

Evaluation de nano-objets pour le ciblage et la thérapie des cancers.

Jacquet Thibault

▶ **To cite this version:**

Jacquet Thibault. Evaluation de nano-objets pour le ciblage et la thérapie des cancers.. Cancer. 2018. hal-01691582

HAL Id: hal-01691582
https://ephe.hal.science/hal-01691582

Submitted on 25 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

JACQUET THIBAULT

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Evaluation de nano-objets pour le ciblage et la thérapie des cancers.

Soutenu le 11/12/2017 devant le jury suivant :

Dr. Rossel Mireille **– Président**
Pr. Righini Christian **– Tuteur scientifique**
Dr. Frachet Véronique **– Tuteur pédagogique**
Dr. Marquette Christel **– Rapporteur**
Dr. Favier Arnaud **– Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr. RIGHINI Christian
Clinique Universitaire d'ORL-Pôle TCCR
Hôpital Albert Michallon
Institut pour l'Avancée des Biosciences, unité Inserm UJF/U1209
Boulevard de la Chantourne
38700 Grenoble

et de :

Dr. FRACHET Véronique
UMR_S 1209/UMR 5309
Bâtiment Jean Roget, domaine de la Merci
BP170 La Tronche, 38042 Grenoble Cedex

Résumé

La détection précoce est un enjeu de taille dans le traitement des cancers. Elle permettrait une prise en charge plus rapide et une thérapie plus efficace.

Une des approches pour améliorer la détection précoce est l'imagerie optique et le ciblage de récepteurs tumoraux comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est un des récepteurs les plus couramment utilisé pour l'imagerie optique *in vivo* et le ciblage tumoral. Ce récepteur est largement exprimé en surface des cellules endothéliales des néo-vaisseaux tumoraux et de certains types de cellules tumorales y compris des VADS.

Le «RAFT-c[RGD]$_4$» (Regioselectively Addressable Functionalized Template-arginine-glycineaspartic acid) est une molécule qui cible l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur les néo vaisseaux et les cellules tumorales. Il est un bon outil de ciblage tumoral.

Dans la cadre de ce travail de recherche, nous avons étudié l'apport de la présentation multivalente du RAFT-c[RGD]$_4$ sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Dans une approche thérapeutique nous avons également étudié l'efficacité d'une nanoparticule radiossensibilisante, la nanoparticule AGuIX®. La radiothérapie est l'un des modalités référence dans le traitement du cancer, cependant elle présente des limites ; irradiation des tissus sains, effets secondaires.

Mots clés : Cancers des VADS ; Radiothérapie ; Nanoparticules ; Macromolécules ciblantes ; RAFT-c[RGD]$_4$

Table des matières

Résumé 2

Introduction 10

I. Développement de nouvelles stratégies innovantes pour le diagnostic et le traitement des cancers 12

1. L'angiogenèse 12

2. L'angiogenèse tumorale 13

II. Les nanoparticules 17

1. Ciblage de la tumeur 18

2. Applications des nanoparticules 20

3. Les nanoparticules radiosensibilisantes 21

III. Les cancers des Voies Aéro-digestives Supérieures 24

1. Généralités 24

2. Les facteurs de risques 25

3. Prise en charge des cancers des VADS 26

Matériel et méthodes 28

I. La culture cellulaire 28

1. Lignée CAL33-LUC 28

2. Lignées Hek293-(β_1) et Hek293-(β_3) 28

3. Lignées M21 et M21L 28

4. Lignée U87MG 29

5. Le maintien des cellules en culture 29

6. Congélation et décongélation 29

II. Les différentes molécules étudiées 30

1. Les conjugués peptidiques 30

2. Les nanoparticules AGuIX® 32

III. Les modèles animaux 34

1. Anesthésie des souris 34
2. Le modèle VADS 35
3. Le modèle U87MG sous cutané. 37
IV. L'imagerie Optique 38
1. L'imagerie de Bioluminescence 38
2. L'imagerie de fluorescence 42
V. Evaluations biologiques ex-vivo 43
1. Tests d'inhibition de l'adhésion cellulaire 43
2. Etude *in cellulo* par microscopie confocale 45
3. Etude par cytométrie en flux. 46
VI. Evaluations biologiques *in vivo* des nanoparticules AGuIX® 49
1) Biodistribution des conjugués 49
2) Cinétique sanguine des conjugués chez la souris 49
3) L'exérèse chirurgicale des tumeurs 50
4) Irradiation des tumeurs Cal33-luc 51
5. Histologie 53
Résultats 55
I. Evaluations biologiques des conjugués linéaires polymère-clusters peptidiques 55
1. Evaluation de l'affinité pour les intégrines αvβ3 lors de tests d'inhibition de l'adhésion cellulaire 55
2. Etude *microscopique* des conjugués polymère-clusters Raft(cRGD)4 fluorescents 59
3. Etude par cytométrie en flux 63
4. Etude du comportement des conjugués *in vivo* 67
5. Conclusion sur l'évaluation biologique des conjugués linéaires 73
II. Evaluations biologiques *in vivo* des nanoparticules AGuIX® 74
1. Etudes de la biodistribution des AGuIX® 74
2. Étude de l'efficacité thérapeutique des nanoparticules en tant qu''agents radiosensibilisants. 78

3. Conclusion sur les effets *in vivo* de la nanoparticule AGuIX®. 87
III. Discussion et perspectives.....88
1. Synthèse de macromolécules ciblant l'angiogenèse.....88
2. Evaluation de la nanoparticule AGuIX 89
Bibliographie.....91

Liste des figures

FIGURE 1: LES GRANDES ETAPES DE L'ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT 12

FIGURE 2: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CHANGEMENTS DE CONFORMATION DE L'INTEGRINE AVB3 14

FIGURE 3: STRUCTURE DU RAFT-RGD ET DU CRGD. (10) 16

FIGURE 4 : COMPARAISON DE L'ORDRE DE GRANDEUR DES NANOPARTICULES ET DES CONSTITUANTS BIOLOGIQUES (11). 17

FIGURE 5: REPRESENTATION DE LA COMPLEMENTARITE DES CIBLAGES PASSIF ET ACTIF (19). 20

FIGURE 6 : PRINCIPE DE L'UTILISATION D'AGENTS RADIOSENSIBILISANTS POUR LA RADIOTHERAPIE 22

FIGURE 7 : COMPARAISON DU COEFFICIENT D'ABSORPTION DE L'ENERGIE DE MASSES DES PHOTONS, POUR LE GADOLINIUM ET LES TISSUS MOUS. ADAPTE DE HUBBELL ET SELTZER (30,31). 23

FIGURE 8: LES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURS 24

FIGURE 9: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES CONJUGUES LINEAIRES FLUORESCENTS POLYMERE-CLUSTERS PEPTIDIQUES. . 31

FIGURE 10: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES NANOPARTICULES AGUIX®. 33

FIGURE 11: SYSTEME D'ANESTHESIE GAZEUSE 34

FIGURE 12: SUIVI DE LA CROISSANCE TUMORALE PAR IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE IN VIVO APRES IMPLANTATION SOUS CUTANEE DES CELLULES CAL33-LUC AU NIVEAU DU FLANC DE LA SOURIS. 36

FIGURE 13: (A) PRELEVEMENT D'UNE TUMEUR CAL33-LUC SOUS-CUTANEE ET REALISATION DES COPEAUX TUMORAUX. (B) IMPLANTATION INTRA-JUGALE D'UN COPEAU DE TUMEUR CAL33-LUC ET TUMEUR ORTHOTOPIQUE DEVELOPPEE AU NIVEAU DE LA JOUE (FLECHE). 36

FIGURE 14: SUIVI DE LA CROISSANCE TUMORALE PAR IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE IN VIVO APRES IMPLANTATION DE COPEAUX TUMORAUX AU NIVEAU DE LA JOUE DE LA SOURIS. 37

FIGURE 15: SCHEMA DE L'OXYDATION DE LA LUCIFERINE EN OXYLUCIFERINE 38

FIGURE 16: PRINCIPE DE L'IMAGERIE OPTIQUE DE BIOLUMINESCENCE. 39

FIGURE 17: SYSTEME D'IMAGERIE IVIS KINETIC (CALIPER LIFE SCIENCE) 40

FIGURE 18: CINETIQUE DU SIGNAL DE BIOLUMINESCENCE APRES INJECTION INTRA PERITONEALE DE LUCIFERINE. 40

FIGURE 19: IMAGES OBTENUES APRES ACQUISITION EN BIOLUMINESCENCE SUR L'IVIS KINETIC. 41

FIGURE 20: CREATION DE ROI AVEC LE LOGICIEL LIVING IMAGE (CALIPER LIFE SCIENCES) 41

FIGURE 21: (A) CE DIAGRAMME ILLUSTRE LES DIFFERENTES TRANSITIONS ELECTRONIQUES ET LES DIFFERENTS PHENOMENES DE DESEXCITATIONS POSSIBLES. (B) SPECTRE DE FLUORESCENCE D'UNE MOLECULE AVEC SON SPECTRE D'EXCITATION ET D'EMISSION DE FLUORESCENCE. 42

FIGURE 22: SCHEMA DES PRINCIPALES ETAPES DU TEST D'INHIBITION DE L'ADHESION DES CELLULES HEK293-B3 A LA VITRONECTINE. 44

FIGURE 23: SCHEMA DES PRINCIPALES ETAPES DU TEST D'INHIBITION DE L'ADHESION DES CELLULES HEK293-B3 A LA VITRONECTINE. 45

FIGURE 24: SCHEMA DU PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX 47

FIGURE 25: CYTOMETRE ACCURI C6. (56) 48

FIGURE 26: EXERESE D'UNE TUMEUR ORTHOTOPIQUE 50

FIGURE 27: EXERESE D'UNE TUMEUR ORTHOTOPIQUE 50

FIGURE 28: SOURIS PLACEE DANS L'IRRADIATEUR PETIT ANIMAL. LA ZONE ECLAIREE CORRESPOND AU CHAMP D'IRRADIATION. 52

FIGURE 29: CRYOMICROTOME LEICA CM3050 S. 53

FIGURE 30: POURCENTAGE DE CELLULES ADHERENTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CLUSTER RAFT(CRGD)4 POUR LE CLUSTER SEUL ET POUR LES DIFFERENTS CONJUGUES 1, 2, 3 ET 4 56
FIGURE 31: COMPARAISON DES IC50 EN RAFT(CRGD)4 (A) ET EN CONJUGUE (C) ET DES EFFICACITES RELATIVES EN RAFT(CRGD)4 (B) ET EN CONJUGUE (D) 58
FIGURE 32: IMAGES DE MICROSCOPIE CONFOCALE (PLAN A MI-EPAISSEUR DES CELLULES) PERMETTANT LA COMPARAISON DU MARQUAGE DES LIGNEES CELLULAIRES HEK293(B3), HEK293(B1), M21 ET M21L PAR LES CONJUGUES 5 ET 7 ET LE RAFT(CRGD)4 FLUORESCENTS A TROIS CONCENTRATIONS : 10 MM, 1µM ET 0.1µM 61
FIGURE 33: AGRANDISSEMENT D'UNE CELLULE HEKB3 MARQUEE PAR LE CONJUGUE 5 A UNE CONCENTRATION DE 1 MM. 62
FIGURE 34: HISTOGRAMME COMPARANT LES CONJUGUES 5 ET 7 PORTEUR DE CY5.5 (NON SULFONATEES) ET LE RAFT(CRGD)4-CY5.5 TETRASULFONATES. CHAQUE GRAPHIQUE REPRESENTE LA QUANTITE DE CELLULES EN FONCTION DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE MESUREE POUR CHACUNE D'ENTRE ELLES. 64
FIGURE 35: HISTOGRAMME COMPARANT LES CONJUGUES 6 ET 8 PORTEURS DE CY5.5 TETRASULFONATES ET LE RAFT(CRGD)4-CY5.5 TETRASULFONATES, CHAQUE GRAPHIQUE REPRESENTE LA QUANTITE DE CELLULES EN FONCTION DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE MESUREE POUR CHACUNE D'ENTRE ELLES. 66
FIGURE 36: DIAGRAMME DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE DES DIFFERENTS CONJUGUES PEPTIDIQUES. 68
FIGURE 37: A) BIODISTRIBUTION IN VIVO DES CONJUGUES CHEZ LA SOURIS NUDE PORTANT UNE TUMEUR U87MG. LES IMAGES DE FLUORESCENCE (500 MS DE TEMPS D'INTEGRATION, LE CONTRASTE FIXE ENTRE 1784-11015) SONT OBTENUES A 1H, 3H, 5H ET 24H APRES INJECTION INTRAVEINEUSE DES CONJUGUES. B) BIODISTRIBUTION *EX VIVO* DANS LES ORGANES A 24H. LES ROI SONT DEFINIES SUR LES ORGANES EXTRAITS AFIN DE QUANTIFIER LA QUANTITE DE PHOTONS EMIS PAR PIXEL APRES UNE EXPOSITION DE 500 MS 69
FIGURE 38: COURBES REPRESENTATIVES DU POURCENTAGE DE FLUORESCENCE EN FONCTION DU TEMPS, AVEC LA FLUORESCENCE A 15 MINUTES COMME VALEUR REFERENCE. 71
FIGURE 39: COURBES REPRESENTATIVES DU POURCENTAGE DE FLUORESCENCE EN FONCTION DU TEMPS, AVEC LA FLUORESCENCE A 15 MINUTES COMME VALEUR REFERENCE. 72
FIGURE 40: BIODISTRIBUTION DES AGUIX-CY5.5 CHEZ LA SOURIS NUDE PORTANT UNE TUMEUR ORTHOTOPIQUE CAL33-LUC LUC. 75
FIGURE 41: BIODISTRIBUTION IN VIVO DES AGUIX-CY5.5 CHEZ LA SOURIS NUDE PORTANT UNE TUMEUR ORTHOTOPIQUE SQ20B. 76
FIGURE 42: LOCALISATION DES NANOPARTICULES FLUORESCENTES SUR LES COUPES CONGELEES DE TUMEURS CAL33-LUC-LUC A DIFFERENTS TEMPS APRES L'ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE (AGUIX-CY5.5, 200 µL A [GD3 +] ~ 20 MMOL / L). 77
FIGURE 43: PROTOCOLE D'IRRADIATION DES TUMEURS DANS UN MODELE DE CANCER DES VADS 78
FIGURE 44: COURBES DE CROISSANCE TUMORALE CHEZ DES SOURIS PORTEUSES DE TUMEURS CAL33-LUC 79
FIGURE 45: COURBES DE SURVIE CHEZ DES SOURIS PORTEUSES DE TUMEURS CAL33-LUC 80
FIGURE 46 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'IRRADIATION. 81
FIGURE 47: COURBES DE CROISSANCE TUMORALE CHEZ DES SOURIS PORTEUSES DE TUMEURS CAL33-LUC. 83
FIGURE 48: COURBES DU SIGNAL DE BIOLUMINESCENCE CHEZ DES SOURIS PORTEUSES DE TUMEURS CAL33-LUC 85
FIGURE 49: COURBES DE SURVIE CHEZ DES SOURIS PORTEUSES DE TUMEURS CAL33-LUC 86

Liste des Tableaux

TABLEAU 1: LES DIFFERENTS CONJUGUES PEPTIDIQUES TESTES. 31

TABLEAU 2: COMPARAISON DES VALEURS DE IC_{50} EXPRIMEES EN RAFT(CRGD)$_4$ ET EN CONJUGUE. 57

TABLEAU 3: RECAPITULATIFS DES CARACTERISTIQUES DES CONJUGUES LINEAIRES FLUORESCENTS POLYMERE-RAFT(CRGD)4. 59

TABLEAU 4: NIVEAU D'EXPRESSION RELATIF DES INTEGRINES AVB3 ET AVB1 EN FONCTION DES LIGNEES CELLULAIRES 60

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléiques

AMP : Adénosine MonoPhosphate

Ang-1: Angiopoïétine-2

Ang-2: Angiopoïétine-2

ARN : Acide RiboNucléiques

ATP : Adénosine TriPhosphate

BSA : Albumine Sérine Bovine

Ca : Calcium

CAL : Centre Antoine Lacassagne

CCD : Charge Coupled Device

CE: Cellules Endothéliales

Cy5.5: Cyanine 5.5

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

EBV: Epstein-Barr virus

EMCCD: Electron Multiplying Charge Coupled Device

EPR: Enhanced Permeability and Retention

HPV: Human papillomavirus

IC50 : Concentration Inhibitrice médiane

IMRT : RadiotThérapie avec Modulation d'Intensité

IRM: Imagerie à Résonance Magnétiqu

IT : Intra Tumorale

IV : IntraVeineuse

KeV : Kilo électron Volte

LUC : Luciférase

MEC : Matrice Extracellulaire

MeV : Mega électron Volte

Mg : Magnésium

NAM: N-acétyl-muramique

NMRI: Naval Medical Research Institute

O.C.T: Optimal Cutting temperature

ORL: Oto-rhino-laryngologie

PBS: Phosphate Buffered Saline

PDGF: Platelet Derived growth Factor

PEG: PolyEthylène Glycol

PSM : Poste de Sécurité Microbien

RAFT: Regioselectively Addressable Functionalized Template

RGD: Arginine-Glycine-Acide aspartique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROI : Region d'Intérêt

RPM : Rotation Par Minute

RT : RadioThérapie

SVF : Sérum de Veau Foetal

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TEMP: Tomographie par Emission MonoPhotonique

TGF-β_1: Transforming Growth Factor β

VADS: Voies Aéro-Digestives Supérieur

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Z : Numéro atomique

Introduction

A l'heure actuelle, la cancérologie fait face à un double enjeu : améliorer le diagnostic précoce des tumeurs et développer de nouvelles thérapies ciblées.

La détection précoce des cancers est primordiale pour permettre une thérapie efficace. En effet, aux stades précoces, le nombre de cellules tumorales à éradiquer est relativement faible et ces cellules ne possèdent pas toutes les anomalies génétiques qui leur permettront de s'adapter et de résister aux traitements. A l'heure actuelle, le diagnostic des cancers repose sur des techniques d'imagerie traditionnelles et sur la détection de marqueurs tumoraux circulants. Ces derniers, secrétés en grande quantité par les cellules tumorales, ne présentent pas de spécificité absolue, mais permettent de suspecter la présence d'un cancer.

Les techniques d'imagerie utilisées, la radiographie (rayons X), l'échographie (ultra-sons), l'IRM (résonance magnétique), les techniques nucléaires (radioactivité) et l'endoscopie sont des méthodes adaptées et performantes pour la détection de tumeurs de quelques millimètres.

Malgré les récents progrès réalisés pour ses différents moyens de traitements, la chirurgie demeure la thérapeutique pivot du traitement de la majorité des tumeurs solides. L'exérèse de la tumeur primaire est efficace pour les petits foyers tumoraux sans métastases. Cependant, elle reste problématique car l'élimination de l'intégralité des cellules tumorales et la prévention de la dissémination lors de l'opération chirurgicale peuvent être difficiles. Toujours pour les traitements locaux, la radiothérapie, basée sur l'utilisation de rayonnements ionisants (X, alpha, beta ou gamma) est également utilisée pour le traitement anti-tumoral, mais pose le problème de la toxicité des rayonnements ionisants sur les tissus sains environnants. Enfin, les chimiothérapies agissent sur toutes les cellules qui prolifèrent. Elles sont très efficaces, mais ne sont pas sélectives des cellules tumorales et sont à l'origine de nombreux effets secondaires (toxicité hématologique, cardiaque, gonadique, digestive, alopécie).

Dans cette optique de détection et de traitement précoce des cancers, des peptides ciblant la néo-angiogenèse ont été développés comme le motif RGD qui fera l'objet de cette étude.

Le but du projet est d'évaluer l'apport de la présentation multivalente du cluster Raft(cRGD)$_4$ sur l'affinité du conjugué pour les intégrines $\alpha v\beta 3$ fortement exprimées lors de la néo-vascularisation. Cette étude est réalisée sur une série de conjugués linéaires à nombre variable de clusters peptidiques Raft(cRGD)$_4$.

L'étude *in vitro* sera faite sur des cellules rénales embryonnaires HekB1 et HekB3, l'évaluation *in vivo* sera faite sur des souris *nude* porteuses de tumeurs sous-cutanées U87MG (glioblastome humain).

Nous montrerons également l'intérêt de l'utilisation de nanoparticules théranostiques à base de Gadolinium (AGuIX®) pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique des cancers des Voies-Aéro-Digestives Supérieures (VADS).
L'étude et la validation de nouvelles molécules thérapeutiques ou de nouvelles techniques chirurgicales pour le traitement des cancers des VADS nécessite un modèle animal approprié. Ce modèle doit être représentatif de la maladie et reproductible afin de s'approcher au plus près de la réalité clinique. Nous réaliserons donc les études sur le modèle orthotopique de cancers des VADS développé et validé au sein de l'équipe (1).

I. Développement de nouvelles stratégies innovantes pour le diagnostic et le traitement des cancers

1. L'angiogenèse

Le processus d'angiogenèse est le développement de nouveaux capillaires à partir du réseau vasculaire préexistant, c'est un phénomène physiologique normal de formation de vaisseaux sanguins, notamment lors du développement embryonnaire, qui devient un processus pathologique essentiel pour la croissance des tumeurs et la dissémination des métastases.

L'angiogenèse peut se développer selon deux procédés : par bourgeonnement (figure 1) ou par intussusception, c'est à dire par scission des vaisseaux existants.

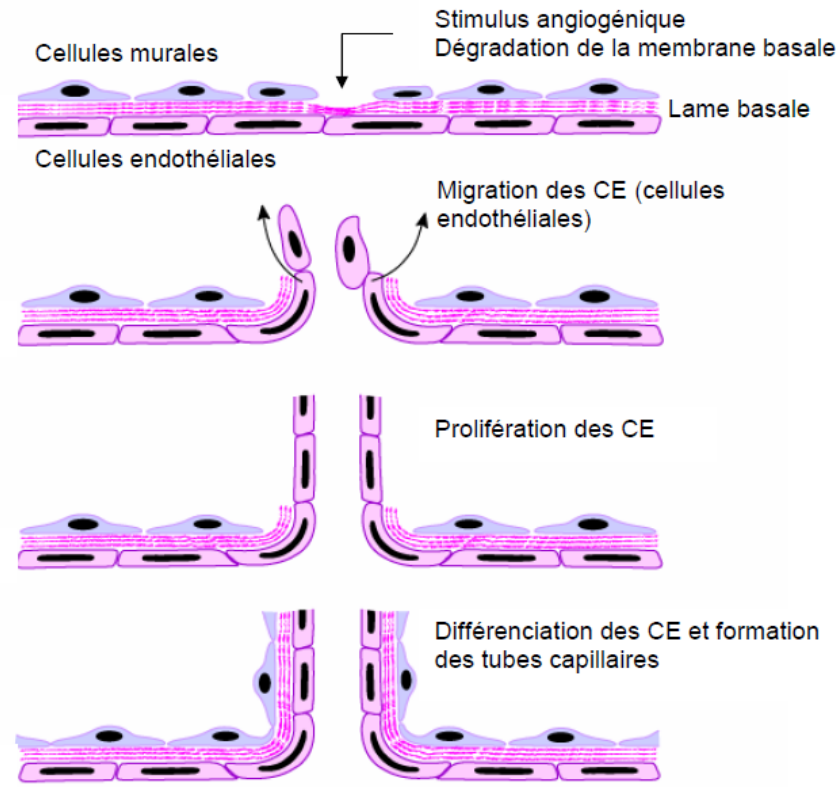


Figure 1: Les grandes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement suit différentes étapes. L'activation des cellules endothéliales quiescentes par des facteurs angiogéniques entraîne la dégradation locale de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante par les protéases. Cette première étape n'est possible qu'après la perte de contact entre les cellules endothéliales et les péricytes. Pour cela, VEGF (Vascular

Endothelial Growth Factor) et Ang-2 (Angiopoïétine-2) sécrétés par les cellules endothéliales activées, conduisent à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à la perte de contact entre les cellules. Les cellules endothéliales produisent alors les protéases qui dégradent la lame basale puis migrent en direction du stimulus angiogénique par chimiotactisme et prolifèrent sous l'activation du couple VEGF / VEGF-R1.

Enfin, elles se différencient en une structure de type capillaire dépourvu de cellules périvasculaires. Celles-ci sont alors recrutées par TGF-β_1 (transforming growth factor β), PDGF (platelet derived growth factor) et Ang-1 pour former un réseau vasculaire fonctionnel irriguant les zones en développement.

2. L'angiogenèse tumorale

De la même manière que l'organisme, la tumeur a besoin d'apports spécifiques pour se développer. Pour croitre jusqu'à 1 à 2 mm^3, les cellules tumorales reçoivent l'oxygène par diffusion passive. Au-delà de cette taille, cet apport devient insuffisant, provoquant alors un manque d'oxygénation. Cette hypoxie demeure un puissant activateur du phénomène d'angiogenèse (2).

La néo-angiogenèse tumorale est reconnue comme une étape critique indispensable au développement, à la survie et à la dissémination des tumeurs cancéreuses. Les nouveaux vaisseaux vont non seulement permettre l'apport nécessaire en nutriments et en oxygène pour le développement de la tumeur mais également le passage de cellules malignes dans la circulation sanguine.

