

L'importance du VEGF aussi bien pendant le développement embryonnaire que chez l'adulte se révèle par l'haploinsuffisance du gène du VEGF-A. En oncologie, on distingue les mutations dominantes touchant un seul allèle (oncogènes) des mutations récessives nécessitant la perte des deux allèles (suppresseurs ou anti-oncogènes). La découverte de gènes, dont la perte d'un seul allèle ne permet pas d'assurer la fonction normale et favorise l'apparition de cancers, a conduit cette notion d'haploinsuffisance. L'invalidation d'un seul allèle du VEGF est ainsi associée à une mortalité embryonnaire provoquée par une vascularisation défectueuse[33].

Le VEGF joue également un rôle clé dans l'établissement de la vasculature d'une tumeur[25, 30, 34]. L'ensemble de ses actions biologiques favorise la néoangiogenèse et la formation d'un micro-environnement favorable à la croissance des cellules tumorales (Figure 5, [35]).



**Figure 5. Rôle du VEGF dans l'angiogenèse tumorale**

Parmi les membres de cette famille des VEGFs, on retrouve les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PlGF (placental growth factor)[29, 36].

### 1.2.3. Structure du VEGF

Le VEGF-A est considéré comme le médiateur clef de l'angiogenèse physiologique et tumorale[29, 37]. Nous utiliserons par la suite l'abréviation VEGF pour se référer au VEGF-A. Il s'agit du membre de la famille le plus documenté et il a été caractérisé simultanément par deux équipes[38, 39].

Le VEGF est une glycoprotéine homodimère liée par un pont disulfure hautement conservé et qui perd son activité biologique en présence d'agents réducteurs. Il existe plusieurs isoformes du VEGF avec des masses moléculaires allant de 34 - 45 kDa. Ces différentes isoformes sont identifiées par leurs nombres de résidus : 121, 145, 165, 165b, 189 et 206 acides aminés. Elles présentent des particularités quant à leurs distributions ou leurs interactions avec les récepteurs.

Le gène humain codant pour le VEGF (14 kb) est localisé sur le chromosome 6 et possède 8 exons[40]. Le pré-ARNm va alors générer, par épissage alternatif des exons 6 et 7, plusieurs ARN messagers codant pour les différentes isoformes protéiques. Les exons 6 et 7 codent pour un nombre différent de résidus basiques dont l'expression modifie la sécrétion, la fixation à l'héparine et l'association à la membrane (la forme 121 est soluble alors que la forme 189 est intimement associée à la membrane).

L'isoforme VEGF<sub>183</sub> possède une large distribution tissulaire. Les isoformes VEGF<sub>145</sub> et VEGF<sub>206</sub> sont spécifiquement exprimées dans les cellules d'origine placentaire mais en proportion très faible par rapport aux autres[41]. La forme 165b diffère de la forme 165 par la seule extrémité COOH terminale, elle agit comme inhibiteur du récepteur 1 au VEGF[42]. L'étude de l'expression des différents épissages a montré que la plupart des types cellulaires produisaient simultanément plusieurs isoformes du VEGF. Cependant, seules les isoformes 121, 145 et 165 induisent, *in vivo*, la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse. Le VEGF<sub>165</sub> étant l'isoforme la plus abondante et la plus étudiée[43].

Les différentes isoformes du VEGF se lient ainsi à des récepteurs impliqués dans le développement vasculaire. Ce sont des composants essentiels des voies de transduction du signal du VEGF. Ces récepteurs sont surexprimés dans les cellules endothéliales tumorales et ils constituent donc l'une des cibles les plus prometteuses pour l'imagerie de l'angiogenèse tumorale.

### ***1.3. Récepteurs du VEGF***

Le VEGF se lie principalement à deux récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK): le VEGFR-1 et le VEGFR-2 (Figure 6)[44, 45]. Ces récepteurs sont codés par trois gènes différents possédant des analogies de séquence et de structure. Ces RTK sont composés d'une région extracellulaire formée de sept domaines de type immunoglobuline, d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire conservée comportant deux domaines d'activité enzymatique tyrosine kinase[46]. La fixation d'un homodimère de VEGF entraîne successivement une dimérisation homologue des RTK puis l'activation de leur activité tyrosine kinase intracellulaire. Ces RTK activés par trans-autophosphorylation des résidus tyrosines de leur domaine intracellulaire qui vont servir de point d'ancrage à des protéines. Après phosphorylation, ces protéines activent alors en cascade d'autres effecteurs cellulaires.

Le VEGFR-1 (flt-1) intervient dans la vasculogénèse et dans la régulation négative de la fixation du VEGF sur le VEGFR-2[44]. Il a une affinité 10 fois plus élevée pour le VEGF que le VEGFR-2, mais une activité tyrosine kinase 10 fois plus faible (faible capacité d'autophosphorylation après la fixation du VEGF)[16]. Ces propriétés lui confèrent des rôles dans la migration, la croissance tumorale ainsi qu'un rôle de régulateur en agissant comme un récepteur-leurre pour le VEGF.

Le VEGFR-2 (flk-1/KDR) induit les effets physiologiques et pathologiques majeurs du VEGF sur les cellules endothéliales en phosphorylant de nombreuses protéines cellulaires. Malgré sa faible affinité pour le VEGF, il est le principal médiateur de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules endothéliales ainsi que de la perméabilité des vaisseaux sanguins[25, 44].

En plus de ces récepteurs, les cellules endothéliales expriment la neuropiline-1 (NRP-1) et la neuropiline-2 (NRP-2), récepteurs cellulaires transmembranaires simples, qui agissent comme des co-récepteurs entre le VEGF et ses récepteurs (Figure 6) [45].

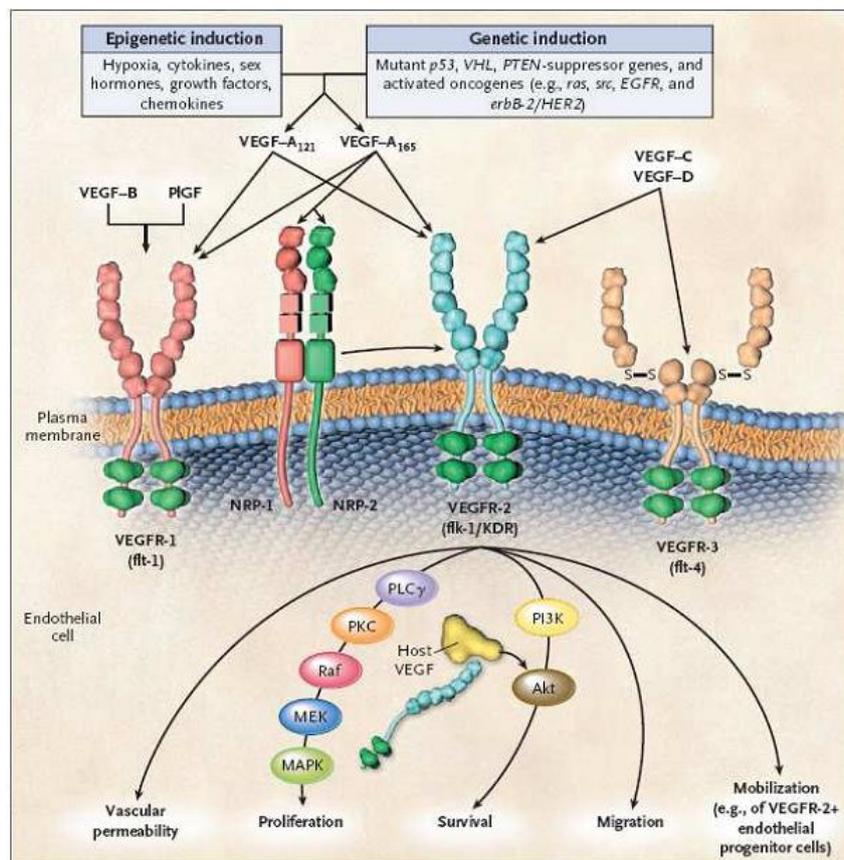


Figure 6. Famille des VEGFs et leurs récepteurs. (D'après Kerbel et al. 2008) [45].

Les VEGFR-1 et VEGFR-2 semblent être tous les deux indispensables au développement d'un réseau vasculaire normal de l'embryon. Les souris invalidées pour l'un ou l'autre gène, meurent *in utero* mais les causes de la mortalité des embryons sont différentes ce qui indique que leurs rôles sont distincts[47, 48]. L'invalidation du gène codant pour le VEGFR-1 provoque une mortalité embryonnaire sans différenciation de vaisseaux alors que l'invalidation du gène codant pour le VEGFR-2 conduit à une mort embryonnaire sans angiogenèse ni hématopoïèse.

Au vue de la position centrale qu'occupe l'axe VEGF / VEGFR dans la stimulation de l'angiogenèse tumorale, le VEGF et son récepteur constituent donc les cibles principales des traitements antiangiogéniques. La surexpression de ce récepteur dans les vaisseaux sanguins tumoraux en fait une cible particulièrement intéressante pour le développement d'agents d'imagerie de l'angiogenèse tumorale.

#### ***1.4. Autre marqueur de l'angiogenèse tumorale : les intégrines***

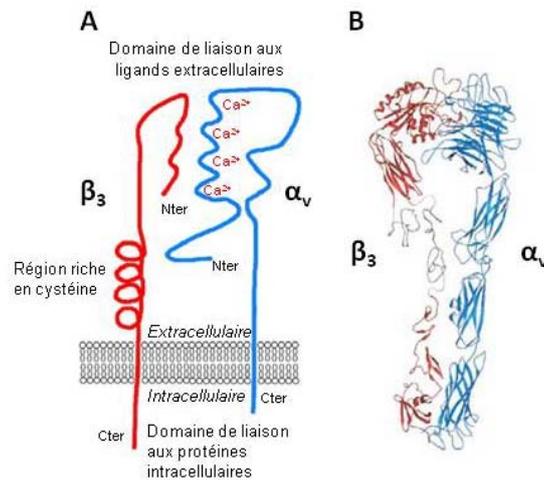
##### **1.4.1. Rôles des intégrines**

Les intégrines constituent une famille importante de récepteurs membranaires responsables des interactions cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire et cellule-agent pathogène[49]. Elles jouent un rôle important dans le rattachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine, vitronectine). Les intégrines sont également impliquées dans le transfert de signaux à travers la membrane plasmique et régulent de nombreuses fonctions dont la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou la cicatrisation. Certaines intégrines sont impliquées dans la modulation de l'angiogenèse comme l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$ [50] mais le principal marqueur de l'endothélium angiogénique est l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ [51].

##### **1.4.2. Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$**

Comme les autres membres de cette famille de récepteur, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est constituée de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$ , associées de façon non covalente. La sous-unité  $\alpha$  est caractérisée par la présence, dans le domaine extracellulaire de régions capables de s'associer à des cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Le

domaine extracellulaire de la sous-unité  $\beta$  présente une région riche en cystéine et une partie *N*-terminale repliée formant une large boucle. Ces sous-unités se lient aux ligands extracellulaires *via* les domaines *N*-terminaux (Figure 7, [52]).



**Figure 7. Intégrine  $\alpha_v\beta_3$  : A/ Schéma simplifié; B/ Représentation en ruban**

Les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  présentent des parties transmembranaires et de courtes régions intracellulaires comprenant les extrémités C-terminales (Figure 7). L'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\beta$  peut s'associer aux filaments d'actine reliant alors le récepteur au cytosquelette. Elle peut également former des complexes avec des protéines intracellulaires (taline, vinculine,  $\alpha$ -actinine) et établir une connexion avec les kinases cytoplasmiques ou avec les récepteurs de facteurs de croissance.

Des études ont mis en évidence que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est hautement surexprimée lors de processus de néovascularisation et dans certaines lignées tumorales par rapport aux tissus normaux[10, 53]. Cette différence d'expression fait de ce récepteur une autre cible attrayante pour le développement de traceurs de l'angiogenèse tumorale et d'anticancéreux.

Des antagonistes de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  se sont également révélés capables d'inhiber l'angiogenèse tumorale et de perturber les métastases[54]. L'affinité de ces antagonistes pour le récepteur a donc entraîné l'utilisation de ces molécules comme ligands spécifiques pour le ciblage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

### **1.4.3. Ligands spécifiques de l'Intégrine $\alpha_V\beta_3$**

Le ligand endogène privilégié de l'intégrine  $\alpha_V\beta_3$  est la vitronectine, mais l'intégrine se lie également à de nombreuses autres protéines d'adhésion telles que la fibronectine, le facteur de von Willebrand (vWF), le fibrinogène ou la thrombospondine. La liaison de l'intégrine  $\alpha_V\beta_3$  à ces protéines se fait par l'intermédiaire de la séquence consensus d'acides aminés « arginine - glycine - acide aspartique » (-RGD-). Cette découverte a ainsi stimulé le développement de peptides présentant cette séquence -RGD- et la conception de peptidomimétiques mimant ce tripeptide[55].

Les cibles privilégiées pour imager l'angiogenèse tumorale sont les récepteurs du VEGF et les récepteurs aux intégrines  $\alpha_V\beta_3$  ou la fibronectine. La fonctionnalisation des effecteurs impliqués dans ces voies de transduction, afin de les rendre détectables par une modalité d'imagerie, constitue donc une approche majeure dans la détection des processus tumoraux[56, 57].

## **2. Imagerie médicale**

Depuis plusieurs décennies, les techniques d'imagerie médicale *in vivo* non invasives font partie intégrante des soins médicaux. Elles donnent un accès rapide et fiable à des informations inaccessibles par le diagnostic clinique. Il peut s'agir de la forme ou de la densité d'un organe (imagerie anatomique), de certains aspects de son métabolisme (imagerie fonctionnelle) ou de la distribution d'un traceur spécifique (imagerie moléculaire).

### ***2.1. Evolution de l'imagerie médicale***

L'imagerie médicale a tout d'abord été utilisée pour effectuer des analyses morphologiques telles que la visualisation d'un organe, l'estimation de sa forme et de sa taille ou de son intégrité. Le couplage de l'imagerie fonctionnelle à l'imagerie anatomique a ensuite

permis dans un second temps d'améliorer le niveau de détail détecté lors d'un examen. La résolution est alors devenue telle que les petites anomalies physiologiques ont également permis d'apprécier l'état pathologique d'un organe.

Les développements accomplis en biologie cellulaire et en biochimie ont par la suite conduit à identifier un grand nombre de cibles potentielles (récepteurs, enzymes) lors de processus pathologiques. Cette nouvelle étape a permis de faire évoluer l'imagerie médicale vers une imagerie moléculaire reposant sur la création et l'utilisation de sondes moléculaires ciblant un marqueur biologique spécifique. L'apport décisif de la chimie a ainsi permis de mettre à la disposition des médecins de nombreux produits de contraste, de vecteurs et de molécules radiomarquées. Cette avancée a autorisé une meilleure évaluation de l'étendue des localisations cancéreuses lors de diagnostics précoces ou de suivis thérapeutiques.

L'ensemble des techniques d'imagerie médicale a par la suite bénéficié d'importants développements technologiques et informatiques. Les progrès de l'instrumentation dans les domaines de la production des radiations ainsi que dans la détection des signaux ont permis l'amélioration des résolutions spatiales et temporelles des examens. L'arrivée du numérique et des logiciels informatiques de traitement de données ont grandement facilité l'interprétation des images générées et la création d'images fusionnées lors d'examens multimodaux.

L'imagerie médicale regroupe un ensemble de modalités diagnostiques dont certaines sont connues depuis plus de 50 ans comme la radiographie et la scintigraphie, d'autres depuis deux à trois décennies comme la tomodensitométrie (scanner), l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP). Cette dernière s'implante en France comme la technique de référence en oncologie[58].

## ***2.2.Imagerie de l'angiogenèse tumorale***

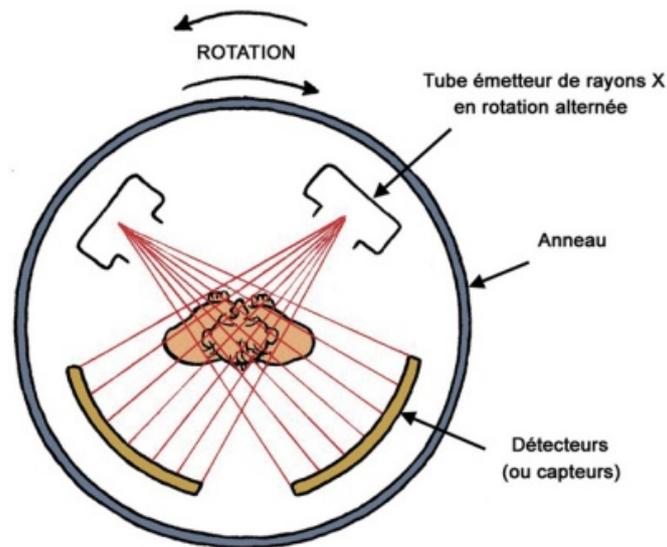
Certaines modalités d'imagerie existantes ou en phase de développement sont actuellement utilisées afin d'observer les vaisseaux tumoraux ou de suivre la réponse à des traitements antiangiogéniques. Cependant ces techniques ne mesurent que de façon indirecte le développement de l'angiogenèse tumorale en clinique car il n'existe actuellement aucun moyen de la quantifier de façon simple.

Lors d'un examen, il est alors fréquent d'allier deux modalités d'imagerie différentes, anatomique et fonctionnelle afin de recueillir le maximum d'indices caractérisant la présence d'une tumeur. L'imagerie dynamique repose quant à elle sur la capacité des appareils à acquérir de façon rapide et répétée des images après l'injection d'un produit de contraste. Elle permet ainsi de suivre le rehaussement tissulaire et d'en déduire des paramètres reflétant la microcirculation tumorale [59-62].

L'angiogenèse tumorale a pour conséquence une augmentation de la densité vasculaire qui se traduit par une augmentation du flux sanguin et du volume sanguin dans la tumeur[63]. La perméabilité élevée des vaisseaux tumoraux peut aussi être mesurée par la constante de transfert endothélial et le volume de distribution extravasculaire et extracellulaire. Ces paramètres de perfusion et de perméabilité ont été utilisés avec succès pour détecter les tumeurs, différencier les lésions bénignes des lésions malignes et pour le suivi des thérapies antiangiogéniques à l'aide de techniques d'imagerie que nous allons décrire[64-66].

### **2.2.1. Angiographie**

L'angiographie est un examen tomodensitométrie peu invasif dédié à la cartographie du réseau vasculaire ainsi qu'à la recherche de lésions vasculaires. La tomodensitométrie (TDM), également nommé CT-Scan (Computed Tomography) ou scanner, est une technique d'imagerie médicale mettant en œuvre la capacité des rayons X à traverser le corps humain en étant plus ou moins absorbés selon la nature des tissus traversés (les os étant plus opaques et les muscles plus transparents). C'est un système d'imagerie par transmission, pour lequel le patient est placé entre une source de rayons X et un détecteur. L'appareil est constitué d'un tube à rayons X qui tourne autour du patient pendant l'exposition (Figure 8). Des détecteurs placés autour du cercle permettent de recueillir de très nombreuses images de projection, les données obtenues sont ensuite traitées par ordinateur et recomposées en coupe d'organes ou en reconstructions tridimensionnelles des tissus.



**Figure 8. Principe du scanner**

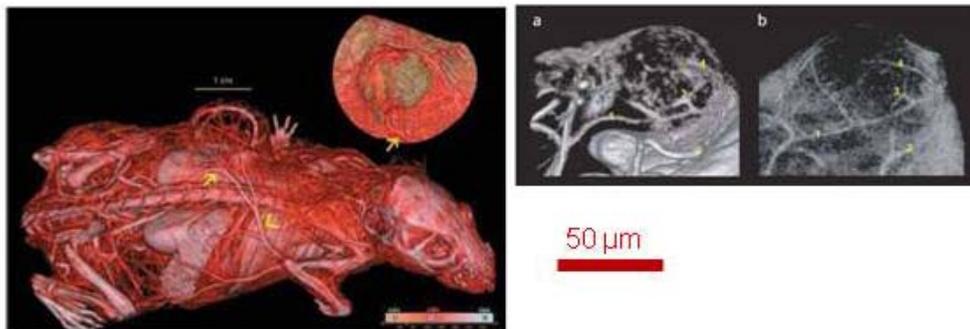
On peut faire ressortir certains tissus, en particulier les vaisseaux sanguins, en injectant un produit de contraste qui a la propriété de fortement absorber les rayons X. L'amélioration du contraste est due à l'utilisation de produits qui contiennent des éléments de numéro atomique élevé augmentant ainsi la densité électronique locale. L'iode s'est imposé comme l'élément de référence et les composés benzéniques tri-iodés sont les produits de contraste les plus utilisés.

L'angiographie permet donc de réaliser des examens à visée diagnostique en explorant les artères (artériographie) (Figure 9) ou les veines (phlébographie) afin d'identifier des pathologies vasculaires telles que les sténoses (rétrécissement ou obstruction d'une artère), les shunts artério-veineux ou les anévrismes. L'évaluation des désordres vasculaires des poumons a aussi pu être étudiée par cette technique[67]. Des interventions peuvent aussi être pratiquées au cours d'une angiographie telles que l'angioplastie ou le comblement d'anévrisme[68].



**Figure 9. Exemple d'angiographie X**

Au niveau de l'imagerie de l'angiogenèse tumorale, les données recueillies par TDM sont multiples : flux sanguin tissulaire, volume sanguin ou perméabilité capillaire. Des études de micro-angiographie sur des souris possédant un carcinome implanté en sous-cutanée ont ainsi été réalisées pour concevoir l'imagerie 3D de la vasculature tumorale[69, 70]. Ces résultats de TDM couplés à des données en IRM ont permis d'établir l'architecture des vaisseaux tumoraux et la discrimination de zones saines et nécrotiques au sein de ce modèle(Figure 10).



**Figure 10. A gauche, image TDM en 3D d'une souris porteuse d'une tumeur. Les vaisseaux larges sont indiqués par une flèche. A droite, différentes images de la tumeur en gros plan. (a) vaisseaux larges intra-tumoraux, (b) capillaires en périphérie. (Modifié d'après Kiessling et al. 2004) [69].**

Un autre développement de la micro-CT chez la souris a permis de visualiser la microvasculature d'un carcinome humain implanté dans les poumons et d'évaluer l'efficacité d'un traitement au bevacizumab[71]. Ce médicament est un anticorps monoclonal qui se lie

au VEGF empêchant ainsi la liaison de ce dernier à ses récepteurs. Les résultats de cette application nécessitent cependant une comparaison par des méthodes immunohistochimiques pour évaluer la régression de la vasculature.

Cette modalité d'imagerie apporte donc des renseignements d'ordre morphologique, avec une résolution infra-millimétrique, mais pas d'ordre fonctionnel. Elle présente un grand intérêt en première intention pour le diagnostic d'une tumeur intracrânienne mais l'IRM sera souvent préférée à cause de la meilleure qualité des images obtenues pour les tissus mous. De plus, la nocivité des rayons X ne permet pas la répétition de ce type d'examen.

### 2.2.2. Ultrasonographie

L'imagerie ultrasonore échographique repose sur la capacité des ondes à se propager dans les tissus biologiques mous et à se réfléchir aux interfaces des milieux d'impédances différentes. Le transducteur ultrasonore, qui transmet et reçoit les ultrasons, doit être couplé à la surface de la zone à imager par un milieu autorisant la propagation des ultrasons (gel, eau). L'acquisition d'une image s'effectue alors en déplaçant le faisceau ultrasonore le long de la section anatomique d'intérêt et en enregistrant les échos rétrodiffusés (Figure 11).

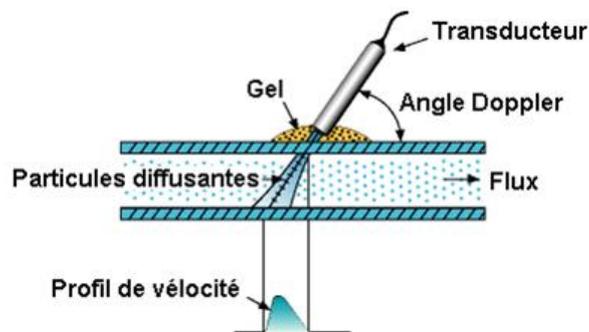


Figure 11. Schéma de principe de l'échographie

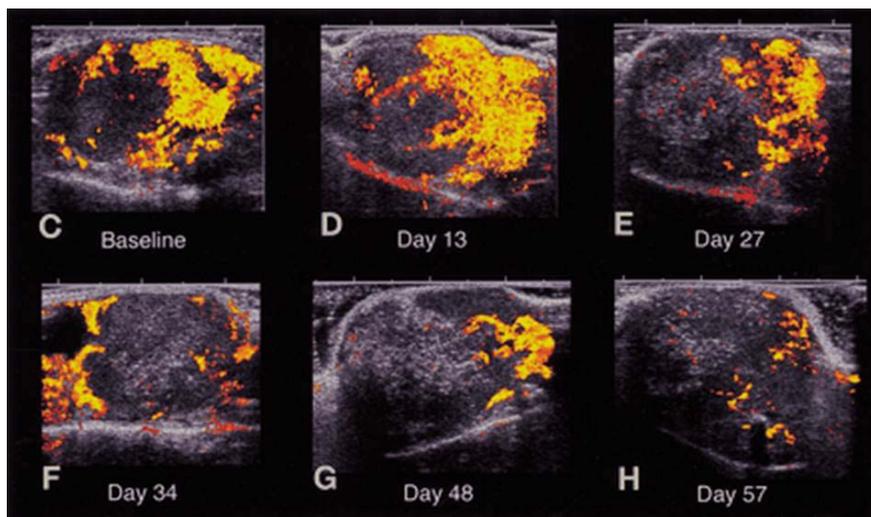
L'analyse de ces échos et la présentation de leur amplitude sous la forme d'intensité dans une image permettent de construire une coupe anatomique dans un plan. La vitesse des ultrasons dans les milieux biologiques et les temps de traitement des signaux autorisent ainsi une imagerie en temps réel. La résolution d'une image est liée à la fréquence d'émission des ultrasons. Des résolutions comprises entre 1 mm et 30  $\mu$ m sont donc accessibles pour des

fréquences comprises entre 3 et 80 MHz. L'atténuation des ultrasons dans les tissus mous est d'autant plus forte que la fréquence est élevée, ce qui explique qu'il est impossible d'obtenir de très fines résolutions pour les organes profonds.

Les techniques ultrasonores Doppler offrent la possibilité d'obtenir des informations sur la vitesse des tissus en mouvement (valve cardiaque, sang). Les vitesses sont recueillies par l'analyse de la variation fréquentielle entre les ondes émises et reçues lorsque celles-ci rencontrent sur cible en déplacement. Ces données sont superposables à l'imagerie anatomique et permettent une estimation de la vascularisation et une analyse fonctionnelle de l'appareil cardiovasculaire[72]. Ces techniques permettent l'évaluation de flux dans les vaisseaux ayant un diamètre supérieur à 200  $\mu\text{m}$ .

Des agents de contraste ultrasonore ont été développés dans le but d'améliorer la qualité des images des tissus vascularisés. L'injection de produits de contraste échographiques renforce l'efficacité et la spécificité de la technique. Ces agents sont des microbulles de gaz encapsulées de dimensions proches de celles des globules rouges (diamètre compris entre 2 et 10  $\mu\text{m}$ ). Ils sont injectés dans le système vasculaire et ne diffusent pas dans les tissus. En raison de leur importante différence de densité et de compressibilité avec les tissus biologiques, les microbulles rehaussent l'intensité du signal ultrasonore rétrodiffusé. De plus, elles possèdent une réponse harmonique plus importante en intensité que les tissus. Leur visualisation dans de petits capillaires devient alors possible par l'étude de ce signal[59].

L'étude de l'angiogenèse tumorale en écho-Doppler est utilisée dans la détection des tumeurs superficielles comme les mélanomes et dans les cancers du sein[59]. Elle permet de détecter un flux anormal caractéristique d'une tumeur maligne et d'évaluer l'efficacité des nouvelles thérapeutiques antiangiogéniques [73, 74]. Le doppler couleur (Figure 12) a ainsi été réalisé sur une souris porteuse d'un adénocarcinome syngénique lors de l'évaluation d'un traitement anti-angiogénique. L'évaluation de l'efficacité d'une forme soluble du récepteur VEGFR-2 a alors pu être effectuée par la détermination du volume de la tumeur et des zones vascularisées[74]. Les résultats obtenus sur l'estimation du volume de la tumeur par cette technique montrent de très bonnes corrélations avec des mesures directes déterminées par méthodes invasives. La réponse au traitement a donc pu être détectée par la diminution du nombre de capillaires tumoraux. Cependant la variabilité du contraste en fonction des tumeurs représente une importante limitation.



**Figure 12. Doppler couleur à J0 (C). Début du traitement (D à H), évolution de la tumeur : diminution de la fixation de l'agent de contraste au cours du traitement. (Modifié d'après Iordanescu et al. 2002) [74].**

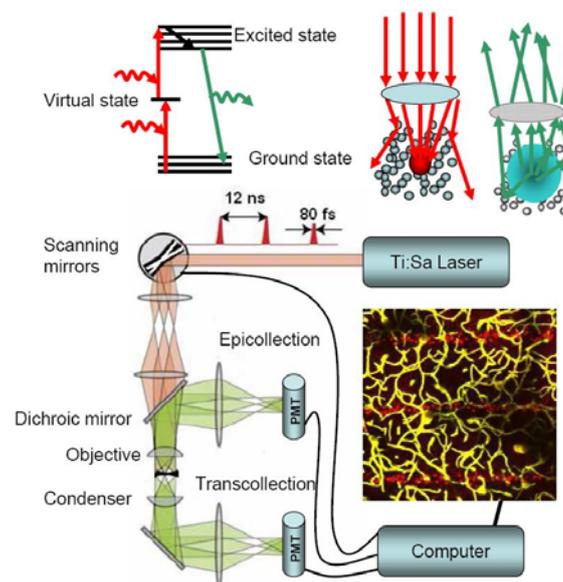
La plupart des centres hospitaliers possèdent les installations nécessaires pour utiliser cette modalité car cette technique est rapide et peu coûteuse. La résolution atteint 500  $\mu\text{m}$  avec des sondes de 2 à 20 MHz et 10  $\mu\text{m}$  avec des sondes de 20 à 200 MHz, spécifiques aux études du petit animal. Il est également possible de réaliser des images 3D et en couleur (en fonction de la vitesse du flux enregistrée). L'ultrasonographie est cependant limitée pour certains patients, notamment en cas d'obésité, du fait de l'échogénéicité faible des tissus riches en lipides. L'exploration des organes mous n'est également pas du ressort de l'échographie (tube digestif, poumons). Enfin, chaque examen est « opérateur dépendant » : les mesures réalisées manuellement par une sonde sont difficiles à réinterpréter et à recalculer avec une autre modalité d'imagerie médicale. En cas de doute, l'examen doit être refait en totalité.

### **2.2.3. Microscopie biphotonique intravivale**

La microscopie biphotonique est une méthode à balayage laser qui a été inventée en 1990 par Denk, Strickler et Webb. Cette technique invasive combine l'illumination optique et la production d'images sous microscope confocal laser ou multi-photons. Son utilisation pour des applications biologiques est apparue à la fin des années 1990 et elle est devenue une méthode de référence aussi bien pour des études cellulaires que pour des études intravitales. Elle combine la bonne résolution spatiale et la bonne résolution temporelle de la microscopie

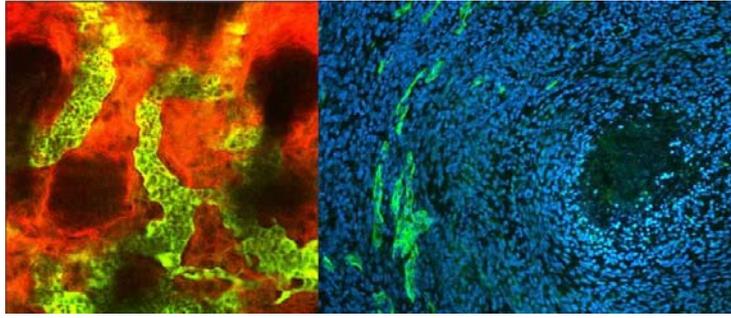
confocale tout en offrant des profondeurs d'observation allant jusqu'à un millimètre dans certains tissus[75].

Cette technique repose sur le principe d'absorption simultanée de deux photons par un fluorochrome (Figure 13). Un électron périphérique va alors passer d'un état de repos à un état excité en transitant par un niveau virtuel dont la durée de vie est de l'ordre de la femtoseconde. Cet électron va ensuite revenir à un état proche de l'état de fondamental en émettant un photon de fluorescence par conversion interne. Dans la plupart des cas, on utilise un laser délivrant une lumière dans l'infrarouge[76].



**Figure 13. Principe de la microscopie biphotonique intravitale**

L'observation de la microvascularisation est alors accessible jusqu'à une profondeur de 600  $\mu\text{m}$  avec une résolution spatiale micrométrique. Il est ainsi possible d'imager certaines zones spécifiques avec l'injection intraveineuse de colorants fluorescents tels que la fluorescéine ou la rhodamine couplés à un dextran chez la souris (Figure 14). Une reconstitution tridimensionnelle de l'arbre vasculaire a ainsi pu être obtenue suite à l'acquisition d'une série d'images. Ces résultats ont permis de caractériser l'organisation anarchique et la densité importante des vaisseaux attestant la présence d'une vascularisation tumorale. Les résultats obtenus par cette technique nécessitent cependant d'être confirmés par des études immunohistochimiques sur des coupes fixées.



**Figure 14. (A) Marquage in vivo de la vascularisation tumorale d'un gliome F98 suite à l'injection par voie iv de FITC dextran 70kDa (vert) ; en rouge, marquage de structures extravasculaires. (B) Marquage de la vascularisation tumorale sur une coupe réalisée au même niveau que lors de l'étude in vivo par un anti collagène IV (vert) ; en bleu marquage des noyaux.**

La principale limite de cette modalité d'imagerie est donc sa très faible profondeur d'analyse, inférieure au millimètre. Tout comme la TDM et l'ultrasonographie, cette technique ne permet de détecter que des altérations de la vasculature indiquant la présence de zones tumorales.

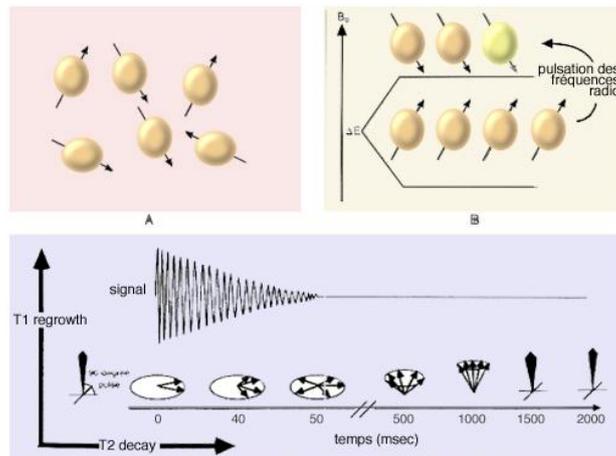
#### **2.2.4. Imagerie par Résonance Magnétique ou IRM**

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire est une méthode d'imagerie anatomique et fonctionnelle *in vivo* non invasive et non irradiante. Elle utilise le phénomène de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), technique de spectroscopie découverte en 1946 par Felix Bloch et Edward Mills Purcell (Prix Nobel de physique en 1952).

La RMN et l'IRM font appel aux propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques (de spin non nul) des molécules. Elles utilisent un aimant avec un champ magnétique élevé (de 0,3 à 23,5 Tesla) et homogène ainsi qu'un équipement électronique et informatique spécialisé.

Certains noyaux, tel que l'hydrogène, sont dotés d'un moment magnétique ou spin. Ils se comportent comme des aiguilles aimantées et adoptent différentes orientations selon le champ magnétique. La résonance magnétique est obtenue en appliquant une radiofréquence dont la fréquence de précession est caractéristique d'un atome donné. L'application d'une onde électromagnétique à la fréquence de résonance fait alors basculer l'orientation de ces spins. Lorsque cette impulsion radiofréquence s'interrompt, les atomes d'hydrogène

reprennent leur position d'équilibre dans le champ magnétique (relaxation) en redonnant de l'énergie (Figure 15). L'énergie redistribuée peut être décomposée suivant deux axes : un axe parallèle au champ magnétique ou relaxation longitudinale (ou  $T_1$ ) et un axe perpendiculaire au champ magnétique ou relaxation transversale (ou  $T_2$ ). Ces signaux permettent ainsi d'obtenir des informations qualitatives ou quantitatives sur la composition chimique de l'échantillon analysé.



**Figure 15. Principe de la RMN**

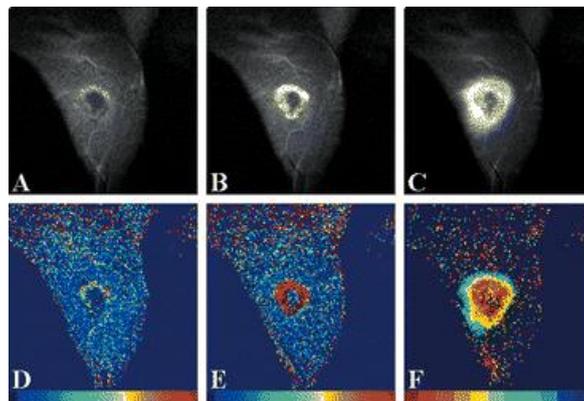
**A : Système de spins désordonnés ; B : Orientation des spins dans un champ magnétique ; C : Relaxation du système après un pulse**

L'obtention d'images en IRM nécessite l'application un gradient linéaire du champ magnétique selon un plan dans l'espace de sorte que la fréquence de résonance diffère d'un point à l'autre de l'objet. Les relaxations  $T_1$  et  $T_2$  des protons, qui dépendent de la nature des tissus, sont ainsi modifiées par la variation du champ magnétique. Ce différentiel permet d'obtenir deux images de contraste différent pondérées en  $T_1$  et  $T_2$ . Les images pondérées en  $T_1$  sont souvent utilisées pour des examens anatomiques. La séquence d'acquisition favorise alors la détection de l'eau peu mobile c'est à dire l'eau intracellulaire. De la même manière, les images pondérées en  $T_2$  ou  $T_2^*$  (temps de relaxation transversal apparent) sont utilisées comme images fonctionnelles dans la mesure où la séquence d'acquisition favorise la détection de l'eau mobile (extracellulaire ou intravasculaire). Ce dernier type d'examen donne donc accès au débit sanguin local. L'IRM permet d'obtenir des images du débit sanguin avec une bonne précision anatomique (1 mm) et temporelle (1/10 de seconde).

Deux types d'agent de contraste sont développés en IRM : les petites molécules à base de chélates de gadolinium et les macromolécules fonctionnalisées. Les agents de contraste ont pour effet de diminuer les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2^*$  des tissus dans lesquels ils se situent. Les petites molécules diffusent rapidement dans les espaces extravasculaire et extracellulaire. Elles permettent de calculer la perfusion tissulaire, la fraction du volume vasculaire et la fraction de perméabilité afin de permettre de différencier les tissus sains des tissus malins[77]. L'IRM de perfusion a ainsi permis de caractériser les anomalies vasculaires de l'angiogenèse tumorale par une imagerie dynamique pondérée en  $T_1$  après injection en bolus d'un agent de contraste [78].

Des études précliniques ont montré que les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  peuvent être utilisées comme cibles en IRM grâce à des liposomes vectorisés et marqués par du gadolinium[79]. D'autres macromolécules, encore au stade de recherche expérimentale, permettront d'allier par la suite imagerie de haute résolution et imagerie fonctionnelle[80].

L'IRM avec rehaussement dynamique de contraste (IRM-DCE, dynamic contrast enhanced) peut aussi être employée pour évaluer la microvascularisation tumorale au sein des tumeurs en utilisant comme produit de contraste un chélate de gadolinium (Figure 16)[81]. L'augmentation de perméabilité de ces vaisseaux a ainsi pu être prouvée par une élimination rapide de l'agent de contraste.



**Figure 16.** Tumeur transfectée avec le gène codant pour le VEGF165, implantée dans une patte de souris. (A-C) images à 1, 10 et 60 minutes après injection d'un agent de contraste à base de gadolinium ; (D) fraction du volume sang/plasma ; (E) perméabilité ; (F) étude interstitielle. Echelle : 5mm. (D'après Dafni et al. 2002) [81].

Le ciblage par l'anticorps monoclonal LM609, dirigé contre les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , a été utilisé dans des carcinomes humains implantés chez l'animal[79]. Cette sonde est basée sur des liposomes paramagnétiques de 300 à 350 nm de diamètre contenant du gadolinium fonctionnalisés en surface par des anticorps LM609[82]. Les examens effectués avec ce type de traceur sont pondérés en  $T_1$ .

Une autre approche de ciblage repose sur des liposomes paramagnétiques contenant du gadolinium et des perfluorocarbones qui sont fonctionnalisés en surface par des peptides synthétiques antagonistes des intégrines. Ces vecteurs ont déjà permis de détecter et de caractériser l'angiogenèse tumorale chez l'animal[83]. Les développements futurs de ces stratégies permettront de localiser les tumeurs primaires et les métastases ainsi que de déterminer l'effet de traitement antitumoraux[84].

L'IRM est une technique qui permet donc de réaliser une imagerie corps entier avec un bon contraste spontané des tissus mous. Sa résolution est infra-millimétrique et atteint même 100  $\mu\text{m}$  pour les IRM dédiées au petit animal. Cette technique présente l'avantage de ne causer aucun effet toxique aux tissus biologiques[85]. Cependant, le principal inconvénient de l'IRM est sa faible sensibilité qui peut être partiellement compensée en utilisant de hauts champs magnétiques (4,7 à 14 T) et en augmentant la durée de l'examen. De plus, les résultats sont très variables selon le type de cancer.

### **2.2.5. Imagerie radionucléaire**

Comme nous l'avons vu dans la première partie, les cellules endothéliales tumorales diffèrent des cellules endothéliales normales par leur activité proliférative et surexpriment des marqueurs spécifiques qui peuvent être ciblés par un traceur[86, 87]. Afin de bien caractériser les zones tumorales des zones saines, la méthode d'imagerie utilisée doit alors être sensible à ce marqueur à de faibles doses car l'accumulation dans le tissu de l'agent de contraste ne doit pas perturber le métabolisme. Les techniques TEP et TEMP répondent à ce critère de haute sensibilité et permettent d'imager des radiotraceurs dans des quantités infimes.

### 2.2.5.1. Imagerie TEMP

La tomographie d'émission monophotonique (TEMP) est une technique tomographique qui utilise un traceur radioactif émetteur gamma. Un photon gamma est émis lors de la désintégration du radionucléide. L'obtention d'une image repose sur la détection de ce photon par un ensemble de gamma caméras qui tournent autour du patient. Des collimateurs sont installés devant ces caméras afin de sélectionner les photons selon leur angle d'incidence. La géométrie des collimateurs permet ainsi de retrouver la direction d'émission des photons. L'image obtenue est donc initialement la projection de la répartition dans l'espace du radiotraceur. Les différentes caméras montées sur le plateau rotatif du tomographe recueillent alors différentes projections afin de réaliser des reconstructions en trois dimensions de cette distribution. La profondeur d'émission des photons est retrouvée par différents algorithmes de reconstruction[88] (Figure 17, [89]).

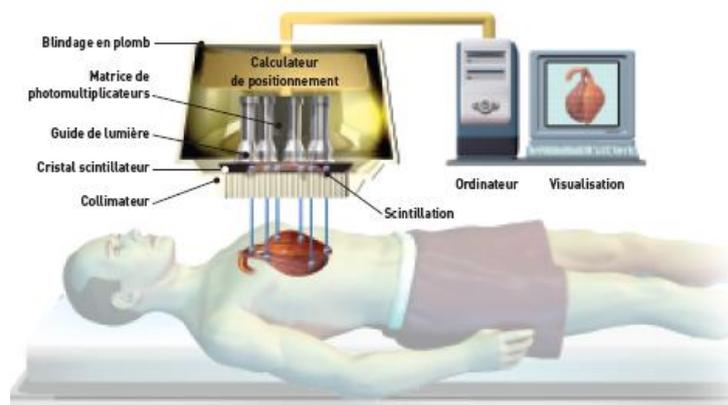


Figure 17. Principe de fonctionnement d'une gamma caméra

Les isotopes couramment utilisés en TEMP incluent des éléments comme le Technétium, l'Indium ou l'Iode. La demi-vie de certains de ces isotopes peut atteindre plusieurs dizaines de jours (6 h pour le  $^{99m}\text{Tc}$ , 13 h pour  $^{125}\text{I}$  et 2,8 jours pour  $^{111}\text{In}$ ) ce qui autorise une large utilisation de ces traceurs hors des centres de production[90]. Ces isotopes sont incorporés chimiquement à des molécules d'intérêt biologique comme des anticorps, des hormones ou des médicaments.

La sensibilité de la TEMP est de l'ordre de  $10^{-10}$  à  $10^{-11}$  M[89]. Cette technique permet seulement de réaliser des images statiques de distribution d'un radiotraceur et non un suivi métabolique. La résolution spatiale du système est de 1 à 2 mm, elle est déterminée par la

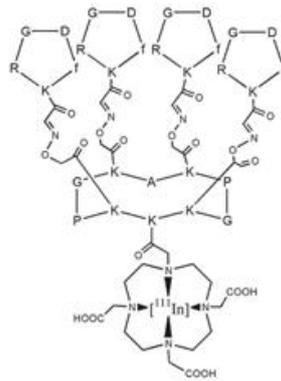
longueur et le diamètre des tubes du collimateur ainsi que par la distance entre le sujet et le détecteur. En diminuant la taille des collimateurs et en les multipliant, des résolutions inférieures à 1 mm ont été obtenues sur la souris avec une sensibilité acceptable[91]. Les principales applications concernent la scintigraphie osseuse et thyroïdienne ainsi que l'imagerie cérébrale avec le suivi de la dopamine ou l'imagerie cardiaque[92].

Le développement de radioligands spécifiques de l'angiogenèse tumorale possède plusieurs avantages[56, 90]. Tout d'abord, ces traceurs permettent la détection précoce de tumeurs lors des premiers stades de croissance, dès lors que le switch angiogénique s'est mis en place. De plus, les interactions VEGF / VEGFR étant extracellulaires, le ciblage est directement accessible via la circulation sanguine. Il n'y a donc pas de problèmes liés à la métabolisation ou la captation du traceur par les cellules tumorales.

Des vecteurs comprenant la séquence RGD ont été étudiés chez des souris avec des carcinomes ovariens humains implantés[93]. Ces traceurs ont été complexés avec de l'indium 111 et du technétium 99m. Les deux molécules ont montré une accumulation spécifique au niveau des tumeurs mais elles ont aussi été rapidement éliminées par les reins et dans l'urine. Cette étude a par ailleurs montré que la captation tumorale du  $^{111}\text{In}$ -RGD est légèrement supérieure à celle du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RGD. Cependant les acquisitions obtenues restent de mauvaise qualité, ceci est dû au manque de systèmes de détection adaptés au petit animal et à la diminution très rapide de la captation tumorale[94, 95]. L'utilisation de ces radiopharmaceutiques ne semble donc pas envisageable pour l'imagerie chez l'homme.

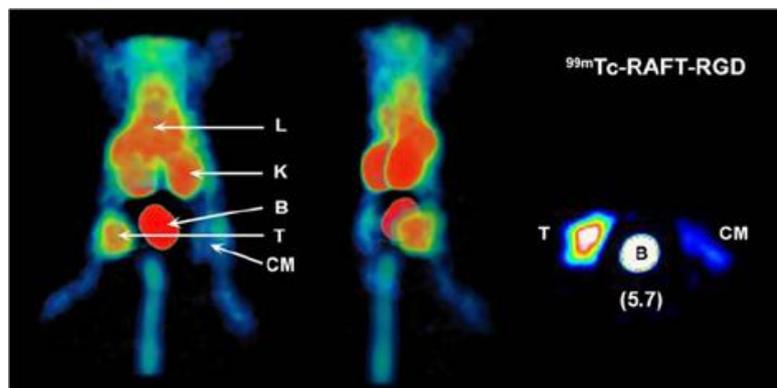
D'autres peptides ciblant les récepteurs des intégrines ont été testés après des marquages au technétium 99m ou à l'iode 125[96-98]. Ces traceurs, qui possède pour base la séquence cyclique c[-RGDf(NMe)V-], ont conduit à la conception d'un agent antiangiogénique et à des tests en phase clinique II[57, 98, 99].

L'étude de la biodistribution *in vivo* d'un autre peptide  $^{111}\text{In}$ -DOTA-RAFT-RGD a également montré une forte accumulation dans les zones tumorales. Ce type de vecteur est basé sur un cyclodécapeptide qui est fonctionnalisé par 4 séquences RGD cycliques (Figure 18). Cependant ce traceur possède les mêmes problèmes de forte clairance rénale ce qui ne permet pas actuellement d'en faire un bon agent d'imagerie[100].



**Figure 18. Structure du  $^{111}\text{In}$ -DOTA-RAFT-RGD**

L'évaluation du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD a permis d'imager la tumeur chez la souris (Figure 19)[101]. On observe aussi une forte captation dans le foie, la vessie et les reins. Les biodistributions obtenues ont ensuite été comparées par des études immunohistochimiques et autoradiographiques.



**Figure 19. Examen TEMP (vue de face et latérale) d'une souris après injection de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. L (liver), K (kidney), B (bladder), T (tumour), CM (contralateral muscle). (Modifié d'après Sancey et al. 2007) [101].**

Pour l'imagerie des récepteurs du VEGF, l'utilisation d'un traceur composé de VEGF simple chaîne marqué au  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  a également été étudié chez la souris[102]. Ces études ont montré que cet agent se fixait et était internalisé par les cellules dans les zones tumorales. Cependant des accumulations très hétérogènes ont été reportées dans les zones tumorales ainsi que de fortes accumulations dans le foie et les reins. Ces différences de captation peuvent être

expliquées par la contribution de plusieurs mécanismes : perfusion de la vasculature, problème d'accessibilité des récepteurs, compétition avec le VEGF.

Des études de binding de différentes isoformes du VEGF ont aussi été réalisées sur des cellules endothéliales et cancéreuses par l'intermédiaire de dérivés radiomarqués à l'iode 123[82, 103]. Les isoformes 121 et 165 montrent ainsi des bonnes associations spécifiques pour les cellules tumorales comparativement aux cellules saines. Des tumeurs gastro-intestinales ont notamment été imagées avec le [<sup>123</sup>I]VEGF<sub>165</sub> sans aucun effet secondaire pour les patients et sans aucune accumulation du traceur dans les tissus sains[104]. D'autres études sur les isoformes 121 et 165 ont aussi été réalisées avec des marquages à <sup>125</sup>I. Les résultats obtenus ont ainsi permis d'imager sélectivement les tumeurs implantées chez la souris[105].

Le développement de nombreux traceurs ciblant les récepteurs des intégrines ou du VEGF conduisent ces dernières années à de bons agents d'imagerie sélectifs des tumeurs[87]. Les informations recueillies sur les tumeurs et les applications futures de la TEMP restent cependant liées à sa sensibilité et sa résolution spatiale.

#### **2.2.5.2. Imagerie TEP**

La tomographie par émission de positons (TEP) est également une technique d'imagerie fonctionnelle *in vivo* mesurant la distribution tridimensionnelle d'un traceur radioactif. Le principe de détection est cependant très différent de la TEMP car les traceurs sont ici marqués par un isotope émetteur de positons[106, 107].

Une fois émis, le positon ( $\beta^+$ ) parcourt quelques millimètres dans les tissus (d) durant lesquels il perd toute son énergie cinétique (Figure 20). Quand le positon est pratiquement au repos, il interagit avec un électron ( $e^-$ ) du milieu, suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma de 511 keV, émis dans des directions opposées. Cette propriété permet de déterminer la projection du lieu d'annihilation au moyen de détecteurs indépendants qui mesurent en coïncidence ces deux photons. Les images obtenues par reconstruction tomographique permettent alors de quantifier la biodistribution du traceur.

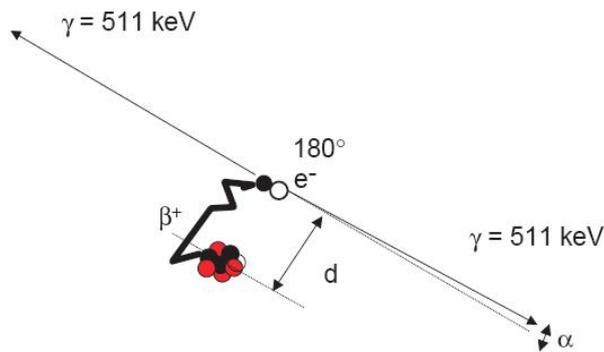


Figure 20. Désintégration du positon et réaction d'annihilation

Les émetteurs de positons les plus utilisés en TEP sont classés en fonction de leurs caractéristiques physiques et de leurs périodes radioactives[108]. La période radioactive ou demi-vie correspond à la durée nécessaire pour que l'activité d'une source soit divisée par deux. Les caractéristiques physiques de ces principaux isotopes sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous.

Isotopes	<sup>11</sup> C	<sup>13</sup> N	<sup>15</sup> O	<sup>18</sup> F	<sup>64</sup> Cu
Energie cinétique maximale des $\beta^+$ (MeV)	0,96	1,19	1,72	0,63	1,67
Energie cinétique la plus probable des $\beta^+$ (MeV)	0,39	0,49	0,73	0,25	0,68
Libre parcours maximal dans l'eau (mm)	3,9	5	7,9	2,3	6,5
Libre parcours moyen dans l'eau (mm)	1,1	1,5	2,7	0,6	2,1
Période des radioéléments (min)	20,4	10,0	2,1	109,8	762

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des principaux isotopes émetteurs de positons utilisés en TEP

Parmi ces émetteurs de positons, on distingue tout d'abord l'oxygène 15 (<sup>15</sup>O), l'azote 13 (<sup>13</sup>N) et le carbone 11 (<sup>11</sup>C), de périodes respectives de 2, 10 et 20 minutes[90]. Ces isotopes, constitutifs de l'ensemble des composés biologiques, permettent de réaliser des marquages de ces molécules et de suivre leur métabolisation. Compte tenu de leur courte durée de vie, la production de ces isotopes et la synthèse des traceurs doivent être réalisées rapidement sur le lieu de réalisation des examens TEP[109]. L'utilisation de ces isotopes est limitée aux centres de recherche multidisciplinaires, disposant de radiochimistes assurant la

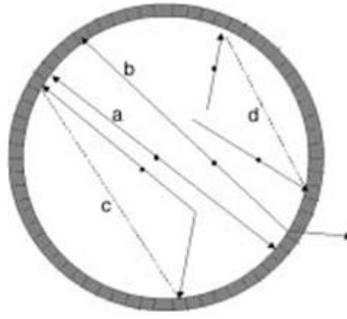
production du traceur, d'ingénieurs et de médecins pour la réalisation des examens d'imagerie.

Il y a ensuite les émetteurs dont la période varie de 1 à plusieurs heures. La production et le marquage peuvent alors être réalisés par un laboratoire radiopharmaceutique. Le traceur peut être ensuite distribué dans des centres cliniques disposant d'un appareillage TEP. L'isotope le plus utilisé est le fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ), qui a une période de 120 minutes. La diversification des applications de la TEP a conduit à l'utilisation de nouveaux isotopes tels que le gallium 68 ou le cuivre 64[110]. Le gallium 68 a ainsi permis de marquer des analogues de la somatostatine avec le développement de traceur de type ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA) pour le ciblage de plusieurs types de tumeurs[111]. Les différents radionucléides du cuivre sont également très étudiés car ils permettent d'obtenir une large variété de composés possédant des demi-vies et des énergies de positons très variées[112, 113].

Il y a enfin le brome 76 ( $^{76}\text{Br}$ ) qui est caractérisé par une période de 16 heures et par une énergie d'émission des positons relativement élevée. Cependant la combinaison de ces deux phénomènes entraîne une majoration des doses reçues par le patient par rapport au  $^{18}\text{F}$ . Pour des raisons dosimétriques, le  $^{76}\text{Br}$  n'est donc pas recommandé pour des examens diagnostiques. De plus, la difficulté de production de ce radionucléide limite ces applications.

Les premières molécules marquées au  $^{18}\text{F}$  ont été synthétisées à la fin des années 1970[114, 115]. À la même époque, ont été construits les premiers tomographes à émission de positons (caméras TEP) utilisables dans un environnement clinique[116]. Les tomographes sont constitués d'une série de couronnes de détecteurs élémentaires répartis en anneau autour du patient[117]. Chaque détecteur est constitué d'un cristal scintillateur et d'un photomultiplicateur optimisés pour la détection des photons gamma.

La détermination du lieu d'annihilation des positons est effectuée par un système électronique de détection basée sur deux critères : une fenêtre temporelle (de l'ordre de 6 à 15 ns) et une fenêtre en énergie. La détection des deux photons  $\gamma$  de 511 keV résultant d'une annihilation correspond à une coïncidence vraie (annihilation a, Figure 21). Si l'un des deux photons n'est pas détecté, la désintégration n'est pas mesurée ce qui conduit à une plus faible efficacité de détection (annihilation b).



**Figure 21. Nature des évènements enregistrés en coïncidence**

En raison des limites de l'appareil de mesure au niveau de la résolution en énergie et de la résolution temporelle, le circuit de coïncidence enregistre de nombreux événements parasites qui génèrent du bruit de mesure. Du fait de la résolution en énergie limitée des scintillateurs, une fraction des photons ayant subi une diffusion Compton est acceptée, il en résulte l'enregistrement de coïncidences diffusées (annihilation c). La diffusion Compton conduit à une perte d'énergie et un changement de direction d'un photon incident à la suite d'une collision avec un atome. La détection de deux photons  $\gamma$  de 511 keV dans la fenêtre temporelle de coïncidence résultant de deux annihilations distinctes entraîne la mesure d'une coïncidence aléatoire (événement d). Les coïncidences aléatoires et diffusées sont donc des sources de bruit qui nécessitent des corrections informatiques afin de permettre une meilleure quantification du traceur.

Comme le principe de base de la TEP consiste à détecter les deux photons émis de 511 keV, l'information mesurée correspond au lieu d'annihilation et non à celui de l'émission  $\beta^+$ . La distance entre ces deux lieux est appelée libre parcours moyen du positon (distance d, Figure 20). Elle est déterminée par l'énergie d'émission des positons et la densité du milieu traversé ; elle constitue donc une limite en terme de résolution spatiale[118]. Pour le  $^{18}\text{F}$ , le libre parcours moyen d'un positon est de 0,6 mm dans l'eau et de 2 à 3 mm dans les tissus biologiques. Une autre limite intrinsèque de la résolution spatiale provient de la non-colinéarité des deux photons de 511 keV résultant de l'annihilation d'un positon qui n'a pas intégralement perdu son énergie cinétique. Ce défaut de colinéarité peut être de l'ordre de  $0,5^\circ$  (Figure 20) conduit à une incertitude sur la position de la désintégration initiale. Enfin la résolution spatiale d'un tomographe TEP dépend aussi de la taille des détecteurs élémentaires.

La localisation anatomique précise des zones tumorales n'est souvent pas évidente sur les images TEP reconstruites, par manque de références anatomiques, seules les structures fixant le traceur étant visualisées. En revanche, les images obtenues avec la TDM ou l'IRM fournissent de manière très précise la localisation des structures anatomiques. Le développement d'imagerie multimodale permet d'exploiter au mieux l'apport de chaque type d'imagerie. Les images issues de ces différentes techniques sont complémentaires et peuvent être fusionnées. Les industriels proposent actuellement des appareils TEP/TDM qui réalisent lors de la durée de l'examen les deux acquisitions. Les avantages de ces équipements sont nombreux et la fusion des images permet une excellente localisation anatomique des foyers fixant le FDG. Les derniers développements permettent d'envisager des acquisitions corps entier TEP/TDM en moins de 20 minutes.

Le principal inconvénient à cette technique est sa faible résolution spatiale, les caméras qui sont actuellement utilisées en TEP clinique ont une résolution de 5 à 6 mm. Certains prototypes atteignent une résolution spatiale 2,5 mm alors que la plus petite caméra TEP utilisée pour l'animal à une résolution spatiale de 1,6 mm grâce à l'utilisation de détecteurs composés de cristaux plus performants. Malgré toutes ces avancées technologiques pour améliorer cette résolution, le libre parcours moyen du positon restera la limite physique de cette modalité.

La tomographie par émission de positons est par contre une modalité d'imagerie médicale qui permet de détecter de manière très sensible des accumulations de traceur. Selon le type de cible étudié, les examens peuvent être réalisés avec des quantités infimes de molécules marquées ( $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  mole) ce qui ne perturbe pas le fonctionnement de l'organisme[119].

La molécule la plus largement utilisée en TEP est le  $^{18}\text{F}$ -FDG (2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-désoxy-D-glucose) en raison de ses nombreuses applications pour la détection de maladies néoplasiques[120-122]. C'est le principal traceur du métabolisme du glucose.

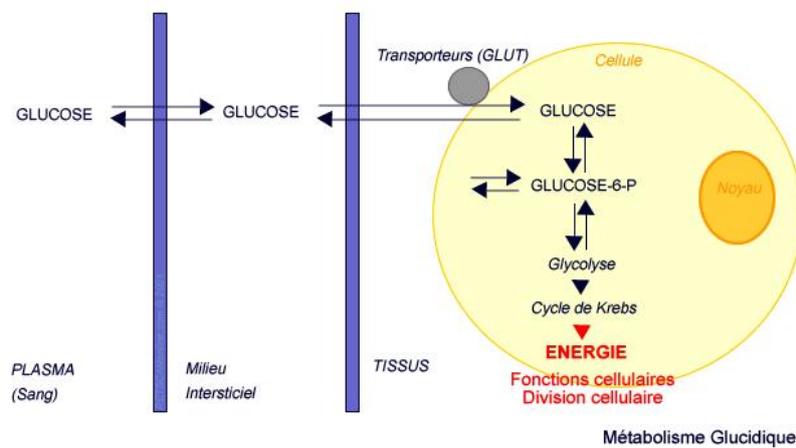
#### ***2.2.5.2.1. Métabolisation du glucose et du FDG***

Depuis les travaux de Warburg dans les années 1930[123], les perturbations du métabolisme glucidique des cellules tumorales sont bien connues. Ces modifications ne proviennent pas d'un dérèglement anarchique du métabolisme tumoral. Elles résultent d'une

programmation génétique parfaitement ordonnée sous la dépendance directe de la progression tumorale. Cette programmation reproduit dans un microenvironnement pathologique, caractérisée par la prolifération cellulaire non régulée, les mécanismes physiologiques mis en jeu lors de la prolifération des tissus sains : croissance, cicatrisation, renouvellement tissulaire[124]. Ces altérations métaboliques réorientent alors le métabolisme cellulaire vers la synthèse des précurseurs des acides nucléiques indispensable à la multiplication des cellules.

La possibilité d'exploiter cette augmentation de consommation de glucose par les cellules tumorales pour détecter les tumeurs ou mesurer leur activité métabolique est illustrée par le développement de traceurs détenant de bonnes affinités avec le transporteur du glucose et avec l'enzyme catalysant la première étape de la glycolyse.

En effet, le premier paramètre important lors de la conception d'un traceur est de conserver les interactions essentielles de ce dernier avec le transporteur transmembranaire du glucose. Ce transport passif de type uniport est effectué par des protéines à 12 hélices transmembranaires les perméases du glucose GLUT (Figure 22).



**Figure 22. Transport et métabolisme du glucose**

Le second paramètre important à conserver pour un traceur est son affinité avec l'enzyme de la première étape de la glycolyse une fois la molécule internalisée. Cette réaction est la phosphorylation de l'hydroxyle en position 6 qui transforme le glucose en glucose-6-phosphate (glucose-6-P, Figure 22). Elle est catalysée par une kinase, soit par une hexokinase qui est ubiquitaire dans les tissus chez les mammifères soit par la glucokinase dans le foie et les cellules pancréatiques. Comme la phosphorylation est énergiquement très favorisée, cette

réaction est irréversible. Seule la présence de phosphatase dans le cytoplasme permet au retour en arrière. Le glucose-6-phosphate est ensuite métabolisé au cours des étapes suivantes de la glycolyse. Cette voie métabolique est un mécanisme de régénération de l'ATP et a pour produit final le pyruvate.

Parmi les analogues fluorés du glucose développés pour l'imagerie TEP, le  $^{18}\text{F}$ -FDG (Figure 23) est apparu comme le meilleur candidat de cette classe de traceurs. C'est un glucose modifié où l'hydroxyle en position 2 est substitué par un atome de fluor.

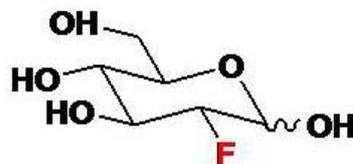
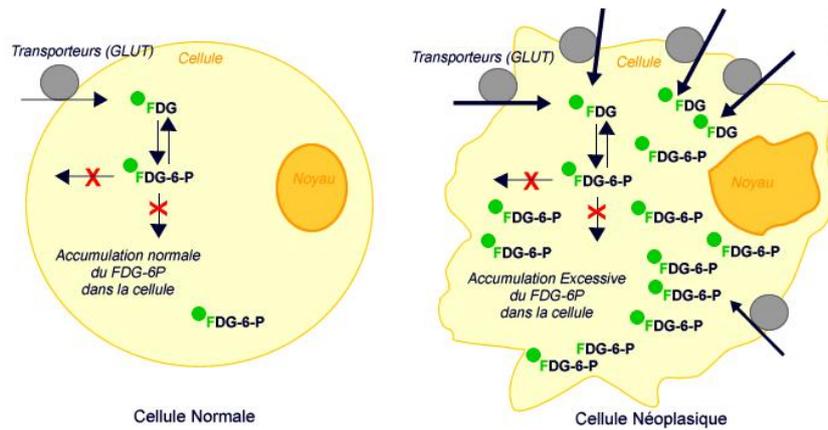


Figure 23. Molécule de FDG

Au cours du métabolisme pathologique, la transformation tumorale s'accompagne d'une hyperexpression du gène codant pour GLUT-1 ce qui se traduit par une augmentation des ARNm correspondant[125] et donc par une augmentation du nombre total de transporteurs GLUT-1 exprimés à la surface des cellules tumorales (Figure 24). De plus, l'augmentation du transport de glucose par diffusion facilitée n'est que la conséquence de sa consommation accrue dans la glycolyse. Cette métabolisation rapide entraîne une diminution du glucose intracellulaire et donc accroît la différence du gradient de concentration extracellulaire / intracellulaire. Après être entré dans la cellule, le  $^{18}\text{F}$ -FDG est phosphorylé par une hexokinase et va s'accumuler dans la cellule sous forme de FDG-6-phosphate (Figure 24). Les premiers travaux qui ont établi ce mécanisme d'accumulation du FDG dans les tumeurs remontent aux années 80 sur des modèles animaux [126-128].



**Figure 24. Transport et métabolisme du FDG**

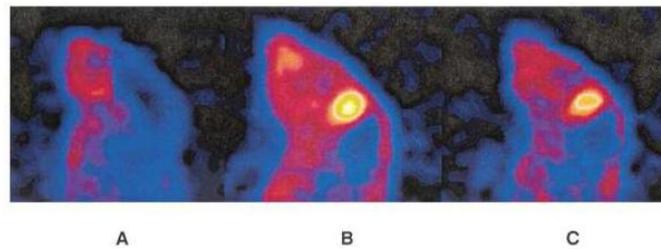
Dans les cellules tumorales, la reprogrammation génétique des enzymes clefs conduit à favoriser la voie métabolique de la glycolyse au détriment de la néoglucogenèse qui permet la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques. L'augmentation de la quantité d'hexokinase dans les cellules tumorales a été confirmée dans de nombreuses études[129, 130]. L'activité de l'hexokinase est aussi fortement augmentée, elle se trouve alors exprimée sous une forme liée aux mitochondries qui est insensible au rétrocontrôle négatif du glucose-6-phosphate[131].

La seconde étape de la glycolyse est une isomérisation, c'est une réaction réversible catalysée par la glucose-6-phosphate isomérase. Du fait de la substitution de l'hydroxyle sur le carbone 2, le FDG-6-phosphate n'est pas un substrat de cette enzyme et ne peut donc pas poursuivre sa métabolisation au cours de la glycolyse. De ce fait, le FDG-6-phosphate est piégé dans les cellules proportionnellement à la vitesse du transport membranaire et à l'activité de l'hexokinase[132]. De plus, seule une faible quantité de FDG-6-phosphate est retransformée en FDG car les cellules avides de glucose ne contiennent qu'une faible quantité de glucose-6-phosphatase.

Le traceur s'accumule donc de façon particulièrement intense, bien que non spécifique, dans les cellules tumorales du fait de leur consommation accrue de glucose. Les sites d'hyperaccumulation du FDG sont alors facilement visibles lors d'un examen TEP.

#### 2.2.5.2.2. Traceur de l'angiogenèse tumorale

Le développement de radioligands spécifiques de l'angiogenèse tumorale est aussi très important en imagerie TEP[82, 87]. Le [ $^{18}\text{F}$ ]galacto-RGD permet ainsi de suivre le niveau d'expression des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  dans des processus d'angiogenèse tumorale[57]. Cependant ce traceur montre des accumulations très hétérogènes et diffuse rapidement[133]. Des tests chez la souris possédant une tumeur cérébrale ont également été effectués sur des peptides avec la séquence RGD radiomarqués au fluor 18. Les résultats ont alors montré une forte accumulation dans les zones tumorales comparativement au tissu sain (Figure 25,[134]). Cependant le traceur montre aussi des accumulations dans le foie et les reins[135] ainsi qu'une élimination rapide.

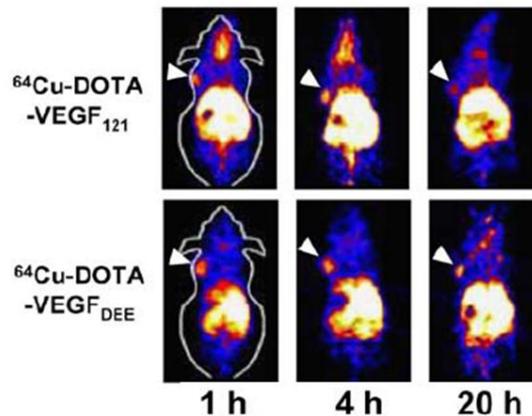


**Figure 25.** (A) Imagerie micro-TEP d'un dérivé RGD marqué au  $^{18}\text{F}$  d'une souris saine ; (B) souris avec glioblastome 30 min. après injection du traceur et (C) même souris 60 min après injection. (D'après Chen et al. 2004) [134].

Parmi l'imagerie des récepteurs du VEGF, une famille de composés concerne les anticorps anti-VEGF ou le VEGF marqué [84]. Des études ont été effectuées sur un VEGF simple chaîne marqué au cuivre 64 et possédant une DOTA comme chélateur[102]. Ce  $^{64}\text{Cu}$ -scVEGF-PEG-DOTA montre une bonne stabilité dans le plasma et une faible clairance. Il est beaucoup moins capté au niveau des reins comparativement à son analogue technétié. Il possède en plus une accumulation tumorale supérieure mais sa rétention au sein d'une tumeur reste très hétérogène.

L'isoforme 121 du VEGF a aussi été marqué au  $^{64}\text{Cu}$ /DOTA chez l'animal avec un glioblastome humain implanté[136, 137]. Cette expérience a permis de visualiser une accumulation rapide et spécifique du traceur dans une tumeur U87 très vascularisée. Cependant la visualisation est dépendante de l'expression du VEGFR-1 et du VEGFR-2 *in vivo* et il existe de grandes différences d'accumulations en fonction du type de tumeur[138].

Une étude comparative de distribution entre l'isoforme 121 du VEGF et un mutant produit par recombinaison a aussi été réalisée sur un modèle de tumeur mammaire [139]. Ces 2 traceurs ont été fonctionnalisés par une DOTA et radiomarqués au  $^{64}\text{Cu}$  (Figure 26). Les 2 traceurs montrent une forte accumulation tumorale mais le mutant est beaucoup moins éliminé au niveau rénal. Cette molécule possède donc la même efficacité de ciblage que la forme native tout en étant beaucoup moins toxique.



**Figure 26. Imagerie microPET de souris avec tumeur implantée. Résultats 1h, 4h et 20h après l'injection d'un des 2 traceurs. (D'après Wang et al. 2007) [139].**

La biodistribution du bevacizumab radiomarqué au  $^{89}\text{Zr}$  a également été réalisée sur des souris possédant une tumeur implantée[140]. Les résultats ont montré une bonne incorporation tumorale, équivalente pour les 2 isotopes, malgré les accumulations retrouvées dans le foie et les reins. Ces molécules représentent donc de bons traceurs potentiels pour l'imagerie TEP.