La néo-angiogenèse tumorale peut être décrite de manière simplifiée comme une succession d'étapes similaires à celles de l'angiogenèse physiologique. La divergence principale concerne la maturation des vaisseaux.

1) Intégrine $\alpha_v\beta_3$: une cible de choix

Les intégrines sont des récepteurs d'adhérence cellulaire, c'est-à-dire des protéines transmembranaires dont l'une des extrémités interagit en général avec des protéines de la matrice extracellulaire, l'autre extrémité interagissant avec des constituants intracellulaires, notamment des molécules de signalisation contrôlant la migration, la survie, la prolifération et la différenciation.

Les intégrines sont constituées de deux sous-unités α et β. Chaque sous-unité possède une courte région cytoplasmique, une région transmembranaire ainsi qu'une région extra-cellulaire. Cette dernière présente la particularité de suivre une structure en « V » où chaque sous unité est repliée (Figure 2). Il s'agit d'une conformation physiologique de faible affinité dans laquelle la liaison avec un ligand entraine un changement de conformation : l'intégrine se déploie et présente un état physiologique de haute affinité (3).

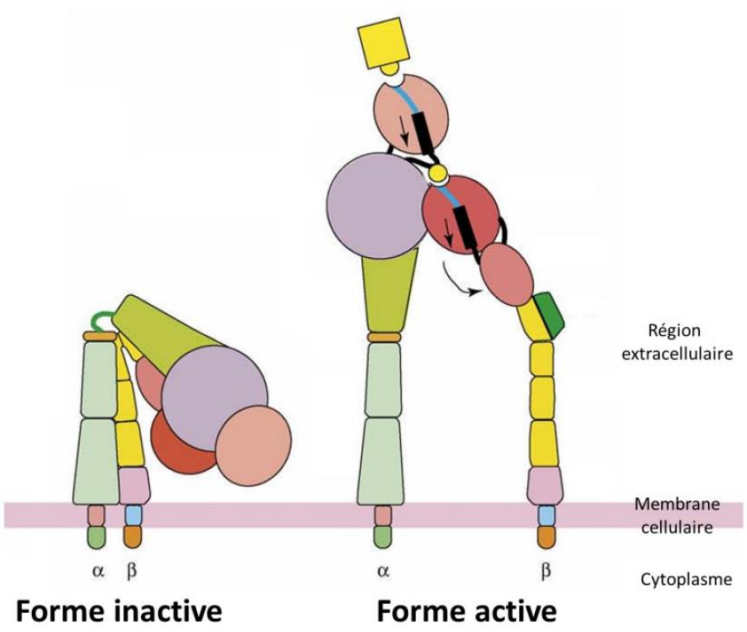


Figure 2: Représentation schématique des changements de conformation de l'intégrine αvβ3
Forme inactive : conformation physiologique de faible affinité ; Forme active : conformation physiologique de haute affinité. (3)

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ n'est pas ou faiblement exprimée dans la plupart des tissus. Seules certaines régions osseuses, l'endomètre (au milieu du cycle menstruel), le placenta, les sites inflammatoires et les tumeurs invasives révèlent de hauts niveaux d'expression. Ces derniers ont été mis en évidence spécifiquement sur l'endothélium des vaisseaux en formation dans différents modèles d'angiogenèse. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est surexprimée par la néo-vascularisation et certaines cellules tumorales (plus de 100 000 intégrines par cellule) par rapport aux tissus normaux (moins de 10 000 intégrines par cellule).

Cette différence d'expression fait de ce récepteur membranaire une cible particulièrement intéressante pour le ciblage de l'angiogenèse tumorale et peut permettre de délivrer des agents thérapeutiques tout en diminuant leurs toxicités sur les cellules saines.

La plupart des intégrines comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ servent de lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (MEC) en se liant à la fibronectine, la laminine et certains récepteurs de la famille des immunoglobulines. Cette fixation se fait grâce à une séquence peptidique constituée de trois acides aminés : Arginine-Glycine-Acide aspartique (RGD).

La séquence RGD est conservée dans tous les ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

2) Le motif RGD

Ce peptide RGD représente un composé clef pour cibler et suivre l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, que ce soit dans les cellules tumorales ou endothéliales durant la néoangiogenèse (4).

Des optimisations de la séquence RGD ont été apportées afin de procurer aux ligands une meilleure stabilité, affinité et spécificité.
Ainsi la cyclisation du RGD (cRGD) est couramment utilisée pour améliorer les propriétés de fixation en donnant une rigidité à la structure (Figure 3). Cela permet également de rendre le peptide moins sujet aux dégradations chimiques.

De nombreuses équipes ont démontré l'utilité du cRGD :

_ Gerlag et al. ont utilisé le cRGD dans un modèle murin d'inflammation articulaire ce qui a permis une diminution de l'inflammation par greffage d'un dimère d'heptapeptide proapoptotique (5)

_ Avraamides et al. ont montré que le peptide cRGD PEGylé marqué avec du ^{18}F ou du ^{64}Cu permet la détection, par imagerie, de tumeurs mammaires xénogreffés à partir d'une taille de 1.5mm de diamètre (6).

Des ligands présentant des motifs cRGD multimériques ont également été décrits. Cette approche permet une meilleure affinité des molécules et une amélioration du ciblage. En effet l'internalisation du cRGD monovalent peut se faire indépendamment des voies d'endocytose alors que le cRGD multivalent induit une endocytose dépendante des intégrines (4,7).

Dans cette optique, une plateforme peptidique RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template) sur laquelle quatre séquences cRGD sont greffées a été développée au laboratoire (Figure 3).

Cette association permet une meilleure affinité pour les intégrines ainsi qu'une présence prolongée de la molécule dans le sang, due à l'augmentation de la taille qui diminue la filtration glomérulaire rénale.

Cela entraine une augmentation du temps de demi-vie plasmatique et augmente la probabilité de fixation de la molécule sur son récepteur (8).

Cette molécule présente également un second domaine qui va permettre son couplage avec différentes molécules de marquage ou à visées thérapeutiques.

Le RAFT-c[RGD]$_4$ est un excellent outil théranostique car il présente une bonne pharmacocinétique et une forte capacité de ciblage des tumeurs primaires ou métastasées après injection systémique. Ainsi, le couplage RAFT-c[RGD]$_4$ avec un fluorophore permet d'obtenir un outil puissant de diagnostic tumoral[10] alors que son couplage avec un peptide pro-apoptotique fait de lui un outil de choix pour la thérapie anti cancéreuse (9).

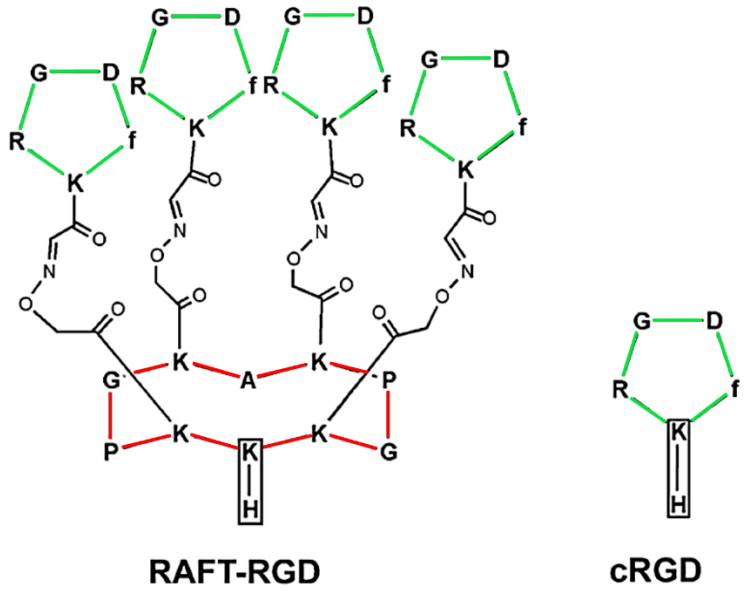


Figure 3: Structure du RAFT-RGD et du cRGD. (10)
Le motif décapeptide RAFT (surligné en rouge) soutient 4 motifs c(RGD) (surlignés en vert)

3) Utilisation de macromolécules ciblantes

La reconnaissance moléculaire est à la base de tous les systèmes vivants. Elle implique des interactions étroites entre deux entités (souvent de type ligand/récepteur) qui résultent de leur complémentarité fonctionnelle, chimique et/ou géométrique. La force et la réversibilité de ces interactions jouent un rôle important sur la modulation et la régulation des phénomènes biologiques. La sélectivité et la stabilité de la reconnaissance ligand/récepteur peuvent être renforcées par des interactions multivalentes.

Pour les systèmes biologiques, une affinité de reconnaissance élevée résulte le plus souvent de multiples interactions faibles (interactions multivalentes) plutôt que d'un nombre restreint d'interactions très fortes. Les interactions multiples permettent d'induire des réponses biologiques spécifiques qui n'ont pas lieu dans le cas d'un contact monovalent.

Afin de présenter les ligands de ciblage de manière multivalente, plusieurs types de support peuvent être utilisés. De nombreuses structures allant de l'échelle moléculaire à l'échelle nanométrique et disposant de caractéristiques variables peuvent être envisagées. Selon la nature du système, l'effecteur à délivrer peut-être soit directement greffé par liaison covalente (ex : polymère, micelle, dendrimère), soit encapsulé à l'intérieur d'une cavité (ex : liposomes, certaines particules polymères).

II. Les nanoparticules

Le terme « nanoparticule » englobe une multitude d'objets de formes et de tailles extrêmement variées. Une nanoparticule est un objet, peu importe la forme, dont au moins une de ses dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres (11).

C'est cette taille extrêmement faible, qui fait des nano-objets, des outils très intéressants pour le domaine biomédical. En effet, ces objets sont du même ordre de grandeur que les biomolécules et plus petits que les cellules (Figure 4)

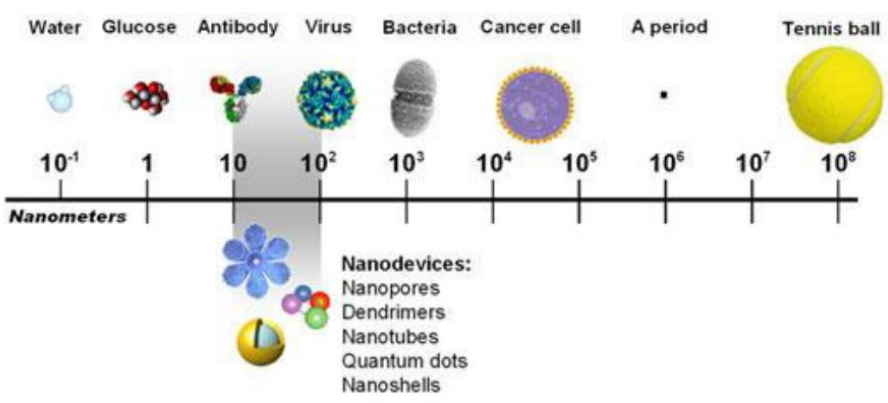


Figure 4 : Comparaison de l'ordre de grandeur des nanoparticules et des constituants biologiques (11).

1. Ciblage de la tumeur

Le ciblage tumoral peut être assuré par des molécules reconnaissant des anomalies caractéristiques des cellules tumorales (antigènes cellulaires, récepteurs membranaires) ou de son environnement (néo-vascularisation tumorale). Ces ligands permettent d'améliorer les propriétés de pharmaco-guidage des systèmes de vectorisation assurant le transport ciblé des molécules effectrices

1) Ciblage tumoral passif : effet EPR

Les anomalies anatomiques et physiopathologiques des tissus tumoraux, en particulier la perméabilité vasculaire accrue et le faible drainage lymphatique, permettent le développement de stratégies plus efficaces en termes de ciblage des tumeurs. En effet, la structure anormale des vaisseaux engendre une fuite importante des composés plasmatiques, ce qui permet aux macromolécules et nanoparticules de diffuser dans la tumeur. De plus, du fait de la déficience de drainage lymphatique dans les tissus tumoraux, les composés plasmatiques s'accumulent dans la tumeur (12). Ce phénomène, appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) et décrit il y a une vingtaine d'années, est mis à profit pour permettre l'accumulation sélective de macromolécules au sein des tumeurs solides. Il est ainsi possible, en un à deux jours, d'atteindre de fortes concentrations locales en principe actif, supérieures à celles obtenues dans les tissus sains (13). L'effet EPR est devenu un élément essentiel, pris en compte pour le développement des nouvelles thérapies anti-tumorales.

Le ciblage passif nécessite l'utilisation de systèmes stables, non agrégés, furtifs et présentant un temps de circulation suffisamment long pour conduire à l'accumulation du système dans les tumeurs. L'effet EPR est prédominant pour les composés de poids moléculaire supérieur à 40 kDa, il nécessite aussi que les composés aient une taille qui ne dépasse pas la taille de pores des vaisseaux perméabilisés (entre 380 et 780 nm) (14,15) et qui ne soit pas trop petite. En effet, l'effet EPR est négligeable pour les petites molécules qui peuvent se redistribuer dans la circulation sanguine par diffusion et/ou convection et sont éliminées préférentiellement par voie rénale (16).

Enfin, l'effet EPR est influencé par la taille de la tumeur, avec un meilleur effet EPR dans les tumeurs de petite taille, probablement lié à une meilleure densité de vaisseaux par rapport aux tumeurs de grande taille présentant une région avasculaire.

2) Ciblage tumoral actif : les cibles tumorales

En plus de l'accumulation passive par effet EPR, un ciblage actif des tumeurs peut être réalisé par greffage d'un motif de ciblage sur les molécules d'intérêt ou sur les vecteurs (Figure 5).

La cible doit être accessible c'est-à-dire qu'elle doit être exprimée à la surface des cellules et si possible être en contact avec la circulation sanguine. Elle doit être également spécifique de la zone tumorale ou y être exprimée plus fortement que dans les autres tissus.

Le ligand choisi pour ce ciblage doit avoir une grande sélectivité ainsi qu'une forte affinité pour sa cible pour éviter tout ciblage non spécifique.

Les cellules tumorales expriment de nombreux récepteurs à leur surface constituant des cibles potentielles. Ainsi, l'utilisation d'anticorps ciblant par exemple, les récepteurs CD20 (lymphome de Hodgkin), CD25 (lymphome à cellules T) ou CD33 (leucémie myéloïde aigüe), a permis de délivrer des radionucléides (Zevalin®), des immunotoxines (Ontak®) et des antibiotiques anti-tumoraux (Mylotarg®) de manière sélective dans les cellules tumorales.

Le grand nombre d'études précliniques réalisées sur le ciblage actif des tumeurs a permis de faire émerger différents principes généraux. Dans la majorité des cas, les nanoparticules ciblant des récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales améliorent l'efficacité anti-tumorale, en augmentant leur internalisation cellulaire plutôt qu'en augmentant l'accumulation tumorale (17,18).

L'accessibilité des récepteurs à la surface des vaisseaux a conduit au développement de nombreuses thérapies ciblant les cellules endothéliales tumorales.

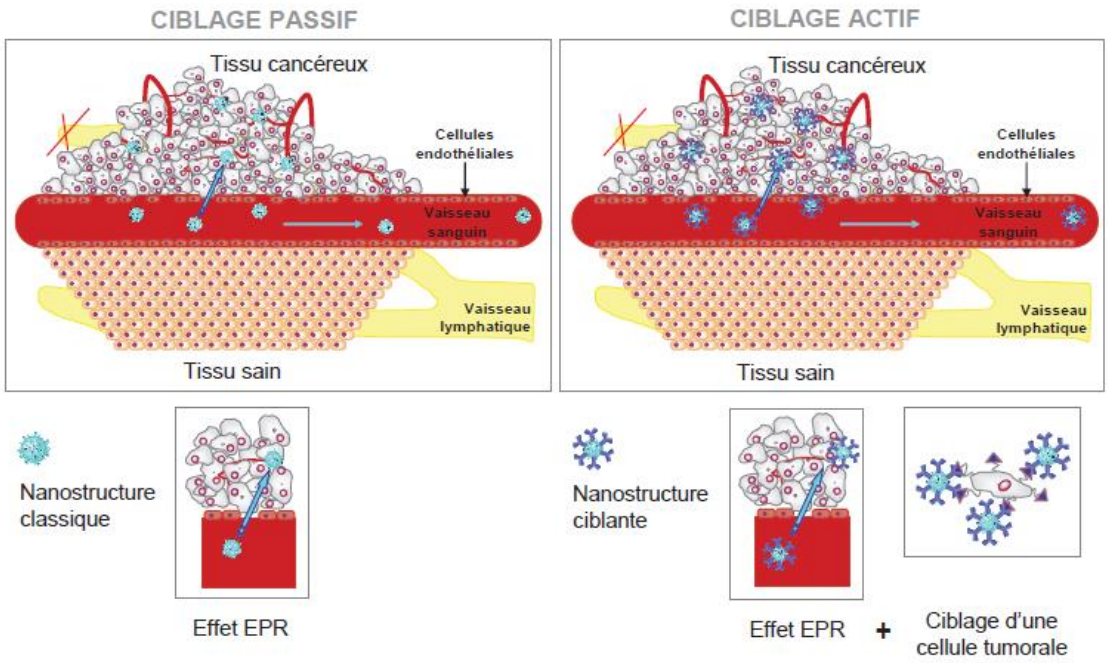


Figure 5: Représentation de la complémentarité des ciblages passif et actif (19).
Ciblage passif de molécules dans les cellules tumorales, *via* l'effet EPR ; Ciblage actif de molécules par vecteur fonctionnalisé, *via* le ciblage de récepteurs (sur)exprimés sur les cellules tumorales.

2. Applications des nanoparticules

L'utilisation des nanoparticules pour la détection et le traitement de pathologies ouvre un nouveau domaine de recherche. L'un des terrains d'application le plus prometteur, et aussi le plus avancé actuellement, est la délivrance de médicaments (« drug delivery » en anglais), et en particulier le développement de thérapies ciblées pour l'oncologie. En effet, véhiculer les molécules anticancéreuses par des nanoparticules permet d'augmenter l'accumulation et donc la libération locale au niveau des tumeurs.

De nombreuses nanoparticules sont actuellement en cours d'études précliniques ou cliniques pour la délivrance de médicaments. Il s'agit principalement de liposomes encapsulant des molécules hydrophiles et de nanoparticules solides à base de lipides, de protéines ou de polymères biodégradables encapsulant des molécules lipophiles, par exemple, l'encapsulation de 5-fluoro-uracile dans des particules polymériques (20).

La délivrance de médicaments concerne principalement des molécules chimiques (principes actifs) mais elle englobe également les agents thérapeutiques biologiques comme les protéines, les peptides et également l'ADN ou l'ARN pour les thérapies géniques (21–23). Les nanoparticules peuvent

également être utilisées pour d'autres types de thérapies comme la radiothérapie, la thermothérapie ou la thérapie photodynamique.

Dans le cadre d'une utilisation en radiothérapie, les nanoparticules peuvent soit véhiculer une source radioactive et cibler la zone d'intérêt (24), soit être utilisées comme agents radiosensibilisants, comme c'est le cas des nanoparticules d'or ou d'oxyde de Gadolinium pour une irradiation par rayons X (10 ; 25).

La thermothérapie ou hyperthermie consiste à provoquer, par un signal extérieur (magnétique ou laser, par exemple), un échauffement local par activation des nanoparticules situées dans la zone à traiter, de manière à ce que l'énergie dissipée soit suffisante pour élever la température de quelques degrés (autour de 45°C), et permettre la destruction des cellules. Cette thérapie fait intervenir des nanoparticules magnétiques (26,27) ou des nanoparticules d'or (28).

Enfin, la thérapie photodynamique est basée sur l'utilisation d'agents photo-sensibilisateurs capables de produire de l'oxygène singulet et des radicaux libres après absorption d'un rayonnement lumineux, conduisant à la destruction des cellules. Les nanoparticules jouent un rôle de transporteur en véhiculant le photo-sensibilisateur dans la zone d'intérêt (29).

3. Les nanoparticules radiosensibilisantes

Le principe de la radiothérapie repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Les rayonnements ionisants se présentent sous la forme d'un faisceau d'ondes ou de particules suffisamment énergétiques pour ôter les électrons de leur enveloppe électronique : c'est l'ionisation. Les rayons déposent leur énergie dans les cellules des tissus à travers lesquels ils passent. L'énergie déposée peut détruire les cellules cancéreuses ou causer des modifications génétiques provoquant la mort de la cellule.

Le rayonnement ionisant agit sur les tissus en trois étapes : la première est physique, la seconde physicochimique et la dernière biologique. L'étape physique est de très courte durée (10-13 s). Elle fait référence aux ionisations et aux excitations moléculaires suite au dépôt d'énergie lors du passage du rayon. Cette phase est suivie par une étape physicochimique pouvant durer de quelques secondes à quelques minutes. Les molécules ionisées ou excitées réagissent entre elles et avec les molécules environnantes. Enfin, lors de l'étape biologique, les rayonnements ionisants altèrent la structure des macromolécules, provoquant la perturbation des fonctions principales de la vie cellulaire. Cette phase peut s'étaler sur plusieurs mois.

La RT est essentiellement limitée dans sa capacité à fournir des doses thérapeutiques pour le volume de la tumeur, tout en minimisant les dommages aux tissus sains environnants.

De nombreuses solutions ont été proposées pour remédier à ce problème, tombant globalement en deux catégories principales :

- La mise en œuvre de techniques de RT de pointe permettant de moduler l'intensité du rayonnement [radiothérapie avec modulation d'intensité (IMRT)] en vue d'adapter plus précisément la dose à la cible tumorale.
- Le développement d'une nouvelle génération d'agents thérapeutiques qui sensibilisent les cellules aux rayonnements ionisants (radiosensibilisateurs) en améliorant la dose d'efficacité avec leur haute densité et leur numéro atomique élevé (Z) comme nous l'avons vu précédemment.

Cette stratégie revient à augmenter sélectivement l'efficacité de la radiothérapie dans les tissus tumoraux et à épargner les tissus sains environnants à condition d'accumuler les agents radiosensibilisants dans la tumeur (Figure 6). Le principe physique repose sur le fait que l'absorption du rayonnement par les nanoparticules produit une émission en cascade d'électrons secondaires (électrons Auger et photoélectrons) pouvant causer de manière directe ou indirecte des dégâts importants aux cellules cancéreuses.

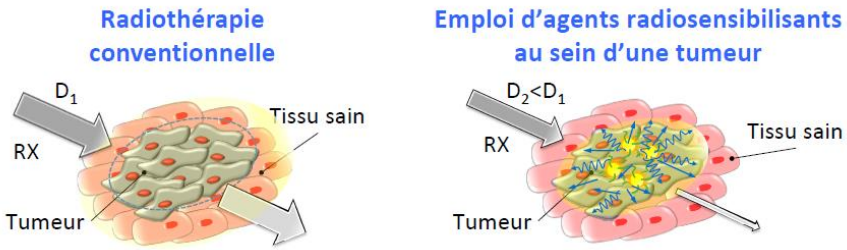


Figure 6 : Principe de l'utilisation d'agents radiosensibilisants pour la radiothérapie
(Journées Nationales en Nanosciences et Nanotechnologies 2012)

Les dégâts directs proviendraient de l'interaction du rayonnement secondaire directement avec les brins d'ADN, provoquant ainsi des cassures. Cependant, l'accès au noyau cellulaire par les nanoparticules est difficile à envisager en raison de la très faible taille des pores nucléaires.

Les dégâts indirects proviennent d'espèces extrêmement réactives, les radicaux, qui sont créés suite à l'interaction du rayonnement secondaire et des nanoparticules ionisées avec l'eau (qui est le constituant cellulaire principal). Les espèces formées sont principalement le radical hydroxyle HO$^{\bullet}$, qui est un

oxydant puissant, et le radical hydrogène ($H^{\bullet}$) qui est un réducteur puissant. Ces radicaux peuvent réagir entre eux ou avec le dioxygène, donnant ainsi l'ion radicalaire superoxyde $O_2^{\bullet -}$, ou encore le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. Ces espèces très agressives interagissent ensuite avec les biomolécules pour causer des dégâts importants, souvent irréversibles.

Lorsque la concentration en agents radiosensibilisants est maximale au sein du volume tumoral à traiter et minimale au niveau des tissus sains, le volume cible peut alors être irradié par des rayons X. Les agents de contraste à base d'éléments à haut numéro atomique comme l'iode (Z = 53) et le gadolinium (Z = 64) présentent une forte probabilité d'interaction de photons de basse énergie par effet photoélectrique.

Les premières démonstrations de l'efficacité de nanoparticules d'or, en termes de sélectivité de la tumeur et d'efficacité de la radiosensibilisation ont été réalisées en 2004 (25).

Par la suite, des modèles prédictifs de l'effet radiosensibilisant basés sur le coefficient d'absorption des éléments à haut numéro atomique comparé au tissu mou ont été développés. Ces modèles mettent en évidence deux effets majeurs : pour une énergie inférieure à 150 KeV, l'effet photoélectrique prévaut (électrons Auger) et induit un coefficient d'absorption d'énergie de masse plus élevé et donc une radiosensibilisation plus importante pour les éléments de haut numéro atomique. Pour des énergies plus hautes comme 6 MeV, l'effet Compton est prédominant et le coefficient d'absorption est similaire pour les deux tissus (Figure 7).

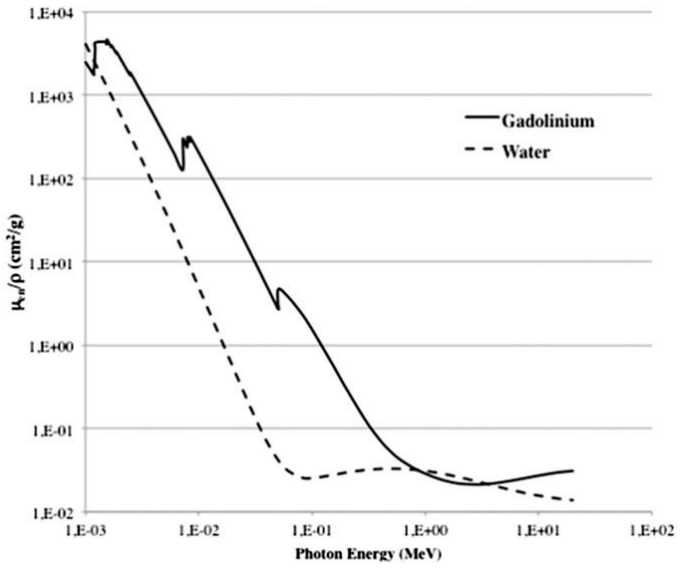


Figure 7 : Comparaison du coefficient d'absorption de l'énergie de masses des photons, pour le gadolinium et les tissus mous. Adapté de Hubbell et Seltzer (30,31).

Ces nano-objets présentent l'avantage de regrouper une grande concentration du même élément au sein d'un même objet, contribuant à l'effet radiosensibilisant, tout en étant aisément fonctionnalisables soit par des polymères, principalement pour améliorer leur furtivité, soit par des ligands biologiques permettant un ciblage spécifique de récepteurs cellulaires.

III. Les cancers des Voies Aéro-digestives Supérieures

1. Généralités

Le cancer des voies aérodigestives supérieures (VADS) est le cinquième cancer le plus fréquent en France.

En 2012, on estime à près de 14 638 nouveaux cas de cancers des VADS dont plus de 74 % chez les hommes, et à 4 098 décès dont 80% chez les hommes, liés à ces cancers (D'après l'institut national du cancer). Au niveau mondial, on compte près de 650 000 nouveaux cas chaque année avec plus de 350 000 décès (39,40).

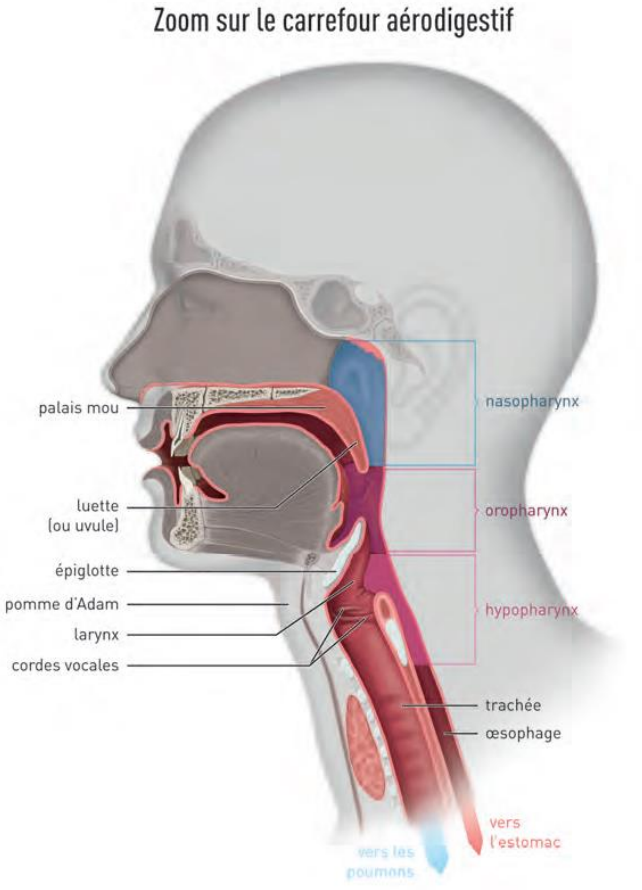


Figure 8: Les voies aérodigestives supérieurs
D'après la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Dans plus de 95 % des cas, ces cancers sont des carcinomes de type épidermoïde, c'est-à-dire des cancers développés au niveau de la muqueuse qui tapisse ces organes.

On distingue deux groupes principaux de tumeurs (Figure 8):

- **Les cancers de la partie supérieure de l'appareil digestif**, qui s'étend des lèvres à l'œsophage.

- **Les cancers de la partie supérieure de l'appareil respiratoire**, qui s'étend des narines jusqu'à la trachée qui conduit l'air dans les poumons.

Les cancers des VADS sont le plus souvent liés à une consommation excessive de tabac et/ou d'alcool. Cependant, certains sont associés à une exposition à des composés nocifs dans un cadre professionnel.

2. Les facteurs de risques

La consommation de boissons alcoolisées et de tabac forme les deux facteurs de risque les plus importants impliqués dans la survenue de ces cancers. Le risque augmente en fonction de la dose consommée. On estime que 54 à 87 % des cancers des VADS, sont liés au tabac. Chez les fumeurs exclusifs, le risque de cancer concerne plus particulièrement le larynx.
Le risque de cancer est majoré chez les personnes associant consommation de tabac et d'alcool. Chez ces personnes, ce sont principalement des cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx et de l'hypopharynx qui se développent.

D'autres facteurs de risques entrent en compte dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures: des prédispositions génétiques ont été mises en évidence (41) ainsi que des causes infectieuses.
Deux types d'infections virales augmentent le risque de survenue de cancer ORL :

- L'Epstein-Barr virus (EBV) transmissible essentiellement par la salive est reconnu comme facteur de risque de cancer du nasopharynx. Il s'agit d'un cancer rare en France, mais 25 fois plus fréquent dans certaines régions du globe comme l'Afrique du Nord, ou l'Asie du sud.
- Depuis quelques années, les preuves s'accumulent sur le rôle du papillomavirus (HPV), en particulier dans l'augmentation du risque de cancer de la cavité buccale et de l'oropharynx. Ce

virus, sexuellement transmissible, est déjà connu pour son rôle dans le développement du cancer du col de l'utérus (42).

3. Prise en charge des cancers des VADS

1. Diagnostique et bilan pré-thérapeutique

Situées au carrefour des voies digestives et respiratoires, les tumeurs des VADS sont délicates à prendre en charge car l'équipe médicale doit proposer un traitement offrant la meilleure efficacité possible tout en limitant au maximum ses conséquences sur l'aspect physique ainsi que sur le fonctionnement normal de la région.

Le protocole de traitement est déterminé selon le stade de la tumeur. Il est établi à la suite du bilan clinique et tient compte de la classification TNM et de l'état général du patient. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour node en anglais) et à distance pour d'éventuelles métastases (M).

2. Le traitement des cancers VADS

Le traitement des cancers des VADS fait face aux mêmes problématiques que celles décrites dans l'introduction. Actuellement, il repose sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, tandis qu'apparaît la perspective de leur adjoindre des traitements ciblés. Le traitement des cancers des VADS à un stade avancé, fait appel à plusieurs de ces techniques diversement associées. Les associations optimales sont loin d'être établies actuellement, d'autant que la diversité des localisations topographiques tumorales complique l'établissement de protocoles évaluant de façon pertinente les différentes stratégies disponibles.

3. La Radiothérapie des cancers VADS

Comme énoncé précédemment, la radiothérapie est un traitement locorégional qui permet une action directe sur la zone tumorale et sa périphérie, ainsi que sur les ganglions lymphatiques.

La radiothérapie est utilisée dans les cas précoces de cancer ne nécessitant pas de chirurgie où en cas de refus de la chirurgie par le patient atteint de cancer des VADS. Elle est également utilisée en postopératoire en fonction des critères histologiques défavorables dont l'exérèse incomplète de la tumeur et la présence de plusieurs ganglions cervicaux envahis. Le rôle de la radiothérapie dans ces situations est de diminuer les risques de rechute locale après chirurgie (43–45).

Malgré son efficacité, la radiothérapie présente plusieurs effets secondaires, des érythèmes cutanés ou des nausées et vomissements peuvent survenir durant la période de traitement. Certains "effets secondaires à long terme" ou "effets secondaires tardifs" peuvent apparaitre longtemps après la fin du traitement mais ils restent exceptionnels.

L'utilisation de nouvelles molécules/nanoparticules radiossensibilisantes pourraient augmenter l'efficacité de la radiothérapie tout en diminuant la dose de radiation administrée au patient et par la suite réduire les effets indésirables (36,46).

Matériel et méthodes

I. La culture cellulaire

1. Lignée CAL33-LUC

Cette lignée est obtenue à partir d'un carcinome épidermoïde humain de la langue (CAL33), les cellules ont ensuite été infectées avec un rétrovirus afin d'insérer stablement le gène de la luciférase. Cette transfection permet de pouvoir les visualiser en imagerie de bioluminescence.
Les cellules ont un temps de doublement de 43 heures.
La lignée cellulaire CAL33-LUC nous a été fournie gracieusement par le Dr. Alexandre Bozec (Service Oto-rhino-laryngologie et chirurgie de la Face et du Cou, Centre Antoine Lacassagne, Nice). Cette lignée a été isolée en culture et caractérisée au sein de ce centre (47).

2. Lignées Hek293-(β_1) et Hek293-(β_3)

Les cellules Hek293-(β_1) et Hek293-(β_3) sont des cellules rénales embryonnaires humaines issues de la lignée Hek293 (ATCC® CRL-1573™). Elles ont été respectivement modifiées pour surexprimer les sous-unités β_1 et β_3 des intégrines.

La culture de ces cellules nécessite l'ajout d'un antibiotique : la G418 (Geneticin) qui est couramment utilisé pour sélectionner des cellules génétiquement modifiées.

3. Lignées M21 et M21L

La lignée M21 est dérivée d'un mélanome humain exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les cellules M21-L sont issues de la lignée M21 et ont été sélectionnées par cytométrie en flux pour leur faible niveau d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

4. Lignée U87MG

Cette lignée cellulaire est une lignée issue de glioblastome humain exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette lignée est fréquemment utilisée au laboratoire pour les implantations sous cutanées car elle possède un bon effet EPR (ATCC® HTB-14™).

5. Le maintien des cellules en culture

La culture cellulaire se fait sous poste de sécurité microbien de type 2 (PSM 2) à flux laminaire pour un maintien de la stérilité et une protection de la manipulation, du manipulateur et de l'environnement. Les cellules sont maintenues en culture en milieu complet contenant du sérum de vœux fœtal 10% (v/v) (préalablement décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C). Elles sont conservées en atmosphère humide dans une étuve à 37°C en présence de 5% de CO_2.
Lors de chaque passage, soit 2 fois par semaine, les cellules sont décollées à la trypsine puis centrifugées et remises en culture au 1/10ème dans du milieu neuf.

6. Congélation et décongélation

I. Congélation

Les cellules à congeler doivent impérativement se trouver dans leur phase exponentielle de croissance. En effet, la congélation provoquant un certain stress pour les cellules, il est nécessaire de les congeler dans les meilleures conditions possibles afin de minimiser ce stress et ainsi maximiser leur récupération et survie ultérieures.

Les cellules sont trypsinées, comptées puis centrifugées 5 minutes à 1200 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules ainsi formé est remis en suspension avec une solution contenant 90% de sérum de veaux foetal et 10% de DMSO. Le DMSO est un cryoprotecteur empêchant la formation de cristaux au sein des cellules lors de la congélation et donc la mort cellulaire. Nous réalisons ensuite des aliquots en cryotubes qui seront placés une nuit à -80°C dans une boîte de congélation permettant une descente en température très lente puis dans un conteneur d'azote liquide à -196°C pour une conservation longue durée.

II. Décongélation

A l'inverse de la congélation, qui doit être lente, la décongélation doit être le plus rapide possible. Pour cela, les cellules sont sorties de l'azote, décongelées pendant environ une minute dans un bain-marie à 37°C puis rincées avec 40 ml de milieu pour éliminer le DMSO.

Une centrifugation de 5 minutes à 1200 rpm est ensuite réalisée, le surnageant est éliminé, puis les cellules sont remises en suspension dans du milieu complet et mises en culture dans une flasque.

II. Les différentes molécules étudiées

1. Les conjugués peptidiques

Différents types de sondes polymères ayant les caractéristiques suivantes ont été étudiées au cours de ce travail :

- fluorescentes dans le rouge lointain/proche infrarouge et de brillance élevée pour permettre une détection en profondeur dans les tissus biologiques.

- de taille nanométrique contrôlée (quelques nm à 200 nm) pour favoriser leur accumulation au niveau des tumeurs. L'utilisation de la polymérisation radicalaire contrôlée RAFT permettra de faire varier les paramètres comme la taille et l'architecture des sondes de manière relativement précise afin d'obtenir des résultats biologiques reproductibles.

- présentant une multivalence à deux niveaux, c'est-à-dire présentant plusieurs clusters tétraédriques de ligands peptidiques (Raft(cRGD)$_4$), pour améliorer l'affinité et l'internalisation des sondes dans les cellules sur-exprimant les intégrines $\alpha_V\beta_3$.

Une série de conjugués linéaires (Figure 9) à base de copolymères réactifs P(NAM-stat-NAS) et d'un nombre variable de clusters peptidiques Raft(cRGD)$_4$ a été synthétisée afin d'évaluer l'apport de la présentation multivalente du cluster Raft(cRGD)$_4$ sur l'affinité du conjugué pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

Ce polymère a été synthétisé par l'équipe d'Arnaud Favier au sein du Laboratoire Joliot-Curie, à l'ENS de Lyon. Au total, huit composés ont été testés (Tableau 1).

Conjugués	M_n (g.mol^{-1})	n_p visé	n_p	Rendement de couplage du Raft(cRGD)$_4$ (%)	Type de fluorophore	n_f	Rendement de couplage du fluorophore (%)
1*	76 500	2	1,5	38	/	0	/
2	77 900	4	4,2	60	/	0	/
3	84 300	6	5,9	59	/	0	/
4	62 100	0	0	/	/	0	/
5	79 900	4	4,2	60	Cy5.5	3,6	64
6	83 800	4	4,8	69	Cy5.5$(SO_3)_4$	3,7	62
7	63 900	0	0	/	Cy5.5	3,1	64
8	65 800	0	0	/	Cy5.5$(SO_3)_4$	3,7	62

Tableau 1: Les différents conjugués peptidiques testés.

Mn : Masse molaire moyenne en nombre du conjugué (après couplage et post-traitement) ; np visé : nombre moyen de Raft(cRGD)4 par chaîne souhaité (en supposant un rendement de couplage du Raft(cRGD)4 d'environ 60 %) ; np : nombre moyen de Raft(cRGD)4 par chaîne déterminé par RMN 1H ; nf : nombre moyen de fluorophores par chaîne déterminé par CES/UV-visible.

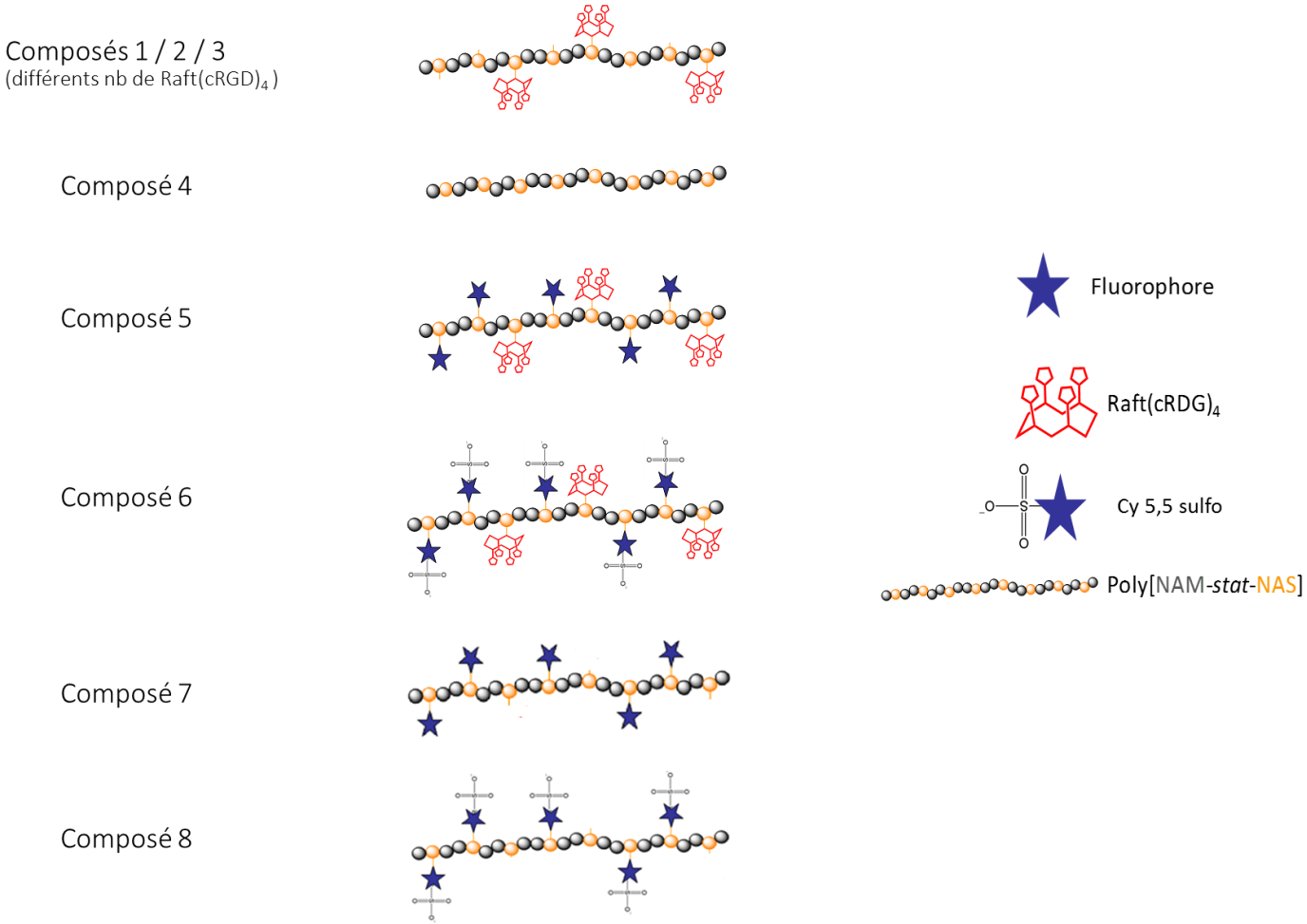


Figure 9: Représentation schématique de la structure des conjugués linéaires fluorescents polymère-clusters peptidiques.

2. Les nanoparticules AGuIX®

Les nanoparticules à base de Gadolinium présentent diverses propriétés qui en font des candidates prometteuses pour des applications médicales. En effet, le gadolinium est un métal de numéro atomique élevé (z = 64). Il est l'élément le plus largement utilisé pour l'IRM en tant qu'agent de contraste paramagnétique. Comme décrit précédemment, son haut numéro atomique lui confère un fort pouvoir d'absorption des rayons ionisant, comme les rayons X.

Ces nanoparticules peuvent donc être visualisées par IRM. De plus, elles peuvent être utilisées comme agent radio-sensibilisant. En vue de ces applications, il est nécessaire d'obtenir des nanoparticules ayant une biodistribution optimale, notamment en modulant leur fonctionnalisation de surface.

L'équipe "Cancer Targets and Experimental Therapeutics" de l'Institut for Advanced Biosciences (INSERM U1209) en collaboration avec le CHU de Grenoble (service d'oto-rhino-laryngologie et chirurgie cervico-faciale, Hôpital Albert Michalon) travaille depuis plusieurs années sur l'identification de cibles diagnostiques et thérapeutiques et le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le cancer du poumon et des VADS. Elle développe notamment des approches théranostiques, combinant le diagnostic et la thérapie des tumeurs avec l'utilisation de nanoparticules à base de Gadolinium.

Ces nanoparticules AGuIX® ont été développées par la start-up Nano-H.

Elles ont été développées par l'intermédiaire d'un processus top-down original, cette approche consiste à concevoir le sujet d'études ou le produit dans les grandes lignes, puis, à s'intéresser à des détails de plus en plus fins.

Elles sont composées d'une matrice de polysiloxane portant des espèces chélateurs de DOTA (1, 4, 7, 10-tétraazacyclododécane-1, 4, 7, 10-acide tétraacétique) à la surface. Les ligands DOTA chélatent les ions Gd^{3} +, ce qui permet leur utilisation comme agent de contraste en IRM (30–32). Les ligands DOTA peuvent également complexer un radionucléide pour réaliser la tomographie par émission de positons (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP).

Des fonctions amines primaires permettent facilement la conjugaison de fluorophores à la matrice de polysiloxane pour les études d'imagerie de fluorescence : un fluorophore proche infrarouge (la cyanine 5,5) est greffé sur les nanoparticules pour permettre l'imagerie de fluorescence.

Cette nanoparticule à base de gadolinium présente des propriétés de radiosensibilisation élevées *in vivo* et *in vitro*, dues à leur nombre atomique élevé (33,34), qui en font un agent thérapeutique

prometteur pour la radiothérapie (33,35,36). En dépit d'une clairance rénale rapide en raison de leur petite taille (<6 nm), ces particules s'accumulent de manière significative dans les tumeurs par un ciblage passif (effet EPR) (31,32).

Un ciblage actif peut être combiné au ciblage passif, par le greffage à la surface des nanoparticules; de ligands c[RGD]. Il devrait fournir une accumulation plus efficace de ces particules dans la tumeur (37,38).

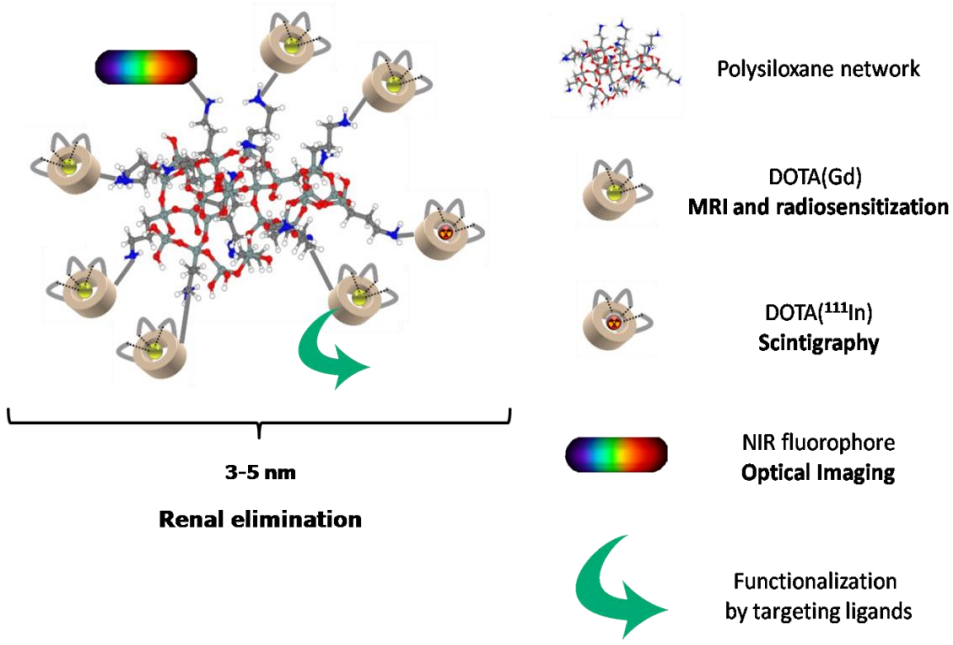


Figure 10: Représentation schématique des nanoparticules AGuIX®.
D'après http://www.chematech-mdt.com

III. Les modèles animaux

Dans le cadre de notre protocole d'expérimentation animale, nous avons utilisé des souris NMRI-Nude femelles (Janvier Labs). Cette lignée de souris a été obtenue suite à une mutation entrainant une absence ou une atrophie du thymus. Les souris sont donc immunodéficientes ce qui permet le développement de tumeurs de cellules humaines sans rejet par la souris. De plus, la souris Nude ne possède pas de poils ce qui permet une utilisation plus aisée en imagerie optique.

L'utilisation des animaux dans le cadre d'un protocole de recherche en cancérologie est soumise à une réglementation stricte. Le protocole a été validé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Cela consiste principalement en une analyse des éventuelles méthodes alternatives, de la réduction du nombre d'animaux et enfin de la prise en charge de la douleur de l'animal et des points limites menant au sacrifice (règle des « 3 R », Remplacer, Réduire et Raffiner (48)). Plus généralement, il faut que les bénéfices apportés par les manipulations soient supérieurs aux risques encourus par les animaux.

1. Anesthésie des souris

Il existe deux possibilités d'anesthésier les souris : l'anesthésie gazeuse ou chimique.