La TEP est donc l'une des techniques les plus performantes actuellement. Son développement est directement lié à la banque de traceurs disponibles et à leurs multiples applications. Parmi tous les isotopes émetteurs de positons disponibles, le fluor 18 représente le meilleur compromis pour le développement de radiotraceurs. Cet intérêt est lié aux propriétés physiques et nucléaires de ce radioisotope. Sa période, l'émission de positon de faible énergie et leur relativement faible libre parcours moyen en font le candidat idéal pour le radiomarquage de molécules en TEP.

Les développements qui sont actuellement réalisés dans la conception de traceurs TEP permettent d'obtenir des systèmes de plus en plus sélectifs vis-à-vis d'une cible moléculaire. Cependant les études de biodistribution de ces traceurs par cette modalité d'imagerie ne permettent pas de recueillir des données sur l'interaction traceur – cible, sur la compétition du traceur avec le ligand de référence ou sur des études de déplacement dose dépendant. Pour obtenir des informations sur la biodistribution des traceurs TEP à un niveau cellulaire, il est donc nécessaire de s'affranchir de cette limite de résolution spatiale millimétrique. L'utilisation d'une autre modalité d'analyse indirecte est alors requise pour atteindre un nouveau niveau d'informations.

Nous proposons d'utiliser une méthode de détection élémentaire avec une bonne sensibilité et une haute résolution spatiale afin d'étudier la biodistribution d'analogues de traceurs TEP marqués au fluor 19 stable. Les informations recueillies via cette approche multimodale pourront par la suite être exploitées pour l'interprétation de résultats obtenus en TEP.

### **3. Analyses du fluor 19**

#### ***3.1. Le fluor 19***

##### **3.1.1. Historique de la chimie du fluor**

Le fluor élémentaire a été isolé pour la première fois en 1886 par Henry Moissan (Prix Nobel 1906). Bien qu'il soit l'halogène le plus répandu dans la croûte terrestre, le fluor n'a été identifié que dans la composition de seulement 13 molécules organiques à l'état naturel dans certaines plantes et micro-organismes[141]. Il faudra attendre le début des années 1960 pour que les propriétés thérapeutiques des molécules organiques fluorées soient découvertes avec le développement d'anesthésiques et d'antitumoraux. La découverte du fluorouracile et des fluorocorticoïdes ont alors montré que la présence de fluor dans une molécule pouvait modifier ses propriétés biologiques. Le développement de nouveaux réactifs et de nouveaux synthons a conduit à des avancées importantes qui ont permis de viser de nouvelles cibles moléculaires. Un très grand nombre de médicaments et de produits phytosanitaires fluorés

sont actuellement utilisés. Les parts de marché des composés fluorés sur le marché pharmaceutique sont passées de 2 % en 1970 à 18 % en 2000.

### 3.1.2. Propriétés et effets du fluor

L'atome de fluor possède un faible rayon de Van der Waals (1,47 Å) qui est intermédiaire entre celui de l'hydrogène (1,20 Å) et celui de l'oxygène (1,52 Å). Le remplacement d'un hydrogène ou d'un oxygène par un atome de fluor ne modifie alors que peu le volume total de la molécule. De plus, le fluor a une faible polarisabilité et possède la plus forte électronégativité de tous les éléments chimiques. Cette propriété implique que la liaison C-F possède un caractère ionique relativement important et lui confère une énergie supérieure ( $485 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) à celle des liaisons C-H ( $412 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) et C-O ( $356 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ).

L'introduction d'un ou plusieurs atomes de fluor à la place d'atomes d'hydrogène dans une molécule biologique peut ainsi être réalisée pour bloquer un site métabolique ou pour moduler les propriétés physico-chimiques et structurales de la molécule. Ces modulations affectent notamment la distribution électronique, l'acidité, l'hydrophobicité ou les liaisons hydrogène de la molécule.

L'affinité d'une substance pour sa cible biologique et les interactions lors de son transport peuvent alors être augmentées. La stabilité métabolique d'une substance active est l'un des facteurs clés qui détermine sa biodisponibilité c'est-à-dire la possibilité d'atteindre sa cible biologique. Les propriétés de l'atome de fluor confèrent donc une très grande force à la liaison C-F ce qui se traduit par une grande inertie chimique et une meilleure stabilité métabolique[142]. Une molécule biologiquement active circulant dans l'organisme subit des processus qui tendent à son élimination (oxydation par des enzymes, hydrolyse acide). Ainsi le remplacement d'une liaison C-H métabolisable par une liaison C-F plus résistante permet à la molécule de résister plus longtemps dans l'organisme.

La lipophilie est également un facteur qui joue un rôle important pour le transport et l'absorption d'une molécule. L'introduction d'atomes de fluor est alors utilisée pour optimiser la lipophilie et améliorer le passage membranaire des composés fluorés[143].

### ***3.2. Méthodes de détection du fluor***

Peu de techniques d'analyses élémentaires permettent d'effectuer une quantification du fluor 19. Ce sont des techniques permettant une détection et une quantification du fluor mais elles sont destructives et ne permettent pas de réaliser une imagerie de la distribution du composé fluoré.

#### **3.2.1. Dosage colorimétrique**

Un dosage colorimétrique permet de réaliser une analyse élémentaire lorsqu'une réaction chimique donne des produits colorés dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Ces dosages s'appuient donc sur la loi de Beer-Lambert. La réalisation d'une gamme d'étalonnage est indispensable pour régler le spectrophotomètre. Elle permet de déterminer la zone de linéarité de la méthode par l'intermédiaire d'analyses réalisées sur des échantillons de concentrations élémentaires connues. Pour réaliser un dosage colorimétrique, il faut que la coloration soit stable dans le temps, que le composé à analyser soit dans des concentrations très faibles et que la gamme étalon soit réalisée dans les mêmes conditions physico-chimiques que les essais.

Le dosage du fluor est basé sur la couleur du complexe formé par les ions fluorures avec l'alizarine. Il permet de déterminer la concentration d'ions fluorures contenus dans des échantillons aqueux, les solides et les végétaux. Le distillat de ces échantillons, obtenu par des méthodes d'extraction, est mélangé avec une solution d'alizarine et de lanthane pour former un complexe bleu. Les mesures sont réalisées à un pH compris entre 4,3 et 4,7 et à une absorbance de 620 nm.

Les limites de détection pour les fluorures totaux dans les échantillons liquides aqueux est de 0,01 mg/L, de 30 µg/g dans les solides et de 2,0 µg/g dans la végétation. Les limites de quantification pour les fluorures totaux dans les échantillons liquides aqueux est de 0,04 mg/L, de 90 µg/g dans les solides et de 6,0 µg/g dans la végétation.

C'est une méthode de quantification qui conduit à la destruction de l'échantillon et ne donne pas accès à une imagerie du fluor.

### **3.2.2. Dosage potentiométrique**

La méthode potentiométrique dite « électrode à ion spécifique pour le fluorure » est basée sur l'étude de la variation du potentiel d'une électrode indicatrice spécifique en fonction de la concentration en ions fluorures des échantillons. Le dispositif expérimental est constitué d'une électrode spécifique, d'une électrode de référence dont le potentiel est constant et d'un potentiomètre.

Dans le cas des ions fluorures, l'électrode spécifique est une électrode à membrane solide constituée par un cristal de trifluorure de lanthane dopé à l'euporium. Cette électrode est environ 1000 fois plus sensible aux ions  $F^-$  qu'aux autres ions. Seuls les ions hydroxydes ( $OH^-$ ) peuvent interférer pour le dosage des ions fluorures, il est donc nécessaire de travailler en milieu tamponné légèrement acide, à un pH compris entre 5 et 6 pour que la force ionique des solutions soit toujours identiques d'une analyse à l'autre.

La limite de détection pour les fluorures totaux dans les échantillons est de l'ordre de  $1 \mu\text{g/g}$  [144]. Comme pour le dosage colorimétrique, cette méthode destructive permet une quantification du fluor mais pas d'imagerie possible.

### **3.2.3. Spectrométrie de masse d'ions secondaires ou SIMS**

Les différentes techniques d'analyse de surfaces permettent de caractériser un échantillon en bombardant la matière par un flux de particules (électrons, ions) ou un rayonnement photonique (U.V., rayon X) émis par une source primaire.

L'interaction d'ions de quelques keV d'énergie avec la surface d'un solide donne naissance à des émissions secondaires variées de photons, d'électrons, d'atomes et de molécules neutres ou ionisées (Figure 27). Ces ions secondaires, caractéristiques de la nature chimique des éléments qui composent le solide, sont alors collectés et analysés par un spectromètre de masse sur la base de leur rapport masse / charge. En balayant l'échantillon par le faisceau d'ions incident, il est possible de reconstruire des images qui rendent compte de la répartition surfacique des éléments. Des appareils commerciaux permettent d'obtenir une résolution latérale inférieure à 50 nm. Du fait de la pulvérisation de la surface de l'échantillon, la technique permet la reconstitution de profils en profondeur jusqu'à une profondeur de 10  $\mu\text{m}$ .

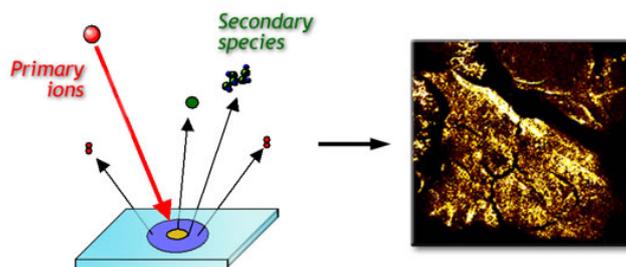


Figure 27. Principe de la méthode SIMS

Les limites de détection en SIMS sont typiquement inférieures à 0,1 ppm. De plus en plus d'études sont actuellement en développement afin d'explorer l'utilisation de la SIMS pour l'analyse cellulaire[145-148].

La technique SIMS a été proposée pour la première fois en 1997 comme méthode d'analyse de pesticides adsorbés à la surface de sols[149]. Dans un domaine où les techniques d'analyse les plus sensibles s'appliquent essentiellement à des phases liquides résultant de processus d'extraction et de purification, le mérite d'une analyse de surface est évidemment de permettre une analyse directe d'échantillons sans traitements. Tout cela bien entendu avec les avantages d'une analyse par spectrométrie de masse, à savoir la détection de la molécule concernée mais aussi de ses fragments caractéristiques dont les intensités respectives peuvent varier en fonction des conditions d'adsorption et de dégradation, ces dernières circonstances pouvant enfin permettre la détection de nouveaux produits. Ce procédé a alors été utilisé pour l'analyse élémentaire et la localisation de drogues possédant des éléments exogènes tels que le brome ou le fluor[150, 151].

### 3.2.4. Microsonde nucléaire : analyses par faisceaux d'ions

Parmi les techniques d'analyses élémentaires existantes, les analyses par faisceaux d'ions permettent d'avoir accès à la composition en éléments chimiques d'échantillons en fonction du protocole expérimental utilisé. Cette technique donne aussi accès à la distribution en profondeur de l'élément choisi.

L'analyse par faisceau d'ions est un terme générique qui reprend toutes les méthodes d'analyses qui sont basées sur les interactions aux niveaux nucléaire et atomique d'un faisceau de particules chargées accélérées avec un échantillon-cible. Lorsqu'une particule chargée énergétique (de l'ordre du MeV) pénètre dans un matériau, elle interagit avec les électrons et les noyaux des atomes constitutifs. Elle subit alors un ralentissement, une éventuelle modification de sa trajectoire et il peut aussi se produire une émission secondaire de rayonnements X,  $\gamma$  ou corpusculaire caractéristiques des éléments constitutifs de l'échantillon ((Figure 28)).

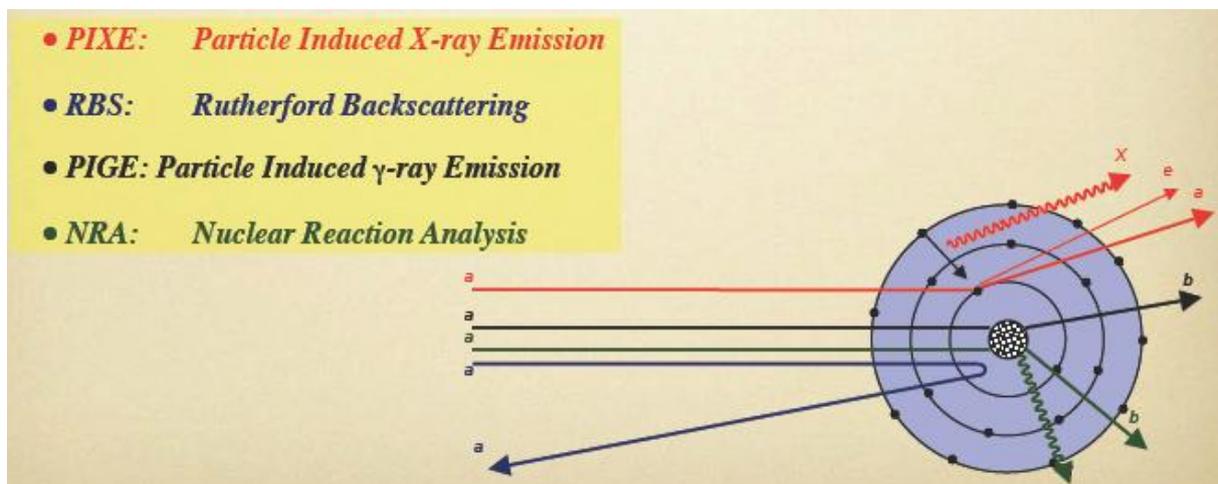


Figure 28. Analyses par faisceaux d'ions. Avec a = particule incidente, b = nouvelle particule émise, e = électron, X = photon X

L'analyse de ce rayonnement secondaire permet donc d'obtenir diverses informations sur le matériau bombardé telles que sa composition élémentaire et la détermination des concentrations en surface ou en profondeur[152, 153].

### 3.2.4.1. Principe

Dans une microsonde nucléaire, le faisceau de particules est constitué de protons, de deutons ou d'hélions. Il est délivré par un accélérateur de particules puis focalisé par différents systèmes de lentilles électromagnétiques sur l'échantillon placé dans une chambre d'analyse sous vide poussé (Figure 29). Des détecteurs placés à proximité de l'échantillon analysent le rayonnement secondaire induit[154].



**Figure 29. Ligne microsonde de la plate-forme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) du CENBG (Centre d'études nucléaires de Bordeaux – Gradignan)**

La nature du rayonnement secondaire détecté définit le type d'analyse. Les techniques les plus couramment utilisées sont la PIXE (Particle induced X-ray emission), la PIGE (Particle induced  $\gamma$ -ray emission) et le RBS (Rutherford backscattering spectrometry).

### **3.2.4.2. Techniques d'analyses**

#### **3.2.4.2.1. PIXE**

La méthode PIXE est basée sur l'ionisation des couches internes (K, L ou M) de l'atome cible par la particule chargée et sur la détection du rayonnement X produit par le réarrangement électronique. Comme ce rayonnement X est caractéristique de l'élément ionisé, on peut tirer de l'analyse du spectre X obtenu des informations sur la composition élémentaire de l'échantillon[155].

La technique est donc fondée sur l'interaction des particules chargées accélérées avec le cortège électronique des atomes de la cible (Figure 30). Lors de cette interaction, un électron d'énergie de liaison  $E_1$  est éjecté; la lacune alors créée est comblée par un électron d'énergie de liaison  $E_2$  issu d'une couche plus externe du cortège électronique. Ce réarrangement s'accompagne de l'émission de rayonnement X d'énergie  $h\nu = E_1 - E_2$ . L'énergie de liaison des électrons est caractéristique de la couche électronique et du numéro

atomique de l'élément considéré. De ce fait, l'énergie des photons X émis est caractéristique à la fois de l'élément excité et du type de réarrangement électronique mis en jeu.

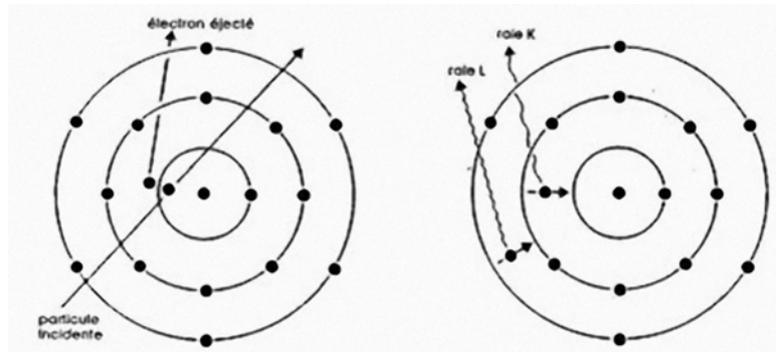


Figure 30. Schéma de principe d'émission X par des particules chargées accélérées

Les transitions électroniques impliquées dans l'émission de rayonnement X sont présentées dans la Figure 31. Les transitions vers le niveau K sont dénotées raies K. Si l'électron vient du niveau L, on note la raie  $K\alpha$  et s'il vient du niveau M,  $K\beta$ .

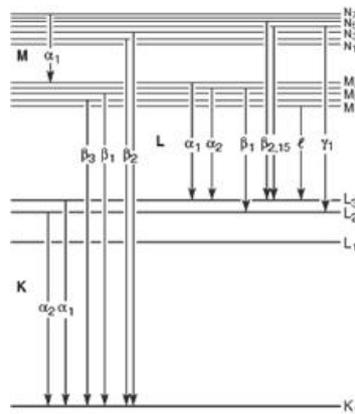


Figure 31. Transitions électroniques conduisant à la production d'émission X

Les analyses PIXE sont généralement réalisées avec des faisceaux de protons d'énergie de l'ordre de 2 à 3 MeV. Cette gamme d'énergie permet d'obtenir une bonne sensibilité pour la détection des raies K pour les éléments chimiques de numéro atomique  $Z < 40$  du fait des sections efficaces d'ionisation élevées pour la couche K. Cependant un autre mode de désexcitation devient prépondérant pour de faibles énergies de liaisons ( $Z < 20$ ). On parle alors d'émission d'électron Auger quand le dégagement d'énergie issu du réarrangement

électronique est capté par un autre électron. Ce dernier possède alors une énergie supérieure à son énergie de liaison et il est éjecté à son tour. Ce phénomène constitue donc une réaction compétitive de l'émission de rayonnement X. De plus, on observe également une baisse de sensibilité pour les éléments lourds en raison d'une diminution des sections efficaces d'ionisation[156].

La détermination quantitative des teneurs élémentaires d'un échantillon à partir du spectre X se fait en général à partir d'un standard interne, dont la composition exacte est connue, qui permet de négliger les effets de surface et de matrice, la géométrie de la détection, la fluctuation du faisceau incident.

Le bruit de fond continu présent dans un spectre PIXE est la principale cause de limitation de la détection d'un élément. Ce bruit de fond provient du bremsstrahlung (rayonnement de freinage) des protons incidents, du bremsstrahlung des électrons secondaires et des rayons gamma provenant de réactions nucléaires. L'intensité de ce phénomène est proportionnelle au carré de la décélération des particules chargées. L'intensité du bremsstrahlung produit par les protons est donc beaucoup moins intense que celle produite par les électrons ce qui contribue à la grande sensibilité de la méthode PIXE. La hauteur du bruit de fond est utilisée en pratique pour déterminer la limite de détection ( $I_{dd}$ ) d'un élément donné.

La spectrométrie PIXE permet donc de réaliser une analyse multi-élémentaire de l'échantillon et offre une bonne sensibilité pour la majorité des éléments[157]. Typiquement, la limite inférieure de détection est de l'ordre du ppm ( $\mu\text{g/g}$ ).

#### **3.2.4.2.2. PIGE**

Dans le cas de la méthode PIGE, les ions accélérés interagissent avec le noyau des atomes de l'échantillon. Des noyaux composés se forment alors dans un état fortement excité et se désexcitent en émettant un rayonnement  $\gamma$ . Contrairement à la PIXE où la section efficace de production (probabilité d'interaction de deux particules) évolue de façon monotone avec l'énergie et le numéro atomique, la détection d'un élément en PIGE dépend de l'existence éventuelle d'une réaction nucléaire appropriée et de sa section efficace correspondante. De plus, pour produire ces réactions nucléaires, il faut que les particules incidentes possèdent une énergie suffisante pour vaincre la répulsion coulombienne (répulsion

électrostatique qu'oppose le noyau) et pénétrer dans le noyau de l'atome. Les réactions nucléaires sont particulièrement utiles pour doser les éléments légers compris entre le lithium et le soufre avec une sensibilité de quelques dizaines de ppm[158].

Pour chaque élément, plusieurs réactions sont utilisables. Le choix de la réaction dépendra de paramètres tels que la section efficace, la composition chimique de la cible ou l'épaisseur de l'échantillon analysé.

Le spectre d'énergie des rayonnements émis est caractéristique de l'élément cible et de sa profondeur dans l'échantillon. La probabilité de la réaction dépend de l'énergie des particules incidentes, de l'angle de détection et varie d'un élément à l'autre. La concentration de l'élément dans la région considérée est calculée par rapport à des standards de références analysés dans les mêmes conditions expérimentales. La détection des photons  $\gamma$  peut être couplée avec l'analyse par PIXE pour permettre une analyse multi-élémentaire.

La PIGE est notamment utilisée pour comparer les compositions en ions phosphates et en ions fluorures de certaines roches granitiques en particulier dans des inclusions d'apatite[159]. D'autres études géologiques ont été menées par Sommer dans des échantillons de topaze[160].

La quantification du fluor dans l'eau est également une part importante de l'utilisation de la PIGE en toxicologie afin de déterminer le niveau de pollution de la biosphère dans le monde et la potabilité de l'eau au Bangladesh par exemple[161]. Les dosages effectués en phase aqueuse vont de 0,03 à 1,1 mg/L.

Les principales études de détection du fluor dans des échantillons biologiques sont réalisées sur des dents afin de déterminer les concentrations en fluor des différentes parties de la dent : étude de l'état de la dentine dans des conditions de dents cariées ou non[162], comparaison de la minéralisation de l'émail (calcium, phosphore) avec l'incorporation du fluor[163, 164]. Le fluor est considéré depuis quelques décennies comme étant bénéfique pour les dents, mais à très faibles doses : il protège des caries grâce à un important effet cariostatique induit par sa fixation durant l'organogenèse des couronnes dentaires sur l'émail dentaire (certains cristaux d'hydroxy-apatite y sont remplacés par des cristaux de fluoro-apatite, plus résistants à la carie). D'autres études concernent la composition des dentifrices et des pâtes gingivales en éléments traces[165].

La quantification du fluor dans les os humains et d'animaux ont été réalisées pour établir des corrélations avec la masse osseuse et les problèmes d'ostéoporose[166]. Les seuls échantillons biologiques qui ont été testés à ce jour étaient hautement fluorés (2000 à 10000  $\mu\text{g/g}$  de fluor), il s'agit principalement d'études sur les dents [163, 167].

La quantification des différents composants de médicaments (principe actif, excipients) est une étape importante dans le processus de contrôle qualité. Les drogues contenant un ou plusieurs fluors tels que le celecoxib peuvent alors être quantifiées par PIGE[168].

#### **4. Analyse par faisceaux d'ions complémentaire : technique RBS**

La méthode d'analyse RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) est basée sur les interactions coulombiennes entre noyaux atomiques. Elle consiste à mesurer le nombre et l'énergie des ions d'un faisceau qui sont rétrodiffusés après interaction avec les noyaux des atomes de l'échantillon. Cette information rend possible la détermination de la masse atomique et des concentrations élémentaires en fonction de la profondeur[169]. Appliquée à la biologie, elle permet d'accéder au dosage des éléments légers carbone, azote et oxygène qui sont les principaux constituants des matrices biologiques et qui sont difficilement quantifiables par PIXE ou PIGE.

Quand un échantillon est bombardé par un faisceau de particules de haute énergie, une petite fraction des particules incidentes entre en interaction coulombienne avec le noyau d'un atome des premiers micromètres de l'échantillon.

L'énergie des particules rétrodiffusées à un angle donné dépend principalement de deux phénomènes. Premièrement, les particules perdent de l'énergie lors de leur passage dans l'échantillon, et ce aussi bien à l'aller qu'au retour. La quantité d'énergie perdue dépend du pouvoir d'arrêt du matériau. Deuxièmement, une particule perdra aussi de l'énergie via la collision elle-même. Cette perte dépendra essentiellement des masses de l'atome-cible  $M_2$  et du projectile  $M_1$ . Le rapport entre l'énergie du projectile avant et après la collision ( $E_0$  et  $E_1$ ) est appelé facteur cinématique (Figure 32).

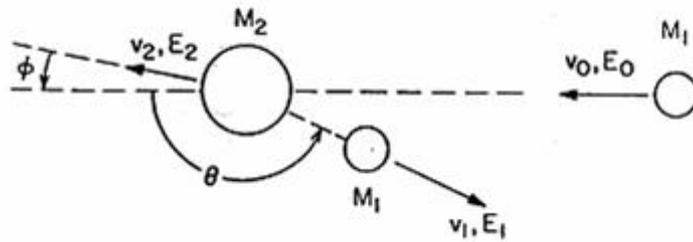


Figure 32. Principe de la diffusion Rutherford

Le facteur cinématique K peut être calculé par la formule :

$$K = \left( \frac{M_1 \cos \theta + (M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{1/2}}{M_1 + M_2} \right)^2$$

Le facteur cinématique dépend donc seulement de l'angle de diffusion et du rapport des masses de l'ion et du noyau atomique. Par contre, il ne dépend pas de l'énergie de l'ion incident.

Le nombre de rétrodiffusions provoquées par un élément particulier dépend de deux facteurs: la concentration de cet élément dans l'échantillon et de sa section efficace de diffusion, qui dépend essentiellement de la taille de son noyau. La connaissance des sections efficaces de diffusion confère à l'analyse RBS un caractère quantitatif. Ces sections efficaces peuvent être calculées pour chaque élément et isotope selon le type et l'énergie initiale des particules incidentes et l'angle de détection. Pour les noyaux légers cependant, les sections efficaces ne sont plus de type Rutherford et présentent de fortes résonances. Les sections efficaces résonantes (0,5 MeV – 3,5 MeV ;  $\theta=135^\circ$ ) pour les noyaux de carbone, d'azote, et d'oxygène ont été mesurées sur la plateforme AIFIRA pour l'analyse des échantillons biologiques[170].

Le dispositif expérimental nécessaire à l'analyse RBS est exactement le même que pour la PIXE, excepté le système de détection qui est ici un détecteur de particules chargées, de type détecteur à barrière de surface ou PIPS. Cette technique est ainsi mise en œuvre en

parallèle à une analyse PIXE ou PIGE pour permettre d'analyser la composition globale et la densité des échantillons.

La seule modalité d'analyse qui permette de réaliser une quantification précise du fluor 19 et une cartographie de sa distribution avec une bonne sensibilité et une résolution micrométrique est donc la microsonde nucléaire. Cependant la détection à faible concentration et la détermination de la biodistribution de traceurs fluorés dans tissus biologiques constituent de nouvelles applications pour les analyses par faisceaux d'ions.

Pour initier ce projet, nous avons tout d'abord évalué les performances des analyses par faisceaux d'ions pour la détection du fluor 19. Nous avons étudié la distribution *in vivo* de l'analogue stable du FDG qui est le principal traceur utilisé en TEP.

Par la suite, nous avons proposé d'injecter un nouveau traceur fluoré ciblant sélectivement les récepteurs du VEGF. Ces derniers étant surexprimés dans les foyers tumoraux, nous avons ainsi voulu imager spécifiquement les zones d'angiogenèse tumorale.

## **Résultats et discussion**

# 1. Détection du FDG par analyses par faisceaux d'ions

Notre projet a tout d'abord nécessité la mise en place d'un protocole expérimental original permettant la détermination des performances de ces analyses.

Nous avons donc réalisé les analyses par faisceaux d'ions sur la ligne microsonde de la plateforme AIFIRA. Cette machine de dernière génération est équipée d'un accélérateur électrostatique simple étage de type 3,5 MV - Singletron<sup>®</sup> qui délivre des faisceaux continus d'ions légers ( $^1\text{H}^+$ ,  $^2\text{H}^+$ ,  $^4\text{He}^+$ ) de basse énergie ( $< 3,5$  MeV) avec une excellente brillance et une très grande stabilité en énergie.

La ligne microsonde de cette installation a permis de réaliser des expériences avec un faisceau de protons de quelques MeV qui est fortement collimaté et focalisé jusqu'à une taille de l'ordre de  $5 \mu\text{m}$  sur la cible. Deux détecteurs ont été utilisés simultanément pour analyser le rayonnement émis par l'échantillon : le premier permet la détection du fluor par analyse PIGE ou PIXE et le second détecte les particules rétrodiffusées des principaux éléments composant la matière organique (C, N, O) par analyse RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry). Le couplage des données recueillies par ces deux analyses va ainsi permettre de normaliser la quantité de fluor détectée par la masse locale de l'échantillon.

Dans un premier temps, nous avons donc déterminé les paramètres optimaux de ces techniques pour la détection du fluor 19 en analysant des standards minéraux. Nous avons ensuite évalué les performances des analyses PIGE et PIXE pour la détection du fluor 19 dans des cellules tumorales incubées avec du FDG. Nous avons enfin adapté et optimisé la quantification du fluor 19 dans des échantillons tissulaires sains et tumoraux.

## *1.1. Détermination des paramètres expérimentaux*

Lors de l'utilisation d'analyses par faisceaux d'ions pour quantifier la concentration d'un élément, nous pouvons décrire le nombre de photons détectés à une énergie  $E$  par l'équation[171] :

$$dY(E) = \varepsilon_a(E) \times Q \times \sigma(E) \times f_m \times f_i \times N_{AV} \times A^{-1} \times Nt$$

avec  $\varepsilon_a(E)$  = efficacité absolue du détecteur à l'énergie E

Q = charge déposée pendant l'analyse

$\sigma(E)$  = section efficace de la réaction à l'énergie E

$f_m$  = fraction massique de l'élément

$f_i$  = abondance de l'isotope considéré

$N_{AV}$  = nombre d'Avogadro

A = masse atomique

Nt = masse de l'échantillon

L'efficacité absolue du détecteur correspond au nombre de particules que l'appareil détecte par rapport au nombre total de particules émises pendant l'analyse. La charge déposée est le nombre de particules qui ont été détectées au cours de l'analyse. La section efficace correspond à la probabilité d'interaction d'une particule pour une réaction donnée.

D'après cette équation, les paramètres importants pour la quantification sont donc l'efficacité du détecteur, la section efficace de la réaction, la charge déposée et la masse de l'échantillon.

Parmi ces paramètres, la charge et la masse de l'échantillon sont déterminées au cours des analyses RBS de chaque échantillon. Ces valeurs sont donc calculées dans un second temps au cours du traitement de données de chaque analyse. L'efficacité théorique du détecteur est déterminée par des simulations Monte Carlo en fonction de l'élément à analyser et de la réaction utilisée.

Pour effectuer la quantification du fluor dans nos échantillons, il nous restait donc à déterminer la meilleure section efficace pour nos analyses.

### 1.1.1. Fonction d'excitation et section efficace

Nous avons tout d'abord effectué des analyses sur des standards de référence afin de déterminer la fonction d'excitation de la réaction qui correspond à la variation de la section efficace en fonction de l'énergie des particules incidentes. Ce premier paramétrage nous permet donc de calibrer l'énergie du faisceau incident en calculant dans quelles gammes d'énergie on retrouve les meilleures sections efficaces. Ces standards fins ont des compositions élémentaires certifiées en fluor. Le standard utilisé pour ces mesures est un film de  $\text{CaF}_2$  de composition certifiée ( $53,6 \pm 2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Les analyses PIGE ont été réalisées par l'intermédiaire de la réaction nucléaire  $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)^{19}\text{F}$ . Lorsqu'un proton incident  $p$  entre en collision avec un atome de fluor 19 avec une énergie suffisamment élevée, il induit une réaction nucléaire au cours de laquelle se forme un noyau excité. Le retour à l'état fondamental est alors caractérisé par l'éjection d'un proton  $p'$  et par l'émission de photons  $\gamma$  caractéristiques. Les gammas caractéristiques du fluor pour cette réaction sont à 110 keV, 197 keV, 1236 keV, 1357 keV, 1459 keV, 6129 keV. Parmi toutes ces émissions qui représentent les différents états excités du fluor, les 2 rayonnements les plus probables sont à 110 et 197 keV.

La détermination de la fonction d'excitation a donc été réalisée sur le film de  $\text{CaF}_2$  pour une énergie de protons variant de 3 à 3,4 MeV par pallier de 0,05 MeV (Figure 33).

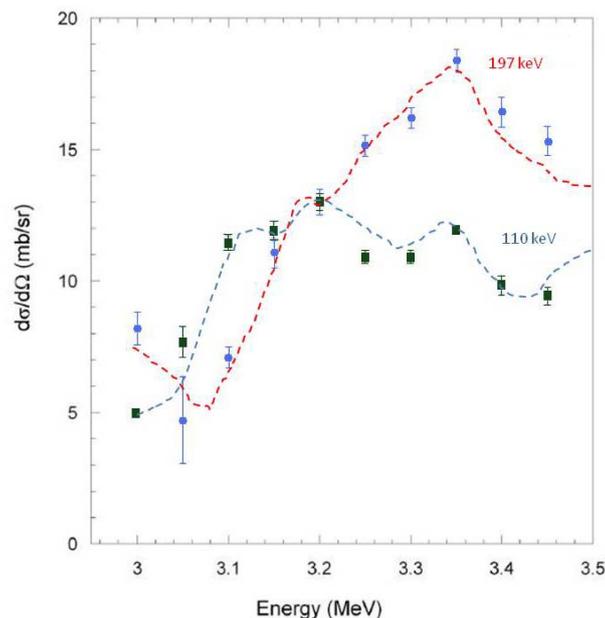


Figure 33. Fonctions d'excitation des photons gamma de 110 et 197 keV

Les sections efficaces de production des photons de 110 et 197 keV qui ont été obtenues sont en accord avec les données recueillies dans la littérature sur de plus grandes gammes d'énergie[158, 172].

Contrairement aux fonctions d'excitations accessibles en PIXE où la section efficace évolue de façon monotone avec l'énergie et le numéro atomique, les fonctions d'excitations en PIGE ne sont pas régulières. Elles présentent de grandes et étroites résonances qui rendent le processus de quantification plus complexe. Les mesures de sections efficaces effectuées entre 3,1 et 3,4 MeV pour les photons à 110 keV montrent la présence d'un plateau alors que celles réalisées pour les photons de 197 keV varient d'un facteur 3 sur la même échelle d'énergie.

Pour réaliser la détection du fluor dans les meilleures conditions, les analyses ont été effectuées en quantifiant l'émission de photons  $\gamma$  à 110 keV. Un faisceau de protons de 3,4 MeV a été choisi pour se trouver à la limite haute de la zone stable en section efficace. Ce choix va faciliter l'analyse en profondeur des échantillons en gardant une réponse homogène de détection des atomes de fluor quelque soit l'atténuation en énergie des protons incidents dans la matière.

### **1.1.2. Quantification du fluor**

La principale méthode utilisée pour éviter les problèmes de quantifications directes du fluor sur un échantillon de composition inconnue est de comparer les concentrations élémentaires de ces échantillons avec des standards de composition connue en fluor. Pour la quantification en fluor des échantillons biologiques, nous avons donc réalisé des analyses sur le standard Micromatter  $\text{CaF}_2$  et sur un film de PVDF (polyvinylidène fluorure, formule  $-(\text{CH}_2\text{CF}_2)_n-$ ) de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. L'utilisation de ce dernier est plus adaptée, que les standards de référence habituellement utilisés dans les analyses par faisceaux d'ions, pour la quantification d'échantillons épais. Il permet ainsi d'obtenir de meilleures approximations de l'épaisseur et de la composition chimique des échantillons biologiques.

L'intensité du pic de photons  $\gamma$  à 110 keV du PVDF a donc été utilisée pour normaliser les données collectées dans les échantillons. Les analyses RBS, enregistrées simultanément

aux analyses PIGE, ont permis de calculer la masse de chaque échantillon et de mesurer la charge collectée au cours de chaque analyse.

La quantification de la concentration en fluor est donnée par l'équation suivante :

$$[F]_i = [F]_{S\text{réf}} \times \frac{Y_i}{Y_{\text{réf}}} \times \frac{Q_{\text{réf}}}{Q_i} \times \frac{1}{M_i}$$

avec  $[F]_i$  = concentration en fluor de l'échantillon i

$[F]_{S\text{réf}}$  = concentration surfacique en fluor de la référence (PVDF,  $\text{CaF}_2$ )

$Y_i, Y_{\text{réf}}$  = nombre de photons de 110 keV détectés pour l'échantillon i et la référence

$Q_i, Q_{\text{réf}}$  = charge déposée pour l'échantillon i et la référence

$M_i$  = masse de l'échantillon i

La quantification du fluor dans un échantillon, donnée en  $\mu\text{g}$  par g de matière, correspond donc au rapport de la quantité de fluor par la charge collectée au cours de l'analyse et normalisée par la masse locale de l'échantillon.