- Anesthésie gazeuse (Figure 11) : Elle consiste à faire respirer à l'animal de l'isoflurane gazeux. L'isoflurane est un agent anesthésique volatil de la famille des éthers halogénés. L'anesthésie se fait soit dans un masque, soit dans une boîte ventilée. L'induction de l'anesthésie est réalisée dans la boite à induction avec 3% d'isoflurane dans l'air et un débit de 1,5 L/minute puis maintenue sur masque avec 1,5% d'isoflurane et un débit à 0,2 L/minute

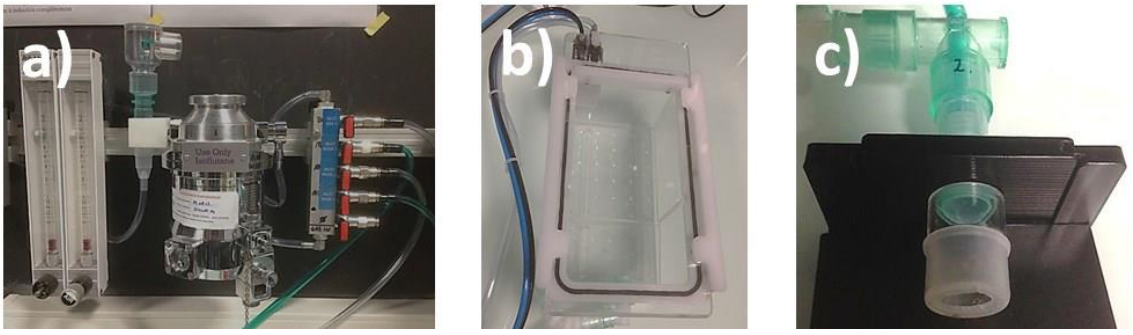


Figure 11: Système d'anesthésie gazeuse
a) cuve d'isoflurane et branchement ; b) boite à induction ; c) masque d'anesthésie.

- Anesthésie chimique : il s'agit d'une injection intrapéritonéale d'une solution de Médétomidine/Kétamine (100µl pour 10 g de souris. Cette solution est préparée à partir de Dormilan® (médétimidine, sédatif, 1mg/ml), Kétamidor® (kétamine, anésthésique, 100mg/ml). Au cours de l'anesthésie, la température corporelle des animaux est maintenue à l'aide d'un tapis chauffant.

2. Le modèle VADS

L'étude et la validation de nouvelles molécules thérapeutiques ou de nouvelles techniques chirurgicales pour le traitement des cancers des VADS nécessitent un modèle animal approprié. Ce modèle doit être représentatif de la maladie et reproductible afin de s'approcher au plus près de la réalité clinique.

Plusieurs modèles murins pour l'étude des cancers des VADS ont été décrits dans la littérature. Le modèle le plus rudimentaire consiste en une injection sous-cutanée de cellules tumorales. Mais ce modèle ne permet pas un développement tumoral des cellules cancéreuses au sein de leur environnement natif, ce qui le rend peu représentatif des cancers des VADS chez l'être humain. Des modèles orthotopiques ont donc été mis au point afin de recréer les interactions entres les cellules et leur environnement naturel.

Le premier modèle utilise l'exposition répétée d'agents carcinogènes au niveau de la cavité buccale. L'avantage de ces modèles est que les tumeurs peuvent se développer chez des souris immunocompétentes relativement facilement, notamment en introduisant l'agent chimique dans l'eau de boisson. Cependant, l'induction est longue (12 à 34 semaines) et une faible reproductibilité spatiale est observée, ce qui rend ces modèles inutilisables pour des essais thérapeutiques (49,50).

Un autre moyen pour développer des cancers des VADS chez une souris consiste à réaliser une xénogreffe orthotopique. Des cellules sont ainsi implantées au niveau du plancher buccal ou de la langue chez des souris immunodéficientes. Ceci permet le développement de tumeurs tout en évitant le phénomène de rejet. Ce modèle présente néanmoins un inconvénient majeur. En effet, du fait de la rapide croissance tumorale, les souris ne peuvent s'alimenter correctement et doivent être sacrifiées au bout de 10 à 12 jours après implantation (49,51). Cette courte durée ne permet donc pas l'étude à long terme de nouvelles molécules thérapeutiques.

Pour cela un modèle orthotopique des cancers VADS a été développé au laboratoire. Il se déroule en deux étapes décrites ci-dessous, premièrement nous implantons des cellules CAL33-LUC en sous cutanée puis en intra jugale de copeaux issus de ces tumeurs sous cutanées.

1) Croissance sous cutanée

Dans un premier temps, une implantation sous cutanées de cellules CAL33-LUC est réalisée. Elle consiste en l'injection de 5.10^6 cellules CAL33-LUC reprisent dans 200µL de PBS.

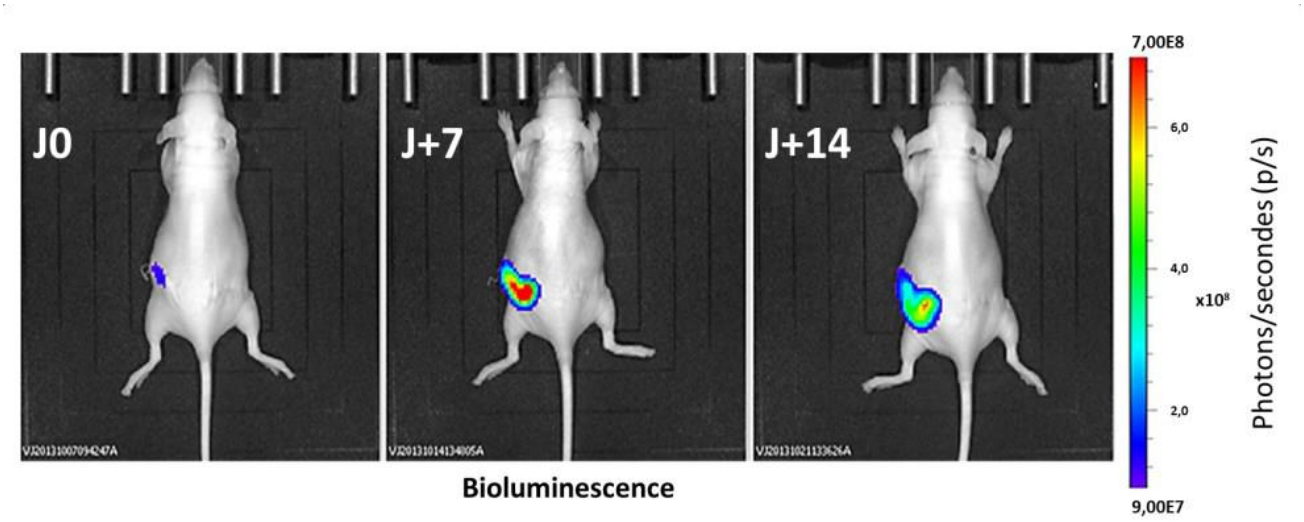


Figure 12: Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence in vivo après implantation sous cutanée des cellules CAL33-LUC au niveau du flanc de la souris.

2) Croissance Orthotopique

Dans un second temps, après 15 jours de croissance sous cutanée, les souris sont sacrifiées et la tumeur est prélevée, des copeaux tumoraux d'environ 0,5mm sont réalisés et implantés dans la face interne de la joue d'une souris saine.

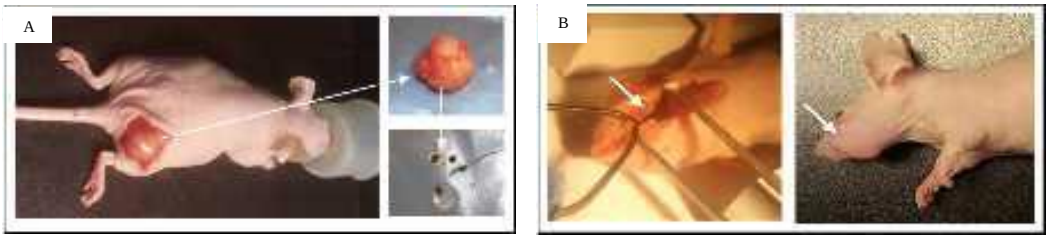


Figure 13: (A) Prélèvement d'une tumeur CAL33-LUC sous-cutanée et réalisation des copeaux tumoraux. (B) Implantation intra-jugale d'un copeau de tumeur CAL33-LUC et tumeur orthotopique développée au niveau de la joue (flèche).

Un suivi est ensuite réalisé sur ces souris par imagerie de bioluminescence. Le suivi en bioluminescence nous permet de montrer que le développement des tumeurs orthotopiques est très reproductible.

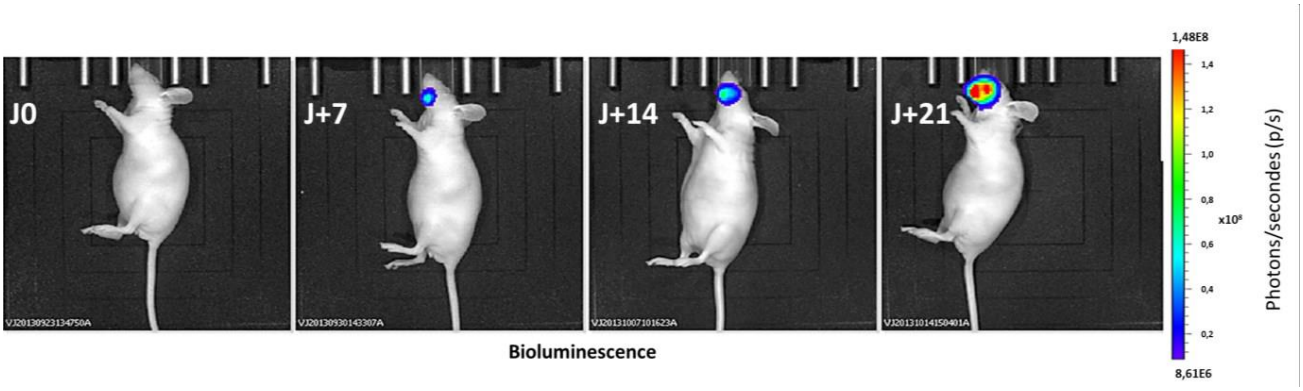


Figure 14: Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence in vivo après implantation de copeaux tumoraux au niveau de la joue de la souris.

Le développement de ce modèle a été réalisé au laboratoire par Clément Millet et le Docteur Ihab Attallah. Les implantations intra-jugales ont été réalisées par Raphaële Quatre et Ihab Attallah, chirurgiens ORL du CHU de Grenoble.

3. Le modèle U87MG sous cutané.

Les cellules U87MG de glioblastome humain (4 millions dans 200µl) sont injectées en sous-cutanée sur le flanc des souris Nude anesthésiées par voie gazeuse. Les souris sont observées quotidiennement. Deux à trois fois par semaine, elles sont pesées et le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. Calcul du volume tumoral :

$$V = L \times l^2 \times 0.52$$

V : volume ; L : longueur ; l : largeur

Si une perte de poids supérieure à 20 % est observée ou si l'animal montre des signes de souffrance (isolement, prostration…), l'euthanasie de l'animal est réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse. De même, l'euthanasie est réalisée si des signes de nécrose cutanée à la surface de la tumeur apparaissent et/ou si le volume tumoral atteint 1500 mm^3.

IV. L'imagerie Optique

1. L'imagerie de Bioluminescence

La bioluminescence est la production et l'émission de lumière par un organisme vivant résultant de la dégradation d'un substrat, la luciférine, par son enzyme, la luciférase. Il existe plusieurs combinaisons luciférase/luciférine qui sont issues de divers organismes animaux ou végétaux.

La réaction la plus utilisée en imagerie biophotonique, catalysée par la luciférase, est l'activation de la luciférine avec formation de luciférine adénylate liée à l'enzyme. Cette réaction est réversible et libère le pyrophosphate inorganique. La luciférine adénylate formée est oxydée par l'oxygène moléculaire et donne un peroxyde très instable, l'oxyluciférine, qui va rapidement se cycliser après une libération d'AMP. Cette molécule, dans un état électronique excité, retourne à l'état stable par une réaction de décarboxylation. Cette réaction va entraîner l'émission d'un photon lumineux, dont la longueur d'onde dépend de la structure du complexe luciférine-luciférase (pic d'émission à 560 nm dans le système de la luciole), et former du CO_2. L'enzyme se libère ensuite pour catalyser une autre réaction (52).

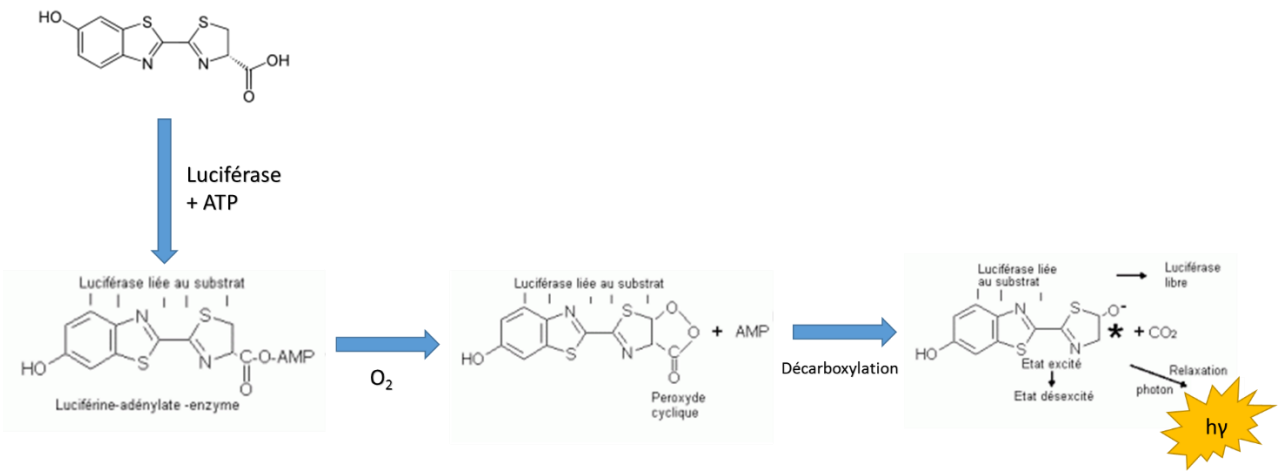
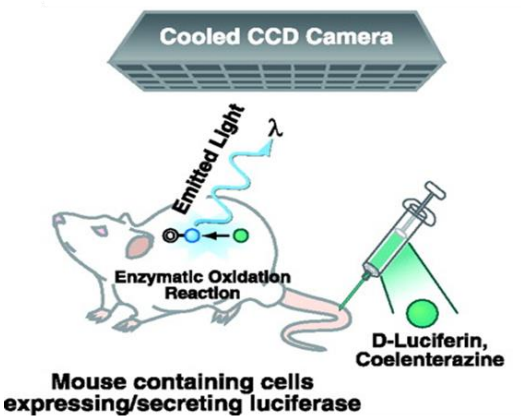


Figure 15: Schéma de l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine

Le génie génétique a permis l'isolement du gène de la luciférase (gène luc) et son insertion dans des bactéries, des virus ou dans des cellules eucaryotes (cellules tumorales pour la recherche en oncologie ou encore cellules embryonnaires pour développer des souris transgéniques).

La bioluminescence est fréquemment utilisée pour suivre des phénomènes biologiques tels que le développement tumoral. En effet, les cellules tumorales modifiées expriment stablement le gène de la

luciférase puis sont implantées chez les animaux. Dans ces modèles bioluminescents de cancer, l'émission de lumière est corrélée à l'expression du gène luc et, par extrapolation, au nombre de cellules tumorales exprimant le gène.



Points forts
- Faible coup
- Bonne sensibilité
- Bonne résolution temporelle
- Simple d'utilisation
- Non-ionizing radiation

Points faibles
- Limite de pénétration
- Résolution spatiale limitée en profondeur
- Dépendant du métabolisme (Enzyme/substrat, Hypoxie…)
- Adaptabilité à la clinique très limitée

Figure 16: Principe de l'imagerie optique de bioluminescence.

Des cellules dans le modèle animal expriment l'enzyme de la luciférase. L'injection du substrat approprié (la luciférine) permet la mise en œuvre d'une réaction enzymatique. Cette réaction entraine l'émission de lumière détectée par une caméra CCD (Charge Coupled Device) refroidie. Une image est ainsi produite (53).

Cette technique est donc un procédé de choix pour la caractérisation de modèles tumoraux chez la souris, pour la détection précoce du développement tumoral primaire ainsi que le suivi longitudinal de l'apparition de métastases.

1) Suivi de la croissance tumorale par Imagerie de bioluminescence

- IVIS® Kinetic

Ce système est composé de 3 parties (Figure 17**)** : un boîtier hermétique contenant une caméra, une source lumineuse et un masque d'anesthésie, un système d'anesthésie contrôlant notamment le pourcentage en air et en isoflurane. Enfin, l'acquisition et l'analyse d'images s'effectue avec le logiciel Living Image, ce logiciel contrôle également la caméra.

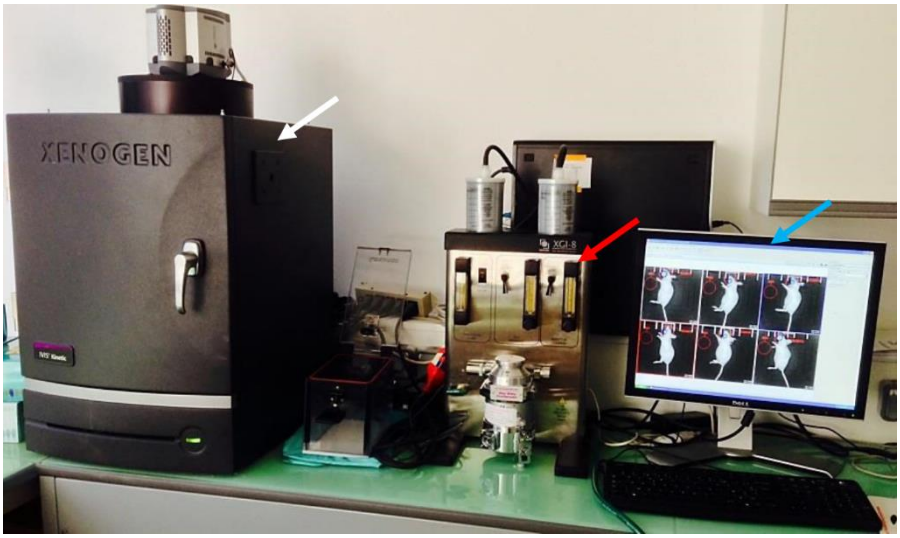


Figure 17: Système d'imagerie IVIS Kinetic (Caliper Life Science)
Boîtier hermétique (flèche blanche) contenant une caméra, une source lumineuse ; système d'anesthésie (flèche rouge) ; ordinateur de contrôle (flèche bleue).

Une acquisition en bioluminescence se déroule de la façon suivante : la souris reçoit une injection intrapéritonéale de 300 µl d'une solution de luciférine à 10 µM (soit 150 mg/kg). Le signal de bioluminescence augmente à partir de l'injection pour atteindre son maximum au bout de 5 minutes (Figure 18) et sera stable pendant environ 15 minutes. Il faut donc réaliser l'acquisition entre 5 et 20 minutes après injection de luciférase afin d'obtenir un signal homogène tout au long de la cinétique.

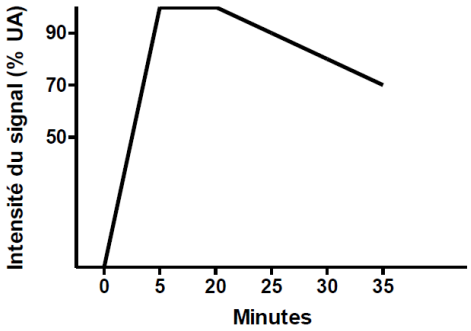


Figure 18: Cinétique du signal de bioluminescence après injection intra péritonéale de luciférine.

De plus, il est important que l'animal soit éveillé pendant 5 minutes environ après l'injection de luciférine afin que la réaction puisse avoir lieu. En effet, l'ATP étant nécessaire à la réaction, si l'animal est endormi, la quantité d'ATP sera plus faible et la réaction prendra donc plus de temps. La souris est ensuite placée sous anesthésie gazeuse et l'acquisition de l'imagerie en bioluminescence est réalisée. La partie optique de l'IVIS® Kinetic est composée d'une caméra EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) de 13,3 mm², permettant l'acquisition d'un champ de 1024x1024 pixels de 13 microns de largeur.

Celle-ci est refroidit à -80°C permettant de réduire le bruit électronique.

2) Quantification des images

Lors de l'acquisition, le logiciel génère deux images, une image en noir et blanc et une image correspondant au signal de bioluminescence. Le logiciel va ensuite réaliser une superposition automatique des deux images en utilisant le meilleur réglage de contraste possible. Cette image superposée présente le signal luminescent en fausses couleurs. Il réattribue pour cela à chaque valeur de niveaux de gris de l'image brute une fausse couleur prédéterminée (Figure 19).

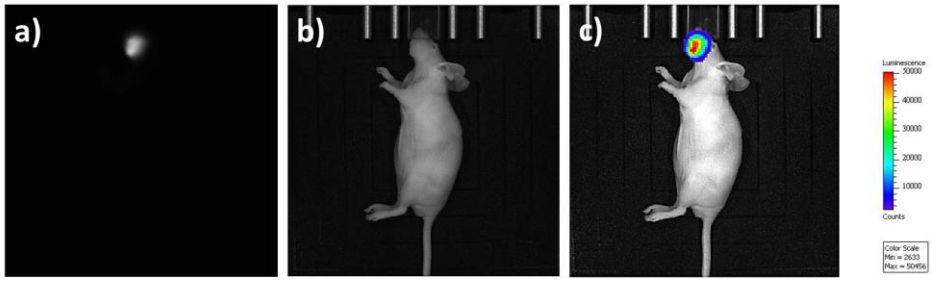


Figure 19: Images obtenues après acquisition en bioluminescence sur l'IVIS Kinetic.
a) Image brute du signal luminescent ; b) image brute en noir et blanc ; c) superposition des deux images précédentes avec signal luminescent en fausses couleurs.

A partir de cette image en fausses couleurs, des régions d'intérêts (ROI : Regions Of Interest) sont dessinées afin de quantifier le signal de bioluminescence. Les résultats sont exprimés en photons par seconde (p/s/cm^2/sr), après soustraction automatique du bruit de fond. Pour chaque image, le logiciel rapporte la valeur quantifiée au temps d'exposition pour homogénéiser le signal si le temps d'exposition varie entre deux acquisitions.

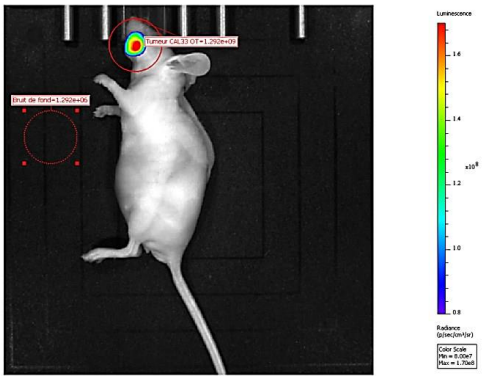


Figure 20: Création de ROI avec le logiciel Living Image (Caliper Life Sciences)
La tumeur (rond plein) et le bruit de fond (rond pointillée).

En parallèle les tumeurs sont suivies par mesure au pied à coulisse dès leur apparition macroscopique.

2. L'imagerie de fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule (généralement par absorption d'un photon) immédiatement suivie d'une émission spontanée.

Une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) peut absorber l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) ce qui entraine son excitation à des niveaux vibrationnels élevés. Le retour à l'état fondamental s'effectue par conversion interne puis par l'émission de photons correspondant à la fluorescence (lumière d'émission). La particularité de la fluorescence est que la longueur d'onde d'émission est supérieure à la longueur d'onde d'excitation. C'est ce qu'on appelle le déplacement de Stockes. L'énergie étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde, l'énergie émise sera plus faible que l'énergie d'excitation (figure 21).

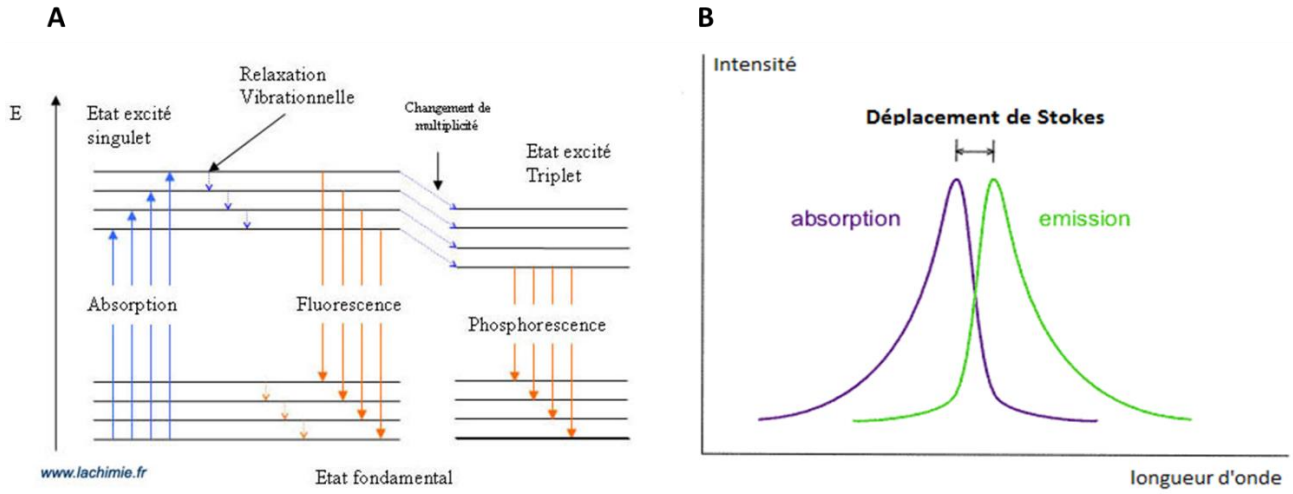


Figure 21: (A) Ce diagramme illustre les différentes transitions électroniques et les différents phénomènes de désexcitations possibles. (B) Spectre de fluorescence d'une molécule avec son spectre d'excitation et d'émission de fluorescence.