L'incertitude sur ces calculs de quantification est principalement due aux incertitudes sur la composition et l'épaisseur du standard de  $\text{CaF}_2$ . Ces erreurs se reportent donc par la suite sur la simulation des spectres PIGE et RBS ainsi que sur les quantifications de fluor. Cependant l'incertitude de 15 % sur l'épaisseur de ce standard certifié est corrigée lors de la normalisation par la charge déposée.

### **1.1.3. Limite de détection et limite de quantification de la PIGE**

La sensibilité de la technique PIGE dans nos conditions expérimentales a été déterminée à partir de mesures répétées sur le standard de  $\text{CaF}_2$ . La limite de détection correspond à la limite ultime d'une méthode, elle définit la valeur à partir de laquelle on peut déterminer s'il y a présence ou absence d'un élément dans un échantillon. La limite de

quantification est la valeur à partir de laquelle on peut calculer la concentration d'un élément dans un échantillon[173, 174].

Ces limites dépendent de la charge déposée, de la composition, de l'épaisseur et de la masse de l'échantillon. La limite de détection définie par Currie est évaluée à partir de l'écart type de mesures répétées sur un standard[175]. Nous avons donc effectué cinq analyses sur le standard CaF<sub>2</sub> qui est le standard le plus fin et qui permet donc d'effectuer le calcul avec une précision maximale (Tableau 2).

Analyses du CaF <sub>2</sub>	Charge	Masse (µg / cm <sup>2</sup> )	Surface pic 110	Concentration (µg F / g)
4	1,23E+11	94,81	2162	24,97
6	8,40E+10	94,81	1554	26,28
10	8,40E+10	94,81	1661	26,05
14	1,26E+11	94,81	2291	25,83
17	1,10E+11	94,81	2129	27,50
<b>Moyenne</b>	1,07E+11	94,81	1959	26,09
			<b>Ecart type</b>	0,816
			<b>Limite de détection</b>	2,693

**Tableau 2 : Analyses du standard CaF<sub>2</sub>**

La composition du standard est de  $53,6 \pm 2,7$  µg/cm<sup>2</sup> de CaF<sub>2</sub>. La proportion de fluor dans ce standard est de 48,6 % ce qui représente 26,09 µg de fluor/cm<sup>2</sup>.

La limite de détection est numériquement égale à 3,3 fois l'écart type sur les mesures[175]. Nous avons donc évalué la limite de détection de la PIGE pour le fluor à 2,7 µg/g.

La limite de quantification correspond quant à elle à 3 fois la valeur de la limite de détection[175] soit 8,16 µg/g. Nous pouvons donc déterminer la concentration en fluor d'un échantillon par cette technique si la quantité locale de fluor dépasse 8 ppm.

Dans le cas d'échantillons biologiques épais, il n'est pas possible de répéter plusieurs mesures sur la même zone car l'échantillon est partiellement détruit par le bombardement au cours d'une analyse, la limite de détection est alors estimée par une autre méthode[175]. Elle est numériquement égale à 3,3 fois l'écart type des fluctuations du bruit de fond détecté au niveau du pic de photons  $\gamma$  à 110 keV.

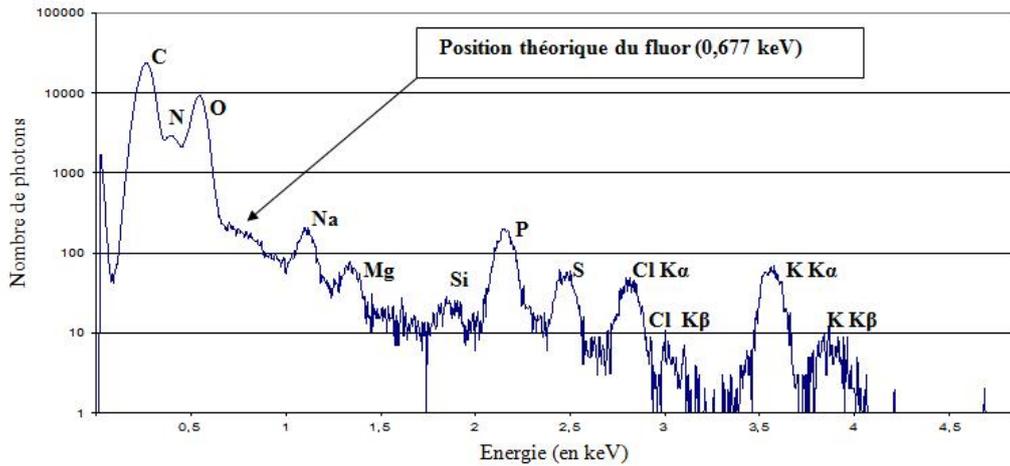
## ***1.2. Etude préliminaire de quantification du FDG dans des cellules en culture***

Après la détermination de ces paramètres expérimentaux, nous avons comparé les résultats de deux techniques d'analyses par faisceaux d'ions pour la détection du fluor 19 : la PIXE et la PIGE.

Au cours des 2 différentes analyses, la quantification du fluor a été réalisée en utilisant soit un détecteur Si(Li) sans fenêtre pour la détection du rayonnement X de basse énergie lors des analyses PIXE ; soit un détecteur au germanium lors des analyses PIGE. Ce dernier est caractérisé par une bonne résolution en énergie et une bonne efficacité pour la détection des rayonnements  $\gamma$  à haute énergie. Lors de chaque analyse PIXE ou PIGE, la détection des particules rétrodiffusées a été réalisée simultanément par RBS à l'aide d'un détecteur en silicium. Dans le cas d'échantillons biologiques, le spectre RBS permet de déterminer la proportion des éléments composant la matière organique C, N, O.

### **1.2.1. Quantification du FDG par PIXE dans des cellules en culture**

Lors de cette première série d'expériences, nous avons déterminé les paramètres expérimentaux de l'analyse PIXE pour la détection du fluor 19 dans un échantillon de cellules IGROV1-p (adénocarcinome ovarien humain). Ces cellules, cultivées sous forme de monocouche adhérente au support, ont été incubées avec diverses quantités de [ $^{19}\text{F}$ ]FDG (0,2, 0,5 et 1 g/L). Nous avons choisi de réaliser ces premières analyses dans des conditions physiologiques pour ne pas perturber le métabolisme des cellules. La glycémie normale d'une cellule étant de l'ordre de 1 g/L, le milieu de culture a été complété par 1 g/L de FDG. Nous nous sommes ensuite placés dans des concentrations inférieures afin d'affiner la limite de détection de la méthode. Ces analyses PIXE ont été effectuées avec un faisceau de protons de 1,5 MeV correspondant à la meilleure section efficace de production des photons X pour le fluor 19. Les données obtenues lors de chacune des analyses ont été collectées sous forme de spectres totalisant le nombre de photons X détectés en fonction de leur énergie d'émission (Figure 34).



**Figure 34. Spectre PIXE de cellules IGROV1-p incubées avec du FDG**

Le rayonnement X issu de cette analyse globale des cellules IGROV1-p a permis d'obtenir une information quantitative de la composition élémentaire de l'échantillon. Les signaux les plus intenses correspondent logiquement aux principaux atomes constituant les cellules (C, N et O) et on retrouve aussi la présence de nombreux éléments trace endogènes.

Par contre, le rayonnement X caractéristique du fluor n'est pas observable par PIXE dans ces conditions expérimentales. Plusieurs paramètres permettent d'expliquer ce résultat. Tout d'abord, les photons X du fluor sont de faible énergie (0,677 keV) et sont auto-absorbés dans l'échantillon par le pouvoir d'arrêt du milieu. Le pouvoir d'arrêt correspond à la perte graduelle de l'énergie de photon dans la profondeur jusqu'à l'arrêt complet. La perte d'énergie est principalement due aux interactions coulombiennes inélastiques avec les électrons liés. Ce phénomène ne permet pas aux photons X de parcourir plus de 0,7  $\mu\text{m}$  dans la matière. Le signal recueilli au niveau du détecteur ne correspond donc qu'à la fraction d'atomes de fluor se trouvant au niveau de la couche superficielle de l'échantillon.

De plus, le rendement de production des photons X pour les éléments légers ( $Z \leq 20$ ) est très faible ce qui complique la détection de ces éléments lorsqu'ils sont à l'état de trace dans l'échantillon. Pour des éléments aussi légers, la désexcitation prédominante de l'atome est l'éjection d'un électron Auger et non l'émission d'un photon X.

Enfin le rayonnement X émis par les atomes d'oxygène (0,525 eV) recouvre celui du fluor. Ces inconvénients majeurs ne permettent pas au signal de fluor de sortir du bruit de fond rendant rédhibitoire la détection du fluor en concentration trace par PIXE.

Les fondements théoriques de la PIXE prévoyaient de grandes difficultés pour détecter les éléments de  $Z < 20$  et nos résultats expérimentaux ont confirmé la limite de la PIXE pour la détection du fluor 19 à l'état de traces. Cette vérification expérimentale restait nécessaire pour écarter l'utilisation de cette analyse dans notre approche. Si une détection avait été possible, un couplage d'analyses PIXE / PIGE simultanées avec 2 détecteurs optimisés aurait permis d'obtenir des informations supplémentaires.

### 1.2.2. Quantification du FDG par PIGE dans des cellules en culture

Une seconde série d'expériences a été menée par analyse PIGE sur les mêmes échantillons de cellules IGROV1-p incubées avec différentes concentrations de FDG. Les analyses ont été effectuées avec des protons de 3,4 MeV.

Les spectres collectés au cours des analyses PIGE sont caractérisés par deux zones distinctes. En plus des pics caractéristiques du fluor à 110 et 197 keV, on retrouve le rayonnement X des principaux éléments constitutifs des cellules (zone inférieure à 20 keV) qui a pu être détecté simultanément par le même détecteur. En effet, les analyses PIGE sont effectuées avec des protons dont l'énergie permet la meilleure section efficace de production des photons  $\gamma$  de 110 keV. Cependant, de nombreuses autres réactions peuvent avoir lieu lors de l'interaction des photons incidents avec les atomes de la matière (Figure 35).

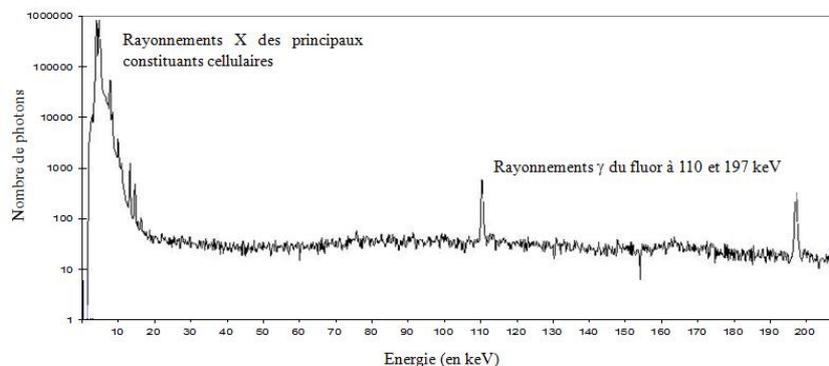


Figure 35. Spectre PIGE de cellules IGROV1-p incubées avec du FDG

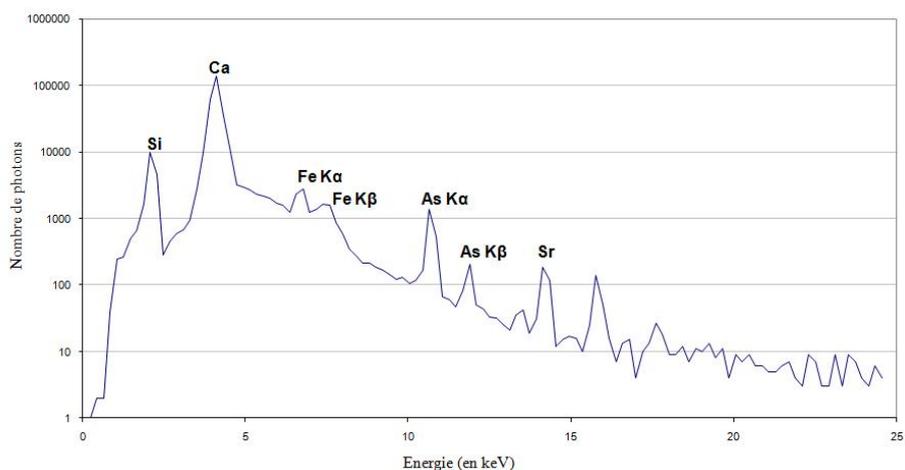
Les photons  $\gamma$  émis au cours de cette réaction nucléaire étant beaucoup plus énergétique que les photons X émis en PIXE, l'absorption du rayonnement dans la matière ne constitue plus un obstacle pour leur détection. De plus, la pénétration de protons de 3,4 MeV dans un échantillon biologique est typiquement de l'ordre de 300  $\mu\text{m}$ . Des échantillons épais peuvent ainsi être analysés sur toute leur épaisseur.

Ces expériences préliminaires aussi bien en PIGE qu'en PIXE à basse énergie n'avaient jamais été réalisées sur des cultures cellulaires pour la détection du fluor. Nous avons ainsi pu confirmer que la technique PIXE n'était pas adaptée à la détection du fluor à l'état de traces dans ces conditions expérimentales. L'analyse PIGE est donc la méthode de référence pour la détection du fluor 19 en utilisant la détection des 2 photons  $\gamma$  à 110 et 197 keV issus de la réaction nucléaire  $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)^{19}\text{F}$ .

### **1.2.3. Détection multiélémentaire**

Comme nous l'avons vu lors de ces dernières analyses sur cellules, le rayonnement X de certains éléments chimiques peut être détecté simultanément dans les échantillons biologiques, en plus des émissions gamma du fluor. Ces émissions X à basse énergie peuvent nous donner des informations élémentaires qualitatives de l'échantillon. Cependant il est nécessaire de calibrer en énergie les spectres PIGE pour permettre l'identification des éléments détectés.

Pour étalonner l'échelle en énergie, il est nécessaire d'ajuster les pics détectés avec des pics de référence. Nous avons alors effectué l'analyse PIGE d'un standard de verre de composition certifiée (National Bureau of Standards, Standard Reference Material (SRM) 620, Soda-Lime Flat Glass). Ce standard est composé de fines couches d'oxydes de divers éléments (silicium, sodium, calcium, potassium, fer, ...). Les rayonnements X détectés lors de l'analyse de ce standard sont comparés à des tables de données comprenant les différentes énergies d'émission des photons X caractérisant chaque élément. Les raies  $K\alpha$  et  $K\beta$  sont définis dans le tableau 3 et la Figure 36.

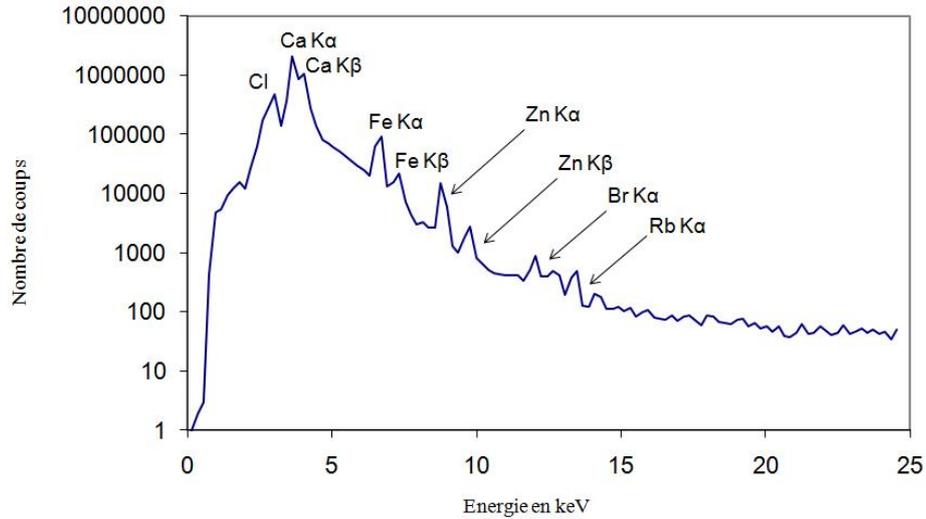


**Figure 36. Spectre PIXE basse énergie du NBS620**

	Canal	Energie en keV
<b>Si</b>	39	1,829
<b>Ca</b>	49	4,012
<b>Fe</b>	α 62	6,403
	β 66	7,057
<b>As</b>	α 82	10,542
	β 87	11,718
<b>Sr</b>	99	14,168

**Tableau 3 : Energie des photons X des éléments constitutifs du NBS620**

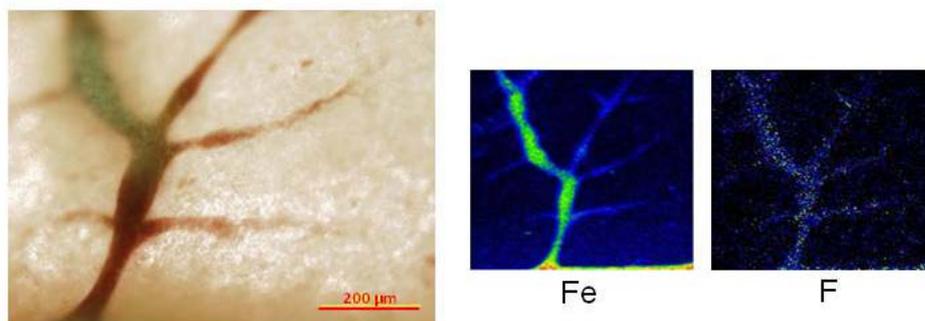
Après avoir réalisé l'attribution des pics composant le NBS620, l'échelle en énergie de nos analyses sur les échantillons biologiques a été ajustée (Figure 37). Les photons X détectés dans ces échantillons ont ainsi permis d'identifier six éléments : le chlore, le calcium, le fer, le zinc, le brome et le rubidium.



**Figure 37. Spectre PIXE basse énergie d'un échantillon biologique**

Cependant la résolution en énergie de ces pics ne permet pas d'effectuer de quantification de ces éléments. Les réglages de l'expérience avec le détecteur au germanium que nous avons utilisé pour les analyses PIGE sont optimisés pour la détection des photons  $\gamma$  de la réaction  $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)^{19}\text{F}$  ce qui a pour conséquence de perdre en informations dans la partie du spectre à basse énergie.

Seules les raies  $K\alpha$  et  $K\beta$  du fer ont donc été utilisées dans chaque analyse pour cartographier la distribution du fer. Il ne s'agit que d'une information sur la répartition du fer dans la zone analysée sans quantification possible. Comme les molécules d'hémoglobine sont composées d'un cofacteur contenant un atome de fer servant de site de fixation de l'oxygène, ces cartographies nous ont aidées pour le repérage des zones vascularisées et plus particulièrement du positionnement des capillaires sanguins (Figure 38).



**Figure 38. Photographie de capillaires sur un échantillon de CAM et cartographies du fer et du fluor correspondantes**

Cependant ces cartographies de distribution élémentaire ne tiennent pas compte de la densité, elles définissent la localisation d'un élément en quantité absolue. La concentration élémentaire n'est accessible que par le calcul avec la normalisation de cette quantité d'atomes par la densité locale de l'échantillon.

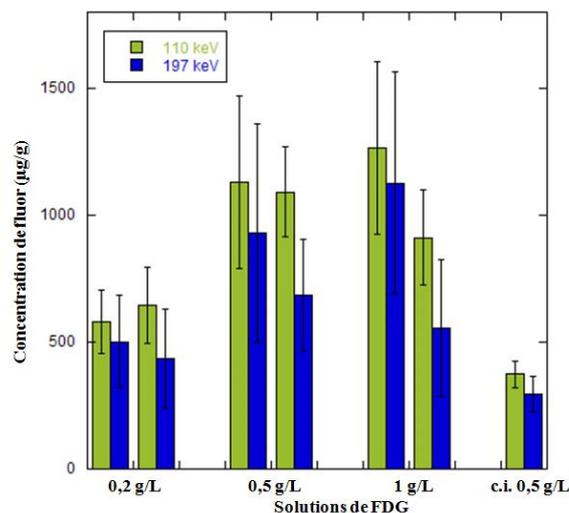
Ces images nous ont donc seulement aidés à définir les différentes zones d'analyses de chaque échantillon. Une zone de tissu et une zone de capillaires ont ainsi été extraites dans toutes les analyses afin de comparer les concentrations en fluor.

De plus, la comparaison des photos de repérage prises pour chaque cible avec ces cartographies de fer a permis de discriminer les capillaires pleins de sang des capillaires vides. En effet, certaines zones de l'échantillon peuvent être lésées au cours du protocole de préparation des échantillons entraînant la dispersion du sang hors des capillaires. Nous avons ainsi pu écarter ces zones lésées qui auraient entraîné de mauvaises estimations de la quantité de traceurs fluorés dans les capillaires au cours du traitement de données.

#### **1.2.4. Bilan de l'étude de faisabilité**

Ces premières analyses ont permis de déterminer que les meilleures conditions expérimentales pour détecter le fluor 19 avec la méthode PIGE se trouvaient pour des protons de 3,4 MeV. L'optimisation des paramètres expérimentaux a permis d'estimer les concentrations en fluor d'un échantillon avec une limite de quantification de 8,16 µg/g et une résolution spatiale de 5 µm.

L'analyse PIGE des différentes séries de cibles nous a donc permis de détecter et de quantifier le fluor incorporé par les cellules IGROV1-p en fonction des concentrations de FDG ajouté dans le milieu de culture (Figure 39). La détection du fluor a été possible dans chaque échantillon mais les incertitudes sur les mesures sont beaucoup trop grandes pour pouvoir comparer les différentes incorporations avec précision. La concentration de fluor retrouvée dans les cellules augmente en fonction des concentrations des solutions de FDG ajoutées dans le milieu de culture. La plus faible concentration est retrouvée dans les échantillons incubés avec la solution à 0,2 g/L de FDG ( $575 \pm 260 \mu\text{g/g}$ ). Cependant les quantités de fluor détectées ne sont pas proportionnelles aux concentrations des solutions, la quantité de fluor retrouvée dans les échantillons incubés avec une solution à 1 g/L de FDG ( $1100 \pm 660 \mu\text{g/g}$ ) n'est ainsi pas 5 fois supérieure à celle retrouvée dans les échantillons incubés avec une solution à 0,2 g/L de FDG. Ces résultats pourraient indiquer une saturation de l'incorporation du traceur pour les échantillons incubés avec la plus haute concentration.



**Figure 39.** Concentration intracellulaire de fluor ( $\mu\text{g/g}$  masse sèche) dans des cellules tumorales exposées *in vitro* à différentes concentrations de FDG (0,2 ; 0,5 et 1 g/L) ; c.i. = imagerie sur cellules isolées 0,5 g/L

Cependant, trop peu d'analyses ont été effectuées pour pouvoir valider une hypothèse sur l'incorporation du traceur dans ce modèle. Il faudrait augmenter le nombre de solutions de concentrations différentes en FDG et augmenter le nombre de points pris pour chaque concentration pour vérifier si la quantité de FDG incorporée atteint un palier. Ces 2 séries

expériences avaient principalement pour but de discriminer la PIGE et la PIXE pour la détection du fluor.

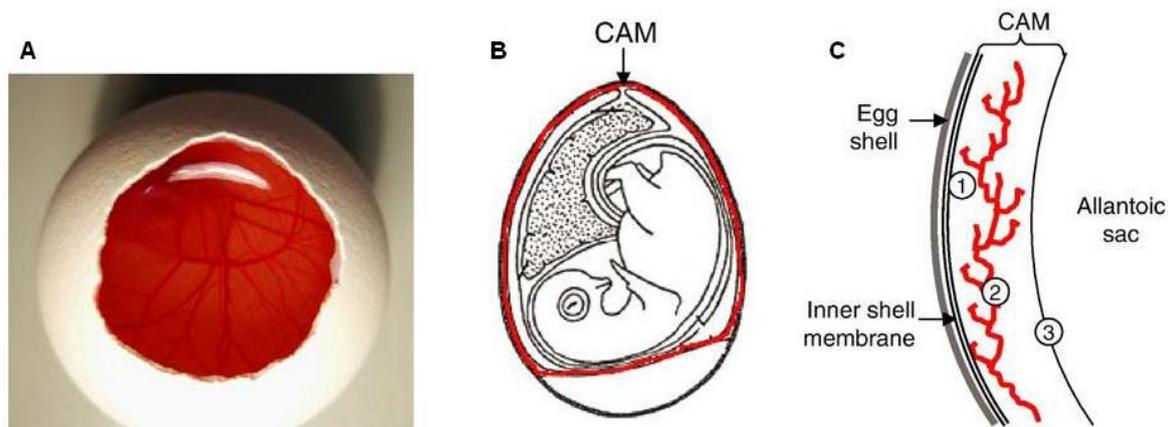
Une analyse sur cellules isolées a également été réalisée (c.i. 0,5 g/L) sur un échantillon incubé avec une solution à 0,5 g/L de FDG. Cette analyse n'a pas permis d'effectuer la cartographie du fluor dans les cellules, seule la concentration en FDG a pu être calculée ( $375 \pm 105 \mu\text{g/g}$ ). L'imagerie du fluor à l'état de traces n'est donc pas accessible par la technique PIGE sur des échantillons très fins comme des cellules isolées. Le nombre d'atomes de fluor contenu dans l'échantillon étant trop faible pour faire ressortir une quantification locale en différents points des cellules.

Ces expérimentations ont ainsi permis de mettre au point les bases de notre approche utilisant l'analyse PIGE comme technique *ex vivo* de détection du fluor avec une résolution micrométrique. La cartographie d'un traceur fluoré à l'intérieur de tissus nécessite par contre l'évolution vers un nouveau modèle biologique plus complexe permettant d'effectuer une imagerie du fluor au sein de tissus vascularisés sains et tumoraux.

### ***1.3. Etude de la biodistribution du FDG dans un tissu***

#### **1.3.1. Modèle biologique**

Nous avons ensuite travaillé sur un nouveau modèle permettant l'obtention rapide et facilitée d'échantillons sains et tumoraux. L'un des meilleurs moyens d'exploration de l'angiogenèse *in vivo* est d'étudier le développement vasculaire de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de poulet[176]. Au cours des dernières décennies, ce modèle a été utilisé afin d'étudier à la fois un développement vasculaire normal et des processus angiogéniques pathologiques comme la vascularisation tumorale. De plus, l'action de nombreuses molécules pro ou antiangiogéniques sur le développement vasculaire a pu être testée sur les CAM [26, 177]. Ce modèle CAM possède de nombreux avantages : il permet une observation directe du développement vasculaire et une implantation facilitée des cellules tumorales[178] (Figure 40).



**Figure 40. Membrane chorio-allantoïdienne de poulet (CAM) ; A : Vue du dessus ; B : Localisation de la CAM autour de l'embryon ; C : Coupe de l'oeuf. (D'après Vargas et al. 2007) [178].**

De plus, les conditions de culture ne sont pas coûteuses et sont favorables d'un point de vue éthique[179].

Le laboratoire des Mécanismes Moléculaires de l'Angiogenèse (LMMA) a ainsi développé un modèle qui permet l'étude de l'angiogenèse induite après la greffe de cellules de glioblastome d'origine humaine U87 sur la CAM[180]. Dans ce modèle, les cellules tumorales forment rapidement des tumeurs vascularisées par angiogenèse gardant les propriétés invasives des glioblastomes humains.

Afin de comparer la biodistribution du FDG dans les tissus sains et tumoraux, une série d'embryons avec des tumeurs implantées et une série d'embryons sans tumeur ont été préparées. Une solution de FDG a ensuite été injectée dans une veine de la CAM de chaque embryon. Les embryons ont été exposés à différents temps d'incubation du traceur dans l'oeuf avant le sacrifice.

Des coupes tumorales de chaque tumeur prélevée ainsi que des échantillons de tissu sain pour la série sans tumeur et des échantillons de CAM ont été déposés sur des cibles en vue de quantifier la répartition du fluor par analyses PIGE.

### **1.3.2. Quantification du FDG dans des échantillons de CAM et des coupes tumorales**

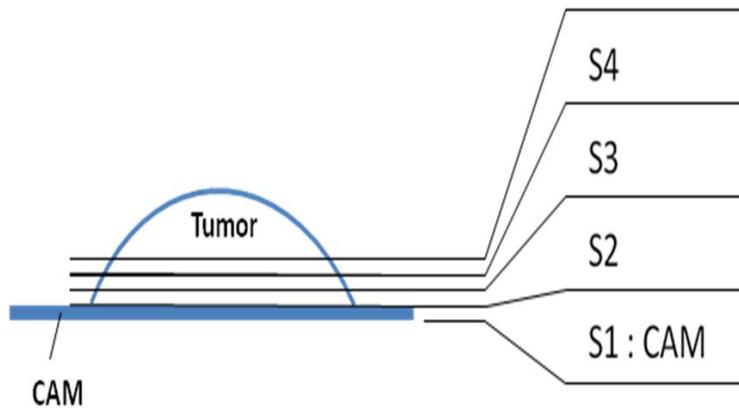
Les tests de détection du fluor dans un modèle de tissu angiogénique ont été réalisés avec deux solutions de FDG de 0,77 et 1,53 M. Ces hautes concentrations ont été utilisées pour nous placer dans les meilleures conditions de détection pour cette première expérience sur tissus. Nous avons précédemment déterminé la limite de quantification à 8,16  $\mu\text{g/g}$ , il est cependant nécessaire de se trouver au-delà de 10 fois cette limite pour réaliser une cartographie de la biodistribution du FDG. A ce niveau de concentration, la quantification locale est alors accessible dans des temps d'analyse de quelques heures. Nous avons donc voulu nous placer à une valeur moyenne dans l'œuf de 100  $\mu\text{g F/g}$  ce qui pour un œuf de 30 g correspond à une quantité de fluor injectée de 3 mg F/œuf.

D'autre part, le volume d'injection dans une veine de la CAM ne peut dépasser 100  $\mu\text{L}$  pour ne pas entraîner de complications vasculaires chez l'embryon. La solution de FDG de 1,53 M a été préparée afin d'injecter 2,9 mg de fluor par œuf ainsi qu'une solution diluée par 2 pour évaluer si les accumulations obtenues dans les échantillons sont doses dépendantes.

De telles concentrations sont très supérieures à la glycémie physiologique d'un embryon de poulet qui est de 7,2 mM. Comme le volume sanguin total d'un embryon de poulet de 17 jours est de 2 mL, l'injection de 100  $\mu\text{L}$  de ces solutions a conduit à des augmentations de la glycémie de respectivement 45,7 et 83,7 mM. L'hyperglycémie engendrée par ces injections pourrait alors conduire à des modifications de l'état physiologique de l'embryon de poulet si ces conditions étaient maintenues sur une plus longue période. Sur le temps d'exposition des embryons au FDG (maximum 6 h), l'hyperglycémie a probablement induit des perturbations dans le métabolisme glucidique.

Plusieurs œufs ont été préparés pour chacune des conditions de concentration en FDG. Des échantillons de CAM et les tumeurs développées ont été prélevés pour réaliser les analyses PIGE dans chaque série d'œufs. Les conditions de vide poussé (de l'ordre de  $10^{-6}$  Pa) nécessaires pour réaliser les analyses PIGE conditionnent la préparation des échantillons. Une congélation rapide dans une solution d'isopentane à  $-160^{\circ}\text{C}$  et une lyophilisation permettent ainsi de préserver les structures cellulaires dans nos conditions expérimentales.

Les échantillons de CAM ont directement été déposés sur les cibles. Les tumeurs ont été segmentées en coupes tumorales de 100 à 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et placées sur les cibles. L'ordre de coupe a été effectué à partir de la face de la tumeur en contact avec la CAM (S1). Les coupes successives sont ensuite notées S2 à S4 (Figure 41).

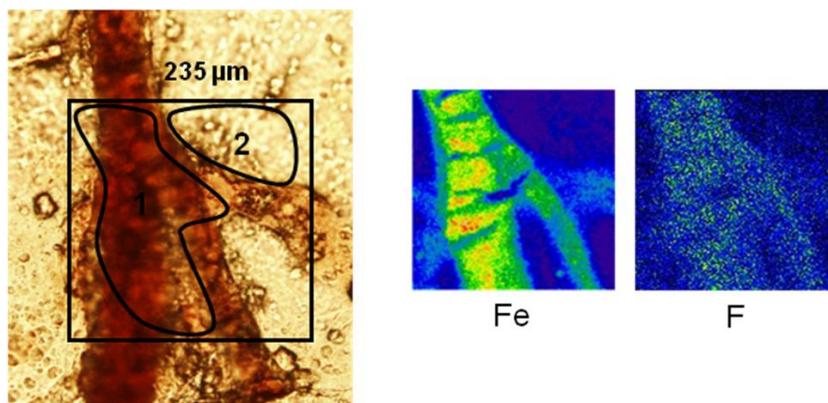


**Figure 41. Schéma de découpe de la tumeur de l'échantillon**

Les photos des cibles lyophilisées ont ensuite permis de définir les zones d'intérêt présentant des capillaires.

Au cours de cette expérience, deux types d'analyses ont été réalisées. D'une part, des analyses courtes (2 à 4 h) de quantification du fluor ont été effectuées sur les coupes tumorales très faiblement vascularisées. Les capillaires étaient invisibles sur les photos de repérages et seules les cartographies de fer ont permis de retrouver quelques vaisseaux. Les données collectées ont alors permis de calculer les concentrations de fluor par zones et de les comparer.

D'autre part, les échantillons CAM largement vascularisés ont été analysés pendant des durées allant jusqu'à 22 h enfin de réaliser une cartographie de la distribution du fluor (Figure 42). La cartographie du fer a également été réalisée pour confirmer la présence de sang dans les capillaires imagés.



**Figure 42. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une CAM exposé au FDG**

Tout d'abord, une analyse a été réalisée sur un échantillon de CAM provenant d'un œuf où nous n'avons pas injecté de traceurs fluorés. Cet échantillon blanc nous a permis de vérifier que nos échantillons biologiques ne possédaient pas naturellement de fluor ou qu'aucune contamination de dérivés fluorés ne pouvait fausser la quantification. De plus, cette vérification a bien montré qu'aucune émission de photons provenant de réactions parasites ne se trouvait à 110 et 197 keV.

Dans l'œuf contrôle où aucune tumeur n'a été implantée (Tableau 4, Echantillon 1), les concentrations de fluor retrouvées au niveau des capillaires et du tissu environnant sont respectivement de  $960 \pm 100 \mu\text{g/g}$  de fluor par g de matière sèche et de  $1560 \pm 180 \mu\text{g/g}$ . La proportion de FDG dans ces capillaires ne représente donc que 60 % de la quantité de traceur captée dans le tissu environnant.

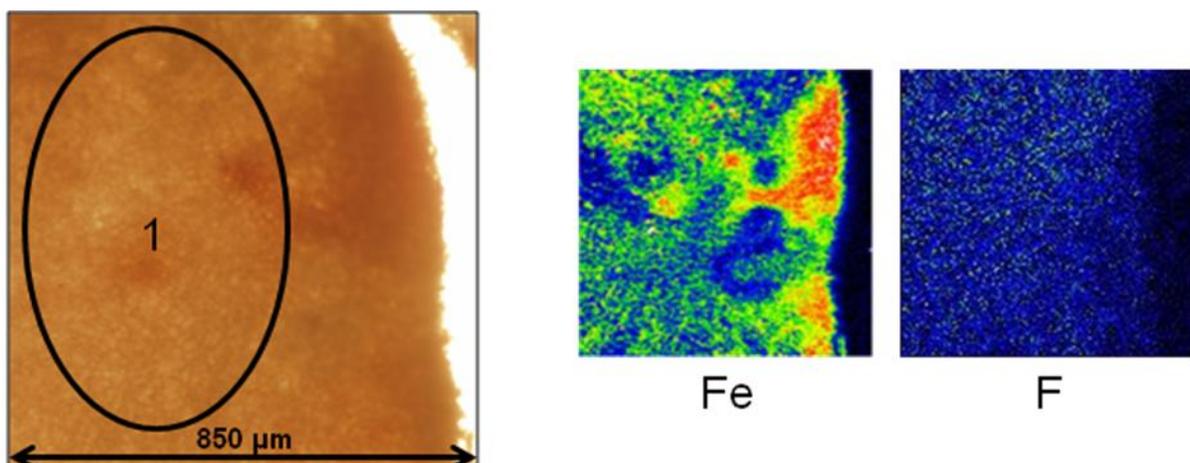
Pour la série des œufs avec tumeur, les analyses effectuées sur l'échantillon 3 (Figure 39 et Tableau 4) montrent des concentrations en fluor de  $1460 \pm 170 \mu\text{g/g}$  au niveau des capillaires (zone 1 sur la photo) et de  $1820 \pm 210 \mu\text{g/g}$  dans le tissu environnant (zone 2). La quantité de FDG dans les capillaires n'est dans ce cas que de 80 % par rapport à la proportion du traceur dans le tissu environnant. Les masses moyennes des différentes zones ont également pu être estimées à l'aide de l'analyse du spectre RBS. La masse de la zone du capillaire est de  $4695 \pm 940 \mu\text{g/cm}^2$  et celle du tissu environnant est de  $1130 \pm 230 \mu\text{g/cm}^2$ . Cette différence de masse permet d'expliquer la répartition du FDG visible sur la cartographie du fluor de cette analyse. Le capillaire semble beaucoup plus concentré en fluor alors le calcul des concentrations du FDG à l'intérieur et en dehors de ce capillaire montre une répartition assez homogène. Cet effet est donc dû aux différences d'épaisseur de ces 2 zones. Un plus

grand nombre de photons  $\gamma$  de 110 keV a été détecté dans le capillaire car il est composé de beaucoup plus de matière que le tissu environnant.

Echantillon	Coupes	Concentration en fluor ( $\mu\text{g/g}$ )	
		Tissu sain	Tissu tumoral
Tissu		CAM	Capillaire
Echantillon 1 (1.53 M)	S1	1560 $\pm$ 180	960 $\pm$ 100
Echantillon 2 (0.77 M)	S1		1570 $\pm$ 180
	S1	1820 $\pm$ 210	1460 $\pm$ 170
Echantillon 3 (1.53 M)	S2		1640 $\pm$ 170
	S3		1950 $\pm$ 240
	S4		1470 $\pm$ 140

**Tableau 4 : Concentration en fluor des échantillons sains et tumoraux exposés aux solutions de FDG (0,77 and 1,53 M). Moyenne  $\pm$  incertitude de mesure.**

Les analyses des coupes tumorales issues de l'échantillon 3 (Tableau 4, S2-S3-S4 et Figure 43) montrent des concentrations de fluor allant de 1470  $\pm$  140 à 1950  $\pm$  240  $\mu\text{g/g}$ . Ces concentrations intratumorales se trouvent dans la même gamme de valeur que les distributions retrouvées dans les capillaires et le tissu environnant sain.



**Figure 43. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une coupe tumorale exposé au FDG**

La cartographie du fer présentée dans la figure 43 ne montre pas la présence de capillaires au sein de la coupe tumorale mais une zone hémorragique est par contre visible sur la partie droite de la zone analysée.

La coupe tumorale issue de l'échantillon 2 (Tableau 4) provient d'un œuf qui a été incubé avec la solution de FDG de 0,77 M. La concentration de fluor estimée dans cette coupe est pourtant comparable aux données recueillies dans les autres échantillons ( $1570 \pm 180$   $\mu\text{g/g}$ ). La différence de concentration entre les 2 solutions de FDG utilisées dans les échantillons 2 et 3 ne conduit donc pas à une accumulation différente dans la tumeur.

Enfin, la limite de détection de la méthode PIGE a été calculée pour ces échantillons épais par la méthode correspondant au niveau du bruit de fond présent sous le pic à 110 keV. Cette limite de détection a été estimée à 8  $\mu\text{g/g}$  pour la détection du fluor dans ces conditions expérimentales.

Le modèle de la CAM de poulet nous a donc permis d'imager la biodistribution du FDG dans un tissu sain (CAM) et dans un tissu tumoral (coupes tumorales). Ces expériences nous ont permis de quantifier le fluor dans des échantillons biologiques avec de très bonnes accumulations (1000 à 2000  $\mu\text{g}$  de fluor/g matière) et de réaliser des cartographies élémentaires à l'échelle micrométrique. Cette étude constitue ainsi la première imagerie d'un traceur fluoré au sein d'échantillons biologiques par analyse PIGE.

Pour réaliser cette première étude, nous nous sommes placés dans des conditions très élevées de concentrations en traceur afin de définir la limite de quantification de la méthode. Cependant ces conditions expérimentales perturbent la physiologie et le métabolisme de l'embryon comme le montre des études menées sur des embryons maintenus pendant plusieurs jours en hyperglycémie[181, 182]. Ces expériences avaient été réalisées en induisant des hyperglycémies avec des solutions de glucose de 50 ou 100 mM sur des embryons à des stades très précoces (2 ou 3<sup>ème</sup> jour d'incubation). Elles ont alors montré un fort taux de mortalité et l'apparition d'un certains nombres de malformations, de retards de croissance ou de diminution de l'angiogenèse lorsque cet état était prolongé. Dans notre étude, nous n'avons exposé des embryons de 17 jours à de hautes concentrations de traceurs que sur de faibles temps d'exposition (maximum 6 h). Ces conditions particulières de glycémie n'ont donc pas engendré de modifications physiologiques aussi importantes sur nos embryons qui avaient

pratiquement terminé leur développement. Cependant ces concentrations ne nous ont pas permis d'évaluer la biodistribution du composé dans un environnement physiologique normal.

Au cours de ces analyses, aucune sélectivité particulière du FDG pour le tissu tumoral n'a été observée. Les rapports de concentration entre les capillaires et les coupes tumorales restent toujours proches de 1. Ceci peut être dû aux hautes concentrations injectées induisant une forte diffusion du traceur par homéostasie dans tous les tissus vascularisés.

De plus, le métabolisme élevé du tissu sain dans un organisme en développement tel qu'un embryon de poulet tend à masquer la forte accumulation du traceur dans les cellules tumorales. Les zones d'hyperfixation caractérisant habituellement les tumeurs ne sont pas observables car tous les tissus de l'embryon sont en intense activité métabolique.

Ces premiers résultats ont montré la nécessité d'utiliser des traceurs polyfluorés pour la quantification du fluor par PIGE. L'augmentation du nombre de fluor par molécule de traceur va alors nous permettre d'injecter des quantités comparables de fluor avec des solutions faiblement concentrées. Une bonne détection pourra ainsi être conservée tout en injectant ces traceurs dans des concentrations physiologiques ne perturbant pas le métabolisme de l'embryon.

## **2. Traceurs polyfluorés du métabolisme du glucose**

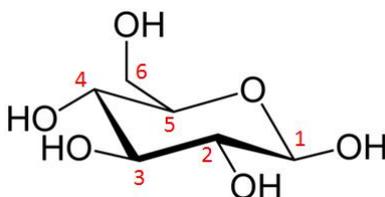
Après cette étape de validation de notre approche, il était essentiel de pouvoir étudier la répartition de traceurs à des concentrations physiologiques. Pour se retrouver dans une gamme de concentration compatible avec la glycémie de l'embryon, il faudrait injecter une solution de FDG 100 fois moins concentrée. Ces conditions se situeraient alors à la limite de quantification de la méthode que nous avons estimée à 8  $\mu\text{g/g}$  dans ce type de tissus biologiques. A ce niveau de concentration, la quantification du fluor ne serait possible qu'avec de très longues accumulations de données (analyses de plusieurs jours) ce qui n'est pas réalisable.

Afin de permettre l'imagerie du fluor par PIGE et pas seulement sa quantification, il faut se trouver au-delà de 10 fois cette limite de quantification. A ce niveau de concentration, les données recueillies lors d'une analyse permettent de quantifier le fluor après 2 ou 3 h d'expérience et la cartographie locale qui nécessite beaucoup plus de données est alors accessible après 15 h d'analyse. Pour atteindre cet objectif, nous avons étudié la possibilité de fonctionnaliser le glucose par plusieurs atomes de fluor.

La synthèse d'un nouveau traceur du métabolisme du glucose nécessite la conservation de certains groupements hydroxyles du glucose impliqués dans l'établissement de liaisons hydrogène. Ces interactions sont indispensables à la reconnaissance du traceur avec le transporteur GLUT1 et l'hexokinase. Il est donc préférable de ne modifier qu'une seule position pour intégrer une chaîne perfluorée.

### ***2.1. Etude structure activité***

Dans la littérature, de nombreuses études de relations structure – activité ont été réalisées sur des glucoses modifiés afin d'évaluer l'impact des modifications et ainsi de déterminer les meilleurs sites de substitution sur la molécule de glucose[183-185](Figure 44).



**Figure 44. Molécule de beta-D-glucopyranose**

Tout d'abord, l'oxygène en position 5 et le groupement hydroxyle 6 ne peuvent pas être modifiés. Le premier est impliqué dans la formation du cycle pyranose et le second doit rester libre pour permettre la réaction de phosphorylation par l'hexokinase lors de la première étape de la glycolyse.

La reconnaissance entre la molécule de glucose et le transporteur GLUT1 se fait par la partie C1-C3. Une liaison hydrogène est alors formée entre le transporteur et l'hydroxyle en

position 1. La substitution de l'hydrogène de ce groupement hydroxyle par des groupements méthyle ou phényle conduit donc à une baisse de l'affinité du transporteur pour la molécule. Cependant cette liaison hydrogène n'est pas indispensable car des traceurs tels que le 1-désoxy-D-glucose entrent quand même dans la cellule par l'intermédiaire du transporteur. De plus, ces analogues substitués en position 1 sont peu réactifs avec l'hexokinase. C'est également le cas d'une substitution de l'hydroxyle en position 4 qui génèrent des dérivés possédant de faibles affinités avec l'hexokinase[183].

Aucune liaison hydrogène n'est par contre formée avec l'hydroxyle en position 2 pendant le transport. L'affinité du transporteur pour le 2-désoxy-D-glucose est même supérieure à celle du D-glucose. De plus, la substitution de l'hydroxyle en position 2 n'entraîne pas de modifications significatives de la phosphorylation par l'hexokinase. Ces analogues modifiés en position 2 constituent donc les dérivés les plus étudiés avec le FDG comme principal exemple.

Enfin il a aussi été montré qu'une liaison hydrogène est formée entre le transporteur de glucose et l'hydroxyle en position 3 [184]. Mais comme pour l'hydroxyle de la position 1, cette liaison n'est pas indispensable pour le transport de la molécule dans la cellule. Bessell et al.[186] ont montré que cet hydroxyle est impliqué dans la reconnaissance du glucose par l'hexokinase. La substitution de ce groupement hydroxyle par un atome de fluor ne conduit pourtant pas à une perte totale de l'affinité et ces traceurs continuent donc d'être des substrats pour l'hexokinase.

Il en résulte donc que les substitutions en position 2, 3 et dans une moindre mesure 4 constituent les meilleurs sites de fonctionnalisation du glucose.

Nous avons donc choisi de modifier la position 3 pour fonctionnaliser le glucose par une chaîne polyfluorée compacte. Cette stratégie a été choisie afin de conserver la possibilité d'effectuer un deuxième marquage ultérieur sur la position 2 par des protocoles déjà décrits dans la littérature comme lors de la synthèse du FDG. Un compromis a ensuite été effectué entre l'intégration d'un maximum d'atomes de fluor pour améliorer la détection du traceur par PIGE et les modifications physico-chimiques que vont engendrer la présence d'une chaîne perfluoroalkyle sur le glucose. L'iodure de perfluorohexyle a donc été utilisé pour intégrer 13

atomes de fluor à notre traceur. L'ajout de ce bras va ainsi nous permettre de gagner un ordre de grandeur en vue de sa détection par PIGE.

## 2.2. Synthèse du glucose polyfluoré

Afin de faire réagir une fonction hydroxyle particulière, il faut protéger les autres fonctions c'est-à-dire les rendre inertes dans les conditions expérimentales de la réaction envisagée pour la fonctionnalisation. Il est ainsi possible de protéger les diverses fonctions d'une molécule par des groupements protecteurs orthogonaux afin de pouvoir effectuer des déprotections sélectives.

Certains groupements protecteurs permettent d'immobiliser 2 fonctions hydroxyles sous la forme d'acétals. Cette réaction dépend notamment de la position axiale ou équatoriale des hydroxyles et de la forme pyranose ou furanose du cycle.

Le glucose, en réaction avec l'acétone et le chlorure de zinc comme catalyseur, donne ainsi un composé bis acétal furanosique : le 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-glucofuranose (**1**). Nous avons utilisé cette molécule comme produit de départ dans notre voie de synthèse car seul l'hydroxyle en position 3 est alors réactif.

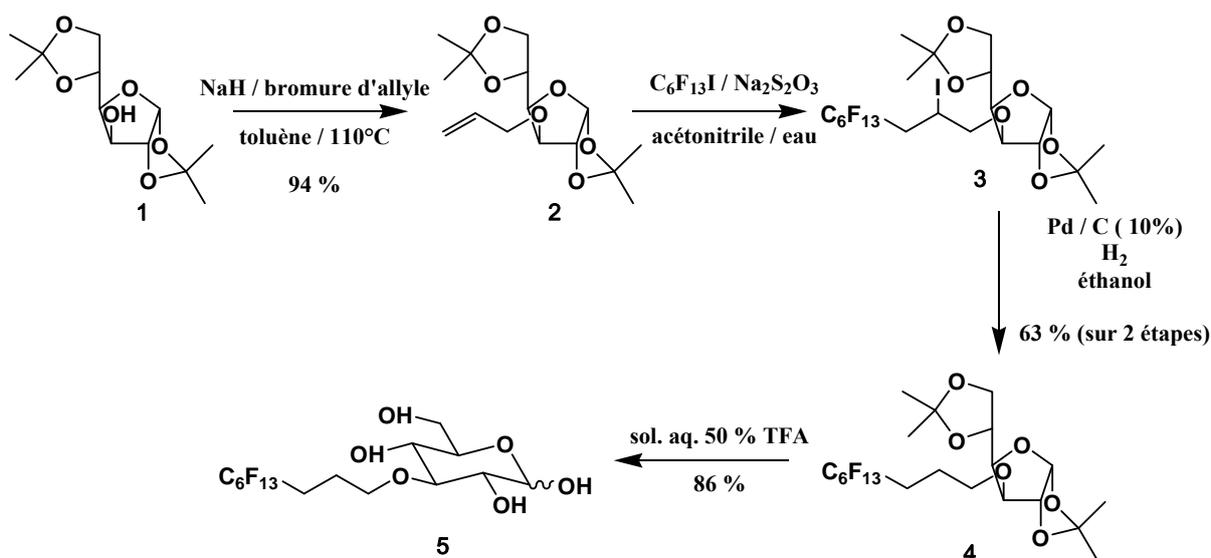


Schéma 1 : Synthèse du glucose polyfluoré

Le composé **2** est obtenu avec un excellent rendement (94 %) par alkylation du 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-glucofuranose avec du bromure d'allyle en présence d'hydrure de sodium[187].

Le couplage de la chaîne perfluorohexyle a été réalisé par addition radicalaire sur un groupement allyle. Deux initiateurs radicalaires ont été utilisés pour réaliser l'addition de l'iodure de perfluorohexyle sur ce groupement allyle. Les premiers essais ont été réalisés avec l'azobisisobutyronitrile (AIBN) à 0,06 équivalent mais ils n'ont pas conduit au produit d'addition attendu. Aucune réaction ne s'est produite malgré des essais d'activation par irradiation ou par la chaleur (60°C). Nous avons alors utilisé le dithionite de sodium dans les conditions décrites par Schwabisch et al.[188] pour obtenir le composé **3**.

La réaction d'hydrogénolyse est ensuite réalisée sous d'hydrogène en présence de palladium sur charbon actif. Le produit de cette réduction est alors obtenu avec un rendement de 63 %. Le conjugué cible **5** est enfin obtenu par déprotection des groupements isopropylidènes dans une solution de TFA à 50%. La réaction effectuée en 1 h à température ambiante a permis d'obtenir le produit attendu avec un rendement de 86 %. Le rendement global de cette synthèse est donc de 41 %.

### ***2.3. Etude de la biodistribution du glucose polyfluoré dans un tissu***

Nous avons testé ce glucose polyfluoré au sein du même modèle biologique que pour l'expérience avec le FDG. Deux séries d'œufs ont donc été préparées pour obtenir des échantillons sains et tumoraux.

Les propriétés amphiphiles de ce traceur ont déjà été étudiées par Schwabisch afin d'obtenir des cristaux liquides. En effet, la partie glucose de cette molécule est hydrophile mais la chaîne polyfluorée hydrophobe contrebalance ces interactions et ne permet pas de solubiliser ce composé en milieu aqueux. Les injections de ce traceur ont donc été réalisées dans une huile injectable (polypropylène glycol). La concentration maximale de ce traceur que nous avons pu réaliser est de 18,5 mM ce qui est très proche de la glycémie normale de l'embryon. L'injection de 100  $\mu$ L de cette solution n'induit donc pas d'hyperglycémie et ni de perturbation du métabolisme de l'embryon. La quantité de fluor injectée dans chaque embryon est alors de 0,46 mg ce qui est 6 fois plus faible que lors des injections de FDG à 1,53 M (2,9 mg de fluor injecté).

Des coupes tumorales et des échantillons de CAM ont ensuite été préparés en suivant le protocole développé lors de l'expérience avec le FDG. Comme prévu dans la littérature, une modification chimique de cette position 3 n'a pas empêché l'internalisation de ce traceur. Nous avons pu quantifier la présence de fluor aussi bien dans la CAM, les capillaires et les coupes tumorales.

Les analyses PIGE / RBS effectuées ont permis d'établir les cartographies de fluor et de fer de chaque zone. Une analyse de 22 h a été réalisée sur la CAM de l'échantillon 4 (Tableau 5 et Figure 45). C'est un œuf contrôle dans lequel nous n'avons pas implanté de tumeur sur la CAM. La quantification du fluor dans cet échantillon est de  $1290 \pm 150 \mu\text{g/g}$  de matière sèche pour les capillaires et de  $2240 \pm 260 \mu\text{g/g}$  pour le tissu environnant. La proportion de glucose polyfluoré dans les capillaires ne représente donc que 57 % de la quantité de traceur captée dans le tissu environnant. Les quantités de fluor mesurées dans cette CAM sont légèrement supérieures à celles retrouvées dans la CAM exposée au FDG ( $960 \pm 100 \mu\text{g/g}$  de fluor dans les capillaires et de  $1560 \pm 180 \mu\text{g/g}$  dans le tissu environnant). Cette augmentation de l'ordre de 35-40 % n'est pas suffisamment significative pour comparer directement les différentes valeurs. Comme nous avons injecté 6 fois moins de fluor dans cette expérience avec le glucose polyfluoré que dans celle du FDG, ces résultats correspondent donc à une très bonne incorporation du traceur dans le tissu sain CAM.

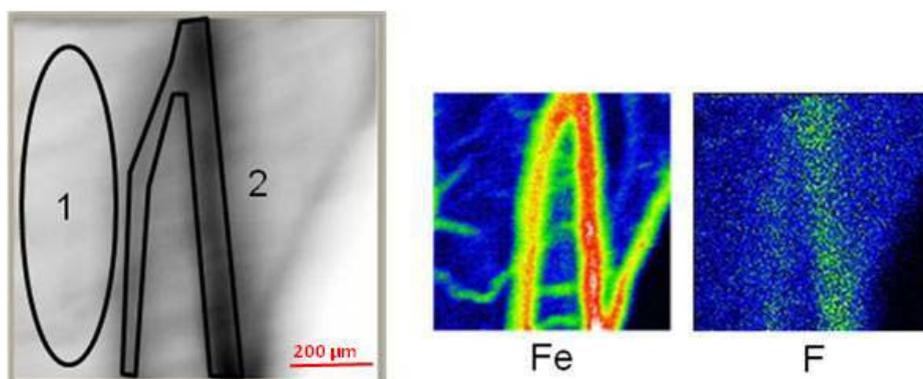
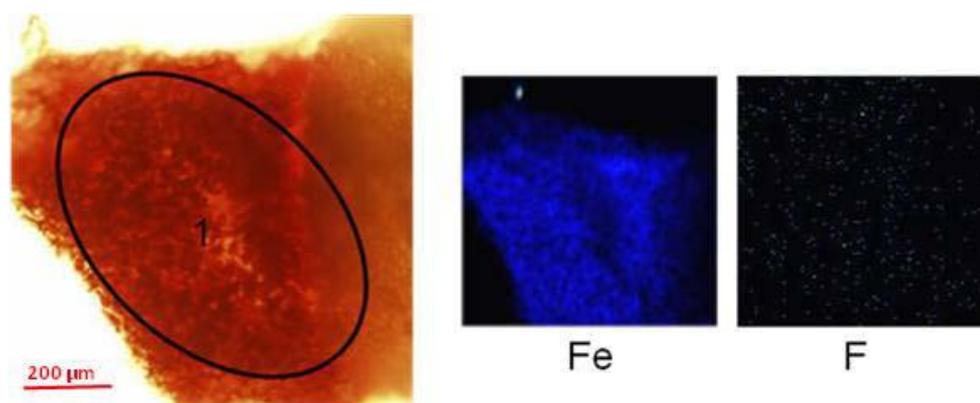


Figure 45. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une CAM exposé au glucose polyfluoré

Echantillon		Concentration en fluor ( $\mu\text{g/g}$ )		
		Tissu sain		Tissu tumoral
Tissu	Coupes	CAM	Capillaire	Tumeur
Echantillon 4	S1	$2240 \pm 260$	$1290 \pm 150$	
Echantillon 5	S1	$330 \pm 60$	$95 \pm 20$	
	S2			$300 \pm 30$
	S3			$140 \pm 30$
	S4			$130 \pm 20$

**Tableau 5 : Concentration en fluor des échantillons sains et tumoraux exposés à la solution de glucose polyfluoré (18,5 mM). Moyenne  $\pm$  incertitude sur la mesure.**

Dans l'échantillon 5, des analyses ont été réalisées sur des capillaires, du tissu environnant sain et sur plusieurs coupes de la tumeur implantée. La Figure 46 présente les cartographies en fluor et en fer d'une des coupes tumorales de cet échantillon. Une analyse de seulement 1 heure a été effectuée pour cette zone afin de seulement quantifier la quantité de fluor incorporée. Cette accumulation de données n'est par contre pas suffisante pour réaliser l'imagerie de la répartition du fluor mais ce choix a été guidé par la très faible vascularisation de la tumeur. Aucune structure apparente n'est observable telle que la localisation de capillaires. D'après la répartition homogène du fer dans la coupe, il est envisageable que cette zone corresponde à une zone hémorragique au sein de la tumeur.



**Figure 46. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une coupe tumorale exposé au glucose polyfluoré**

Les concentrations obtenues dans cet échantillon sont très inférieures à celles recueillies dans l'échantillon 4. Malgré l'injection de la même quantité de fluor, il est difficile de comparer les accumulations dans 2 œufs différents. Ces valeurs sont par contre cohérentes entre elles. Une concentration supérieure du traceur a été retrouvée dans le tissu environnant que dans les capillaires ( $330 \pm 60 \mu\text{g/g}$  contre  $95 \pm 20 \mu\text{g/g}$ ). La différence de distribution est ici plus importante que dans l'échantillon 4, la proportion de traceur dans les capillaires ne représente alors que 29 % de la quantité de traceur retrouvée dans le tissu environnant.

Les coupes tumorales S2 à S4 de cette tumeur ont été réalisées en conservant l'orientation de la tumeur par rapport à la CAM. Ainsi la coupe S2 correspond à la zone de contact entre la CAM et la tumeur qui s'est développée dessus (Figure 41). Une concentration comparable est alors retrouvée dans la CAM et cette première coupe tumorale adjacente ( $300 \pm 30 \mu\text{g/g}$ ). Puis une gradation de la concentration du traceur dans les coupes tumorales en fonction de l'éloignement à la CAM est observée. Les coupes successives ont une plus faible concentration en fluor et la coupe distale est la plus faiblement concentrée ( $130 \pm 20 \mu\text{g/g}$  pour S4).

Cette expérience constitue la première étude de distribution de ce glucose polyfluoré en tant que traceur du métabolisme du glucose. Elle a permis de travailler à une concentration physiologique tout en gardant une très bonne détection par PIGE. L'imagerie du fluor a pu être réalisée dans les capillaires et les coupes tumorales de chaque échantillon malgré la plus faible quantité de fluor injectée. La quantification du fluor a pu être réalisée dans chaque échantillon aussi bien dans les capillaires que dans les tissus vascularisés sains et tumoraux. Et enfin des cartographies de distribution ont été réalisées et l'imagerie des vaisseaux de la CAM a été rendue possible. Cependant ce traceur ne marque pas spécifiquement les zones tumorales vu que le tissu environnant en développement possède aussi un métabolisme accru.

Cette expérience a aussi permis de valider que la fonctionnalisation du traceur par le bras perfluorohexyle a conduit à l'injection de quantités de fluor injectées suffisantes pour réaliser l'imagerie de traceurs dans des conditions physiologiques. Ce bras polyfluoré constitue donc un excellent agent de marquage pour la synthèse de traceurs fluorés.

Ces deux expériences impliquant des traceurs du métabolisme du glucose nous ont permis de valider et d'optimiser la technique PIGE pour la détection du fluor 19 dans les échantillons biologiques. Ces développements ont autorisé la transposition de cette approche à un système imageant spécifiquement l'angiogenèse tumorale. Nous avons alors pu évaluer notre nouvel agent d'imagerie ciblant spécifiquement les récepteurs du VEGF.

### **3. Traceur de l'angiogenèse tumorale**

#### ***3.1. Conception de mimes peptidiques ciblant des récepteurs VEGFR-2***

Les interactions spécifiques entre effecteurs et récepteurs sont impliquées tout au long des processus cellulaires. L'identification et la localisation des éléments structuraux clés engagés dans ces interactions sont des étapes essentielles dans la compréhension du mécanisme d'action de ces protéines.

Dans le cas du VEGF qui possède une haute affinité pour le récepteur VEGFR-2, l'activité des récepteurs est initialisée par la dimérisation du VEGF homodimérique sur le domaine extracellulaire du récepteur.

Des études de structure-activité du récepteur VEGFR-2 ont alors été réalisées pour déterminer les domaines indispensables à la liaison avec le VEGF[189]. D'autre part, la structure tridimensionnelle du VEGF a été décrite par diffraction des rayons X[190]. En complément, des études de relation structure-activité ont aussi été menées par mutagenèse dirigée dans le but d'identifier les acides aminés impliqués dans la fixation sur les récepteurs[191]. Toutes ces études structurales ont permis d'identifier 3 zones essentielles à la reconnaissance du récepteur : les acides aminés 42 et 44, les acides aminés 63,64 et 67 et surtout la séquence 82-93 (Figure 47). Ces séquences sont immunodominantes et forment des boucles aux extrémités du VEGF dont la flexibilité est très importante pour la fixation spécifique sur les récepteurs.

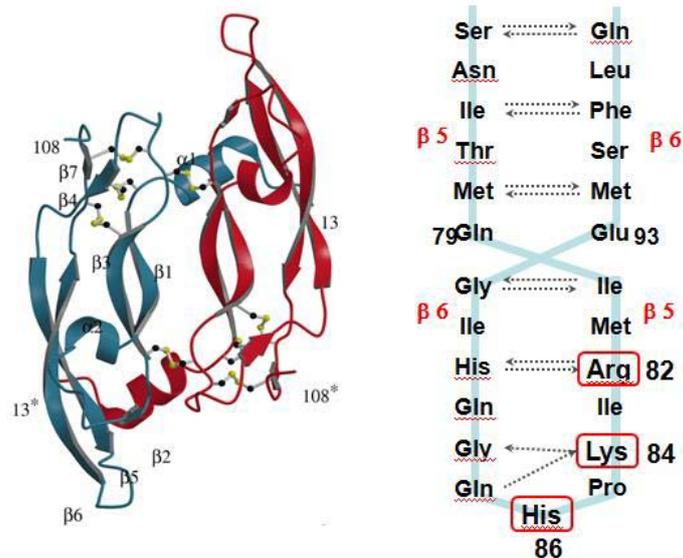


Figure 47. Structure 3D du VEGF et de la séquence 79-93

La séquence principale 79-93 se trouve sur une boucle basique d'environ 20 acides aminés. Ce motif est formé par 2 feuillets  $\beta$  anti-parallèles reliés par une jonction  $\beta$  en épingle à cheveux (région  $\beta 5 - \beta 6$ ).

Une large gamme de peptides linéaires et cycliques incluant partiellement ou intégralement cette séquence 79-93 du VEGF a été synthétisée au cours de précédents travaux réalisés dans notre laboratoire. Tous ces peptides partagent une séquence commune Arg<sup>82</sup>-Ile-Lys<sup>84</sup>-Pro-His<sup>86</sup> comprenant les 3 acides aminés basiques cruciaux dans le domaine de liaison au récepteur. En tout, 25 peptides de 6 à 17 acides aminés avaient ainsi été synthétisés dont 10 linéaires et 15 cycliques.

Afin de déterminer leur affinité pour le récepteur KDR, des études biologiques de ces peptides avaient été effectuées dans le laboratoire LMMA[192]. L'inhibition compétitive de la liaison du VEGF au récepteur VEGFR-2 par ces peptides avait ainsi été testée sur des cellules d'ovaires d'hamster chinois déficientes en sulfate d'héparane transfectées avec un vecteur d'expression contenant VEGFR-2 cDNAs (Cellules CHO<sub>m</sub> VEGFR-2). Il avait été démontré que le VEGFR-2 recombinant de ces cellules présente les mêmes caractéristiques que le VEGFR-2 de cellules endothéliales[193]. Le principe du test est donc d'évaluer le déplacement de l'équilibre de liaison entre le VEGF et son récepteur par ces peptides. Un VEGF marqué à l'iode 125 est utilisé et la radioactivité liée aux cellules est mesurée après

leur incubation avec  $^{125}\text{I}$ -VEGF en présence des peptides. La liaison non-spécifique est déterminée en présence d'un excès de VEGF non marqué. La liaison spécifique est calculée en déduisant la liaison non-spécifique de la liaison totale.

Parmi toutes les variantes synthétisées, un cyclopeptide de 17 acides aminés avait montré une forte affinité de fixation sur le site des récepteurs. Ce peptide est le CBO-P11, il constitue donc un puissant inhibiteur compétitif du VEGF avec une  $\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ [192].

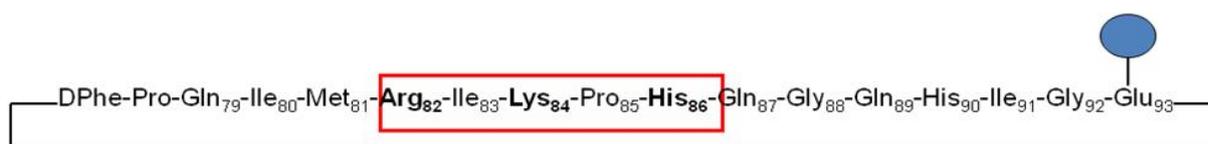
Nous avons donc utilisé ce peptide possédant une forte affinité envers les récepteurs VEGFR-2 pour concevoir un traceur d'imagerie ciblant spécifiquement les cellules tumorales. La fonctionnalisation du CBO-P11 a alors été réalisée pour permettre sa détection par PIGE.

### ***3.2. Synthèses de peptides fonctionnalisables***

Ce peptide conserve intégralement la séquence cible 79-93 du VEGF. Cependant le couple d'acides aminés DPhe-Pro a été inséré entre Gln79 et Glu93 afin de favoriser le repliement de la chaîne principale. La proline va ainsi permettre de faciliter la cyclisation et la structuration du peptide en feuillet et coude  $\beta$  grâce à sa structure particulière qui impose un coude conformationnel.

La cyclisation de la chaîne principale permet de stabiliser le peptide dans une conformation préférentielle qui mime la conformation native de cette région du VEGF. Cette diminution de flexibilité conduit alors à une augmentation significative de la sélectivité et de l'activité biologique. D'autre part, cette cyclisation permet d'augmenter la résistance à la dégradation enzymatique.

Ce site de cyclisation peptidique, réalisée entre Glu 93 et D-Phe, va aussi servir de site fonctionnalisable lors l'étape de libération de la fonction acide. L'intégration d'une longue chaîne polyfluorée sur ce site, qui se trouve à l'opposé de la séquence clé, ne va pas induire d'encombrement stérique au niveau du site de liaison au VEGFR-2 (Figure 48).



**Figure 48. Site de cyclisation et de fonctionnalisation du CBO-P11**

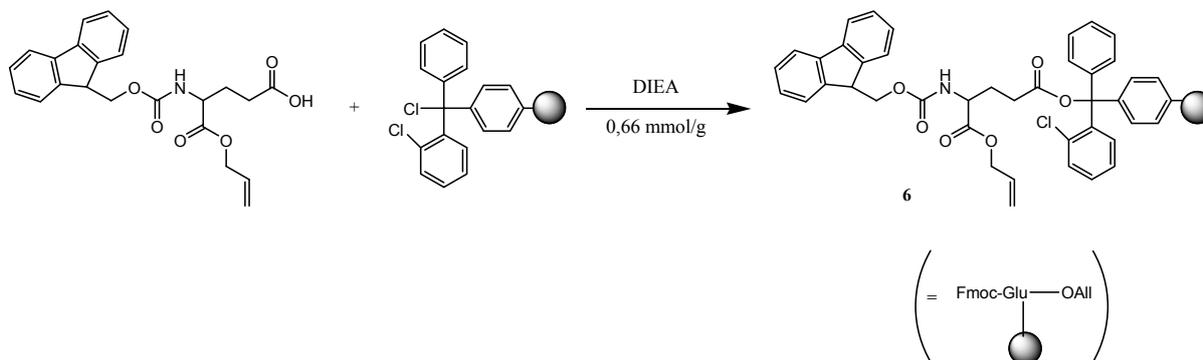
La technique de Synthèse Peptidique sur Support Solide (SPPS) a été utilisée en chimie Fmoc pour préparer le peptide cyclique sous forme protégée. Cette méthode permet de diminuer le nombre d'intermédiaires réactionnels et donc de limiter le nombre de purifications.

Cette méthode, développée dans les années 1960 par Merrifield[194], consiste en l'addition successive d'acides aminés protégés sur un support insoluble à partir de l'extrémité C-terminale. Les supports solides sont typiquement des billes de polymères fonctionnalisées pour permettre la liaison du premier acide aminé. Ces supports sont chimiquement inertes et non solubles dans les réactifs utilisés durant la synthèse mais ils présentent une bonne solvation dans les solvants employés au cours de l'élongation du peptide. Il existe aujourd'hui un très large panel de résines commerciales possédant différentes propriétés de solvation (solvants aqueux/organiques) et diverses fonctions chimiques. Le choix de la résine permet la synthèse de peptides protégés ou non après décrochage de la résine et conditionne la nature de l'extrémité C-terminale (acide, amide, hydrazide, ester méthylique, aldéhyde).

### **3.2.1. Fonctionnalisation de la résine**

La stratégie choisie pour la cyclisation en phase solide repose sur le greffage du premier acide aminé sur la résine par sa chaîne latérale. Cette synthèse a donc été initiée en fonctionnalisant la résine par un dérivé d'acide glutamique protégé par un groupement Fmoc pour la fonction amine et par un groupement allyle pour la fonction acide carboxylique principale. L'utilisation de ce groupement allyle va permettre de réaliser une déprotection sélective et ainsi aboutir à la cyclisation dans un second temps sans risque de réaction parallèle. La résine fonctionnalisée **6** est obtenue par couplage entre le Fmoc-Glu(COOH)-

OAll par l'acide carboxylique de la chaîne latérale et la résine commerciale polystyrène 2-chlorotriyle en présence de DIEA (Schéma 2).



**Schéma 2 : Obtention de la résine Fmoc-Glu(2-CITrt)-OAll**

Cette stratégie permet ainsi de libérer sélectivement l'acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide glutamique après la cyclisation et le clivage de la résine du peptide protégé. Cette fonction acide sera alors le groupement réactif pour réaliser notre fonctionnalisation.

### 3.2.2. Synthèse du cyclopeptide en phase solide

En SPPS, l'addition de chaque acide aminé correspond à un cycle de deux étapes principales : le couplage d'un acide aminé protégé et l'élimination du groupe protecteur *N*-terminal. Cette méthode présente les avantages de la synthèse sur support adaptée à la construction de peptides. Ces avantages sont la facilité et la rapidité de la synthèse grâce aux étapes de lavage du peptide sur le support. Néanmoins, la SPPS nécessite une succession de réactions rapides et quantitatives afin de limiter au maximum les peptides « tronqués ». Afin de tendre vers des réactions complètes, les synthèses sont généralement réalisées en larges excès molaires d'acides aminés et d'activateurs dans des conditions concentrées. La construction de la chaîne peptidique sur support rend possible l'utilisation d'excès de réactifs, facilement éliminés par simple filtration.