L'imagerie de fluorescence *in vivo* présente une très forte sensibilité (<1 pmol) qui permet de visualiser des phénomènes moléculaires de façon non invasive chez le petit animal vivant. C'est une imagerie en temps réel qui permet le suivi *in vivo*. Par contre cette approche 2D est qualitative et semi quantitative.

Cette technique est peu couteuse tant pour l'achat des équipements que pour le fonctionnement qui ne nécessite pas d'infrastructure particulière.

Les applications précliniques chez le petit animal sont multiples : études pharmacocinétiques de biodistribution de nouveaux composés thérapeutiques, recherche et développement de nouveaux biomarqueurs. Il existe également des applications cliniques chez l'homme dans des contextes où l'épaisseur des tissus à traverser est modérée : pour le diagnostic du cancer du sein ou de la prostate, en endoscopie pour la détection de polypes précancéreux dans le colon, en per opératoire pour la détection du ganglion sentinelle ou encore pour assister le geste chirurgical de résection tumorale.

V. Evaluations biologiques ex-vivo

1. Tests d'inhibition de l'adhésion cellulaire

Ce test d'inhibition de l'adhésion cellulaire a pour but de mesurer la capacité des conjugués à bloquer les intégrines $\alpha_v\beta_3$ des cellules (HEK293-β_3), leur interdisant ainsi de se fixer sur leur ligand naturel, la vitronectine.

Une couche de vitronectine (5µg/ml) est déposée pour tapisser le fond du puits (plaque 96 puits) et incubée pendant 1h. Les puits sont alors lavés et une solution de BSA 3% (Albumine de Sérum Bovin) est incubée pendant 1h: elle sert à bloquer les interactions non-spécifiques des intégrines avec le plastique non couvert de vitronectine (Figure 22).

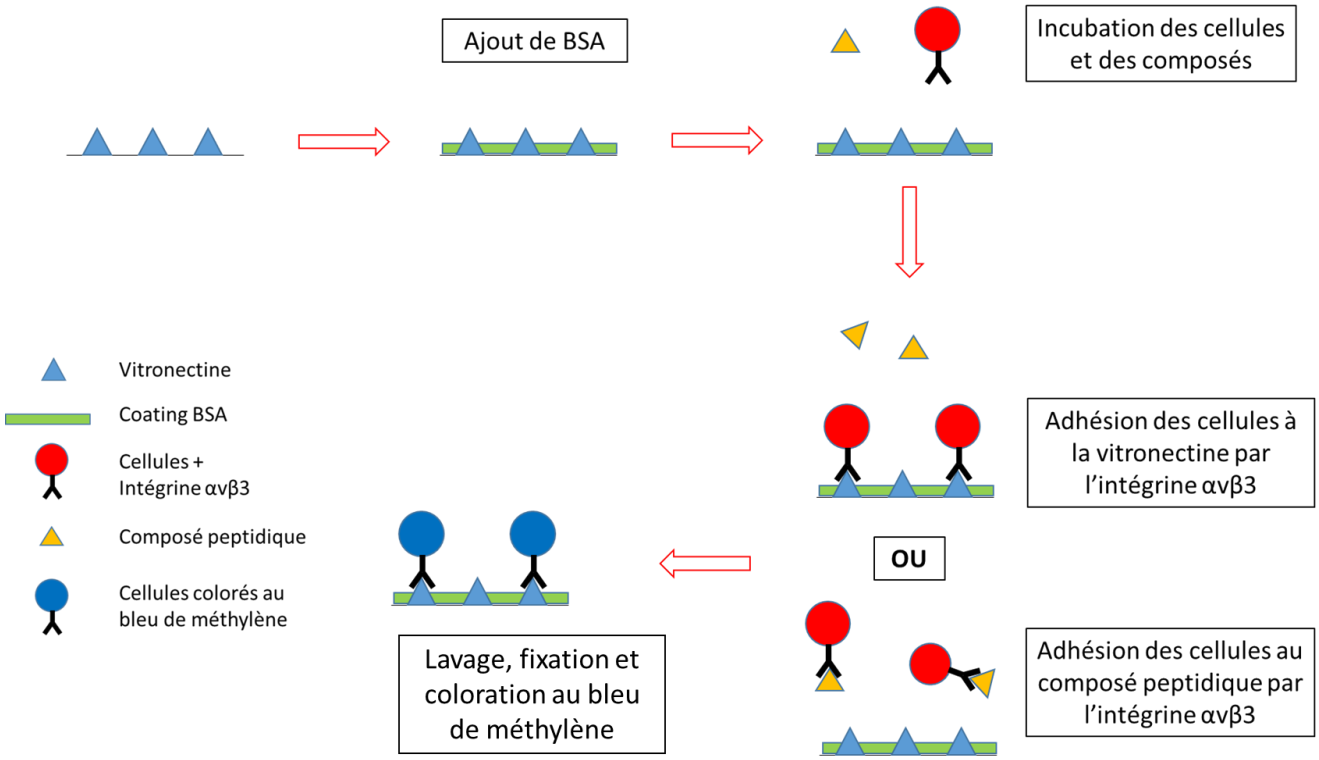


Figure 22: Schéma des principales étapes du test d'inhibition de l'adhésion des cellules HEK293-β3 à la vitronectine.

Les composés à tester sont co-incubés pendant 30 minutes à 37°C en présence de cellules HEK293-β_3 (25 000 cellules par puits) dans du PBS complémenté en Ca^{2+}/Mg^{2+}. Les cellules et les composés restés en suspension sont ensuite éliminés par lavage au PBS. Les cellules adhérant à la vitronectine sont fixées à l'éthanol absolu avant d'être colorées avec du bleu de méthylène. Après lavage, les cellules sont lysées avec une solution d'acide chlorhydrique a 0,1 M. L'intensité de la coloration bleue de chaque puits (lecteur de D.O.) est proportionnelle au nombre de cellules adhérant à la vitronectine. La lecture de l'absorbance se fait à 620 nm.

En comparant les résultats obtenus avec les puits de la condition témoin (cellules seules sans composé) et ceux obtenus en présence de conjugué, il est alors possible de déterminer un pourcentage d'inhibition de l'adhésion des cellules HEK293-β_3. Pour chaque concentration testée, le test de compétition est réalisé trois fois.

2. Etude *in cellulo* par microscopie confocale

1) Principe de la microscopie confocale

Un microscope confocal est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». Ses sections optiques sont obtenues en éliminant la lumière provenant de coupes optiques supérieures et inférieures au plan focal.

En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles nous pouvons obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est donc pas directement observé par l'utilisateur ; celui-ci voit une image recomposée par ordinateur.

Le microscope confocal fonctionne en lumière réfléchie ou en fluorescence. La plupart du temps, un laser est utilisé comme source de lumière. On parle alors de microscope confocal à balayage laser.

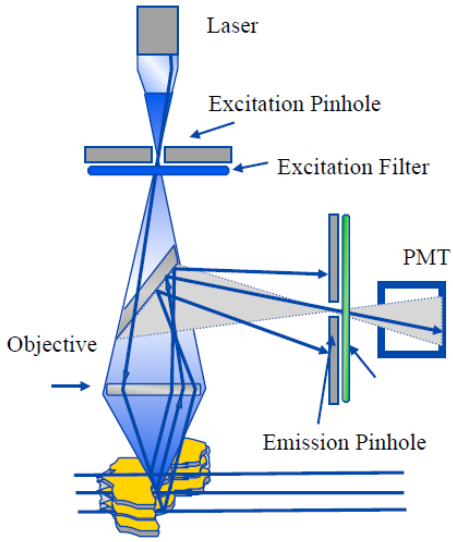


Figure 23: Schéma des principales étapes du test d'inhibition de l'adhésion des cellules HEK293-β3 à la vitronectine.

2) Observation qualitative sur la morphologie des cellules et l'internalisation des conjugués peptidiques

L'utilisation de la microscopie confocale nous a permis de localiser les conjugués fluorescents lorsqu'ils sont incubés avec différents types cellulaires et d'évaluer s'ils interagissent avec les cellules et s'ils sont internalisés. En effet, la liaison au ligand multivalent peut engendrer des phénomènes cellulaires comme l'endocytose (54) et le cluster Raft(cRGD)$_4$ a des propriétés d'internalisation récepteurs-dépendante (4,58).

Les cellules sont cultivées dans des plaques 16 puits dans lesquelles sont déposées des lamelles de verre. Une fois que les cellules ont adhéré à la lamelle, elles sont incubés 30 minutes à 37°C en présence du composé (à 3 concentrations : 0,1 ; 1 et 10 µM) dans du PBS Ca^{2+} /Mg^{2+}. Apres rinçage, les cellules sont fixées et leur ADN nucléaire marqué avec du colorant de Hoechst (Sigma).

Apres rinçage, les lamelles sont déposées sur des lames de microscopie et les cellules sont observées au microscope confocal (Microscope confocal multiparamétrique LSM710 – Logiciel ZEISS).

3. Etude par cytométrie en flux.

1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de mesurer certaines caractéristiques individuelles de cellules présentes dans une suspension comme leur taille, granulosité ainsi que l'intensité de fluorescence en cas de marquage. L'analyse consiste à faire passer une à une des cellules en suspension entrainées par un flux liquide devant un ou plusieurs faisceaux lasers. Les signaux émis par chacune de ces cellules sont alors filtrés puis collectés grâce à des détecteurs ce qui permet, après traitement du signal, la détermination des différents paramètres cités précédemment.

Dans notre cas la cytométrie permet d'évaluer la liaison des polymères peptidiques fluorescents sur les cellules exprimant plus ou moins l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

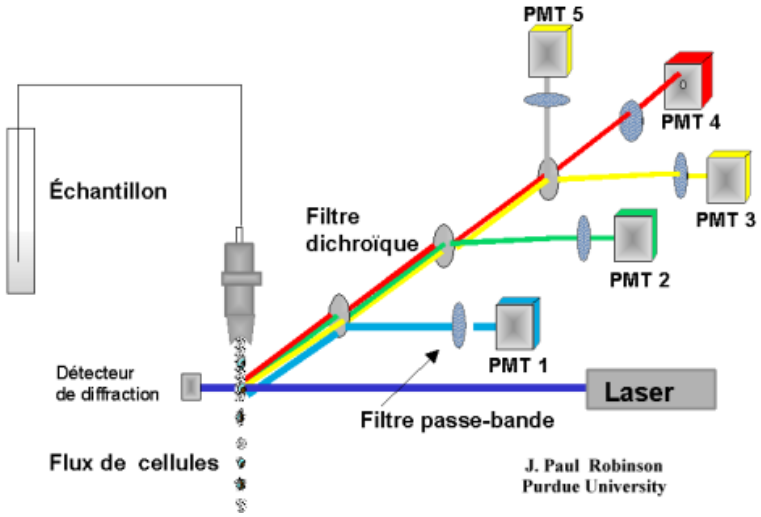


Figure 24: Schéma du principe de la cytométrie en flux
Documents de J. Paul Robinson Purdue University

2. Préparation des échantillons

Les cellules sont trypsinées puis centrifugées 5 minutes à 1200 rpm.

Après un rinçage à l'aide de PBS contenant 1 mM de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (PBS++), 10^6 cellules par condition sont incubées 30 minutes en présence de 200 µl d'une solution de peptides dilués dans du PBS à la concentration désirée (1 µM, 5 µM ou 10 µM), dans l'obscurité et à 37°C. Après 2 rinçages avec du PBS et une centrifugation de 5 minutes à 1200 rpm, le culot cellulaire est repris dans 500µl de PBS et les cellules sont analysées sur le cytomètre en flux.

3. Accuri C6

Toutes les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées sur l'Accuri C6 (BD Biosciences) (Figure 25).



Figure 25: Cytomètre Accuri C6. (56)

Cet appareil à l'avantage d'être extrêmement compact et très simple d'utilisation grâce à son logiciel Cflow Plus qui permet le contrôle de l'instrument, la création de données statistiques et l'analyse des résultats. L'Accuri C6 est composé de 6 détecteurs distincts, les deux premiers concernent les paramètres de taille et de granularité et quatre concernent la fluorescence.

Pour nos acquisitions nous utiliserons les réglages suivant :

- Laser 640 nm :
  - FL4 : filtre passe bande : 675/25nm

L'Accuri C6 fait partie de la plateforme de cytométrie en flux de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences et est contrôlé chaque jour à l'aide de billes commerciales. Ces billes fluorescentes permettent de vérifier la calibration de l'appareil, notamment le débit (en événements par secondes (eps)) la taille, la granulométrie et la fluorescence détectée par le cytomètre.

VI. Evaluations biologiques *in vivo* des nanoparticules AGuIX®

1) Biodistribution des conjugués

Cette étude permet d'évaluer la biodistribution des conjugués, et ainsi de définir leurs voies d'élimination ainsi que leur capacité à s'accumuler dans les tumeurs.

Après anesthésie gazeuse de la souris, les conjugués sont injectées par voie intraveineuse (IV) dans la veine de la queue des souris (200µL). Les images de fluorescence ont été effectuées avant injection et à différents temps après l'injection (30min, 1h, 3h, 5h, 24h).

Les souris sont éclairées par une lumière monochromatique à 660 nm, la fluorescence réémise passe par un filtre (passe-haut à 665nm), puis est captée par la caméra (Hamamatsu OrcaIIBT-512G), préalablement refroidie à -70°C. Les images sont analysées à l'aide du logiciel Wasabi (Hamamatsu).

Après 24h, les souris sont sacrifiées et les organes extraits sont imagés afin de réaliser une évaluation semi-quantitative de la fluorescence dans les organes *ex vivo*.

2) Cinétique sanguine des conjugués chez la souris

Avant injection chez la souris, une gamme de fluorescence des conjugués peptidiques est réalisée sous une caméra CCD (caméra Hamamatsu OrcaIIBT-512G) avec une lumière d'excitation à 660 nm et un filtre passe haut 665 nm pour capter la lumière d'émission.

Une injection intraveineuse des conjugués est réalisée sur 3 souris par composé.

Les prélèvements sanguins sont effectués en entaillant légèrement le bout de la queue des souris. Ces prélèvements sont effectués à différents temps (15min, 30min 1h, 2h, 3h, 5h, 7h, 24h). Le sang est centrifugé et une goutte de sérum est prélevée pour être imagée (de la même manière que la gamme).

3) L'exérèse chirurgicale des tumeurs

19 jours après les implantations orthotopiques, le Dr. Quatre procède à leur explantation macroscopiquement.

Tout d'abord les souris sont anesthésiées chimiquement. Une incision est effectuée sur la partie externe de la joue puis la tumeur est prélevée (Figure 26).



Figure 26: Exérèse d'une tumeur orthotopique.

L'incision est ensuite suturée à l'aide de fils résorbables (Figure 27). Afin de prévenir la douleur entrainée par l'opération chirurgicale, une injection sous-cutanée de buprénorphine (0.1 mg/kg) est réalisée.



Figure 27: Exérèse d'une tumeur orthotopique.
a) juste après exérèse complète ; b) 4 à 7j après exérèse complète d'une tumeur orthotopique.

La souris est complètement cicatrisée 4 à 7 jours après l'explantation de la tumeur.

4) Irradiation des tumeurs Cal33-luc

1) Protocole d'irradiation des tumeurs primaires de cancer VADS

Pour l'administration intra-tumorale, les souris ont reçu une injection de 40 µl d'une solution AGuIX® ([Gd3 +] ~ 100 mM) directement dans la tumeur, et pour l'injection intraveineuse, 200 µl d'une solution AGuIX® ([Gd3 +] ~ 50 mM) ont été injectées dans la veine caudale. Elles sont anesthésiées chimiquement par injection de 100µL/g d'une solution de Médétomidine/Kétamine décrite précédemment.

Le premier protocole est réalisé sur une tumeur orthotopique primaire. Suite à l'étude de la biodistribution des particules dans différents modèles des cancers des voies aérodigestives, le modèle Cal33-Luc a été sélectionné car nous obtenons un ratio de signal tumeur/peau important.

Avant le traitement, le volume de la tumeur a été évalué à l'aide d'un pied à coulisse et les souris ont été randomisées en 5 groupes en fonction du volume tumoral :

_ Groupe témoin (n = 10, administration des nanoparticules par voie intraveineuse n=5 ou intra-tumorale n=5),

_ Irradiation seule (aucune administration de particules irradiation) (n = 11)

_ Irradiation 1 h après l'administration intra-tumorale d'AGuIX® (n = 11),

_ Irradiation 5 h après l'administration intraveineuse d'AGuIX® (n = 11),

_ Irradiation 24 h après l'administration intraveineuse d'AGuIX® (n = 11)

La première irradiation est réalisée 12 jours après l'implantation orthotopique à une seule dose de 10 grays (Gy). La zone d'irradiation a été calibrée par un dosimètre, le flux d'irradiation étant de 1,58 Gy/minutes pour atteindre une irradiation de 10 Gy nous avons donc irradié les tumeurs pendant 5,3 minutes.

Au vu des résultats, une seconde irradiation à 5 Gy est délivrée 34 jours après l'implantation de la tumeur.

2) Protocole d’irradiation des rechutes tumorales.

19 jours après les implantations orthotopique des tumeurs Cal33-Luc, la chirurgie d’exérèse tumorale est réalisée. La cicatrisation et la rechute tumorale sont survit.

L’irradiation a été réalisée 22 jours après l’exérèse chirurgicale pour permettre la rechute tumorale chez la majorité des souris tout en limitant la taille des tumeurs. Ce paramètre est pris en compte pour que la distribution des particules soit optimale. En effet, lorsque la tumeur grossit, elle risque de devenir nécrotique et moins vascularisée en son centre. Une dose de 10 Gy est délivrée.

Après injection de 200 µl d'une solution d’AGuIX® ([Gd^{3+}] à 50 mM) dans la veine caudale de la souris, les souris sont anesthésiées chimiquement par injection de 100µL/g d'une solution de Médétomidine/Kétamine décrite précédemment. L'irradiation est réalisée 15 minutes après l'injection des nanoparticules.

Pour l’étude de l’efficacité thérapeutique des nanoparticules en tant qu’agent radiosensibilisants lors de la rechute tumorale, les souris ont été réparties en 3 groupes :

_ Groupe Contrôle (sans irradiation) n=10

_ Irradiation seule n=13

_ Injection IV AGuIX + Irradiation n=13

La zone d'irradiation a été calibrée par un dosimètre, le flux d'irradiation est mesuré 3 fois et est définit en Gy/minutes. Pour atteindre la dose d’irradiation souhaitée, nous avons donc irradié les tumeurs pendant plusieurs minutes.

La radiothérapie a été réalisée sur le site de l'ESRF, sur un irradiateur petit animal. (Figure 28)



Figure 28: Souris placée dans l’irradiateur petit animal. La zone éclairée correspond au champ d'irradiation.

5. Histologie

1) Inclusion et congélation

Directement après le prélèvement, les échantillons sont inclus dans du Tissue-Tek® O.C.T. ™ (Optimal Cutting temperature). Il s'agit d'une formulation de glycols et résines solubles dans l'eau permettant la coupe des tissus congelés. Une fois le tissu entièrement recouvert d'O.C.T, l'échantillon est placé sur de la carboglace pour une descente en température très lente. Cela aura pour effet une meilleure préservation de l'intégrité tissulaire. Les tissus inclus en O.C.T seront conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2) Coupes au cryostat

Les échantillons congelés sont coupés au cryostat Leica CM3050 S (Figure 29) à -20°C à une épaisseur de 7 µm. L'échantillon est fixé sur le porte-objet à l'aide d'O.C.T liquide et les coupes sont réalisées et déposées sur des lames. Après une nuit à température ambiante, les lames sont conservées à -20°C dans une boîte hermétique.



Figure 29: Cryomicrotome Leica CM3050 S.

3) Marquage Hématoxyline & Éosine

L'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rouge permettant ainsi de visualiser la structure tissulaire et de discriminer tissus sains et tumoraux.

La coloration est réalisée grâce à des bains d'hématoxyline et d'éosine, 3 minutes pour chaque colorant. Un lavage à l'eau courante est effectué après chaque coloration. Pour finir, les lames sont fixées dans 2 bains successifs d'alcool (éthanol 100°) puis un bain de xylène qui permettra le montage des lames. Le montage des coupes entre lames et lamelles est fait à l'aide d'un liquide de montage (Merckoglass™). Après séchage, la lame sera prête à être observée au microscope

Résultats

I. Evaluations biologiques des conjugués linéaires polymère-clusters peptidiques

La synthèse de macromolécules ciblantes est une piste importante dans la recherche de nouveaux traitements anticancéreux. Dans ce contexte, une première partie de mon projet a consisté à à nous caractériser et l'évaluer biologiquement *in vitro* et *in vivo* différents types de sondes polymères (pour la description précise, voir partie II, 1).

Les évaluations biologiques ont tout d'abord pour objectif de déterminer si les clusters peptidiques Raft(cRGD)$_4$ conservent leur affinité pour les intégrines αvβ3 après leur couplage sur les chaînes polymères, et d'évaluer l'influence du nombre moyen de clusters peptidiques par chaine (np) sur cette affinité. Pour cela, les quatre conjugués polymère-clusters non fluorescents (Tableau 2) ont été confrontés au cluster Raft(cRGD)$_4$ seul lors d'un test d'inhibition de l'adhésion cellulaire.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer si les conjugués avaient la capacité de s'internaliser de manière sélective dans des cellules sur-exprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Ainsi, les conjugués polymère-clusters fluorescents (Tableau 4) ont été comparés au cluster peptidique Raft(cRGD)$_4$ seul (marqué par la Cyanine5.5 tétrasulfonatée) par microscopie confocale et cytométrie en flux sur plusieurs lignées cellulaires.

1. Evaluation de l'affinité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$ lors de tests d'inhibition de l'adhésion cellulaire

Les quatre conjugués polymère-peptide non fluorescents 1, 2, 3 et 4 (Tableau 1) comportant en moyenne respectivement 1,5 ; 4, 2 ; 5, 9 et 0 clusters Raft(cRGD)$_4$ par chaîne ont été comparés au cluster Raft(cRGD)$_4$ seul pour évaluer leur affinité envers les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

Pour cela, des tests d'inhibition de l'adhésion cellulaire ont été réalisés. Ils consistent à mesurer la capacité des conjugués synthétiques à bloquer les intégrines $\alpha_v\beta_3$ des cellules, leur interdisant ainsi de se fixer sur leur ligand naturel, la vitronectine (les cellules utilisées sont des cellules humaines embryonnaires du rein, HEK293-β_3).

Chaque composé a été évalué à 9 concentrations différentes en cluster Raft(cRGD)$_4$ comprises entre 0,1 et 10 000 nmol. L^{-1} (nM) Il est très important de noter que ce sont des concentrations exprimées en cluster peptidique Raft(cRGD)$_4$ et non des concentrations en conjugués. Par exemple, pour être à concentration équivalente en cluster Raft(cRGD)$_4$, le conjugué polymère Raft(cRGD)$_4$ porteur de 4,2 Raft(cRGD)$_4$ par chaine en moyenne est testé à des concentrations en composé 4,2 fois moindre que le cluster Raft(cRGD)$_4$ seul.