La synthèse de ce peptide a déjà été décrite par Goncalves et al[195]. Nous avons utilisé une méthode de double couplage conditionnel sans capping pour les acides aminés protégés et les prolines.

Tous les acides aminés utilisés sont protégés par un groupement Fmoc sur leur fonction amine. Les chaînes latérales de certains acides aminés sont aussi protégées par un groupement Trt pour les glutamines et les histidines, par un groupement Pbf pour l'arginine et par un groupement Boc pour la lysine. Ces groupements protecteurs acido-labiles vont nous permettre de réaliser la synthèse du cyclopeptide sans risque de les cliver avant la réaction de déprotection finale dans une solution de TFA.

Les couplages successifs des acides aminés activés sous forme d'ester ont été réalisés en utilisant une solution de HBTU/HOBt. Une fois le peptide linéaire obtenu, la déprotection du Fmoc terminal n'a pas été effectuée sur le synthétiseur. La déprotection de la partie C-terminale du peptide est effectuée avec le tétrakis(triphenylphosphine) palladium (0) dans des conditions neutres (Schéma 3).

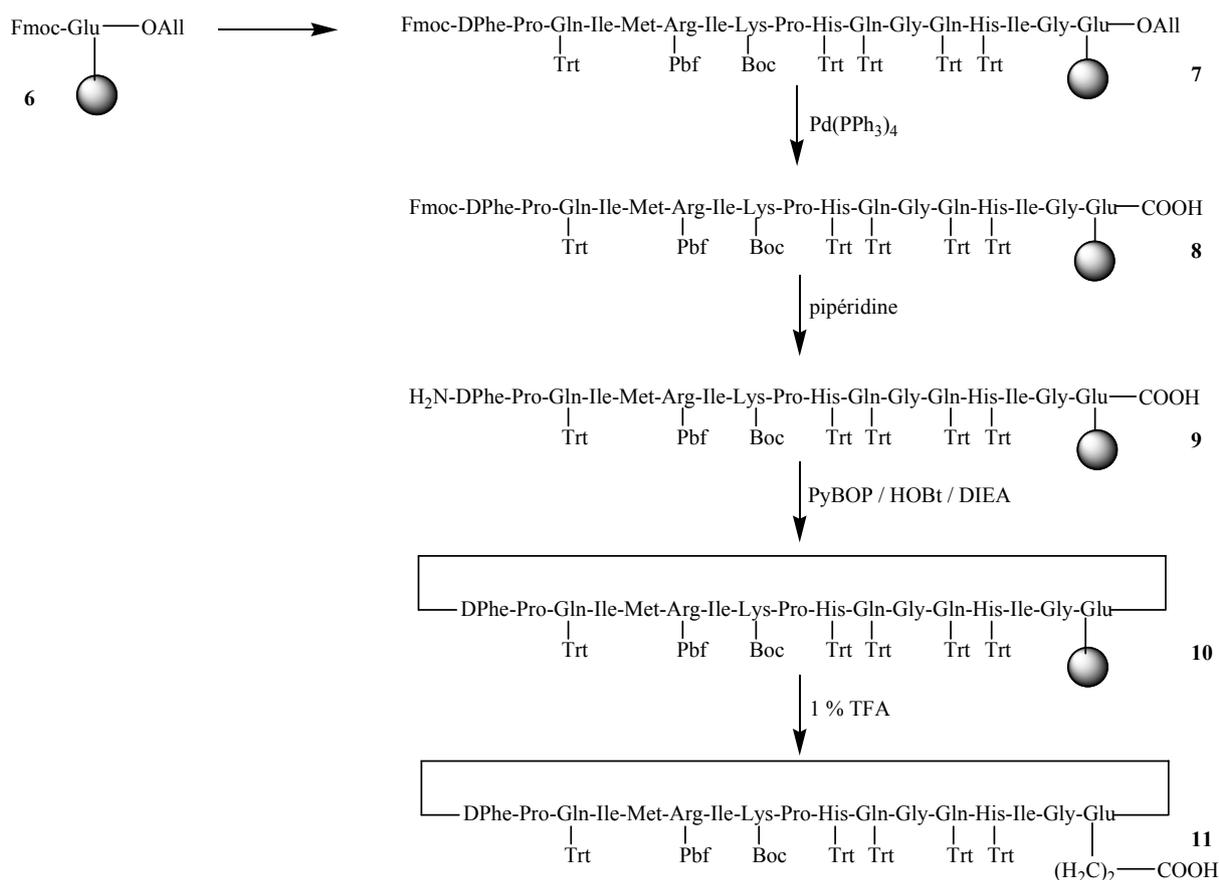


Schéma 3 : Synthèse du CBO-P11 en phase solide

Cette réaction de déprotection du groupement allyle a été effectuée sous atmosphère inerte en plaçant le peptide **7** et le réactif sous vide et sous flux d'argon pendant 3 heures. La déprotection du groupement Fmoc a ensuite été obtenue sous des conditions basiques douces dans une solution à 20 % de pipéridine. Ces conditions expérimentales n'entraînent pas de réactions secondaires au niveau des groupements protecteurs des chaînes latérales.

La cyclisation en phase solide a été réalisée au moyen de l'agent de couplage PyBOP en présence de HOBT et de DIEA. Le clivage de la résine a enfin été effectué dans une solution diluée à 1 % de TFA afin de ne pas éliminer les groupements protecteurs des chaînes latérales. Cette dernière réaction a ainsi permis de libérer sélectivement la fonction acide carboxylique de la chaîne latérale de l'acide glutamique en vue de la fonctionnalisation du peptide avec un rendement global de 65 %.

### 3.2.3. Synthèse du bras polyfluoré

Pour réaliser la synthèse du bras polyfluoré, un espaceur polyéthylène glycol a été utilisé pour intégrer la chaîne polyfluorée au peptide. Ce type de dérivés hydrosolubles constitue de très bons candidats pour synthétiser un espaceur bifonctionnelisé. Il existe de nombreux dérivés possédant des longueurs de chaînes variables, nous avons préparé notre bras à partir du triéthylène glycol commercial **12**.

Selon le protocole décrit par Goncalves[195], la première étape est une mono-allylation sélective du triéthylène glycol (TEG). Cette réaction a été réalisée avec un excès de TEG et en présence de bromure d'allyle et d'hydruure de sodium (Schéma 4). Le composé mono-tosylé mono-allylé est ensuite obtenu par tosylation du composé **13** par le chlorure de tosyloyle. Cette étape permet d'intégrer un très bon groupe partant en vue de la fonctionnalisation de cette extrémité.

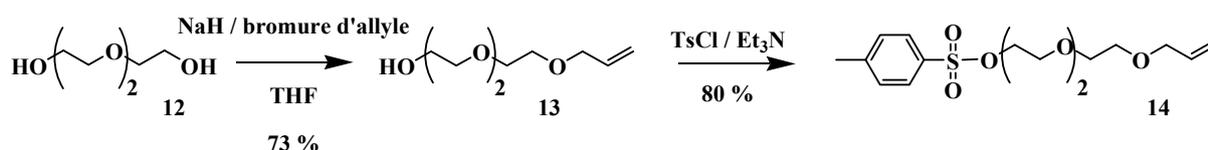


Schéma 4 : Obtention du TEG bifonctionnelisé

Le composé **15** est obtenu par substitution nucléophile du groupement tosyle par un phthalimide (Schéma 5). Le groupement phthalimide nous permet ainsi d'intégrer un atome d'azote sur ce bras en vue d'obtenir une amine terminale par la réaction de Gabriel.

L'intégration de la chaîne polyfluorée en 2 étapes a été réalisée en nous appuyant sur la voie de synthèse décrite par Schwabisch[188]. La première réaction est une addition radicalaire de l'iodure de perfluorohexyle sur le groupement allyle en utilisant le dithionite de sodium comme initiateur. L'étape d'hydrogénolyse catalysée par du palladium sur charbon a ensuite été réalisée sous atmosphère de dihydrogène.

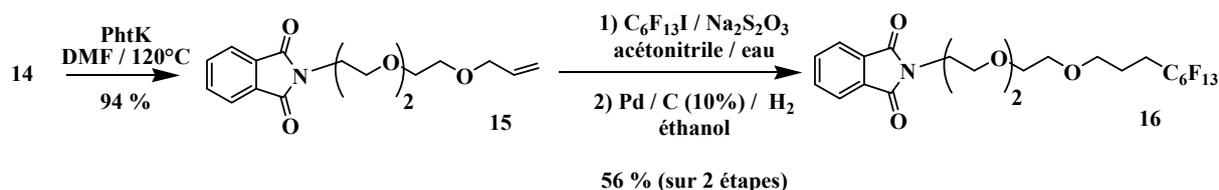


Schéma 5 : Intégration de la chaîne polyfluorée sur l'espaceur TEG

Le composé **17** est obtenu par hydrolyse basique du phthalimide dans une solution d'hydrazine (Schéma 6). L'amine primaire ainsi générée va nous permettre de réaliser un couplage peptidique avec la fonction acide libre du peptide. Cette réaction est effectuée dans un mélange PyBOP / HOBt / DIEA. Le traceur cible **18** (F13 CBO-P11) est finalement obtenu par déprotection des chaînes latérales en milieu acide dans une solution à 50 % de TFA et après purification par HPLC avec un rendement de 51 %.

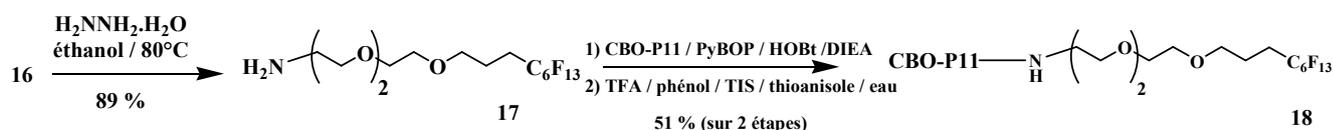


Schéma 6 : Obtention du traceur F13 CBO-P11

Un test de binding a alors été réalisé pour vérifier si la fonctionnalisation du CBO-P11 par une longue chaîne polyfluorée avait un impact sur l'affinité du traceur. Nous avons ainsi pu déterminer un  $\text{IC}_{50}$  de 3,7  $\mu\text{M}$  pour cet agent d'imagerie original (Figure 49). Nous avons

donc obtenu un agent d'imagerie possédant une affinité comparable au CBO-P11 pour les VEGFR.

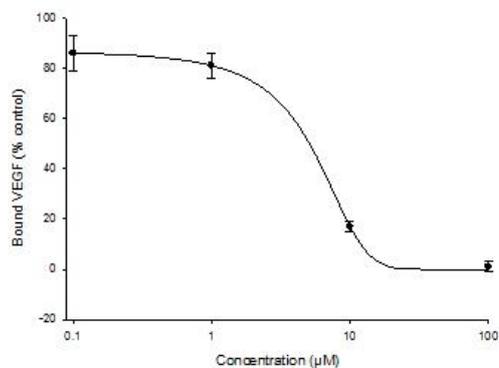


Figure 49. Courbe dose réponse du F13 CBO-P11

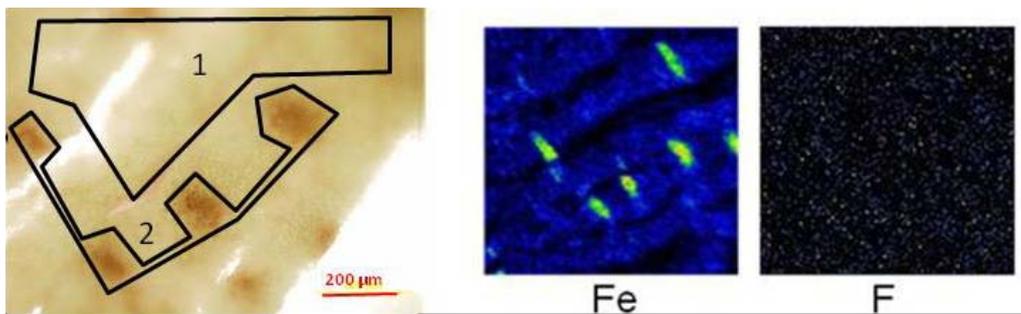
### ***3.3. Etude de biodistribution du F13 CBO-P11***

Les tests de détection du fluor dans notre modèle de tissu angiogénique ont été réalisés avec deux solutions de F13 CBO-P11 de 20 et 35 mM. Avec ces solutions, la quantité du fluor injectée dans chaque œuf est donc respectivement de 0,49 et 0,85 mg. Nous nous retrouvons ainsi avec une quantité de fluor injectée équivalente à celle du glucose polyfluoré (0,46 mg) mais à des quantités inférieures à celles du FDG (2,9 et 1,4 mg). Deux séries d'œufs ont alors été préparés avec l'injection de 100 µL pour chaque solution de F13 CBO-P11 dans une veine de la CAM.

Des échantillons de CAM et les tumeurs développées dans chaque œuf ont été prélevés puis préparés pour réaliser les analyses PIGE selon le protocole précédemment décrit.

La coupe tumorale S2 issue de l'échantillon 6 (Figure 50) provient d'un œuf qui a été incubé avec la solution de F13 CBO-P11 de 20 mM. Les analyses effectuées sur cet échantillon (Tableau 6) montrent des concentrations en fluor de  $360 \pm 50$  µg/g au niveau des capillaires et de  $270 \pm 20$  µg/g dans le tissu tumoral environnant. La quantité de F13 CBO-P11 dans les capillaires représente donc 130 % de la proportion du traceur dans le tissu environnant. La même proportion est retrouvée dans la coupe S1 du même échantillon.

Contrairement aux traceurs du métabolisme du glucose précédemment utilisés, une plus grande quantité de traceur au niveau des capillaires a été obtenue. La détection de ces derniers au sein des coupes tumorales a ainsi pu être effectuée grâce à la cartographie du fer. La concentration locale de fluor n'est par contre pas suffisante pour faire ressortir la distribution vasculaire du F13 CBO-P11 dans l'image de cartographie du fluor.



**Figure 50. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une coupe tumorale exposé au F13 CBO-P11**

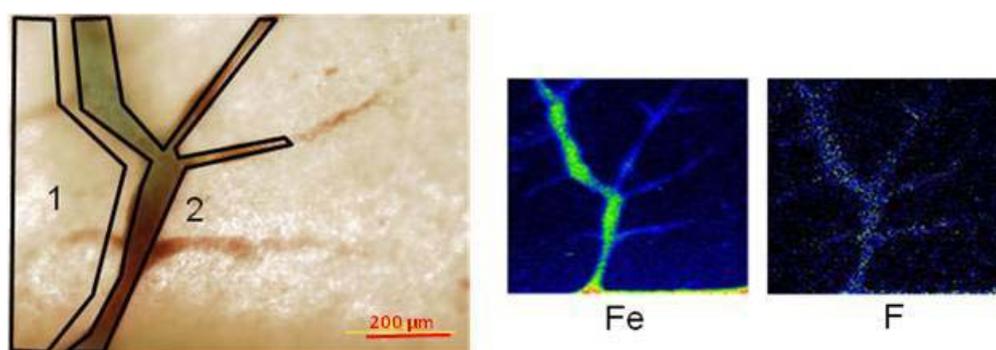
L'échantillon 7 a été incubé avec la solution de 35 mM et des analyses sur 2 coupes tumorales ont été réalisées. La proportion de F13 CBO-P11 au niveau des capillaires est encore supérieure. Elle est de 190 % dans la coupe S1 et de 210 % dans la coupe S2. Une localisation vasculaire plus marquée du peptide fluoré est donc observée dans cet échantillon. Les concentrations en fluor des échantillons 6 et 7 sont comparables malgré la différence de fluor injecté. Cela laisse supposer que l'accumulation de fluor n'est pas dose dépendante dans nos conditions expérimentales.

La quantité de traceur présent dans les capillaires par rapport à celle dans le tissu environnant est donc de 1,5 pour 1 dans le tissu tumoral.

Echantillon		Concentration en fluor ( $\mu\text{g/g}$ )			
		Tissu sain		Tissu tumoral	
Tissu	Coupes	CAM	Capillaires	Coupes	Capillaires
Echantillon 6 (20 mM)	S1			$450 \pm 35$	$610 \pm 70$
	S2			$270 \pm 20$	$360 \pm 50$
Echantillon 7 (35 mM)	S1			$345 \pm 30$	$650 \pm 70$
	S2			$215 \pm 35$	$460 \pm 45$
Echantillon 8 (35 mM)	S1	$2050 \pm 175$	$6570 \pm 555$		

**Tableau 6 : Concentration en fluor des échantillons sains et tumoraux exposés aux solutions de F13 CBO-P11 (20 and 35 mM). Moyenne  $\pm$  incertitude de mesure.**

L'échantillon 8 est un morceau de CAM qui a été exposé à la solution de F13 CBO-P11 de 35 mM (Tableau 6 et Figure 51). Ce tissu richement vascularisé a permis d'obtenir des cartographies très fines de fer et de fluor. Dans cet échantillon sain, les concentrations de fluor retrouvées au niveau des capillaires et du tissu environnant sont respectivement de  $6570 \pm 555 \mu\text{g/g}$  de fluor par g de matière sèche et de  $2050 \pm 175 \mu\text{g/g}$ . La proportion de F13 CBO-P11 dans les capillaires représente donc 320 % de la quantité de traceur captée dans le tissu environnant.



**Figure 51. Distribution élémentaire du fer et du fluor dans une CAM exposé au F13 CBO-P11**

La quantité de traceur présent dans les capillaires par rapport à celle dans le tissu environnant est donc de 3 pour 1 dans les échantillons sains.

L'accumulation de F13 CBO-P11 dans les capillaires de la CAM constitue la plus forte concentration de traceur que nous avons détecté dans l'ensemble de nos échantillons. La

quantité de fluor injecté dans cet œuf est pourtant 3 fois moins importante que dans les œufs incubés avec la solution de FDG la plus concentré. D'autre part, les faibles concentrations de fluor retrouvées dans les coupes tumorales peuvent être expliquées par la faible vascularisation des tumeurs.

Les études précédentes que nous avons réalisées avec les traceurs du métabolisme du glucose montraient un rapport inverse avec des tissus plus fortement concentrés que les capillaires. Le F13 CBO-P11 n'est donc pas distribué uniformément dans les tissus. Cette étude a permis de montrer la sélectivité de ce traceur pour les sites de surexpression des récepteurs VEGFR-2. Notre modèle biologique étant un organisme en développement, il existe cependant des tissus angiogéniques sains présentant également des récepteurs VEGFR-2 à la surface des cellules endothéliales des capillaires normaux.

Ces études de biodistributions du F13 CBO-P11 ont ainsi permis d'évaluer les ratios d'incorporation dans les tissus sains et tumoraux. Les résultats obtenus ont défini que la quantité de traceur présent dans les capillaires par rapport à celle dans le tissu environnant est de 3 pour 1 dans les échantillons sains alors qu'elle est seulement de 1,5 pour 1 dans le tissu tumoral. Le F13 CBO-P11 marque donc plus intensément les tumeurs que le tissu angiogénique sain. Ceci peut être expliqué par la surexpression des VEGFR dans les zones tumorales, pas seulement au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins tumoraux mais également grâce à l'expression de ces récepteurs sur l'ensemble des cellules tumorales.

Nos résultats ont donc permis de développer et d'imager la distribution un nouvel d'agent d'imagerie spécifique. Cette approche a également montré toutes les possibilités offertes par la méthode PIGE pour l'imagerie de traceurs fluorés à l'échelle micrométrique.

## **Conclusion et perspectives**

Les travaux présentés dans ce mémoire visaient à concevoir dans un premier temps un nouvel agent d'imagerie de l'angiogenèse tumorale puis à développer une nouvelle méthode d'analyse *ex vivo* palliant le manque de résolution de la TEP et permettant ainsi de valider les résultats de cette modalité d'imagerie par une étude complémentaire.

L'angiogenèse, qui conduit à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, joue un rôle clé dans le développement et la dissémination des cancers. La conception de vecteurs d'imagerie sélectifs des récepteurs endothéliaux des vaisseaux tumoraux constitue donc l'un des principaux axes de ciblage des cancers. L'imagerie moléculaire de l'angiogenèse tumorale connaît actuellement d'importants développements avec la conception de nombreux vecteurs d'imagerie. Parmi les différentes techniques d'imageries utilisées, la TEP est actuellement la plus performante pour détecter les tumeurs. Elle présente l'avantage de pouvoir imager des radiotraceurs injectés en quantités infimes en raison de sa haute sensibilité. Cependant sa résolution spatiale millimétrique ne permet pas d'accéder à la biodistribution cellulaire de ces traceurs. Il est donc nécessaire de recourir à une technique d'analyse complémentaire pour recueillir ces informations inaccessibles à l'imagerie TEP.

Nous avons donc choisi d'utiliser une méthode d'analyse élémentaire indirecte possédant une haute résolution spatiale et une bonne sensibilité afin d'imager la biodistribution d'analogues de traceurs TEP à l'échelle micrométrique. Nous avons alors initié notre étude en évaluant les analyses par faisceaux d'ions pour la détection du [<sup>19</sup>F]FDG, analogue stable du principal traceur utilisé en TEP. Nos travaux ont ainsi permis de développer une nouvelle technique de quantification et d'imagerie du fluor 19 possédant à la fois une bonne sensibilité et une résolution micrométrique.

La quantification du fluor a été réalisée par l'intermédiaire de la technique PIGE via la réaction nucléaire  $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)^{19}\text{F}$  qui conduit à l'émission de photons  $\gamma$  caractéristiques à 110 et 197 keV. Les études effectuées sur les standards minéraux et les cultures cellulaires incubées avec du [<sup>19</sup>F]FDG ont tout d'abord permis d'optimiser les conditions expérimentales de cette méthode. Ces résultats ont alors montré que la PIGE permettait d'effectuer une analyse du fluor avec une sensibilité de quelques  $\mu\text{g/g}$  de matière avec une résolution de 5  $\mu\text{m}$ .

Afin d'estimer les capacités de cette technique pour l'imagerie de traceurs fluorés, nous avons ensuite étudié la biodistribution du [<sup>19</sup>F]FDG au sein de tissus biologiques sains et tumoraux. Le modèle de la CAM d'embryon de poulet a été choisi pour l'évaluation de nos traceurs car il permet à la fois d'accéder à un tissu très vascularisé sain et d'implanter facilement des tumeurs. Cette expérience a ainsi permis de quantifier le fluor dans la CAM et

des coupes tumorales. Nous n'avons pas observé de sélectivité particulière du FDG pour le tissu tumoral. Ces résultats peuvent être expliqués d'une part à cause de l'injection de fortes concentrations de traceur qui a pu conduire à une diffusion importante dans tous les tissus. D'autre part, la différence de métabolisme entre tissu sain et tissu tumoral n'est pas aussi marquée chez un embryon en développement que dans un individu adulte. Nous avons utilisé ces hautes concentrations de traceur pour déterminer les conditions expérimentales nécessaires à l'imagerie du fluor par PIGE. Ces analyses ont ainsi permis de reconstruire des cartographies inédites de la distribution du FDG dans ces tissus à l'échelle micrométrique.

Une fois la validation de la faisabilité de notre approche effectuée, nous avons voulu optimiser la quantité de traceur injectée tout en conservant une bonne détection du fluor par PIGE. Notre choix s'est alors porté sur la synthèse d'un glucose que nous avons fonctionnalisé par une chaîne perfluorohexyle. Nous avons ainsi pu évaluer cette molécule en tant que nouveau traceur du métabolisme du glucose. Cette étude a été effectuée dans des conditions de glycémie proche de la glycémie physiologique. L'incorporation de ce traceur n'avait jamais été étudiée et nous avons pu observer son accumulation à la fois dans le tissu sain et le tissu tumoral. La quantification du fluor dans les capillaires et le tissu environnant a révélé des accumulations comparables aux échantillons exposés au FDG malgré l'injection de 6 fois moins de fluor dans les embryons. Cette expérience a ainsi permis de valider le bras perfluorohexyle utilisé comme un bon agent de fluoration permettant d'atteindre des quantités de fluor injectées suffisantes pour réaliser l'imagerie de traceurs dans des conditions physiologiques.

Après l'optimisation de notre modèle expérimental avec des dérivés du glucose, nous avons enfin appliqué notre approche à l'imagerie de l'angiogenèse tumorale. Nous avons alors choisi un agent antiangiogénique précédemment développé au laboratoire, le CBO-P11, qui a montré une excellente affinité pour les récepteurs du VEGF pour élaborer ce nouveau traceur sélectif.

La fonctionnalisation du cyclopeptide CBO-P11 par la chaîne perfluorohexyle a alors été réalisée afin de permettre sa détection par PIGE. L'affinité de ce nouveau traceur pour les VEGFR n'a pas été altérée par l'intégration de cette chaîne polyfluoré. L'étude de sa biodistribution a ensuite permis d'évaluer les ratios d'incorporation dans les tissus sains et tumoraux. La quantité de traceur présent dans les capillaires par rapport à celle dans le tissu environnant est de 3 pour 1 dans les échantillons sains alors qu'elle est seulement de 1,5 pour

1 dans le tissu tumoral. Le F13 CBO-P11 marque donc plus intensément les tumeurs que le tissu angiogénique sain. Cependant, l'étude de ce traceur dans ce modèle angiogénique d'embryon de poulet n'a pas permis d'explorer ses capacités de ciblage dans des conditions optimales. Il serait alors très intéressant d'étudier le ciblage d'une tumeur intracrânienne, implantée chez un modèle mammifère de souris, par le F13 CBO-P11 et d'évaluer la sélectivité de ce traceur pour les capillaires tumoraux.

Nos travaux ont donc démontré la capacité de la PIGE pour quantifier la biodistribution de traceurs fluorés à l'échelle micrométrique. Les possibilités offertes par cette technique *ex vivo* sont intéressantes en vue de déterminer si un vecteur moléculaire a bien atteint sa cible. Le retour de ces informations inaccessibles en TEP permettrait alors de compenser le manque de précision de cette dernière dans l'utilisation de traceurs en TEP.

On pourrait ainsi envisager de marquer le CBO-P11 à la fois au fluor 18 et au fluor 19. L'analyse successive de la distribution de ce nouveau traceur en TEP et en PIGE pourrait alors permettre de réunir des informations complémentaires sur sa biodistribution en combinant les avantages de chaque modalité.

## **Partie expérimentale**

# 1. Synthèses

## *Techniques générales*

Les produits chimiques et les solvants utilisés ont été acquis chez Sigma-Aldrich et Alfa-Aesar. Les résines préchargées et les acides aminés proviennent de Novabiochem.

Toutes les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice (Merck, 60F<sub>254</sub>, épaisseur 0,25 mm) et révélées par ultraviolets ( $\lambda = 365$  nm) ou par une solution de permanganate de potassium diluée à 1 % dans l'eau.

Les synthèses peptidiques ont été réalisées sur des automates de synthèse Applied Biosystems 431A ou 433A en chimie Fmoc.

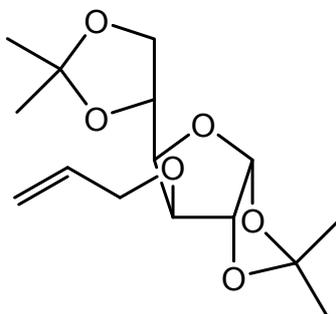
Les spectres RMN 1D <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ainsi que les spectres 2D HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) et HSQC (heteronuclear single quantum correlation) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 300 (300 MHz for <sup>1</sup>H and 75 MHz for <sup>13</sup>C). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm et les constantes de couplage en Hertz (Hz). Le déplacement chimique du signal d'un proton est défini par rapport au triméthylsilane (TMS) qui est utilisé comme référence. Nous emploierons pour décrire les spectres les abréviations suivantes : s, singulet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet.

Les analyses infrarouges ont été réalisées sur un imageur Spotlight 300 IR-FT équipé d'un spectromètre Spectrum One (Perkin-Elmer, France). Les études par spectrométrie de masse ont été réalisées sur un spectromètre MALDI-TOF Reflex III (Bruker).

Les analyses par faisceaux d'ions ont été réalisées sur la ligne microsonde de la plateforme AIFIRA (accélérateur électrostatique simple étage de type 3,5 MV - Singletron<sup>®</sup>) avec un faisceau continu de <sup>1</sup>H<sup>+</sup> de basse énergie (< 3,5 MeV).

Les traitements de données, les reconstructions des cartes élémentaires et la définition des zones d'intérêts ont été faites avec le logiciel Supavisio. Les concentrations locales en éléments chimiques, les profils de distribution en profondeur et les charges déposées ont été déterminées avec le programme SimNRA. Le logiciel PyMCA a été utilisé pour calculer l'intensité des pics de fluor sur les spectres PIGE.

3-allyl-1,2:5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**2**)



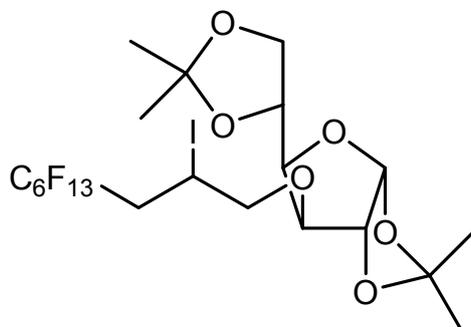
De l'hydruure de sodium (350 mg, 11,5 mmol) a été ajouté à une solution de 1,2:5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**1**) (2 g, 7,7 mmol) dans 50 mL toluène. Le milieu réactionnel est chauffé à 110°C pendant 2 h. Le bromure d'allyle (1,35 mL, 15,4 mmol) est ensuite introduit et le milieu réactionnel est agitée à 110°C pendant 18 h. 10 mL d'eau distillée ont ensuite ajoutés et la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (2 x 25 mL). Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux brun est purifié par chromatographie sur gel de silice (75:25 n-hexane/éthyl acétate). Le composé **2** (2,16 g, 94%) est obtenu sous forme d'huile incolore.

SM (m/z): calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> 300,35 ; valeur obtenue 300,16.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 1,27-1,46 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 3,79-3,86 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,94 (m, 1H, H-3), 4,14-4,21 (m, 2H, H-4, H-5) ; 4,39 (d, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,4 Hz), 4,51 (m, 1H, H-2), 5,14-5,28 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,3 et 9,7 Hz); 5,73 (t, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,8 Hz); 5,84-5,91 (m, 1H, H-1).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 25,8-27,5 (4C, CH<sub>3</sub>), 65,0 (C-3), 67,9 (C-6), 70,1 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 72,6 (C-4), 77,9 (C-5), 80,5 (C-2), 105,6 (C-1), 108,9 et 111,7 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 116,6 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>); 134,3 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>).

3-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridécafluoro-2-iodo-nonyl)-1,2:5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**3**)



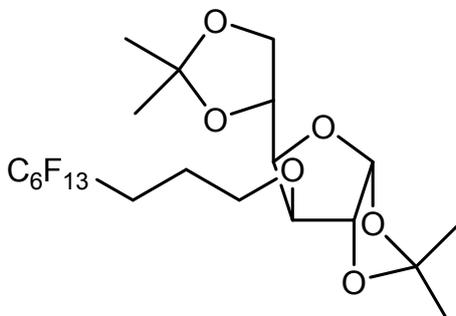
A une solution de 1,33 mmol du composé **2** (400 mg) dans un mélange d'acétonitrile (6 mL) et d'eau distillée (3 mL) refroidie à 0°C, 360 mg (4,28 mmol) de bicarbonate de sodium sont ajoutés sous atmosphère d'argon. Puis 765  $\mu$ L de 1-iodoperfluorohexane (3,3 mmol) et 420 mg de dithionite de sodium (2,4 mmol) sont lentement ajoutés au mélange. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h 30 à température ambiante. 100 mL d'éther diéthylique sont versés dans le mélange. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (50 mL) puis de l'eau distillée (50 mL). Elle est ensuite séchée sur MgSO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu brut (huile brune, 900 mg) est utilisé sans étape de purification pour l'étape suivante.

SM (m/z): calculé pour C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>F<sub>13</sub>IO<sub>6</sub> 746,30 ; valeur obtenue 746,04.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 1,27-1,46 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 2,54-2,74 (d, 2H, CHICH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,48 Hz), 3,03-3,09 (tt, 1H, CHI, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,73 et 6,48 Hz), 3,79-3,86 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,90 (dd, 2H, OCH<sub>2</sub>CHI, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,82 et 7,85 Hz), 3,94 (m, 1H, H-3), 4,14-4,21 (m, 2H, H-4, H-5), 4,51 (m, 1H, H-2), 5,84 (d, 1H, H-1, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,7 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 15,6 (CHI), 25,8-27,5 (4C, CH<sub>3</sub>), 37,6 (t, CHICH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 20 Hz), 46,2 (OCH<sub>2</sub>CHI), 65,0 (C-3), 67,9 (C-6), 72,6 (C-4), 77,9 (C-5), 80,5 (C-2), 105,6 (C-1), 108,9 et 111,7 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 108,1-126,3 (5C, qt, CF<sub>2</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 268,6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32,3 Hz); 118,5 (tq, CF<sub>3</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 287,9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32,3 Hz).

3-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridécafluoro-nonyl)-1,2:5,6-di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D-  
glucofuranose (**4**)



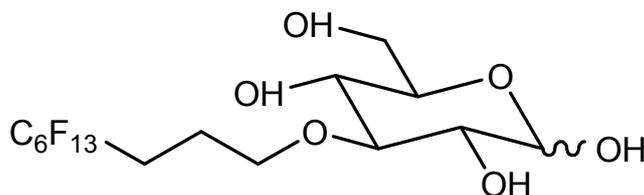
Le composé **3** (2,4 g, 3,2 mmol) est dissous dans un mélange d'éthanol (30 mL) et d'acétate d'éthyle (30 mL). Après l'addition de 1 mL de triéthylamine (7 mmol) et de 150 mg de palladium sur charbon (10 %), l'iode est clivé sous atmosphère de dihydrogène (1 atm). La réaction est effectuée pendant 15 h. Le charbon est éliminé par filtration et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux brun est purifié par chromatographie sur gel de silice (75:25 n-hexane/éthyl acétate). Le composé **4** (1,26 g, 63 %) est obtenu sous forme d'huile brune.

SM (m/z): calculé pour  $C_{21}H_{25}F_{13}O_6$  620,40 ; valeur obtenue 620,14.

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm: 1,27-1,46 (s, 12H,  $CH_3$ ), 1,84-1,87 (tt, 2H,  $OCH_2CH_2$ ,  $^3J_{H-H} = 7,3$  et 7,4 Hz), 2,11-2,26 (t, 2H,  $CH_2CH_2CF_2$ ,  $^3J_{H-H} = 7,4$  Hz), 3,55-3,70 (t, 2H,  $OCH_2CH_2$ ,  $^3J_{H-H} = 7,3$  Hz), 3,79-3,86 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,94 (m, 1H, H-3), 4,14-4,21 (m, 2H, H-4, H-5), 4,51 (m, 1H, H-2), 5,84 (d, 1H, H-1  $^3J_{H-H} = 3,7$  Hz).

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm: 21,0 ( $OCH_2CH_2$ ), 25,8-27,5 (4C,  $CH_3$ ), 28,1 (t,  $CH_2CH_2CF_2$ ,  $^2J_{CF} = 22$  Hz), 66,1 (C-6), 69,1 ( $OCH_2CH_2$ ), 70,0 (C-3), 72,6 (C-4), 77,9 (C-5), 80,5 (C-2), 105,6 (C-1), 108,9 et 111,7 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 108,1-126,3 (5C, qt,  $CF_2$ ,  $^1J_{CF} = 268,6$  Hz,  $^2J_{CF} = 32,3$  Hz); 118,5 (tq,  $CF_3$ ,  $^1J_{CF} = 287,9$  Hz,  $^2J_{CF} = 32,3$  Hz).