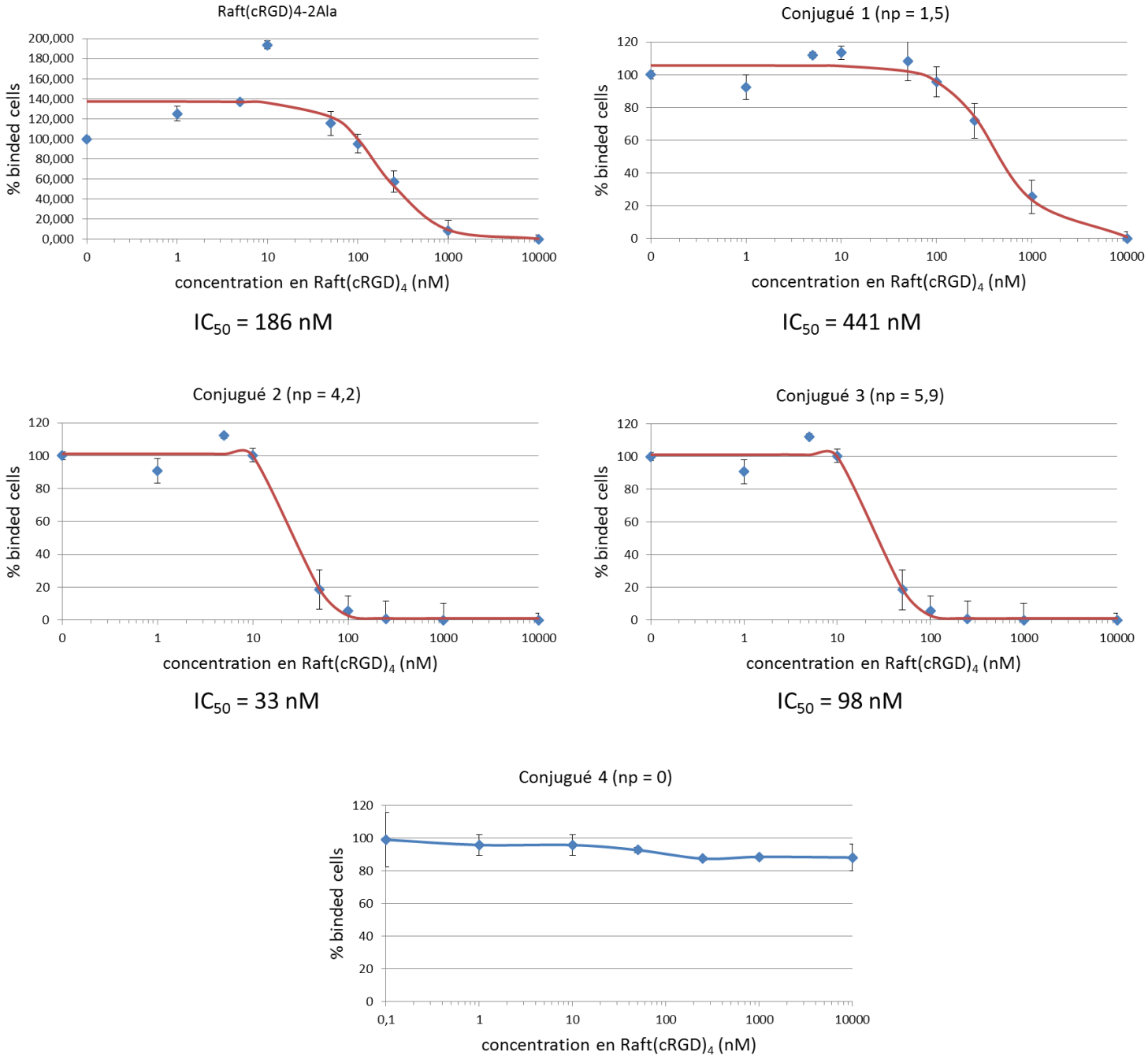


Figure 30: Pourcentage de cellules adhérentes en fonction de la concentration en cluster Raft(cRGD)4 pour le cluster seul et pour les différents conjugués 1, 2, 3 et 4.

Si les conjugués peptidiques testés ont une affinité avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$, une diminution du pourcentage de cellules adhérentes à la vitronectine est alors observée lorsque la concentration du conjugués augmente. Cette affinité est d'autant plus importante que la diminution se produit à des concentrations faibles. Pour mieux comparer quantitativement les différents composés, on note la concentration IC_{50} (en anglais ≪ inhibition concentration ≫) en cluster Raft(cRGD)$_4$, à laquelle 50 % de l'adhésion cellulaire sur la vitronectine est inhibée. Par ailleurs, la concentration IC_{50} en conjugué est obtenue en divisant la valeur précédente par n_p.

Lors de ces évaluations biologiques, il est indispensable de vérifier que les interactions entre les conjugués et les cellules sont bien dues au couple Raft(cRGD)$_4$/intégrine $\alpha_v\beta_3$, autrement dit que le polymère n'induit pas d'interaction non spécifique. Ainsi, pour le conjugué 4 (qui ne comporte pas de cluster peptidique), le pourcentage de cellules adhérentes reste proche de 100 % sur toute la gamme de concentrations testées (aucune valeur d'IC_{50} ne peut être déterminée dans ce cas). Le polymère n'induit donc pas d'interaction non spécifique avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et les cellules.

Composés	n_p	densité moyenne*	IC_{50} en Raft(cRGD)$_4$ (nM)	Efficacité relative en Raft(cRGD)$_4$	IC_{50} en conjugué (nM)	Efficacité relative en conjugué
Raft(cRGD)$_4$ seul	/	/	186 ± 26	1	186	1
Conjugué **1**	1,5	0,003	441 ± 74	0,4	294	0,6
Conjugué **2**	4,2	0,011	33 ± 5	5,6	8	23,3
Conjugué **3**	5,9	0,015	98 ± 19	1,9	17	10,9

Tableau 2: Comparaison des valeurs de IC_{50} exprimées en Raft(cRGD)$_4$ et en conjugué.

* La densité moyenne est égale à n_p divisé par le DP_n du squelette polymère (modèle de chaine complètement étirée).
IC_{50} en Raft(cRGD)$_4$: concentration en cluster nécessaire pour inhiber 50 % de l'adhésion cellulaire à la vitronectine ;
IC_{50} en conjugué : concentration en conjugué nécessaire pour inhiber 50 % de l'adhésion cellulaire à la vitronectine ;
Efficacité relative (exprimée soit en concentration en Raft(cRGD)$_4$, soit en concentration en conjugué) : IC_{50} du cluster Raft(cRGD)$_4$ seul divise par l'IC_{50} du conjugué X ; n_p : nombre moyen de clusters Raft(cRGD)$_4$ par chaine polymère.

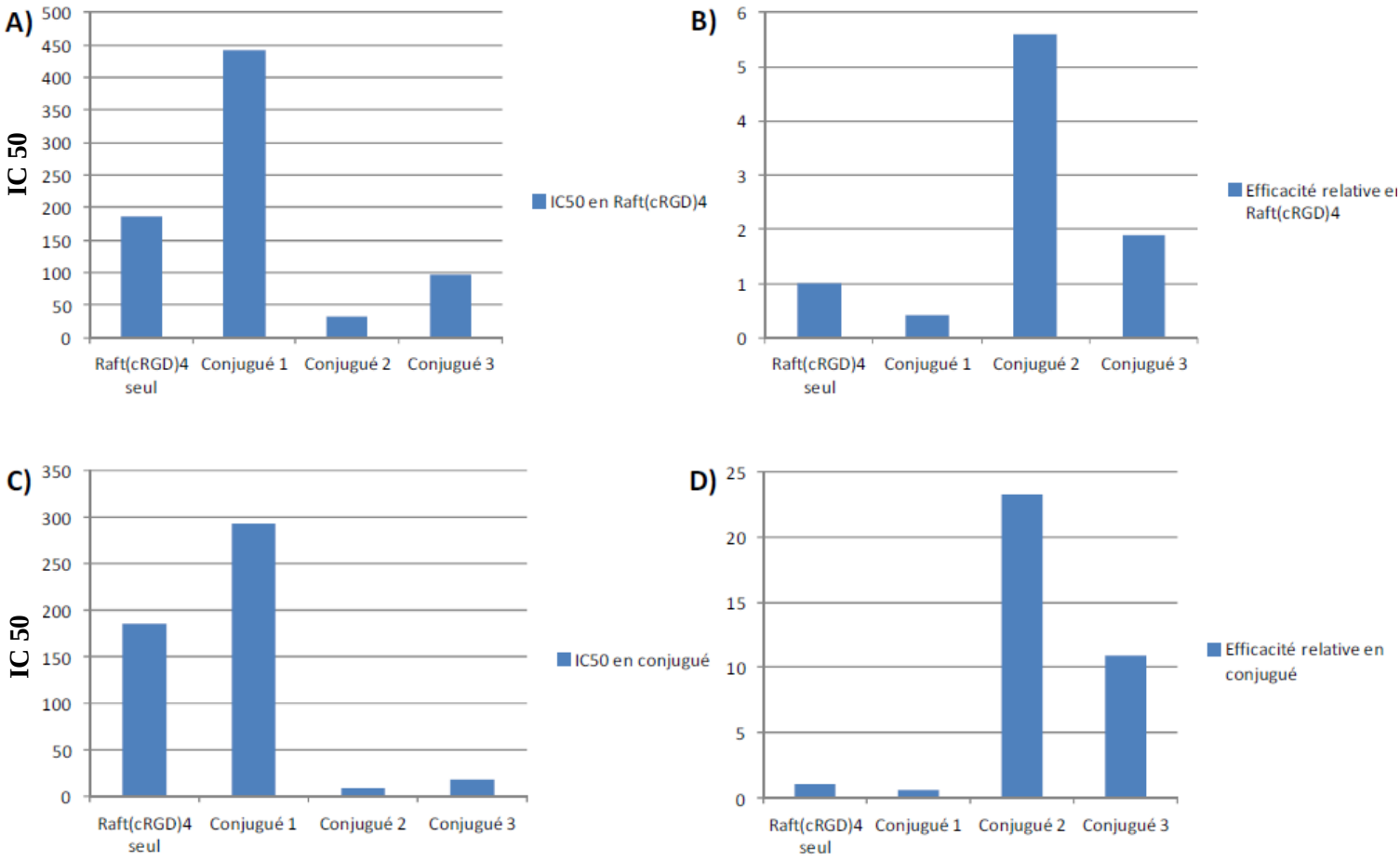


Figure 31: Comparaison des IC50 en Raft(cRGD)4 (A) et en conjugué (C) et des efficacités relatives en Raft(cRGD)4 (B) et en conjugué (D).

Le cluster Raft(cRGD)$_4$ seul fait office de référence pour cette étude et les conjugués peptidiques sont comparés selon deux aspects principaux: l'affinité par conjugué quantifiée par l'IC$_{50}$ en conjugué et l'affinité par Raft(cRGD)$_4$ quantifiée par l'IC$_{50}$ en Raft(cRGD)$_4$. Le conjugué 2 (n_p = 4,2) présente la meilleure efficacité pour se lier aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ suivi par le conjugué 3 (n_p = 5,9) puis par le Raft(cRGD)$_4$ seul et pour finir le conjugué 1 (n_p = 1,5). Les conjugués 2 et 3 ont respectivement une efficacité 23 et 11 fois plus élevée que le cluster Raft(cRGD)$_4$ seul, alors que le conjugué 1 est 1,6 fois moins efficace.

De la même manière, si l'on se réfère aux IC$_{50}$ en clusters peptidiques, les clusters Raft(cRGD)$_4$ portés par le conjugué 2 se lient plus efficacement aux intégrines que ceux du conjugué 3 eux-mêmes plus efficacement qu'un cluster Raft(cRGD)$_4$ libre (IC$_{50}$ respectivement 5,6 et 1,9 fois inférieures). Les clusters Raft(cRGD)$_4$ portés par le conjugué 1 possèdent la moins bonne efficacité (IC$_{50}$ environ 2,4 fois plus élevée que le Raft(cRGD)$_4$ libre).

Pour la suite des évaluations, un fluorophore est greffé sur les polymères. La nature du fluorophore peut avoir une influence sur la conformation spatiale du conjugué. Pour cela, deux fluorophores différents sont greffés sur les différents polymères : une Cyanine 5.5 classique et une Cyanine 5.5 tetrasulfonatée.

Les groupements sulfonates ajoutés modifient la charge des polymères et peuvent influer sur le comportement du composé.

2. Etude *microscopique* des conjugués polymère-clusters Raft(cRGD)$_4$ fluorescents

Au vu des résultats du test d'inhibition de l'adhésion cellulaire, le conjugué 2 (n_p = 4,2) a été choisi pour la suite de l'étude. Sur la base de ce conjugué, différents polymères peptidiques greffés avec un fluorophore ont été synthétisés. Deux fluorophores sont testés ; une cyanine 5.5 et une cyanine 5.5 tétrasulfonatée.

Conjugués	M_n (g.mol^{-1})	n_p	Fluorophore	n_f
Raft(cRGD)$_4$	5060	/	Cyanine5.5 tétrasulfonates	/
5	79 900	4,2	Cyanine5.5	3,6
6	83 800	4,8	Cyanine5.5 tétrasulfonates	3,7
7	63 900	0	Cyanine5.5	3,1
8	65 800	0	Cyanine5.5 tétrasulfonates	3,7

Tableau 3: Récapitulatifs des caractéristiques des conjugués linéaires fluorescents polymère-Raft(cRGD)4.
M_n : Masse molaire moyenne en nombre du conjugué ; n_p : nombre moyen de Raft(cRGD)$_4$ par conjugué déterminé par RMN ^{1}H ; n_f : nombre moyen de fluorophores par conjugué déterminé par CES/UV-visible.

Les conjugués 5 et 7 sont comparés au cluster Raft(cRGD)$_4$ également fluorescent sur 4 lignées cellulaires choisies pour les intégrines qu'elles expriment : Hekβ_3, Hekβ_1, M21 et M21L. Tout comme les cellules Hekβ_3, les cellules M21 expriment les intégrines $\alpha_v\beta_3$ mais dans une moindre mesure (Tableau 4). Au contraire, les cellules Hekβ_1 et M21L n'expriment pas (ou très faiblement) les intégrines $\alpha_v\beta_3$, mais expriment les intégrines $\alpha_v\beta_1$. Le conjugué fluorescent 7, ne comporte pas de cluster peptidique et sert de contrôle. Il est en effet indispensable de démontrer que les interactions observées avec les cellules sont induites par le couple cluster Raft(cRGD)$_4$/intégrine $\alpha_v\beta_3$ et non par des interactions non spécifiques entre le polymère fluorescent et les cellules.

Lignées cellulaires	Expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	Expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_1$	Types de cellules
Hekβ3	++++	-	Cellules rénales embryonnaires humaines modifiées
Hekβ1	--	++++	Cellules rénales embryonnaires humaines modifiées
M21	++	-	Cellules de mélanome humain
M21L	-	+	Cellules de mélanome humain
U87	++	+	Cellules de glioblastome humain

Tableau 4: Niveau d'expression relatif des intégrines αvβ3 et αvβ1 en fonction des lignées cellulaires
Niveau d'expression : - faible ; + moyen ; ++ élevé ; ++++ très élevé.

1) Evaluation de la spécificité et de la sélectivité des conjugués dans les différents types cellulaires.

Les conjugués étant greffés avec un fluorophore, l'utilisation de la microscopie confocale nous permet de visualiser les conjugués lorsqu'ils sont incubés avec différents types cellulaires et d'évaluer s'ils interagissent avec les cellules et s'ils sont internalisés.

- Les images fluorescence ont été normalisés, rendant comparable le marquage des différentes cellules (Figure 32).

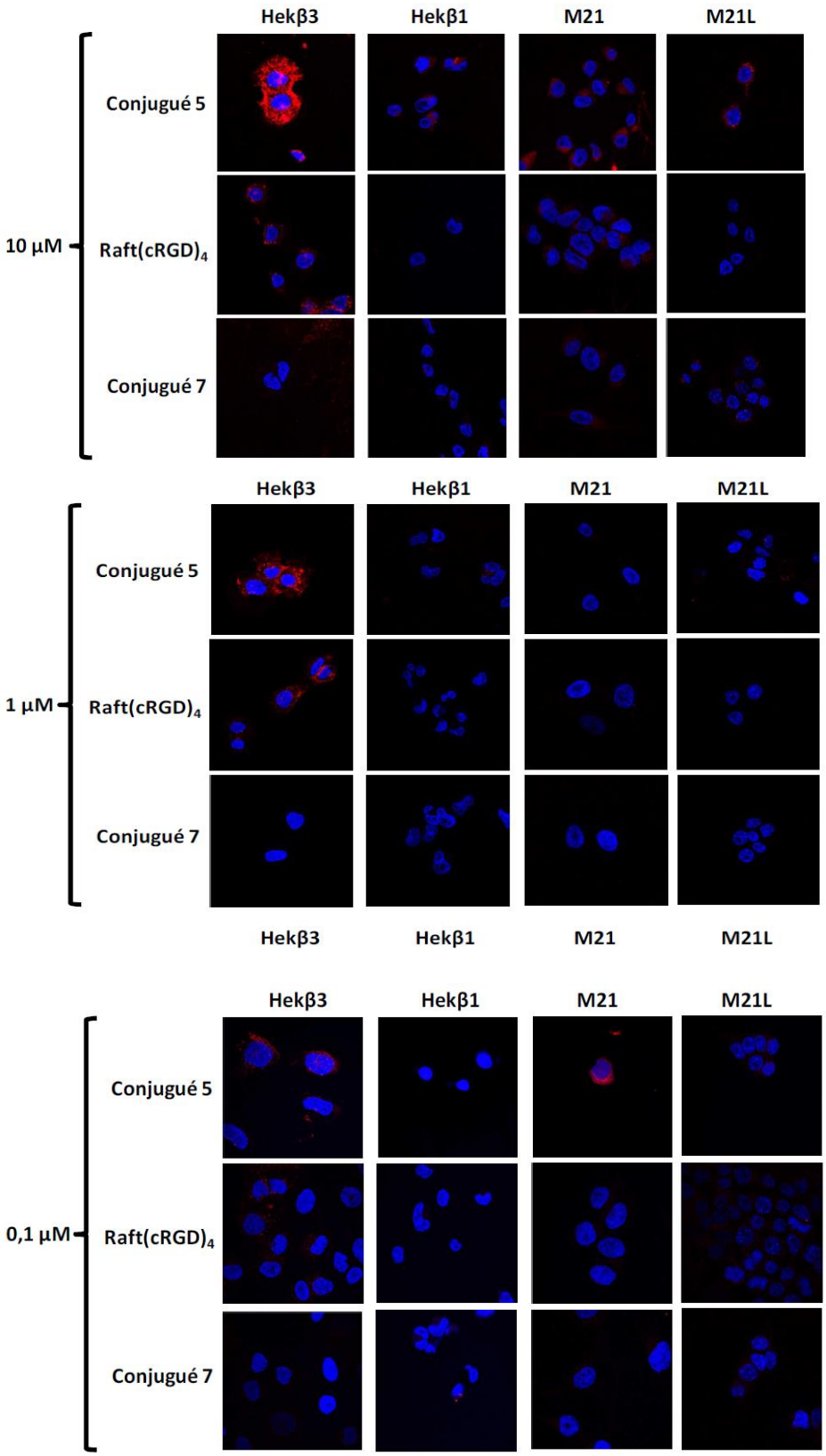


Figure 32: Images de microscopie confocale (plan à mi-épaisseur des cellules) permettant la comparaison du marquage des lignées cellulaires Hek293(β3), Hek293(β1), M21 et M21L par les conjugués 5 et 7 et le Raft(cRGD)4 fluorescents a trois concentrations : 10 µM, 1µM et 0.1µM

- Comparaison des conjugués 5 et 7 :

Le conjugué 5 se lie à la lignée cellulaire Hekβ_3. Le conjugué 7 sans peptide (contrôle) ne marque pas les cellules quelles que soient les lignées, sauf pour la concentration de 10 µM où le marquage est très léger et diffus. Ces résultats montrent qu'il y a peu d'interactions aspécifiques et que ces polymères fluorescents sont faiblement internalisés (par endocytose par exemple) en absence du cluster Raft(cRGD)$_4$, au contraire de ce qui a pu être observé par le passé avec d'autres conjugués polymère-chromophore basés sur des squelettes polymères du même type mais comportant des chromophores non chargés. Cela confirme que la nature des chromophores ainsi que le post-traitement des polymères jouent un rôle important quant au comportement des conjugués *in vitro*

Ainsi, il semble que le marquage des cellules par le conjugué 5 soit dû à la présence des Raft(cRGD)$_4$ et soit donc spécifique.

- Comparaison du conjugué 5 et du Raft(cRGD)$_4$:

Globalement, le conjugué 5 marque très préférentiellement la lignée Hekβ_3 qui exprime le plus l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. On observe un marquage diffus du cytoplasme associé à un marquage beaucoup plus intense (constitué de points très brillants, plus proches du noyau) qui pourrait correspondre à du conjugué internalisé au sein de vésicules endosomales. La lignée M21 est aussi marquée de manière légèrement plus importante que les lignées M21L et Hekβ_1 ce qui va aussi dans le sens d'un accroissement du marquage avec l'augmentation de la présence de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en surface des cellules.

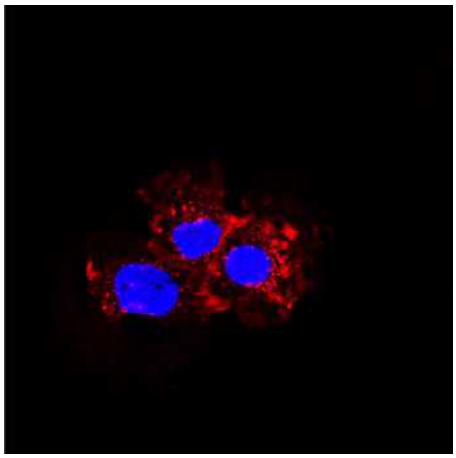


Figure 33: Agrandissement d'une cellule Hekβ3 marquée par le conjugué 5 à une concentration de 1 µM.

A concentration équivalente, le conjugué 5 conduit à une intensité de marquage plus importante que le cluster Raft(cRGD)$_4$. Deux hypothèses peuvent expliquer cette observation :

- le conjugué 5 porteur de plusieurs fluorophores (3,6 par chaine en moyenne) est intrinsèquement plus brillant que le Raft(cRGD)$_4$ qui n'en porte qu'un.

- le conjugué 5 a une meilleure affinité que le cluster Raft(cRGD)$_4$ pour les intégrines $\alpha v\beta 3$, ce qui induit une internalisation et un marquage des cellules plus importants.

Cette étude ne permet pas de dire s'il s'agit plutôt de l'une ou l'autre des hypothèses ou d'une combinaison des deux. Pour cela, il faudrait disposer d'un conjugué avec à la fois une affinité pour les intégrines $\alpha v\beta 3$ identique à celle du conjugué 5 et une brillance identique à celle du Raft(cRGD)$_4$ seul.

Pour la concentration la plus importante de 10 µM (concentration supérieure à celle généralement utilisée *in vitro* (0,1 - 1 µM) ou *in vivo* chez le petit animal (1 à 2 µM)), le cluster Raft(cRGD)$_4$ est sélectif en ne marquant que les lignées Hekβ_3 et M21 qui sur-expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En revanche, le conjugué 5 marque toutes les lignées cellulaires même s'il montre une très nette préférence pour les lignées Hekβ_3 et M21. Comme discuté ci-dessus, il est difficile de savoir si ces observations sont dues à une moins bonne sélectivité des conjugués ou à leur brillance plus importante que le cluster Raft(cRGD)$_4$ libre qui permet de les détecter/visualiser à des concentrations plus faibles. D'autre part, il faut rappeler que les cycles RGD ont une affinité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$ qui est 100 fois plus importante que pour les autres intégrines reconnaissant la séquence RGD comme ligand. Ainsi, il n'est pas impossible qu'une faible quantité de conjugué puisse être internalisée par des cellules présentant très peu d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ mais éventuellement beaucoup d'autres intégrines, comme les lignées M21L et Hekβ_1.

3. Etude par cytométrie en flux

Deux séries d'analyses ont été effectuées : la première avec les conjugués 5 et 7 porteurs de Cyanine5.5 (sans charges sulfonates) et la seconde avec les conjugués 6 et 8 porteurs de Cyanine5.5 tetrasulfonatée. Les conjugués peptidiques ont été testés à deux concentrations : 0,1 µM et 1 µM.

1) Evaluation des conjugués 5 et 7

Quelle que soit la lignée cellulaire, le conjugué 7 (ne portant pas de peptide) n'induit pas de marquage (à 0,1 µM) ou très peu (à 1 µM). Le conjugué 5 marque préférentiellement les lignées cellulaires exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Par conséquent, il semble que le marquage engendré par le conjugué 5 soit spécifique car il résulte de la présence des clusters Raft(cRGD)$_4$ sur le conjugué.

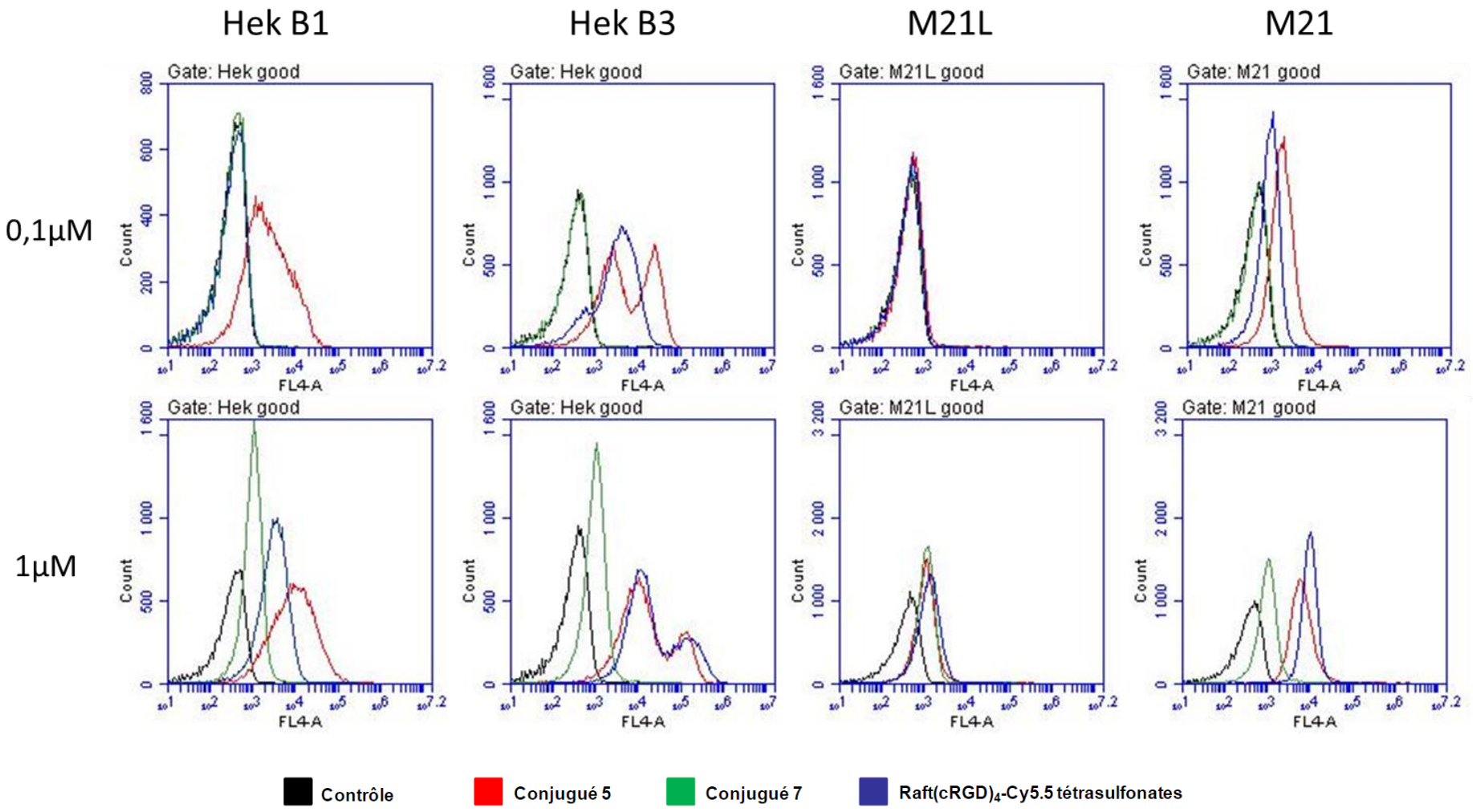


Figure 34: Histogramme comparant les conjugués 5 et 7 porteur de cy5.5 (non sulfonatées) et le Raft(cRGD)4-Cy5.5 tétrasulfonates. Chaque graphique représente la quantité de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée pour chacune d'entre elles.

A 1 µM, le conjugué 5 marque toutes les lignées cellulaires, avec un marquage préférentiel pour les cellules Hek293(β3). Le conjugué 7 marque lui aussi toutes les lignées; cela signifie que ce marquage n'est pas significatif de l'affinité du Raft(cRGD)$_4$ pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

Pour la concentration 0,1 µM, le conjugué 5 et le cluster Raft(cRGD)$_4$ marquent tous les deux les lignées Hek293(β3) et M21, avec un marquage plus important pour la lignée Hek293(β3) ce qui est en accord avec un niveau de surexpression de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ plus important pour cette lignée. Comme attendu, le conjugué 5 ne marque pas la lignée M21L mais marque un peu la lignée Hek293(β1).

A cette concentration le conjugué 7 n'a pas d'affinité pour les cellules ce qui confirme de l'interaction du Raft(cRGD)$_4$ et des intégrines dans le cas du conjugué 5.

2) Evaluation des conjugués 6 et 8

La deuxième série permet de comparer les conjugués 6 et 8 porteurs de Cy5.5 tétrasulfonates au cluster Raft(cRGD)$_4$ également marqué par la Cy5.5 tétrasulfonates (Figure 35). Il est ainsi possible d'avoir un premier aperçu de l'influence de la charge électrostatique des fluorophores couplés sur les conjugués polymériques.

Dans cette étude, une nouvelle lignée est étudiée, la lignée U87MG (cellules de glioblastome). Cette lignée a été choisi en vue de passer aux études *in vivo*. En effet, les cellules U87MG présentent un bon effet EPR accompagné d'une bonne expression des intégrines β3 tout en restant à un niveau « physiologique ».

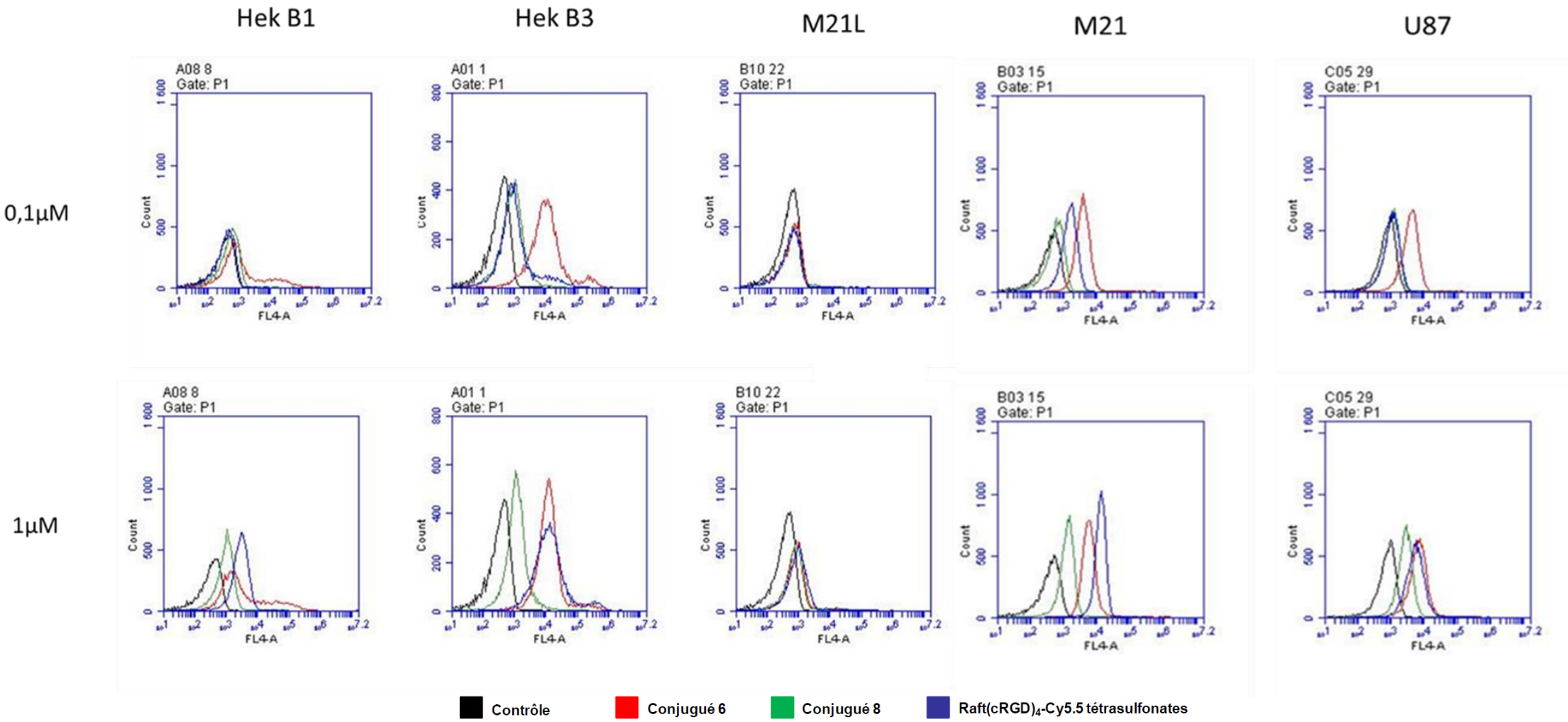


Figure 35: Histogramme comparant les conjugués 6 et 8 porteurs de cy5.5 tétrasulfonatés et le Raft(cRGD)4-Cy5.5 tétrasulfonatés, Chaque graphique représente la quantité de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée pour chacune d'entre elles.

Pour les deux séries, les conjugués peptidiques ont un comportement similaire. Les résultats semblent légèrement meilleurs à la concentration 0,1 μM pour laquelle le conjugué 6 induit moins de marquage non spécifique pour Hek293(β_1) que le conjugué 8 et davantage de marquage que le cluster Raft(cRGD)$_4$.

Pour la lignée U87MG, le marquage par les différents conjugués peptidiques est très proche de celui observé pour la lignée M21 et moins important que pour la lignée Hek293(β_3). Ceci est en accord avec le fait que la lignée Hek293(β_3) surexprime davantage l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ que les lignées M21 et U87MG. De la même manière que les lignées M21 et Hek293(β_3), pour la lignée U87MG, le conjugué 6 induit un marquage supérieur au Raft(cRGD)$_4$ à 0,1 μM alors qu'ils ont un comportement très proche à 1 μM.

4. Etude du comportement des conjugués *in vivo*

L'évaluation *in vivo* des conjugués peptidiques est réalisée sur les conjugués marqués à la Cy5.5 et Cy5.5 sulfonatée. Cela permet d'évaluer les différences de distribution et les différents niveaux de fluorescence des conjugués en fonction de la présence ou non de charges sulfonates et de groupements Raft-(cRGD)$_4$.

La gamme de fluorescence réalisée sous l'appareil d'imagerie après dépôt d'une goutte de conjugué montre que les conjugués ont un niveau de fluorescence différent à concentrations égales (Figure 36). En effet si l'on compare les conjugués 5 et 6 entre eux ou les conjugués 7 et 8, les polymères avec la Cy5.5 sulfonatée semblent plus fluorescents que les polymères Cy5.5. De même si on compare les conjugués 5 et 7 ou 6 et 8, nous observons qu'en présence de Raft(RGD), le niveau de fluorescence des conjugués semble plus faible.

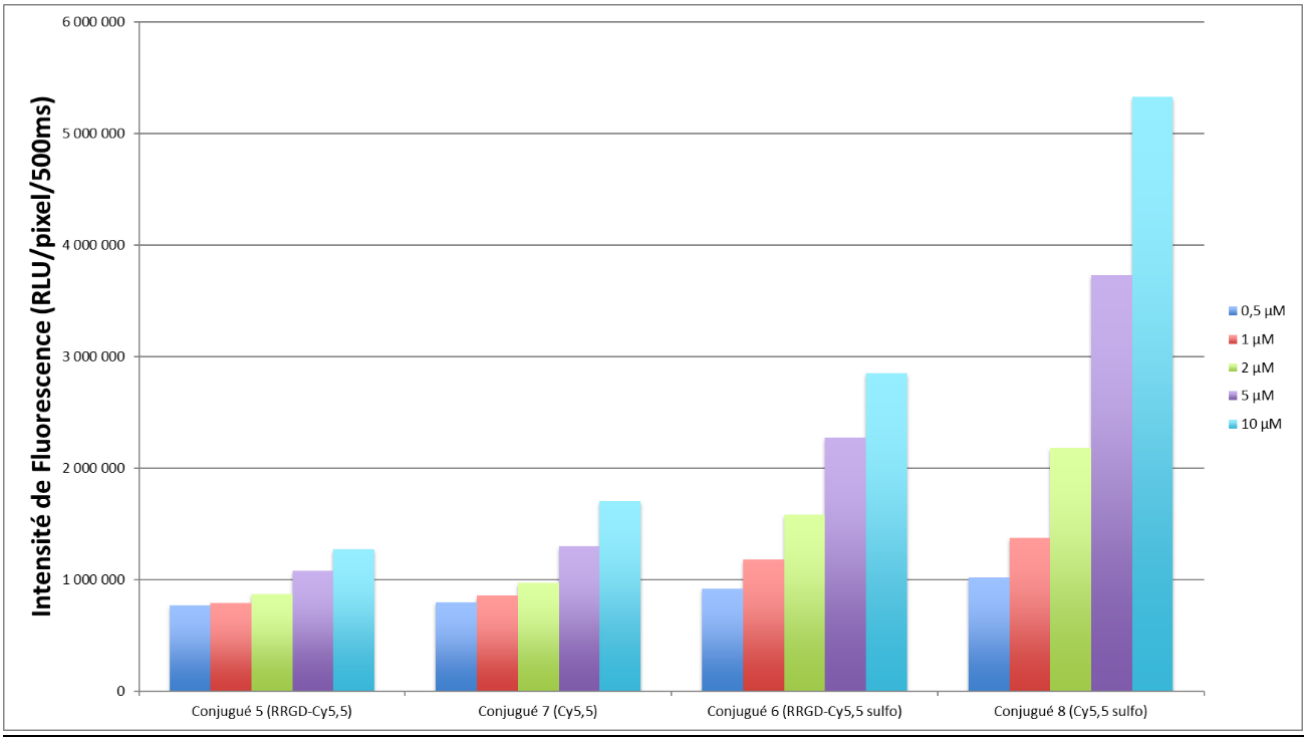


Figure 36: Diagramme de l'intensité de fluorescence des différents conjugués peptidiques.

Suite à cette gamme de fluorescence des conjugués peptidiques, nous avons choisi la concentration à 10 µM pour l'injection *in vivo*. Les conjugués peptidiques sont injectés à concentrations égales en conjugués malgré leurs fluorescences différentes *ex vivo*. Trois souris par composés sont injectées en intraveineuse avec 200µL de solution à 10µM.

Les souris sont imagées sur le flanc et sur le ventre pour avoir une vue d'ensemble de la distribution du conjugué peptidique dans les organes.

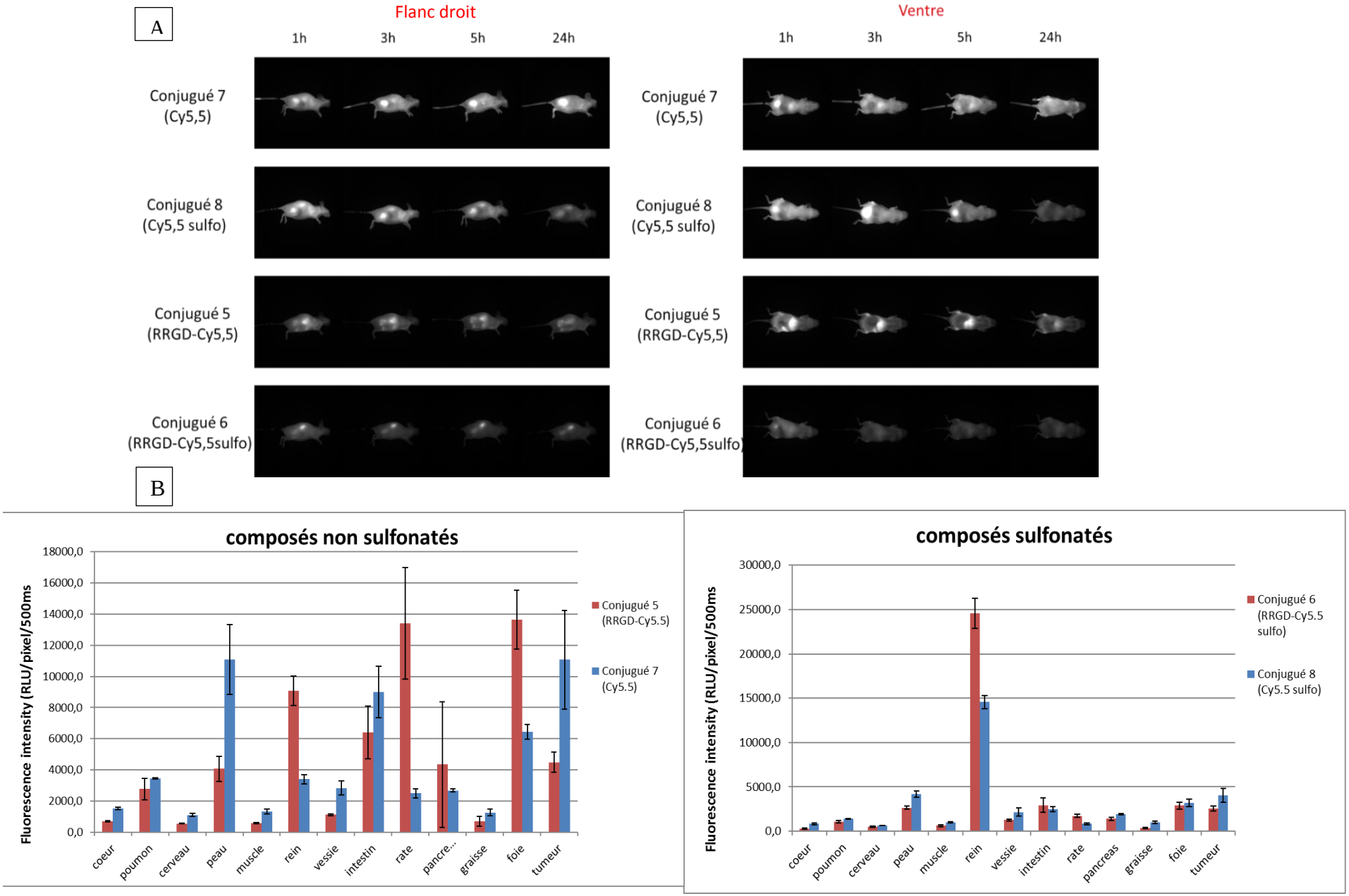


Figure 37: A) Biodistribution in vivo des conjugués chez la souris nude portant une tumeur U87MG. Les images de fluorescence (500 ms de temps d'intégration, le contraste fixé entre 1784-11015) sont obtenues à 1h, 3h, 5h et 24h après injection intraveineuse des conjugués. B) Biodistribution *ex vivo* dans les organes à 24h. Les ROI sont définies sur les organes extraits afin de quantifier la quantité de photons émis par pixel après une exposition de 500 ms

Après analyse des images *in vivo*, nous observons une distribution hétérogène des composés.

Des différences de fluorescence dans le corps de la souris ainsi que des différences au niveau de l'accumulation dans les organes et dans les voies d'élimination sont observées. (Figure 37)

Cette observation est confirmée par les mesures de fluorescence des organes *ex vivo*. En effet on observe une différence de distribution des conjugués avec une cyanine sulfonatée ou non.

Les conjugués greffés avec une Cy5.5 sulfonatée semblent induire une clairance rénale puis une élimination par la vessie alors que les conjugués avec une Cy5.5 classique sont éliminés par la voie hépatique.

Nous observons également une intensité de fluorescence plus faible des conjugués sulfonatés dans les organes à 24h, ce qui traduit une rétention plus faible du composé dans les organes.

En effet, lorsque l'on compare l'intensité du signal de fluorescence dans les tumeurs 24 post-injection (Figure 37), nous constatons que les conjugués non sulfonatés ont un signal plus fort dans la tumeur mais sont moins spécifiques, car une forte accumulation dans d'autres organes comme les intestins, le foie, et la peau est constatée.

Pour les conjugués sulfonatés le signal dans la tumeur est plus faible, ce qui est dû à une meilleure élimination. Cette élimination rapide est bénéfique puisqu'elle permet une rétention passive plus faible dans les autres organes et donc une accumulation plus spécifique dans la tumeur.

Pour confirmer nos observations, une cinétique sanguine a été réalisée. Les composés sont cette fois injectés à des concentrations différentes pour avoir la même intensité de fluorescence.

Les conjugués avec la Cy5.5 sulfonatée sont donc injectés à concentration plus faible car à concentration équivalente ils sont plus fluorescents.

Après le premier prélèvement, 15 minutes après l'injection, on constate que les niveaux de fluorescence sont différents malgré leur étalonnage. La fluorescence est exprimée en pourcentage, avec l'intensité de fluorescence mesurée à 15 minutes comme valeur de référence.

Nous avons choisi de comparer les différents conjugués en fonction de la présence ou non de Raft(cRGD)$_4$ et de la nature de la cyanine 5.5. Pour cela différentes courbes du pourcentage de fluorescence en fonction du temps ont été tracées (Figure 38).

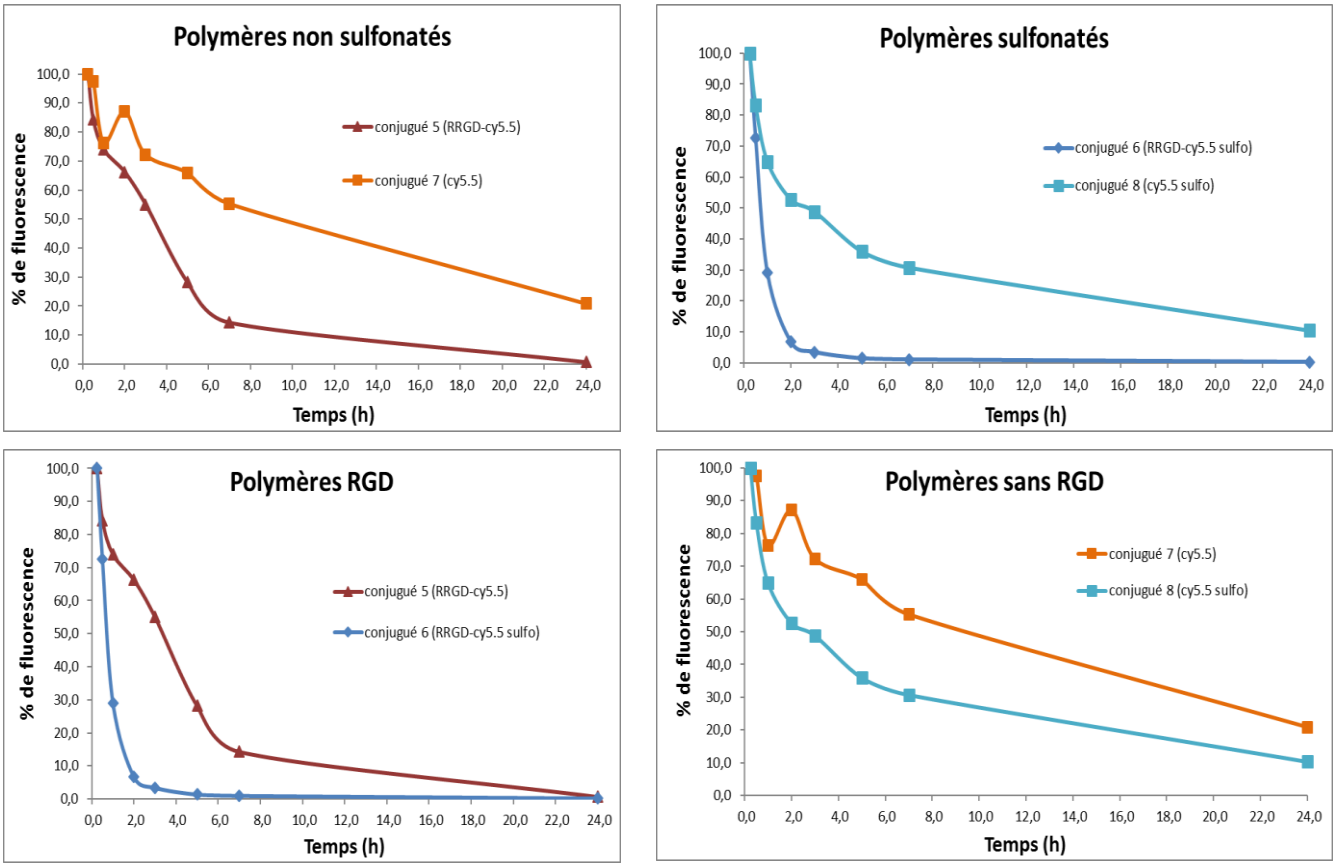


Figure 38: Courbes représentatives du pourcentage de fluorescence en fonction du temps, avec la fluorescence à 15 minutes comme valeur référence.

Dans cette expérience, en comparant les conjugués porteurs de Raft(RGD), nous observons que le groupement peptidique a un effet sur la vitesse d'élimination du conjugué peptidique. Les conjugués porteurs de Raft(RGD) comme les conjugués 5 et 6 ont une élimination plus rapide.

Il en est de même pour les composés portant une cyanine sulfonatée, les conjugués 6 et 8 montrent une élimination de la fluorescence plus rapide que les conjugués 5 et 7 qui n'ont pas de charges sulfonâtes.

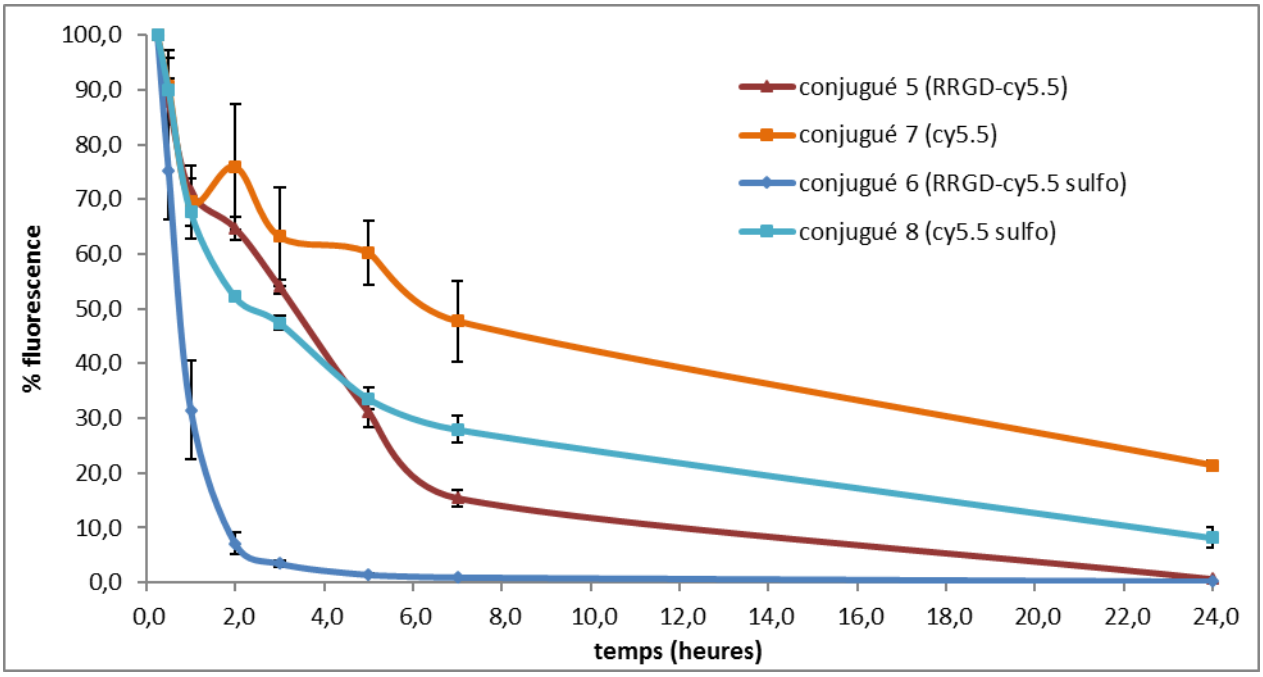


Figure 39: Courbes représentatives du pourcentage de fluorescence en fonction du temps, avec la fluorescence à 15 minutes comme valeur référence.