3-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridécafluoro-nonyl)- $\alpha$ -D-glucose (**5**)



Le composé **4** (800 mg, 1,29 mmol) est dissous à température ambiante dans 70 mL d'une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique à 50 %. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h. Le solvant est ensuite évaporé et les impuretés sont coévaporées avec de l'éthanol et du toluène (3 x 30 mL chacun). Le produit brut est ensuite recristallisé dans l'acétate d'éthyle. Le composé **5** (1,26 g, 86 %) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

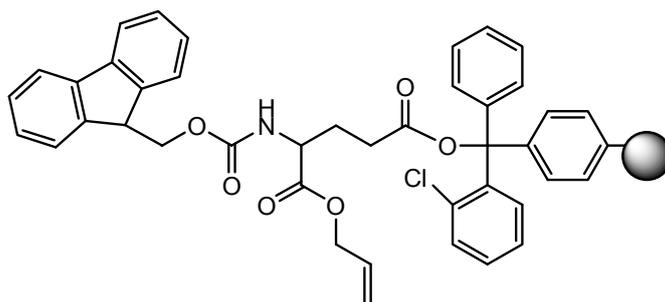
Point de fusion : 165 °C

SM (m/z): calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>F<sub>13</sub>O<sub>6</sub> 540,27 ; valeur obtenue 540,08.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 1,63-1,68 (tt, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,3 et 7,4 Hz), 2,08-2,13 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,4 Hz), 3,11 (m, 1H, H-3), 3,35-3,46 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,3 Hz), 3,59-3,66 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3,73-3,76 (m, 2H, H-4, H-5), 3,81 (m, 1H, H-2), 4,26 (d, 1H, H-1, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 22,5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29,1 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 22 Hz), 62,9 (C-6), 71,5 (C-4), 72,6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 75,4 (C-5), 78,1 (C-3), 86,7 (C-2), 98,4 (C-1), 108,1-126,3 (5C, qt, CF<sub>2</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 268,6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32,3 Hz); 118,5 (tq, CF<sub>3</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 287,9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32,3 Hz).

Fmoc-Glu(résine 2-ClTrt)-OAll (**6**)

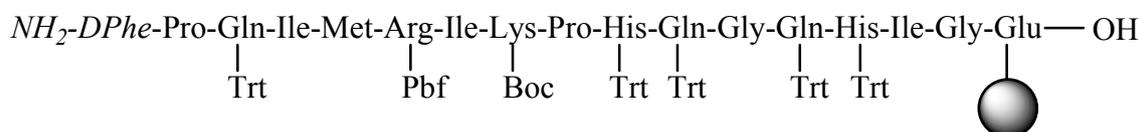


L'acide aminé protégé Fmoc-Glu-OAll (1,6 g, 3,9 mmol) est placé dans un ballon à température ambiante, la résine polystyrène 2-chlorotrytyle (2,34 g, 1,4 mmol/g) et 2,3 mL de DIEA sont ensuite ajoutés dans 25 mL de DCM. Le milieu réactionnel est agité sous azote pendant 5 h. Le DCM est filtré et des lavages successifs sont effectués avec 3 x 20 mL d'un mélange DCM/MeOH/DIEA (17/2/1), 3 x 20 mL de DCM, 3 x 20 mL de DMF et 3 x 20 mL de DCM. Le composé **6** (3,1 g) est ensuite placé sous vide pendant une nuit. Le taux de greffage est estimé par spectroscopie UV en déterminant la quantité de groupement Fmoc clivé. 4 mg de composé **6** est placé dans un tube et 0,5 mL de solution de pipéridine à 20 % dans le DCM est ajouté. Parallèlement, 0,5 mL de solution de pipéridine à 20 % dans le DCM est ajouté seul dans un autre tube pour réaliser un test blanc. Après 15 min d'agitation, 49,5 mL de DMF sont ajoutés dans chaque tube. Le test blanc va permettre de définir l'absorbance zéro du spectroscope UV à 301 nm. L'absorbance du tube avec résine est également déterminée. Le taux de greffage est ensuite calculé en suivant la formule :  $(Abs_{301nm} \times \text{volume de solution en mL}) / (7800 \times \text{masse de résine en g})$ . Le composé **6** a été synthétisé avec un taux de greffage de 0,66 mmol/g.





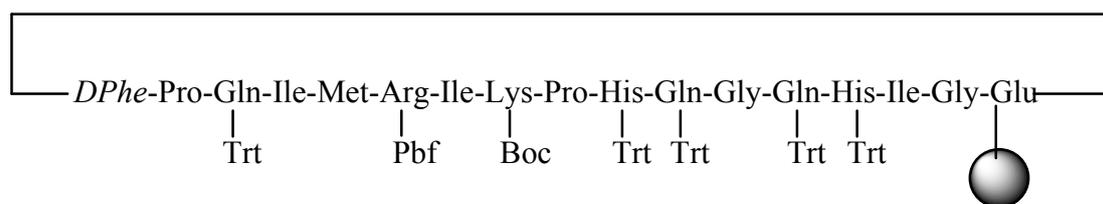
*D-Phe-Pro-Gln(Trt)-Ile-Met-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Pro-His(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Gln(Trt)-His(Trt)-Ile-Gly-Glu(résine 2-chlorotrityle)-OH (9)*



Le composé **8** (2,3 g) est placé dans un ballon à température ambiante, 20 mL de solution à 20 % de pipéridine dans la NMP sont ensuite ajoutés. Le milieu réactionnel est agité sous azote pendant 3 h. La solution de pipéridine est filtrée et des lavages successifs sont effectués avec 50 mL NMP, 50 mL d'une solution de HOBt à 1 M dans la NMP, 50 mL NMP, 50 mL DCM. Le composé **9** (2,1 g) est ensuite placé sous vide pendant une nuit. Un échantillon de 5 mg est déprotégé pour être analysé par MALDI-TOF en suivant le protocole décrit pour le composé **7**.

SM (MALDI-TOF) (m/z): calculé pour C<sub>90</sub>H<sub>142</sub>N<sub>28</sub>O<sub>23</sub>S 2015,05 ; valeur obtenue 2016,33.

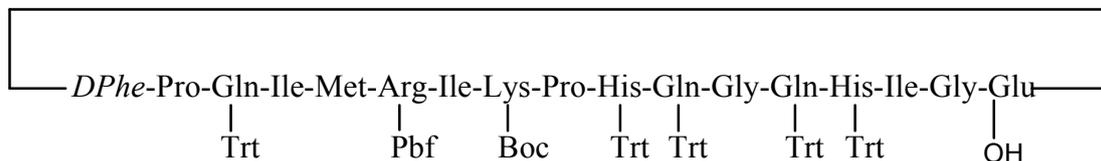
Cyclo(*D-Phe-Pro-Gln(Trt)-Ile-Met-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Pro-His(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Gln(Trt)-His(Trt)-Ile-Gly-Glu(résine 2-chlorotrityle)*) (**10**)



Le composé **9** (1,35 g) est placé dans un ballon dans lequel sont ajoutés 25 mL de NMP. Après ajout de HOBt (102 mg), le PyBOP (391 mg) puis la DIEA (260 µL), le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 h. Des lavages successifs sont ensuite effectués avec 50 mL DMF, 50 mL DCM, 50 mL de méthanol puis 50 mL DCM. Le composé **10** (1,2 g) est obtenu après mise sous vide pendant une nuit. Un échantillon de 5 mg est déprotégé pour être analysé par MALDI-TOF en suivant le protocole décrit pour le composé **7**.

SM (MALDI-TOF) (m/z): calculé pour C<sub>90</sub>H<sub>140</sub>N<sub>28</sub>O<sub>22</sub>S 1998,33 ; valeur obtenue 1998,03.

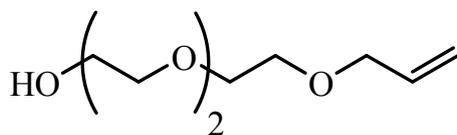
Cyclo(*D-Phe*-Pro-Gln(Trt)-Ile-Met-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Pro-His(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Gln(Trt)-His(Trt)-Ile-Gly-Glu) (**11**)



Le composé **10** (3,18 g) est placé dans un fritté de porosité 3 et la résine est gonflé avec 10 mL de DCM. Après filtration du DCM, 20 mL d'une solution de TFA à 1 % dans le DCM sont ajoutés puis le milieu réactionnel est agité pendant 3 min. La solution est ensuite filtrée dans un ballon contenant 10 mL d'une solution de pyridine à 20 % dans le méthanol. L'ajout de la solution de TFA et la filtration sont répétées 10 fois. La résine passe alors du jaune au rouge en présence de TFA. Des lavages successifs de la résine sont effectués avec 3 x 20 mL DCM, 3x 20 mL MeOH, 3 x 20 mL DCM, 3 x 20 mL MeOH. Le solvant est éliminé sous pression réduite jusqu'à la limite de précipitation du peptide. 20 mL d'eau distillée sont ensuite ajoutés pour faire précipiter le peptide cyclique. La solution est éliminée par filtration dans un fritté de porosité 3 pour obtenir le composé **11** (1,75g). Le rendement global de la synthèse peptidique est de 65 %. Un échantillon de 5 mg est déprotégé pour être analysé par MALDI-TOF en suivant le protocole décrit pour le composé **7**.

SM (MALDI-TOF) (m/z): calculé pour C<sub>90</sub>H<sub>140</sub>N<sub>28</sub>O<sub>22</sub>S 1998,33 ; valeur obtenue 1998,03.

1-allyloxy-8-hydroxy-3,6-dioxaoctane (**13**)



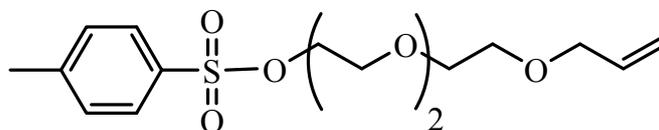
De l'hydrure de sodium (60 % dans l'huile minérale, 3 g, 0,08 mol) est ajouté lentement à une solution de triéthylène glycol (20 ml, 0,15 mol) dans du THF anhydre (50 mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 15 min. Le bromure d'allyle (4,3 ml, 0,05 mol) est introduit et la réaction se poursuit pendant 1 h. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans le DCM. Le mélange est filtré puis extrait avec une solution saturée en NaCl (40 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM (2 x 100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux brun est purifié par chromatographie sur gel de silice (70:30 n-hexane/éthyl acétate). Le composé **13** (6,93 g, 73 %) est obtenu sous forme d'huile brune.

SM (m/z): calculé pour C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> 190,24 ; valeur obtenue 190,12

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 3,53-3,76 (m, 12H); 3,99 (d, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=5,61 Hz); 5,23-5,24 (dd, 2H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=1,32 et 10,61 Hz); 5,84-5,94 (ddt, 1H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=6,06 Hz, 10,66 Hz et 17,21 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 61,6 (CH<sub>2</sub>OH); 70,2-70,5 (4C, CH<sub>2</sub>O); 72,2 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>); 72,5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 117,1 (CH=CH<sub>2</sub>); 134,6 (CH=CH<sub>2</sub>).

1-[(p-toluènesulphonyloxy)-9-allyl-3,6,9-Trioxaoctane (**14**)



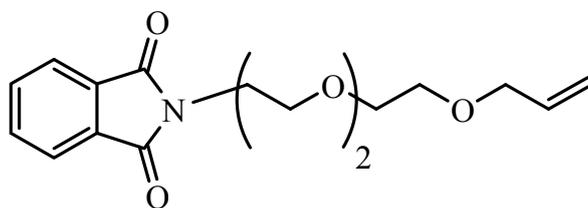
A un mélange du composé **13** (2,14 g, 11,3 mmol) dans 30 mL de triéthylamine refroidit à 0°C, le chlorure de tosylo est ajouté (3,22 g, 16,9 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le mélange est ensuite plongé dans un bain de glace et 100 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite avec 2 x 100 mL d'acétate d'éthyle supplémentaire. Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution aqueuse d'acide acétique à 2 % (50 mL) puis avec de l'eau distillée (50 mL). Elles sont ensuite séchées sur MgSO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux brun est purifié par chromatographie sur gel de silice (75:25 n-hexane/éthyl acétate). Le composé **14** (3,1 g, 80 %) est obtenu sous forme d'huile incolore.

SM (m/z): calculé pour C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>S 344,42 ; valeur obtenue 344,13

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 2,44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,52-3,66 (m, 10H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 4,01 (d, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,61 Hz); 4,14 (t, 2H, CH<sub>2</sub>OTs, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 4,7 Hz); 5,14-5,28 (dd, 2H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=1,32 et 10,61 Hz); 5,84-5,94 (ddt, 1H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=6,06 Hz, 10,66 Hz et 17,21 Hz); 7,33 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8,1 Hz); 7,77 (d, 2H, CH<sub>Ar</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8,1 Hz)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 21,2 (CH<sub>3</sub>); 68,2-68,9 (4C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 70,1-70,2 (2C, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OTs); 71,7 (CH<sub>2</sub>OTs); 116,6 (CH=CH); 127,5-129,5 (4C, CH<sub>Ar</sub>); 132,5 (C<sub>Ar</sub>SO<sub>2</sub>); 134,3 (CH=CH<sub>2</sub>); 144,5 (C<sub>Ar</sub>CH<sub>3</sub>).

N-2-(2-[2-(2-allyloxy-éthoxy)-éthoxy]-éthyl)-phthalimide (**15**)



A une solution de composé **14** (3,1 g, 9 mmol) dans 100 mL de DMF distillé, est ajouté le phthalimide de potassium (1,83 g, 9,9 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 120°C pendant 12 h puis refroidit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est repris dans 100 mL de DCM. 100 mL d'eau distillé sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite avec 3 x 100 mL de DCM supplémentaire. Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le composé **15** (2,73 g, 94%) est obtenu sous forme d'huile incolore.

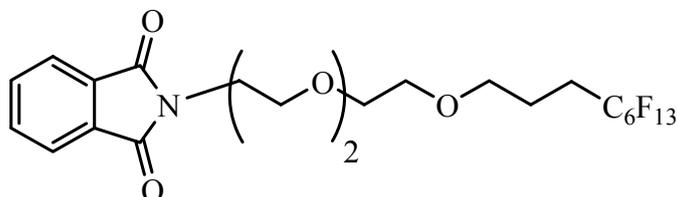
SM (m/z): calculé pour C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub> 319,35 ; valeur obtenue 319,14

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 3,34-3,47 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,52 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NPh<sub>t</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,76 Hz); 3,67 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NPh<sub>t</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,85 Hz); 3,77 (d, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,61 Hz); 4,91-5,09 (dd, 1H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=1,32 et 10,61 Hz); 5,57-5,76 (ddt, 2H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>=6,06 Hz, 10,66 Hz et 17,21 Hz); 7,48-7,55 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,57-7,63 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 37,1 (CH<sub>2</sub>NPh<sub>t</sub>); 67,8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NPh<sub>t</sub>); 69,3-72,0 (4C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 74,5 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>); 116,9 (CH=CH<sub>2</sub>); 123,1 (2C, CH<sub>Ar</sub>); 132,0 (2C, C<sub>Ar</sub>); 133,8 (2C, CH<sub>Ar</sub>); 134,6 (CH=CH<sub>2</sub>); 168,1 (2C, C=O).

IR (cm<sup>-1</sup>): 2906; 2867; 1774; 1713; 1615; 1107; 1006; 928.

N-2-(2-(2-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridécafluoro-nonyloxy)-éthoxy]-éthoxy)-éthyl)-  
phtalimide (**16**)



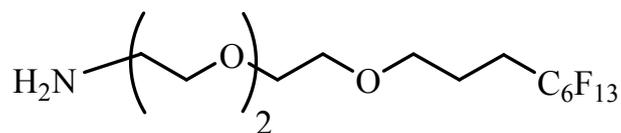
5,6 g de composé **15** (17,5 mmol) et le bicarbonate de sodium (4,7 g, 56 mmol) sont ajoutés sous argon à une solution d'acétonitrile et d'eau distillée (2:1) refroidit à 0°C. Le 1-iodoperfluoroalcane (6 mL, 24,8 mmol) et le dithionite de sodium (5,5 g, 31,6 mmol) sont ensuite introduits dans le mélange. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h. Après l'achèvement de la réaction (suivi par CCM pendant 3 h), 300 mL d'éther de diéyle sont ajoutés dans le mélange. La solution est ensuite lavée avec une solution saturée en NaCl puis avec de l'eau distillée (150 mL de chacune). Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut obtenu est utilisé sans étape de purification. Il est dissous dans 100 mL d'éthanol. 2 mL de triéthylamine et 300 mg de palladium sur charbon (10 %) sont ajoutés sous atmosphère de dihydrogène (1 atm). La réaction est agitée pendant 15 h. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est repris dans 100 mL de DCM. La phase organique est lavée avec 2 x 50 mL d'eau distillée. Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le composé **16** (6,9 g, 56 %) est obtenu sous forme d'huile incolore.

SM (m/z): calculé pour C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>F<sub>13</sub>NO<sub>5</sub> 639,40 ; valeur obtenue 639,13

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1,46 (tt, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,3 et 7,4 Hz); 1,61 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,4 Hz); 3,32 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,3 Hz); 3,34-3,47 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,52 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NPh<sub>t</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,76 Hz); 3,67 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NPh<sub>t</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,85 Hz); 7,48-7,55 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,57-7,63 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 16,5 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2$ ); 28,8 (t,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2$ ,  $^2J_{\text{CF}} = 22$  Hz); 37,1 ( $\text{CH}_2\text{NPh}$ ); 67,8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NPh}$ ); 69,3-72,0 (4C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 72,4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2$ ); 108,1-126,3 (5C, qt,  $\text{CF}_2$ ,  $^1J_{\text{CF}} = 268,6$  Hz,  $^2J_{\text{CF}} = 32,3$  Hz); 118,5 (tq,  $\text{CF}_3$ ,  $^1J_{\text{CF}} = 287,9$  Hz,  $^2J_{\text{CF}} = 32,3$  Hz); 123,1 (2C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 132,0 (2C,  $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,8 (2C,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 168,1 (2C,  $\text{C}=\text{O}$ ).

N-2-(2-[2-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridécafluoro-nonyloxy)-éthoxy]-éthoxy)-éthylamine (**17**)



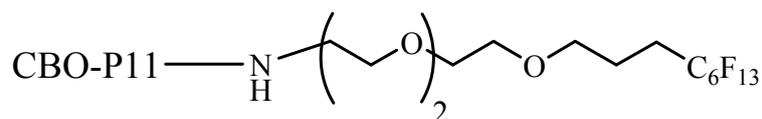
A une solution de composé **16** (6,9 g, 10,8 mmol) dans 120 mL d'éthanol, l'hydrazine (4 ml, 43,2 mmol) est ajoutée. Le mélange réactionnel est chauffé à 80°C pendant 16 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est repris dans 50 mL de DCM. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux brun est purifié par chromatographie sur colonne de silice (100 % DCM). Le composé **17** (1,7 g, 89 %) est obtenu sous forme d'huile incolore.

SM (m/z): calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>F<sub>13</sub>NO<sub>3</sub> 509,30 ; valeur obtenue 509,12

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1,46 (tt, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,3 et 7,4 Hz); 1,61 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,4 Hz); 2,82 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,3 Hz); 3,37 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7,3 Hz); 3,34-3,47 (m, 10H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,63 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,3 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 16,5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>); 28,8 (t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 22 Hz); 41,8 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 69,3-72,0 (4C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 72,4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>); 73,2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 108,1-126,3 (5C, qt, CF<sub>2</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 268,6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32,3 Hz); 118,5 (tq, CF<sub>3</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 287,9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32,3 Hz).

F<sub>13</sub>-CBO-P11 (**18**)



Le CBO-P11 protégé **11** (311 mg, 93 μmol) est ajouté à un mélange de composé **17** (100 mg, 196 μmol), de PyBOP (242 mg, 465 μmol), de HOBT (94 mg, 698 μmol) et de DIEA (152 μl, 930 μmol) dans 20 ml de THF. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite, le produit brut est précipité dans de l'eau distillée à 0°C puis filtré. Le précipité obtenu est traité avec du phénol (0,75 g) dans une solution de triisopropylsilane / thioanisole / eau distillée / acide trifluoroacétique dans des proportions 1:2:2:40. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h. Le composé final est précipité dans d'éther de diéyle à 0°C puis filtré. Le produit est purifié par HPLC phase inverse sur colonne C18 sous les conditions suivantes : éluant A (0.05% TFA dans l'eau); éluant B (0.05% TFA dans un mélange acétonitrile/eau (70/30)); gradient = 25 % de B pendant 10 min, 25-50 % B en 5 min, 50 % de B pendant 10 min, 50-100 % B en 5 min, 100 % de B pendant 20 min; débit 15 ml/min; détection à 214 nm. Le produit attendu possède un temps de rétention de 36 min. Après évaporation de l'acétonitrile et lyophilisation de l'eau, nous obtenons 210 mg d'un solide blanc. Le rendement global de la synthèse du F13 CBO-P11 est de 51 %.

SM (m/z): valeur théorique : 2489.48 Da; valeur obtenue : 2489.16 Da.

## 2. Préparation des solutions injectables

La solution de FDG a été obtenue par ajout progressif du traceur dans un microtube Eppendorf contenant 1 mL de tampon PBS stérile. La sursaturation est atteinte pour 274 mg de FDG dans 1 mL de PBS soit 1,5 M de FDG.

La solubilisation du sucre polyfluoré en milieu aqueux dans un tampon PBS s'est révélée très difficile. Différentes tentatives de solubilisation de ce composé dans l'eau distillée ou le PBS ont échoué pour des concentrations allant de 10 à 40 mg / mL. En effet, la partie glucosidique de cette molécule est hydrophile mais la chaîne polyfluorée hydrophobe contrebalance ces interactions. Aussi le caractère amphiphile de notre molécule ne permet pas de solubiliser ce composé en milieu aqueux.

Les propriétés amphiphiles de ce traceur ont déjà été étudiées par Schwabisch[188] dans le but d'obtenir des cristaux liquides. De nombreuses études ont été réalisées sur ces molécules de type perfluorocarbure (PFC). Ces molécules présentent de nombreuses propriétés remarquables telles qu'une grande inertie chimique et biologique. De plus le caractère hydrophobe et la tension de surface augmentent en fonction de la longueur de la chaîne perfluorée. L'injection intraveineuse de ce type de composés hautement fluorés doit alors se faire sous forme d'émulsions car ils ne sont donc pas miscibles dans le sang.

Une gamme d'émulsions injectables a été réalisée en mélangeant le traceur à différentes concentrations d'émulsifiants. Les émulsifiants que nous avons utilisé sont le Pluronic F-68 (co-polymère de polyoxyéthylène et polyoxypropylène) et la L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (lécithine). Une première série de solutions de 10 à 50 mg de glucose polyfluoré a été préparée dans 1 mL d'eau distillée. Une autre série de solutions a été préparée dans 1 mL de tampon PBS. Les émulsions sont ensuite formées au cours d'un protocole alternant 3 séries de sonication et de vortex de 1 min chacune. Aucune de ces émulsions n'est restée stable pendant 24 h.

Cet échec nous a amené à essayer de solubiliser le sucre polyfluoré dans des huiles injectables utilisées pour la formulation de certains médicaments. Le Labrasol® et le Mygliol® sont des mélanges d'esters de glycérol et de polyéthylène glycol développés dans

l'industrie pharmaceutique comme additif pour la solubilisation de drogues hydrophobes. Ces composés montrent une faible toxicité pour les animaux[196] et sont utilisés comme composants principaux de microémulsions pour formulation parentérale. Le polyéthylène glycol 400 et le polypropylène glycol ont aussi été testés pour solubiliser le sucre polyfluoré.

Au final, seuls le Labrasol® et le polypropylène glycol ont permis d'obtenir la solubilisation complète du traceur. La solution la plus concentrée a été obtenue en mélangeant 10 mg de traceur dans 1 mL de polypropylène glycol. Cette solution de glucose polyfluoré a une concentration de 18,5 mM et c'est uniquement cette dernière qui a été utilisée pour l'étude de biodistribution du traceur.

Les solutions de peptide F13 CBO-P11 ont été réalisées dans le tampon PBS. Les 2 concentrations souhaitées de 20 et 35 mM ont été obtenues en solubilisant respectivement 50 et 87 mg de peptide dans 1mL.

### **3. Modèles biologiques**

#### ***3.1. Culture cellulaire IGROV1-p***

La culture des cellules IGROV1-p a été initiée à partir d'un flacon contenant des cellules dans leur 10<sup>ème</sup> passage. Les cellules se multiplient en monocouche dans des flacons en plastique de 75 cm<sup>2</sup> (Nuclon). Elles sont incubées à 37°C dans un incubateur à 5 % CO<sub>2</sub> et dans une atmosphère humide. Le milieu de culture RPMI 1640 complet est supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal inactivé et un mélange d'antibiotiques (pénicilline : 100 UI/mL ; streptomycine 100 µg/mL). L'ajout de ces antibiotiques est nécessaire pour éviter les contaminations bactériennes dans la culture. Le milieu de chaque flacon est renouvelé 3 fois par semaine pour éviter le manque de nutriments. Les cellules en suspension dans le milieu résiduel sont récupérées par centrifugation et remises en culture avec les cellules adhérentes. Le passage des cellules est effectué chaque semaine avec un facteur de transfert ¼ après détachement des cellules à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA 0,25 %.

Au cours du dernier renouvellement, différentes concentrations de FDG sont ajoutées dans la composition de milieu. 25 mg de FDG sont dissous dans 25 mL de milieu pour réaliser la condition de concentration en FDG de 1 g/L. Les autres conditions sont obtenues par dilution de cette solution mère. La solution à 0,5 g/L de FDG est ainsi préparée en mélangeant 2,5 mL de la solution mère avec 2,5 mL de milieu RPMI normal. La solution à 0,2 g/L de FDG est réalisée par une dilution de 1 mL de solution mère dans 4 mL de milieu normal.

### ***3.2. Culture cellulaire U87***

Les cellules gliales U87 d'origine humaine sont incubées à 37°C dans un incubateur à 5 % CO<sub>2</sub> et une atmosphère humide. Le milieu de culture DMEM est supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal inactivé, de la L-glutamine (2 mM) et un mélange d'antibiotiques (pénicilline : 50 UI/mL ; streptomycine 50 µg/mL). Les cellules se multiplient jusqu'à confluence, sont récupérées par trypsination (trypsine-EDTA 0,25 %) et resuspendues dans du milieu DMEM sans sérum pour l'implantation. Ces cellules U87 ont été utilisées car elles forment des tumeurs développant une bonne vasculature.

### ***3.3. Implantation des cellules U87 dans les embryons de poulet et injection du traceur***

Les œufs fertilisés de poulet ont été incubés à une température de 37°C et une atmosphère humide supérieure à 80 % car ils sont très sensibles au dessèchement. Au bout de 4 jours d'incubation, 5 mL d'albumine sont aspirés à l'aide d'une seringue pour détacher la CAM de la coquille, et après l'ouverture d'une fenêtre dans la coquille qui permet l'accès à la CAM environ 4ml d'albumine sont remis dans l'œuf. Au 10<sup>ième</sup> jour d'incubation, pour le groupe d'œufs sains, une grille en nylon est déposée sur la CAM afin que du tissu angiogénique se développe sur ce support ; alors que pour le groupe d'œufs tumoraux, un anneau est déposé sur la CAM, et cette dernière est lésée pour permettre l'implantation des cellules U87 récoltées. Pour chaque œuf de ce dernier groupe, 5 millions de cellules suspendues dans 20 µL de milieu DMEM sans sérum ont été implantées.

Après 7 jours d'implantation (17<sup>ième</sup> jour d'incubation), une injection de 100  $\mu$ L de l'une des solutions de traceurs fluorés est réalisée dans une veine de la CAM selon un protocole développé au laboratoire. Ce travail est réalisé dans une salle obscure afin de voir la vasculature de la CAM à travers la coquille au moyen d'une lampe. Cette observation permet de différencier les veines des artères qui sont plus foncées et dans lesquelles le pouls est perceptible. La coquille est ensuite cassée au niveau d'une veine de taille moyenne pour délimiter la zone d'injection. L'injection ne se fait pas au niveau de la veine principale car le risque de forte hémorragie est important au moment de l'injection du traceur. De l'huile est ensuite ajoutée sur la CAM afin d'améliorer la transparence du tissu et de mieux visualiser la zone d'injection.

Dans chaque œuf, l'injection de 100  $\mu$ L de solution de traceurs est réalisée à l'aide d'une micro-seringue. L'œuf est ensuite replacé dans l'incubateur jusqu'au sacrifice. Une vérification de la survie de chaque œuf est effectuée régulièrement. Nous avons envisagé 3 temps d'exposition des traceurs pour étudier la cinétique d'incorporation des traceurs fluorés dans les différents tissus étudiés. Les sacrifices ont donc été réalisés 1 heure, 3 heures et 6 heures après les injections.

## **4. Préparation des cibles pour les analyses PIGE**

### ***4.1. Support d'analyse***

Afin de pouvoir analyser des échantillons biologiques sans avoir d'interférences avec le rayonnement issu du support, des pastilles (ou cibles) en aluminium de 20 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur ont été utilisées. Ces pièces s'adaptent directement sur le passeur d'échantillon de la chambre d'analyse. Les pastilles sont percées d'un orifice de 3 mm en leur centre pour laisser passer le faisceau. Un film polymère de faible épaisseur est alors utilisé pour supporter les échantillons au centre de la pastille. La minceur du film permet à la fois de minimiser le bruit de fond et d'estimer avec précision la masse de l'échantillon par analyse RBS.

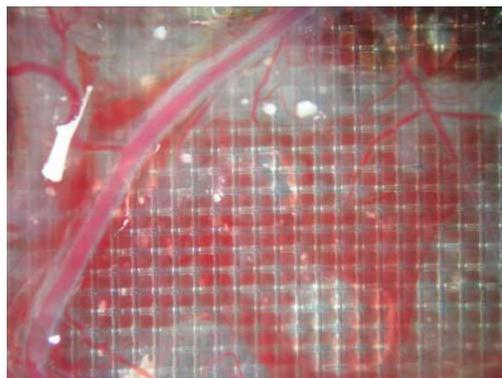
Un film de polycarbonate de 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été choisi pour préparer nos cibles. Ce film est collé sur chaque cible à l'aide d'une solution de Formvar.

#### ***4.2. Préparation des cibles de suspensions cellulaires IGROV1-p***

Pour la préparation des échantillons de suspension cellulaire IGROV1-p, le milieu de culture contenant les différentes concentrations de FDG est tout d'abord éliminé. 3 mL de PBS sont ajoutés pour rincer les traces de milieux fluorés qui restent dans la partie extracellulaire. Cette précaution permet d'analyser seulement le FDG internalisé dans les cellules au cours de l'incubation. 3 mL d'eau distillée sont ensuite ajoutés et les cellules sont grattées pour les détacher de leur support. Une goutte est enfin prélevée pour la déposer au centre d'une cible en aluminium avant de la laisser sécher sous la hotte

#### ***4.3. Préparation des cibles d'échantillons de CAM et de coupes tumorales***

Après le sacrifice de chaque œuf du groupe sain, la CAM est découpée autour de la grille afin de récupérer le support en nylon. Le tissu angiogénique qui s'est développé sur cette grille est prélevé puis déposé sur le film de polycarbonate recouvrant la cible (Figure 52).



**Figure 52. Échantillon de tissu sain développé sur la grille en nylon**

Dans le groupe d'œufs tumoraux, les tumeurs sont prélevées et placées dans des microtubes en vue d'être sectionnées en coupes tumorales (Figure 53).



**Figure 53. Récupération d'une tumeur implantée**

Enfin, un échantillon de CAM des œufs de chaque groupe est également prélevé et déposé directement sur des cibles (Figure 54).



**Figure 54. Echantillon de CAM déposé sur une cible en aluminium**

Tous les échantillons prélevés sont immédiatement congelés dans l'isopentane refroidit à  $-160^{\circ}\text{C}$  par de l'azote liquide.

Les analyses par faisceaux d'ion sont réalisées en plaçant la chambre d'analyse sous vide. Les échantillons doivent donc être lyophilisés pour éviter leur dégradation lors de la mise en place du vide. Le protocole utilisé pour réaliser cette opération doit permettre de préserver les structures cellulaires. Nous avons donc utilisé une technique de cryofixation des échantillons suivi par une étape de lyophilisation.

La cryofixation est une étape critique car la formation incontrôlée des cristaux de glace va entraîner une destruction partielle des structures cellulaires. La meilleure méthode consiste à abaisser très fortement et très rapidement la température de l'échantillon, de façon à

transformer l'eau qu'il contient en glace amorphe ce qui n'entraîne pas d'augmentation de volume.

L'azote liquide est le principal agent de cryofixation, sa température de fusion est de  $-210^{\circ}\text{C}$ . Cependant sa température d'ébullition étant aussi très basse ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), le phénomène de caléfaction généré lorsqu'on plonge un échantillon à cryofixer dans l'azote liquide ralentit le processus de congélation.

Un bain d'isopentane refroidit dans l'azote liquide a donc été utilisé. Les cibles sont ensuite transportées dans l'azote liquide jusqu'au cryostat dont l'enceinte est maintenue à  $-30^{\circ}\text{C}$  pour être lyophilisées pendant plusieurs jours.

Les tumeurs sont maintenues à  $-30^{\circ}\text{C}$  dans l'enceinte du cryomicrotome et collées sur une tête de coupe. La tumeur est ensuite entièrement incluse dans la colle qui durcit en 2-3 minutes afin de réaliser des coupes plus facilement. Le couteau du cryomicrotome est réglé pour réaliser des coupes de 100, 200 et 300  $\mu\text{m}$ . Les tumeurs ont été orientées de façon à ce que les premières coupes se situe au niveau de la partie qui se trouvait à l'interface avec la CAM. Des coupes successives sont ainsi réalisées, déposées sur cibles et lyophilisées pendant plusieurs jours dans le cryostat.

## **5. Dispositif expérimental de la ligne microsonde**

La ligne microsonde permet de délivrer un faisceau d'ions légers de quelques MeV délivré par l'accélérateur qui est fortement collimaté puis focalisé jusqu'à une taille de l'ordre du micromètre sur la cible. Le système de focalisation est constitué de deux collimateurs en entrée de ligne et de quatre lentilles quadrupolaires magnétiques (quadruplet de type Dymnikov). Les réglages des deux collimateurs permettent d'obtenir un faisceau d'un diamètre inférieur au micromètre. La microsonde est également équipée de plaques de déflexion électrostatique situées à la sortie du système de focalisation. Celles-ci permettent un

balayage latéral du faisceau dans le plan de la cible donnant ainsi accès à une cartographie 2D de l'échantillon à analyser (Figure 55).

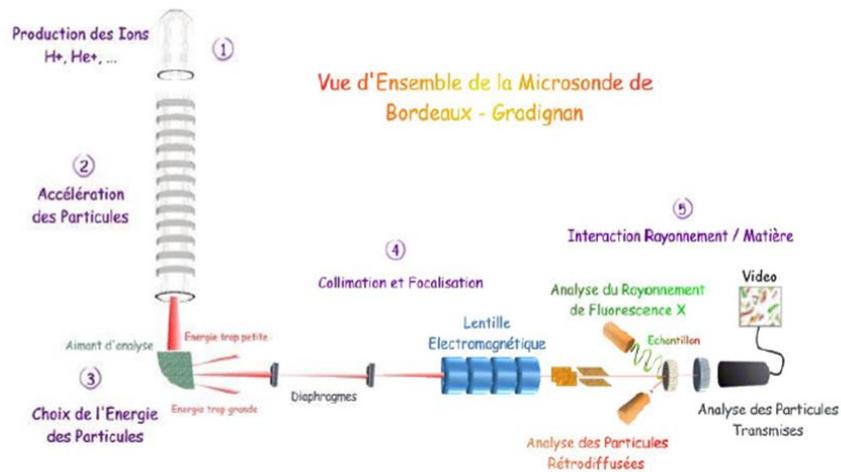


Figure 55. Dispositif expérimental de la ligne microsonde

En bout de ligne, la chambre d'analyse (Figure 56) est composée d'un porte-échantillon, d'un microscope permettant le repérage des cibles, d'une cage de Faraday pour mesurer le courant et de 2 détecteurs permettant de détecter les particules retro diffusées et les rayonnements  $\gamma$ .

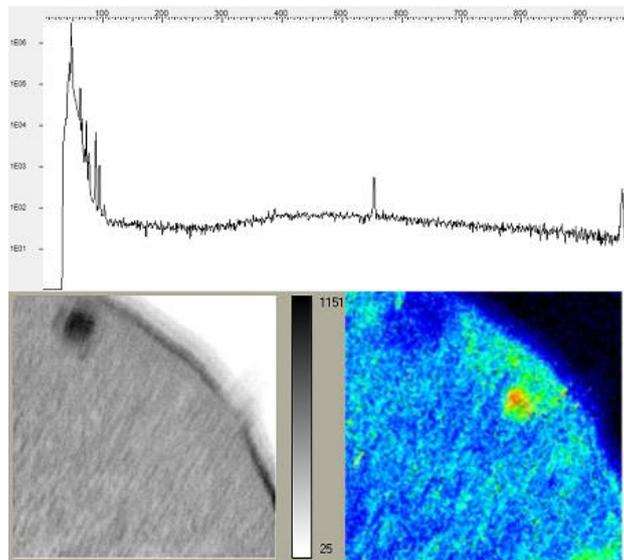


Figure 56. Chambre d'analyse de la ligne microsonde

Le porte échantillon est un disque d'aluminium dans lequel on peut disposer 12 cibles. Il est monté sur des platines à déplacement micrométrique suivant les 3 axes Ox, Oy et Oz. Ces dernières permettent de positionner l'échantillon sous le faisceau. Un microscope couplé à une caméra vidéo permet de contrôler en permanence la focalisation du faisceau et le positionnement de la cible sur une zone d'intérêt.

## 6. Traitement des données

Les données brutes sont converties par le logiciel Supavisio. Ce programme permet de sélectionner le spectre entier enregistré lors de l'analyse ou seulement un pic correspondant à un élément chimique donné et de restaurer sous forme de carte la distribution de cet élément dans la zone analysée. L'établissement des cartographies élémentaires a ainsi pu être réalisé pour les éléments trace détectés (Figure 57).



**Figure 57. Spectre PIGE entier d'une coupe tumorale et reconstruction de la zone analysée par Supavisio (spectre total à gauche et cartographie du fer à droite)**

Des zones d'intérêt sont alors définies au sein de chaque échantillon tel que les capillaires, différentes zones des coupes tumorales, des structures particulières ou le film

polycarbonate. Le spectre RBS de chacune de ces zones est ensuite extrait afin de pouvoir calculer les concentrations des différents éléments chimiques.

Les spectres RBS ont été traités avec le logiciel SIMNRA. C'est un programme d'analyse de spectre RBS utilisé pour calculer des concentrations élémentaires à partir du nombre de coups enregistrés (surface du pic) pour un élément. Ce programme permet de modéliser un spectre RBS théorique et de l'ajuster au spectre expérimental en modifiant la composition et la densité de l'échantillon jusqu'à retrouver les bonnes valeurs (Figure 58).

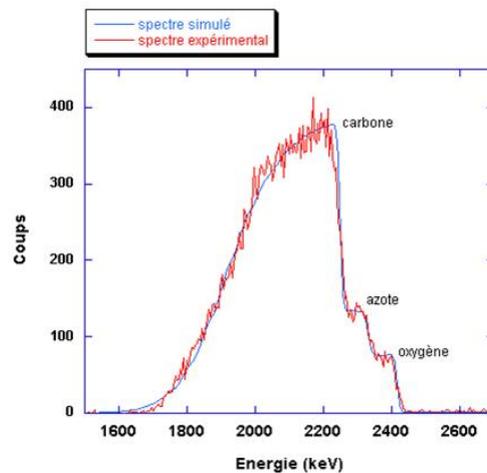


Figure 58. Spectre RBS d'une coupe tumorale déposée sur un film de polycarbonate

Plusieurs paramètres du dispositif expérimental doivent être pris en compte afin de calculer l'aire des pics et les concentrations élémentaires :

- le type de particules incidentes et leur énergie
- le nombre de particules reçues par la cible (charge collectée)
- l'angle solide de détection
- la géométrie du système (angle du faisceau incident avec la cible et le détecteur)
- les caractéristiques du détecteur et du filtre
- l'épaisseur de l'échantillon et sa composition en éléments majoritaires

Lorsque les paramètres du dispositif ont été fixés par l'analyse du standard, seule la charge collectée, la composition de l'échantillon en éléments majoritaires et son épaisseur sont à déterminer.

Il existe plusieurs types d'erreurs associées à l'aire des pics et donc aux concentrations élémentaires : l'erreur liée à l'ajustement du spectre théorique au spectre expérimental et l'erreur statistique basée sur la racine carrée du nombre de coups. Ces deux calculs permettent de donner une incertitude sur la mesure de l'aire des pics considérés. Une autre source d'erreur est l'incertitude sur la charge et l'angle solide qui doit être évaluée par l'utilisateur.

Les spectres des échantillons biologiques sont ensuite simulés à l'aide des paramètres définis précédemment. La composition élémentaire théorique des cellules est de type  $C_{10}H_{18}O_2N_3$ , il faut ensuite ajouter les éléments trace Ca, K, Na, Cl, S, P. Cette composition s'exprime par d'une superposition différentes couches. Pour chaque couche, on détermine quels éléments sont présents et dans quelles proportions, puis on précise l'épaisseur exprimée par X fois  $10^{15}$  atomes par  $cm^2$ , c'est-à-dire X couches d'atomes telles que chaque couche présente  $10^{15}$  atomes par  $cm^2$ .

Nous avons utilisé le programme PyMCA pour déterminer la surface des pics de fluor. Pour simuler l'aire de chaque pic, nous avons utilisé une fonction gaussienne comme algorithme d'ajustement de paramètres ou fitting. C'est un algorithme visant à minimiser l'écart quadratique entre la courbe simulée et la courbe expérimentale.

## **Références bibliographiques**

1. Ellis, L.M. and D.J. Hicklin, *VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 579-91.
2. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
3. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
4. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 932-6.
5. Bikfalvi, A. and R. Bicknell, *Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(12): p. 576-82.
6. Auguste, P., et al., *Molecular mechanisms of tumor vascularization*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2005. **54**(1): p. 53-61.
7. Pettersson, A., et al., *Heterogeneity of the Angiogenic Response Induced in Different Normal Adult Tissues by Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor*. Lab Invest. **80**(1): p. 99-115.
8. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-693.
9. Djonov, V., O. Baum, and P.H. Burri, *Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 107-17.
10. Reynolds, L.E., et al., *Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking [beta]3 integrin or [beta]3 and [beta]5 integrins*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 27-34.
11. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-30.
12. Bauters, C., et al., *Growth factors and endothelial dysfunction*. Drugs, 1999. **59 Spec No**: p. 11-5.
13. Maiorana, A. and P.M. Gullino, *Acquisition of angiogenic capacity and neoplastic transformation in the rat mammary gland*. Cancer Res, 1978. **38**(12): p. 4409-14.
14. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
15. Brem, S., *Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial*. Cancer Control, 1999. **6**(5): p. 436-458.
16. Bikfalvi, A., *[Tumor angiogenesis]*. Bull Cancer, 2007. **94**(7 Suppl): p. F193-8.

17. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
19. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
20. Holmgren, L., M.S. O'Reilly, and J. Folkman, *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. Nat Med, 1995. **1**(2): p. 149-53.
21. Folkman, J. and D. Hanahan, *Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis*. Princess Takamatsu Symp, 1991. **22**: p. 339-47.
22. Holash, J., S.J. Wiegand, and G.D. Yancopoulos, *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*. Oncogene, 1999. **18**(38): p. 5356-62.
23. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
24. Denis, V. *Cascade des évènements*. [cited; Available from: <http://www.illustration-medicale.fr/biologie.php?action=afficheFolio&id=39&idGal=3>].
25. Nagy, J.A., A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2007. **2**(1): p. 251-275.
26. Hagedorn, M. and A. Bikfalvi, *Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials*. Crit Rev Oncol Hematol, 2000. **34**(2): p. 89-110.
27. Gospodarowicz, D. and K.K. Thakral, *Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(2): p. 847-51.
28. Montesano, R., et al., *Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7297-301.
29. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
30. Ferrara, N., *Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis*. Kidney Int, 1999. **56**(3): p. 794-814.
31. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.

32. Dvorak, H.F., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*. J Clin Oncol, 2002. **20**(21): p. 4368-80.
33. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis: past, present and the near future*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 505-15.
34. Gupta, M.K. and R.Y. Qin, *Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(6): p. 1144-55.
35. Denis, V. *VEGF et angiogenèse tumorale* [cited; Available from: <http://www.illustration-medicale.fr/biologie.php?action=afficheFolio&id=42&idGal=3>].
36. Hagedorn, M., et al., *VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis*. Dev Dyn, 2004. **230**(1): p. 23-33.
37. Ferrara, N., *VEGF AND THE QUEST FOR TUMOUR ANGIOGENESIS FACTORS*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(10): p. 795-803.
38. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
39. Plouet, J., J. Schilling, and D. Gospodarowicz, *Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells*. Embo J, 1989. **8**(12): p. 3801-6.
40. Houck, K.A., et al., *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*. Mol Endocrinol, 1991. **5**(12): p. 1806-14.
41. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.
42. Harper, S.J. and D.O. Bates, *VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 880-7.
43. Cheng, S.Y., et al., *Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12081-7.
44. Cross, M.J., et al., *VEGF-receptor signal transduction*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(9): p. 488-94.

45. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 2039-49.
46. Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-676.
47. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
48. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
49. Luo, B.H. and T.A. Springer, *Integrin structures and conformational signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(5): p. 579-86.
50. Chandrasekaran, L., et al., *Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(9): p. 2885-900.
51. Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh, *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis*. Science, 1994. **264**(5158): p. 569-71.
52. Takagi, J., et al., *Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling*. Cell, 2002. **110**(5): p. 599-11.
53. Max, R., et al., *Immunohistochemical analysis of integrin alpha v beta 3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas*. Int J Cancer, 1997. **71**(3): p. 320-4.
54. Brooks, P.C., et al., *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1157-64.
55. Lim, E.H., et al., *A review: Integrin [alpha]v[beta]3-targeted molecular imaging and therapy in angiogenesis*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2005. **1**(2): p. 110-114.
56. Trachsel, E. and D. Neri, *Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(5-6): p. 735-54.
57. Schottelius, M., et al., *Ligands for Mapping alphavbeta3-Integrin Expression in Vivo*. Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(7): p. 969-980.
58. Barentsz, J., et al., *Commonly used imaging techniques for diagnosis and staging*. J Clin Oncol, 2006. **24**(20): p. 3234-44.
59. Ferrara, K.W., et al., *Evaluation of tumor angiogenesis with US: imaging, Doppler, and contrast agents*. Acad Radiol, 2000. **7**(10): p. 824-39.
60. Gupta, N., P.M. Price, and E.O. Aboagye, *PET for in vivo pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements*. Eur J Cancer, 2002. **38**(16): p. 2094-107.

61. Padhani, A.R. and M. Neeman, *Challenges for imaging angiogenesis*. Br J Radiol, 2001. **74**(886): p. 886-90.
62. Padhani, A.R., *Dynamic contrast-enhanced MRI in clinical oncology: current status and future directions*. J Magn Reson Imaging, 2002. **16**(4): p. 407-22.
63. Weidner, N., *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer*. Am J Pathol, 1995. **147**(1): p. 9-19.
64. Gossmann, A., et al., *Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a surrogate marker of tumor response to anti-angiogenic therapy in a xenograft model of glioblastoma multiforme*. J Magn Reson Imaging, 2002. **15**(3): p. 233-40.
65. Kan, Z., et al., *Functional CT for quantifying tumor perfusion in antiangiogenic therapy in a rat model*. Radiology, 2005. **237**(1): p. 151-8.
66. Anderson, H., et al., *Measurement of renal tumour and normal tissue perfusion using positron emission tomography in a phase II clinical trial of razoxane*. Br J Cancer, 2003. **89**(2): p. 262-7.
67. Engelke, C., et al., *High-resolution CT and CT angiography of peripheral pulmonary vascular disorders*. Radiographics, 2002. **22**(4): p. 739-64.
68. Miles, K.A., et al., *Application of CT in the investigation of angiogenesis in oncology*. Acad Radiol, 2000. **7**(10): p. 840-50.
69. Kiessling, F., et al., *Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for noninvasive, high-resolution monitoring of tumor angiogenesis*. Nat Med, 2004. **10**(10): p. 1133-1138.
70. Perkins, J.A., et al., *Three-dimensional CT angiography imaging of vascular tumors of the head and neck*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2005. **69**(3): p. 319-25.
71. Savai, R., et al., *Evaluation of angiogenesis using micro-computed tomography in a xenograft mouse model of lung cancer*. Neoplasia, 2009. **11**(1): p. 48-56.
72. Schwarz, E.R., et al., *Myocardial ischaemia in a case of a solitary coronary ostium in the right aortic sinus with retroaortic course of the left coronary artery: documentation of the underlying pathophysiological mechanisms of ischaemia by intracoronary Doppler and pressure measurements*. Heart, 1998. **80**(3): p. 307-11.
73. Hata, K. and K. Miyazaki, *Color Doppler imaging and angiogenesis in ovarian tumors*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(3): p. 127-30.

74. Iordanescu, I., et al., *Tumor vascularity: evaluation in a murine model with contrast-enhanced color Doppler US effect of angiogenesis inhibitors*. *Radiology*, 2002. **222**(2): p. 460-7.
75. Luker, G.D. and K.E. Luker, *Optical imaging: current applications and future directions*. *J Nucl Med*, 2008. **49**(1): p. 1-4.
76. Jain, R.K., L.L. Munn, and D. Fukumura, *Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(4): p. 266-76.
77. Jackson, A., et al., *Imaging tumor vascular heterogeneity and angiogenesis using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(12): p. 3449-59.
78. Huwart, L., N. Michoux, and B.E. Van Beers, *Imagerie par résonance magnétique de l'angiogenèse tumorale*. *Journal de Radiologie*, 2007. **88**(3, Part 1): p. 331-338.
79. Sipkins, D.A., et al., *Detection of tumor angiogenesis in vivo by [alpha]v[beta]3-targeted magnetic resonance imaging*. *Nat Med*, 1998. **4**(5): p. 623-626.
80. Cristofanilli, M., C. Charnsangavej, and G.N. Hortobagyi, *Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(6): p. 415-426.
81. Dafni, H., et al., *Overexpression of vascular endothelial growth factor 165 drives peritumor interstitial convection and induces lymphatic drain: magnetic resonance imaging, confocal microscopy, and histological tracking of triple-labeled albumin*. *Cancer Res*, 2002. **62**(22): p. 6731-9.
82. Cai, W. and X. Chen, *Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis*. *J Nucl Med*, 2008. **49 Suppl 2**: p. 113S-28S.
83. Winter, P.M., et al., *Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles*. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2270-4.
84. Hsu, A.R. and X. Chen, *Advances in anatomic, functional, and molecular imaging of angiogenesis*. *J Nucl Med*, 2008. **49**(4): p. 511-4.
85. Penet, M.F., et al., *Molecular and functional MRI of the tumor microenvironment*. *J Nucl Med*, 2008. **49**(5): p. 687-90.
86. Choe, Y.S. and K.H. Lee, *Targeted in vivo imaging of angiogenesis: present status and perspectives*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(1): p. 17-31.

87. Neri, D. and R. Bicknell, *Tumour vascular targeting*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(6): p. 436-46.
88. Rosenthal, M.S., et al., *Quantitative SPECT imaging: a review and recommendations by the Focus Committee of the Society of Nuclear Medicine Computer and Instrumentation Council*. J Nucl Med, 1995. **36**(8): p. 1489-513.
89. Massoud, T.F. and S.S. Gambhir, *Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light*. Genes Dev, 2003. **17**(5): p. 545-80.
90. Hamoudeh, M., et al., *Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(12): p. 1329-46.
91. Beekman, F.J., H.W. de Jong, and S. van Geloven, *Efficient fully 3-D iterative SPECT reconstruction with Monte Carlo-based scatter compensation*. IEEE Trans Med Imaging, 2002. **21**(8): p. 867-77.
92. Acton, P.D., et al., *Quantification of dopamine transporters in the mouse brain using ultra-high resolution single-photon emission tomography*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. **29**(5): p. 691-8.
93. Janssen, M.L., et al., *Intraperitoneal radioimmunotherapy in an ovarian carcinoma mouse model: Effect of the radionuclide*. Int J Gynecol Cancer, 2003. **13**(5): p. 607-13.
94. Janssen, M.L., et al., *Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6146-51.
95. Harris, T.D., et al., *Design, synthesis, and evaluation of radiolabeled integrin alpha v beta 3 receptor antagonists for tumor imaging and radiotherapy*. Cancer Biother Radiopharm, 2003. **18**(4): p. 627-41.
96. Garanger, E., D. Boturyn, and P. Dumy, *Tumor targeting with RGD peptide ligands- design of new molecular conjugates for imaging and therapy of cancers*. Anticancer Agents Med Chem, 2007. **7**(5): p. 552-8.
97. Cremonesi, M., et al., *Dosimetry in Peptide radionuclide receptor therapy: a review*. J Nucl Med, 2006. **47**(9): p. 1467-75.
98. Liu, S., *Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(12): p. 2199-2213.
99. Dechantsreiter, M.A., et al., *N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists*. J Med Chem, 1999. **42**(16): p. 3033-40.

100. Ahmadi, M., et al., *Chemical and Biological Evaluations of an (111) In-Labeled RGD-Peptide Targeting Integrin Alpha(V) Beta(3) in a Preclinical Tumor Model*. Cancer Biother Radiopharm, 2008.
101. Sancey, L., et al., *In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer 99mTc-RAFT-RGD*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007. **34**(12): p. 2037-47.
102. Backer, M.V., et al., *Molecular imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature with single-chain VEGF-based probes*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 504-509.
103. Li, S., et al., *Characterization of (123)I-vascular endothelial growth factor-binding sites expressed on human tumour cells: possible implication for tumour scintigraphy*. Int J Cancer, 2001. **91**(6): p. 789-96.
104. Li, S., et al., *Imaging gastrointestinal tumours using vascular endothelial growth factor-165 (VEGF165) receptor scintigraphy*. Ann Oncol, 2003. **14**(8): p. 1274-7.
105. Yoshimoto, M., et al., *Radioiodinated VEGF to image tumor angiogenesis in a LS180 tumor xenograft model*. Nucl Med Biol, 2006. **33**(8): p. 963-9.
106. Gambhir, S.S., *Molecular imaging of cancer with positron emission tomography*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 683-93.
107. Phelps, M.E., *Inaugural article: positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9226-33.
108. Pagani, M., S. Stone-Elander, and S.A. Larsson, *Alternative positron emission tomography with non-conventional positron emitters: effects of their physical properties on image quality and potential clinical applications*. Eur J Nucl Med, 1997. **24**(10): p. 1301-27.
109. Saha, G.B., W.J. MacIntyre, and R.T. Go, *Cyclotrons and positron emission tomography radiopharmaceuticals for clinical imaging*. Semin Nucl Med, 1992. **22**(3): p. 150-61.
110. Freire Macias, J.M. and M. Pajares Vinardell, *Application clinique des nouveaux traceurs TEP en oncologie. La vision d'un médecin nucléaire en Espagne*. Médecine Nucléaire, 2008. **32**(10): p. 546-551.
111. Yang, D.J., Azhdarinia, Ali, Edmund KimE., *Tumor Specific Imaging Using Tc-99m and Ga-68 Labeled Radiopharmaceuticals*. Current Medical Imaging Reviews, 2005. **1**: p. 25-34.

112. Smith, S.V., *Molecular imaging with copper-64*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2004. **98**(11): p. 1874-1901.
113. Shokeen, M. and C.J. Anderson, *Molecular Imaging of Cancer with Copper-64 Radiopharmaceuticals and Positron Emission Tomography (PET)*. Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(7): p. 832-841.
114. Reivich, M., et al., *The [18F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man*. Circ Res, 1979. **44**(1): p. 127-37.
115. Nutt, R., *1999 ICP Distinguished Scientist Award. The history of positron emission tomography*. Mol Imaging Biol, 2002. **4**(1): p. 11-26.
116. Ter-Pogossian, M.M., et al., *A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT)*. Radiology, 1975. **114**(1): p. 89-98.
117. Koeppe, R.A. and G.D. Hutchins, *Instrumentation for positron emission tomography: tomographs and data processing and display systems*. Semin Nucl Med, 1992. **22**(3): p. 162-81.
118. Levin, C.S. and E.J. Hoffman, *Calculation of positron range and its effect on the fundamental limit of positron emission tomography system spatial resolution*. Phys Med Biol, 1999. **44**(3): p. 781-99.
119. Meikle, S.R., F.J. Beekman, and S.E. Rose, *Complementary molecular imaging technologies: High resolution SPECT, PET and MRI*. Drug Discovery Today: Technologies, 2006. **3**(2): p. 187-194.
120. Mankoff, D.A., et al., *Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(12): p. 3460-9.
121. Basu, S. and A. Alavi, *Unparalleled contribution of 18F-FDG PET to medicine over 3 decades*. J Nucl Med, 2008. **49**(10): p. 17N-21N, 37N.
122. Talbot, J.N., et al., *Positron emission tomography with [18F]-FDG in oncology*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2003. **504**(1-3): p. 129-138.
123. Warburg, O., *On the metabolism of tumors*. 1930, London: Constable.
124. Ting, Y.L., D. Sherr, and H. Degani, *Variations in energy and phospholipid metabolism in normal and cancer human mammary epithelial cells*. Anticancer Res, 1996. **16**(3B): p. 1381-8.

125. Su, T.S., et al., *Elevation of facilitated glucose-transporter messenger RNA in human hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 1990. **11**(1): p. 118-22.
126. Gallagher, B.M., et al., *Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose*. *J Nucl Med*, 1978. **19**(10): p. 1154-61.
127. Som, P., et al., *A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection*. *J Nucl Med*, 1980. **21**(7): p. 670-5.
128. Larson, S.M., et al., *Positron imaging feasibility studies. II: Characteristics of 2-deoxyglucose uptake in rodent and canine neoplasms: concise communication*. *J Nucl Med*, 1981. **22**(10): p. 875-9.
129. Knox, W.E., S.C. Jamdar, and P.A. Davis, *Hexokinase, differentiation and growth rates of transplanted rat tumors*. *Cancer Res*, 1970. **30**(8): p. 2240-4.
130. Criss, W.E., *A review of isozymes in cancer*. *Cancer Res*, 1971. **31**(11): p. 1523-42.
131. Parry, D.M. and P.L. Pedersen, *Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. Evidence for an outer mitochondrial membrane location*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(18): p. 10904-12.
132. Wienhard, K., *Measurement of glucose consumption using [18F]fluorodeoxyglucose*. *Methods*, 2002. **27**(3): p. 218-225.
133. Haubner, R., et al., *Noninvasive visualization of the activated alphavbeta3 integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F]Galacto-RGD*. *PLoS Med*, 2005. **2**(3): p. e70.
134. Chen, X., et al., *18F-labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis*. *Nucl Med Biol*, 2004. **31**(2): p. 179-89.
135. Ogawa, M., et al., *Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo alpha(v)beta3 integrin related tumor imaging*. *Nucl Med Biol*, 2003. **30**(1): p. 1-9.
136. Cai, W., et al., *How molecular imaging is speeding up antiangiogenic drug development*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(11): p. 2624-2633.
137. Cai, W., et al., *PET of vascular endothelial growth factor receptor expression*. *J Nucl Med*, 2006. **47**(12): p. 2048-56.
138. Chen, K., et al., *Quantitative PET Imaging of VEGF Receptor Expression*. *Molecular Imaging and Biology*, 2009. **11**(1): p. 15-22.

139. Wang, H., et al., *A new PET tracer specific for vascular endothelial growth factor receptor 2*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007. **34**(12): p. 2001-10.
140. Nagengast, W.B., de Vries, Elisabeth G., Hospers, Geke A., Mulder, Nanno H., de Jong Johan R., Hollema Harry, and G.A.v.D. Adrienne H. Brouwers, Lars R. Perk, and Marjolijn N. Lub-de Hooge, *In Vivo VEGF Imaging with Radiolabeled Bevacizumab in a Human Ovarian Tumor Xenograft*. Journal of Nuclear Medicine, 2007. **48**: p. 1313-1319.
141. O'Hagan, D. and D. B. Harper, *Fluorine-containing natural products*. Journal of Fluorine Chemistry, 1999. **100**(1-2): p. 127-133.
142. Bohm, H.J., et al., *Fluorine in medicinal chemistry*. Chembiochem, 2004. **5**(5): p. 637-43.
143. Biffinger, J.C., H.W. Kim, and S.G. DiMugno, *The polar hydrophobicity of fluorinated compounds*. Chembiochem, 2004. **5**(5): p. 622-7.
144. Venkateswarlu, P., *Determination of fluorine in biological materials: a review*. Adv Dent Res, 1994. **8**(1): p. 80-6.
145. Lorey, D.R., 2nd, G.H. Morrison, and S. Chandra, *Dynamic secondary ion mass spectrometry analysis of boron from boron neutron capture therapy drugs in co-cultures: single-cell imaging of two different cell types within the same ion microscopy field of imaging*. Anal Chem, 2001. **73**(16): p. 3947-53.
146. Guerquin-Kern, J.L., et al., *Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy)*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1724**(3): p. 228-38.
147. Croisy, A., J.-L. Guerquin-Kern, and T.-D. Wu, *Cell imaging by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS): basic principles and biological applications*, in *EMC 2008 14th European Microscopy Congress 1–5 September 2008, Aachen, Germany*. 2008. p. 379-380.
148. Fletcher, J., *Cellular imaging with secondary ion mass spectrometry*. Analyst, 2009. **134**(11): p. 2204-2215.
149. Ingram, J.C., Groenewold G. S. et al., *Direct surface analysis of pesticides on soil, leaves, grass, and stainless steel by static secondary ion mass spectrometry*. Environmental science & technology, 1997. **31**(2): p. 402-408.
150. Adovelande, J., Boulard, Y., Berry, J. P., Galle, P., Slodzian, G., Schrével, J. , *Detection and cartography of the fluorinated antimalarial drug mefloquine in normal*

- and Plasmodium falciparum* infected red blood cells by scanning ion microscopy and mass spectrometry. . *Biology of the cell*, 1994. **81**: p. 185-192.
151. Fragu, P., Kahn, Edmond, *Secondary ion mass spectrometry (SIMS) microscopy: A new tool for pharmacological studies in humans*. *Microscopy Research and Technique*, 1997. **36**(4): p. 296-300.
  152. Demortier, G., *Analysis of light elements with a nuclear microprobe -- A review*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1995. **104**(1-4): p. 244-254.
  153. Coote, G.E., et al., *Twenty years of proton microprobe research in biominerals:: A tribute to Graeme Ernest Coote, 1935-1997*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1999. **158**(1-4): p. 1-5.
  154. Malmqvist, K.G., *Accelerator-based ion beam analysis--an overview and future prospects*. *Radiation Physics and Chemistry*, 2004. **71**(3-4): p. 817-827.
  155. Johansson, S.A.E. and T.B. Johansson, *Analytical application of particle induced X-ray emission*. *Nuclear Instruments and Methods*, 1976. **137**(3): p. 473-516.
  156. Govil, I.M., *Proton Induced X-ray Emission – A tool for non-destructive trace element analysis*. *Current sciences*, 2001. **80**(12): p. 1542-1549.
  157. Knöchel, A., *TXRF, PIXE, SYXRF; Principles, critical comparison and applications*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1990. **337**: p. 614-621.
  158. Jesus, A.P., B. Braizinha, and J.P. Ribeiro, *Excitation function and cross-sections of the reaction  $^{19}\text{F}(p,p'\gamma)^{19}\text{F}$* . *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2000. **161-163**: p. 186-190.
  159. Roelandts, I., et al., *Determination of total fluorine in five coal reference materials by proton-induced gamma-ray emission spectrometry*. *Talanta*, 1996. **43**(3): p. 439-49.
  160. Sommer, F., et al., *Optimization of fluorine detection for biological and geological applications with a nuclear microprobe*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1992. **157**(2): p. 273-280.
  161. Fazlul Hoque, A., Khaliqzaman, M, Hossain, MD, Khand, AH *Determination of fluoride in water residues by Proton Induced Gamma Emission measurements*. *Fluoride*, 2002. **35**(3): p. 176-184.

162. Carvalho, M.L., et al., *Fluorine determination in human healthy and carious teeth using the PIGE technique*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2001. **179**(4): p. 561-567.
163. Yamamoto, H., et al., *Fluorine mapping of teeth treated with fluoride-releasing compound using PIGE*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2003. **210**: p. 388-394.
164. Lyaruu, D.M., et al., *Micro-PIGE determination of fluoride distribution in developing hamster tooth germs*. J Histochem Cytochem, 1989. **37**(5): p. 581-7.
165. Olabanji, S.O., et al., *PIGE-PIXE analysis of chewing sticks of pharmacological importance*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 1996. **113**(1-4): p. 368-372.
166. Chaturvedula, S.S., Venkatesh Iyengar, Y.T. Gilbert Blondiaux, Hermann Petri, and N.K.A. Peter Hoffmann, Vladimir Zaichick, Hugo M. Ortner, *Fluorine determination in human and animal bones by particle-induced gamma-ray emission*. Fresenius J Anal Chem, 2001. **370**: p. 924-929.
167. Salah, H., Arab, N., *Application of PIGE to Determine Fluorine Concentration in Human Teeth : Contribution to Fluorosis Study*. Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences, 2007. **8**(1): p. 31-34.
168. Nsouli, B., et al., *On the direct quantification of celecoxib in commercial solid drugs using the TT-PIXE and TT-PIGE techniques*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2006. **249**(1-2): p. 692-696.
169. W.K. Chu, J.W.M., and M.A. Nicolet, *Backscattering Spectrometry*. 1978.
170. Moretto, P. and L. Razafindrabe, *Simulation of RBS spectra for quantitative mapping of inhomogeneous biological tissue*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 1995. **104**(1-4): p. 171-175.
171. Devès, G., Roudeau, S., Carmona, A., Lavielle, S., Gionnet, K., Déléris, G., Ortega, R., *Fluorine microimaging and quantification using nuclear reaction analysis: A tool for validating tissue distribution of positron emission tomography tracers*. APPLIED PHYSICS LETTERS, 2009. **95**: p. 023701-1.

172. Caciolli, A., et al., *Measurements of [gamma]-ray emission induced by protons on fluorine and lithium*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2006. **249**(1-2): p. 98-100.
173. Mateus, R., A.P. Jesus, and J.P. Ribeiro, *Quantitative analysis of light elements in thick samples by PIGE*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2004. **219-220**: p. 519-523.
174. Mateus, R., et al., *The sensitivity of the PIGE analytical technique*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2007. **264**(2): p. 340-344.
175. Bacquart, T., et al., *Subcellular speciation analysis of trace element oxidation states using synchrotron radiation micro-X-ray absorption near-edge structure*. Anal Chem, 2007. **79**(19): p. 7353-9.
176. Ribatti, D., et al., *The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(6): p. 1189-97.
177. Djonov, V., et al., *Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 286-92.
178. Vargas, A., et al., *The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(11): p. 1162-76.
179. Kilarski, W.W. and A. Bikfalvi, *Recent developments in tumor angiogenesis*. Curr Pharm Biotechnol, 2007. **8**(1): p. 3-9.
180. Hagedorn, M., et al., *Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1643-8.
181. Larger, E., Marre, Michel, Corvol, Pierre, Gasc, Jean-Marie *Hyperglycemia-Induced Defects in Angiogenesis in the Chicken Chorioallantoic Membrane Model*. Diabetes, 2004. **53**: p. 752-761.
182. Datar, S., Bhonde, Ramesh R. , *Shell-less chick embryo culture as an alternative in vitro model to investigate glucose-induced malformations in mammalian embryos*. The Review of Diabetic Studies, 2005. **2**: p. 221-227.
183. Gatley, S.J., *Iodine-123-labeled glucose analogs: Prospects for a single-photon-emitting analog of fluorine-18-labeled deoxyglucose*. Nuclear Medicine and Biology, 1995. **22**(7): p. 829-835.

184. Koumanov, F., et al., *Biological studies of analogues of glucose iodinated in positions 1, 2, or 3*. Nucl Med Biol, 1996. **23**(1): p. 53-60.
185. Brunet-Desruet, M.-D., et al., *Biological Evaluation of Two Iodine-123-Labeled - Glucose Acetals Prepared as Glucose Transporter Radioligands*. Nuclear Medicine and Biology, 1998. **25**(5): p. 473-480.
186. Bessell, E.M. and P. Thomas, *The deoxyfluoro-D-glucopyranose 6-phosphates and their effect on yeast glucose phosphate isomerase*. Biochem J, 1973. **131**(1): p. 77-82.
187. Paleta, O., et al., *Novel amphiphilic fluoroalkylated derivatives of xylitol, -glucose and -galactose for medical applications: hemocompatibility and co-emulsifying properties*. Carbohydrate Research, 2002. **337**(24): p. 2411-2418.
188. Schwabisch, D., et al., *Amphiphilic and mesogenic carbohydrates XIII. Perfluoroalkylated amphiphilic liquid crystals with inositol and carbohydrate head groups*. Liquid Crystals, 2004. **31**: p. 1143-1150.
189. Lu, D., et al., *Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14321-30.
190. Muller, Y.A., et al., *Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7192-7.
191. Keyt, B.A., et al., *Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5638-46.
192. Zilberberg, L., et al., *Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35564-73.
193. Binetruy-Tournaire, R., et al., *Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis*. Embo J, 2000. **19**(7): p. 1525-33.
194. Merrifield, R.B., *Automated synthesis of peptides*. Science, 1965. **150**: p. 178-185.
195. Goncalves, M., et al., *Design, synthesis, and evaluation of original carriers for targeting vascular endothelial growth factor receptor interactions*. Pharm Res, 2005. **22**(8): p. 1411-21.

196. Hu, Z., et al., *Diethyl ether fraction of Labrasol having a stronger absorption enhancing effect on gentamicin than Labrasol itself*. Int J Pharm, 2002. **234**(1-2): p. 223-35.

Sébastien LAVIELLE

**Synthèse de molécules fluorées pour le développement d'un nouvel outil de nano imagerie. Application à l'imagerie de l'angiogenèse pathologique.**

L'angiogenèse est le phénomène qui conduit à la création de nouveaux vaisseaux sanguins. C'est un processus primordial dans la croissance des tumeurs malignes. L'implication prédominante du VEGF et la surexpression de ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux font de cet effecteur une cible particulièrement intéressante pour le développement d'agents d'imagerie sélectifs. Parmi les différentes techniques d'imagerie de l'angiogenèse tumorale, la TEP est actuellement la plus performante pour détecter les tumeurs. Cependant sa résolution spatiale millimétrique ne permet pas d'accéder à la biodistribution cellulaire de ses traceurs. Nos travaux ont donc été fondés sur la conception d'un nouvel agent d'imagerie sélectif et sur le développement d'une nouvelle méthode d'analyse *ex vivo* palliant le manque de résolution de la TEP. L'évaluation des analyses par faisceaux d'ions pour la détection du [<sup>19</sup>F]FDG, analogue stable du principal traceur utilisé en TEP, a tout d'abord été réalisée. Ces résultats ont alors montré que la PIGE permettait d'effectuer une quantification du fluor avec une sensibilité de quelques µg/g de matière avec une résolution de 5 µm au sein de tissus biologiques sains et tumoraux. Ces analyses ont également permis de reconstruire des cartographies élémentaires inédites de la distribution du FDG dans ces tissus. Nous avons enfin appliqué notre approche à l'imagerie de l'angiogenèse tumorale en fonctionnalisant un agent antiangiogénique montrant une excellente affinité pour les récepteurs du VEGF. Cette étude préliminaire semble montrer que le F13 CBO-P11 marque plus intensément les tumeurs que le tissu angiogénique sain. Nos travaux ont donc démontré la capacité de la PIGE pour quantifier la biodistribution de traceurs fluorés à l'échelle micrométrique. Cette technique *ex vivo* pourrait devenir un outil analytique complémentaire à la TEP en vue de déterminer si un vecteur moléculaire a bien atteint sa cible.

Mots clés : analyses par faisceaux d'ions, PIGE, imagerie du fluor, angiogenèse tumorale, VEGF, synthèse de traceurs, synthèse peptidique

Sébastien LAVIELLE

**Synthesis of fluorinated compounds for the development of a new tool for nano imaging. Application for the imaging of pathological angiogenesis.**

Angiogenesis is the phenomenon that leads to the creation of new blood vessels. It's a vital process in the growth of malignant tumors. The predominant involvement of VEGF and the overexpression of its receptors on the surface of endothelial cells of tumor vessels make this effector a particularly interesting target for developing selective imaging agents. Among the various imaging techniques for tumor angiogenesis, PET is currently the most effective for detecting tumors. However millimeter spatial resolution does not allow access to the intracellular biodistribution of its tracers. Our work has been based on designing a new selective imaging agent and developing a new method of *ex vivo* analysis overcoming the lack of PET resolution. The preliminary experiment by ion beam analysis has been performed for the detection of [<sup>19</sup>F]FDG, stable analogue of the main tracer used in PET. These results have shown that PIGE allowed to perform fluorine quantification with a sensitivity of few µg/g and a spatial resolution of 5 µm within normal and tumor tissues. Our results also describe the first mapping of the biodistribution of FDG in these tissues. Finally we applied our approach to the imaging of tumor angiogenesis functionalizing an antiangiogenic agent showing a great affinity for VEGFR. This preliminary study suggests that the F13 CBO-P11 marks more intensely tumor than the angiogenic normal tissue. Our work has demonstrated the ability of PIGE analysis to quantify the biodistribution of fluorinated tracers at a micrometric scale. This *ex vivo* technique could become a complementary tool to PET in order to determine whether a molecular carrier has reached its target.

Keywords : ion beam analysis, PIGE, fluorine imaging, tumor angiogenesis, VEGF, tracers synthesis, peptide synthesis