La décroissance de la fluorescence sanguine n'est pas similaire pour chaque composé. Nous observons différentes pentes correspondant à différentes voies d'élimination de la circulation sanguine.

Cette cinétique sanguine nous montre que les conjugués ont une élimination bien différente en fonction de leur composition.

Le conjugué 6 qui est greffé avec du Raft(cRGD)$_4$ et une cyanine sulfonatée présente une élimination rapide du système sanguin. Son temps de demi-vie est d'environ 24 minutes et après 2h le conjugué est très peu détecté dans le sang.

Le conjugué 5 greffé avec du Raft(cRGD)$_4$ et une cyanine sans sulfonate et le conjugué 8 greffé avec une cyanine 5.5 sulfonatée ont une cinétique assez similaire, leurs temps de demi vie est respectivement de 2h24 pour le conjugué 5 et 3h24 pour le conjugué 8. Ils sont tous les deux détectables très longtemps dans l'organisme. Le conjugué 8 est toujours présent 24h après injection.

Le conjugué 7 greffé avec une cyanine sans sulfonate reste très longtemps circulant dans le corps. Son temps de demi-vie est de 6h24. Environ 20% du signal injecté est toujours détectable 24h après l'injection, ce qui montre que ce conjugué reste circulant beaucoup plus longtemps que les autres.

5. Conclusion sur l'évaluation biologique des conjugués linéaires

L'évaluation de l'affinité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$ a permis de montrer que la présentation multivalente de Raft(cRGD)$_4$ par les conjugués polymère-clusters permet d'obtenir une affinité accrue pour les intégrines $\alpha v\beta_3$ non seulement par conjugué mais également par Raft(cRGD)$_4$. Le conjugué 2 (avec 4,2 Raft(cRGD)$_4$ par chaine en moyenne) présente la meilleure affinité.

Les observations de microscopie confocale ont permis de montrer, comme cela avait déjà été observé pour le Raft(cRGD)$_4$, que le conjugué 5 (polymère portant 4 molécules Raft(cRGD)$_4$ Cy5.5) est internalisé. Il induit un marquage plus important que le Raft(cRGD)$_4$ à concentration équivalente et son marquage est spécifique. Le conjugué 5 induit un marquage très préférentiel des cellules sur-exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ même s'il semble légèrement moins sélectif que le Raft(cRGD)$_4$ car on observe un marquage des cellules n'exprimant pas l'intégrine $\alpha v\beta_3$.

Ces observations ont été confirmées par l'analyse de cytométrie en flux, celle-ci montre que les conjugués 5 et 6 greffés avec ± 4 clusters Raft(cRGD)$_4$ marquent spécifiquement les cellules $\alpha_v\beta_3$ positives comparativement au conjugués 7 et 8 (sans Raft(cRGD)$_4$). Les observations concernant la moins bonne sélectivité du conjugué 5 sont confirmées par cette analyse de cytométrie en flux.

L'étude *in vivo* nous montre une distribution dans l'organisme et une élimination très hétérogène des différents composés en fonction de leur composition.

La nature de la cyanine semble avoir une influence sur la voie d'élimination et la rétention du conjugué dans les organes comme le montre la biodistribution ainsi que la quantification *ex vivo* sur les organes à 24h. Les composés avec une cyanine sulfonatée sont préférentiellement éliminés par voie rénale et sont moins retenus dans les organes tandis que les conjugués Cy5.5 sont dégradé par le foie.
Cette différence de rétention dans les organes entraine une différence de spécificité pour la tumeur. Les composés Cy5.5 sulonatées ont une élimination rapide qui est bénéfique puisqu'elle permet une rétention passive plus faible dans les autres organes et donc une accumulation plus spécifique dans la tumeur.

La cinétique sanguine confirme cette différence de vitesse d'élimination. Dans cette étude nous observons un effet du Raft(cRGD)$_4$ et de la cyanine sur le temps de demi-vie du conjugué dans l'organisme. En effet le Raft(cRGD)$_4$ et la Cy5.5 sulfonatée induisent, indépendamment, une élimination accrue du composé.

II. Evaluations biologiques *in vivo* des nanoparticules AGuIX®.

Les évaluations biologiques ont tout d'abord pour objectif de déterminer si les nanoparticules AGuIX® s'accumulent dans la tumeur après injection intra veineuse dans un modèle orthotopique de cancer des VADS décris plus tôt.

Dans un second temps, nous avons cherché à évaluer le pouvoir thérapeutique des nanoparticules en association avec la radiothérapie. Le suivit de la croissance tumorale est effectuée par mesure au pied à coulisse et l'étude du signal de bioluminescence.

1. Etudes de la biodistribution des AGuIX®

Dans les deux cas, *in vivo* et *ex vivo*, les images de fluorescence ont montré des profils similaires. Après injection intraveineuse, les nanoparticules AGuIX®-Cy5.5 sont distribuées dans l'ensemble du corps et ont été rapidement filtrées par les reins avant l'élimination finale dans la vessie, comme représenté sur la (Figure 40.a)

La majorité des nanoparticules ont été éliminées par les reins et une accumulation hépatique faible a été observée. En outre, un signal fluorescent a été détecté dans les tumeurs orthotopiques CAL33-LUC à partir du premier temps de mesure (30 minutes) et jusqu'à 24 heures après l'injection. Le maximum du rapport de fluorescence tumorale / cutanée a été observé 5 h après l'administration intraveineuse de AGuIX® et persiste 24 heures après, comme le montre la Figure 40.c.

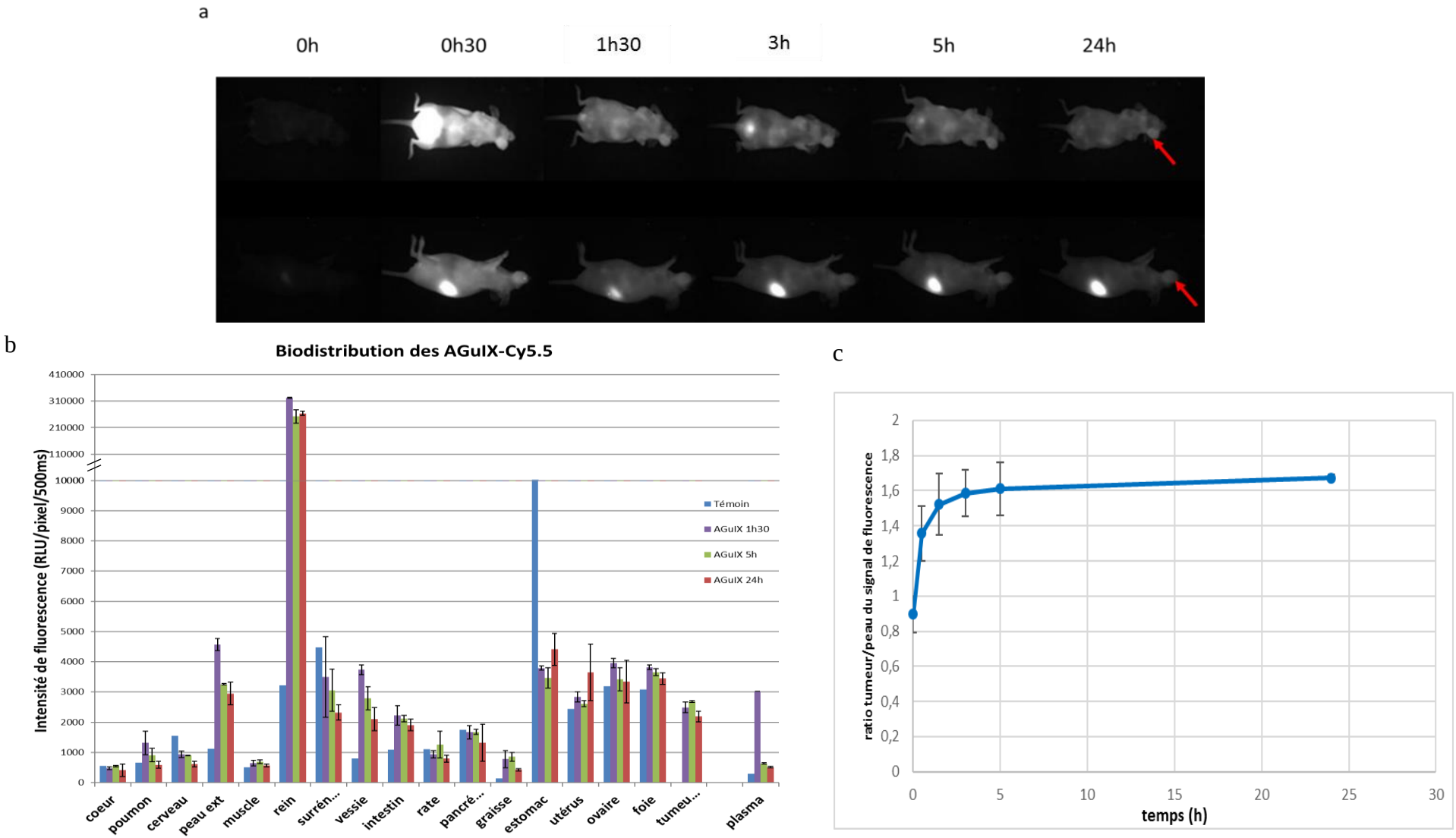


Figure 40: Biodistribution des AGuIX-Cy5.5 chez la souris nude portant une tumeur orthotopique CAL33-LUC Luc.
a) Les images de fluorescence (200 ms de temps d'intégration, le contraste fixe entre 1787 et 5848) sont obtenues à 30 minutes, 1h30, 3h, 5h et 24h après injection intraveineuse des AGuIX-Cy5.5 (200 µL, [Gd3+] ~ 20 mmol / L). b) Biodistribution dans les organes à différents temps après injection des AGuIX-Cy5.5. Les ROI sont définies sur les organes extraits afin de quantifier la quantité de photons émis par pixel après une exposition de 500 ms. c) Ratio du signal de fluorescence de la tumeur sur le signal de fluorescence de la peau à différents temps après injection un temps d'exposition de 500 ms sur la position ventrale.

L'accumulation des AGuIX®-Cy5.5 dans la tumeur a ensuite été évaluée dans un autre modèle de tumeur orthotopique de cancer des VADS (SQ20B) développé en utilisant le même protocole d'implantation que le modèle CAL33-Luc. L'injection d'AGuIX® Cy5.5 et les images de fluorescence ont été effectuées en utilisant le même protocole. Une biodistribution similaire a été observée avec une clairance rénale rapide, suivie par l'élimination des nanoparticules dans les urines (Figure 41 a et b). L'accumulation passive dans les tumeurs a été détectée dans ce modèle après 30 minutes avec un maximum de taux de fluorescence tumeur / peau à 24 h après l'injection intraveineuse (Figure 41 c).

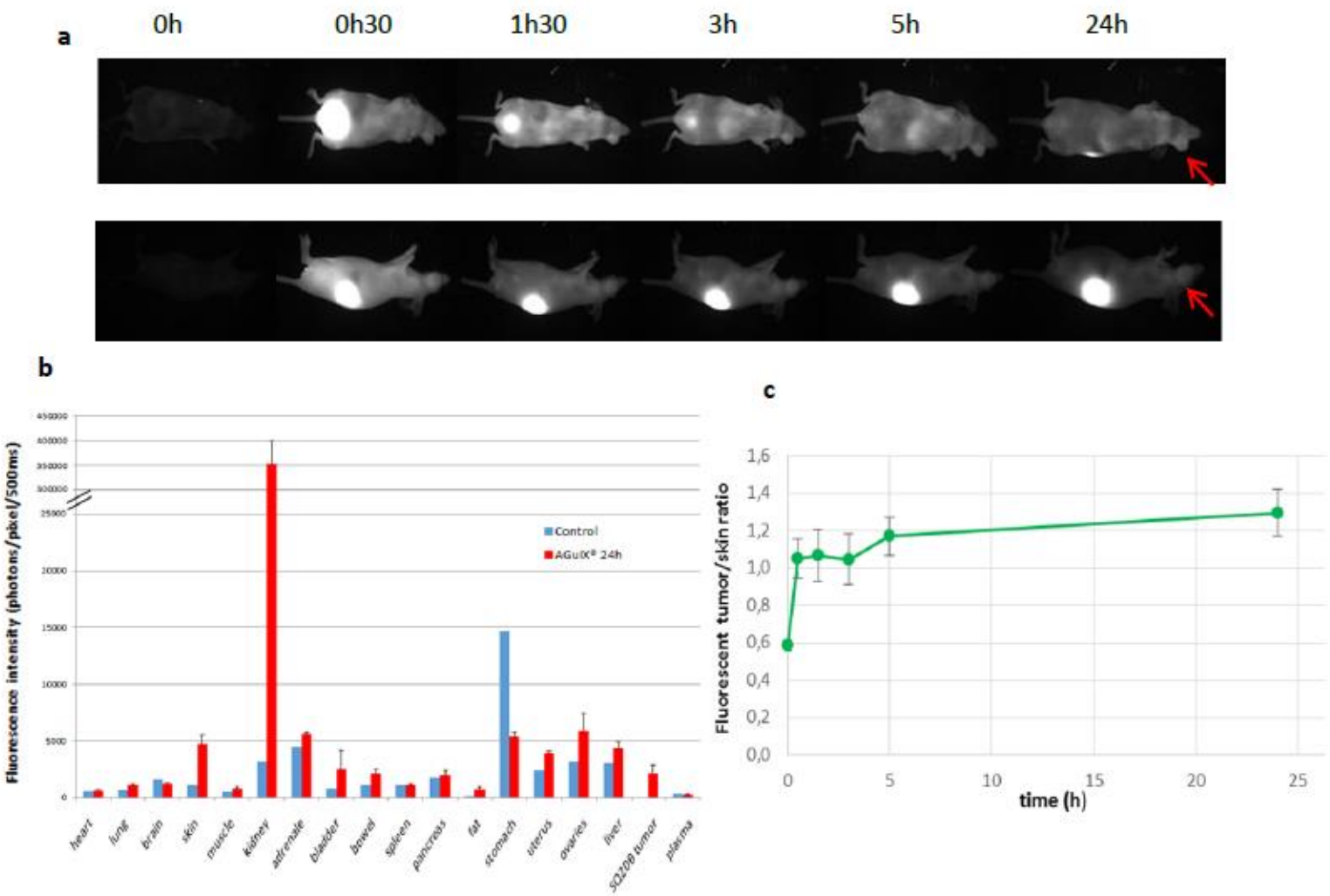


Figure 41: Biodistribution in vivo des AGuIX-Cy5.5 chez la souris nude portant une tumeur orthotopique SQ20B.

Bien que modeste, la présence des nanoparticules au sein des tumeurs CAL33-Luc a également été validée en microscopie de fluorescence. Les nanoparticules sont majoritairement présentes à la périphérie des tumeurs. 1h30 et 5h après l'injection, le signal fluorescent correspondant à la présence des nanoparticules est punctiforme, alors qu'à 24h, il est plus diffus et semble être localisé dans le cytoplasme des cellules.

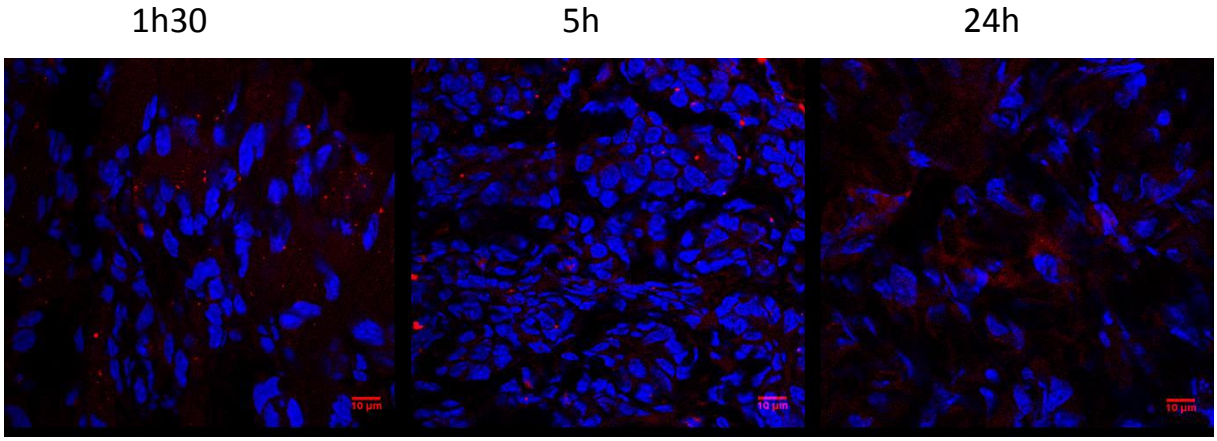


Figure 42: Localisation des nanoparticules fluorescentes sur les coupes congelées de tumeurs CAL33-LUC-Luc à différents temps après l'administration intraveineuse (AGuIX-Cy5.5, 200 µl à [Gd3 +] ~ 20 mmol / L).
Les tumeurs ont été observées par microscopie à fluorescence (en bleu : coloration DAPI des noyaux ; en rouge : signaux de fluorescence correspondant à la Cy5.5, donc aux nanoparticules).

2. Étude de l’efficacité thérapeutique des nanoparticules en tant qu''agents radiosensibilisants.

1) Effet de la nanoparticule sur une tumeur primaire de cancer des VADS

On injecte 200 µl d'une solution d’AGuIX® ([Gd^{3+}] à 50 mM), l'irradiation est réalisée 15 minutes après l'injection des nanoparticules, à 10 Gy.

L'accumulation des nanoparticules AGuIX®-Cy5.5 dans les tumeurs après injection intraveineuse a suggéré qu'un effet de radiosensibilisation pourrait être obtenu. Des souris porteuses de tumeurs orthotopiques CAL33-Luc ont donc été soumises à un protocole de radiothérapie conventionnelle après injection intra-tumorale ou intraveineuse d’AGuIX®.

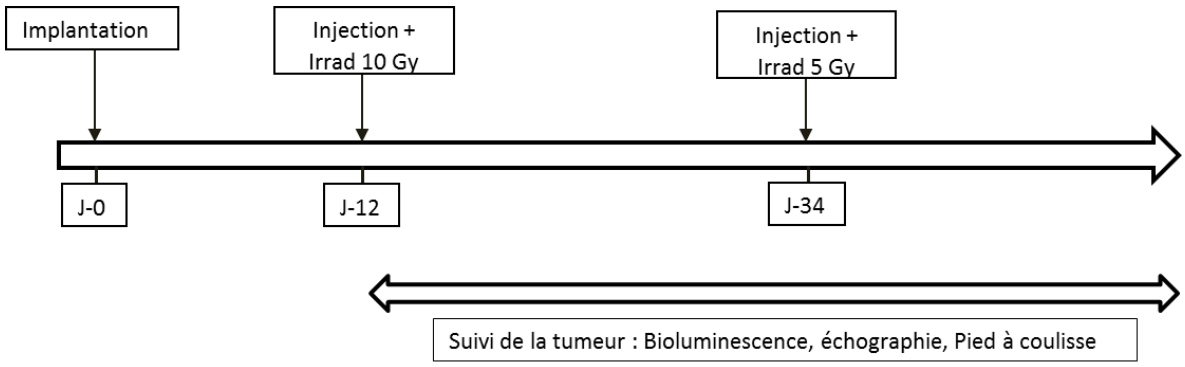


Figure 43: protocole d’irradiation des tumeurs dans un modèle de cancer des VADS

Pendant le suivi, le groupe contrôle a montré une croissance tumorale progressive et constante. En revanche, dans tous les groupes irradiés, avec ou sans administration d'AGuIX®, un ralentissement de la progression de la tumeur a été observé après la première radiothérapie avec une phase de stabilisation pendant 7 jours. Ensuite, une lente progression du volume de la tumeur a été observée, sans aucune différence entre les différents groupes traités (figure 44). Nous avons donc décidé d'effectuer un deuxième traitement au jour 34 avec injection des nanoparticules et une dose unique de 5 Gy.

Le taux de survie est évalué pour chaque groupe. A un stade tumoral avancé, les souris sont euthanasiées quand elles présentent les signes cliniques tels qu'une perte de poids ≥ 20% et/ou un volume tumoral ≥ 600 mm^3.

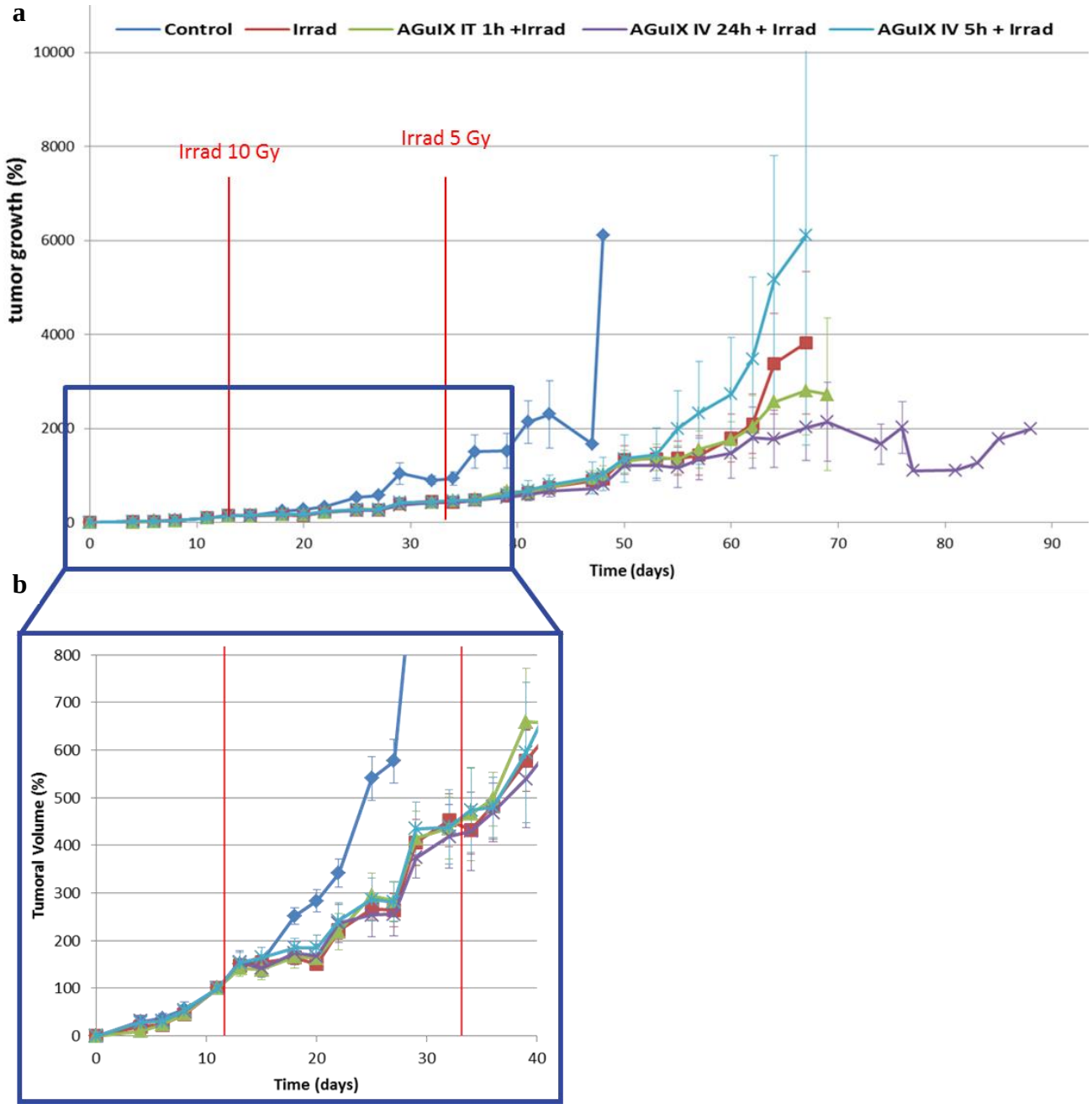


Figure 44: Courbes de croissance tumorale chez des souris porteuses de tumeurs CAL33-Luc; sans traitement (bleu, n = 10) traitées par irradiation seule (rouge, n = 11) traitées par irradiation 24 heures après l'injection intraveineuse de AGuIX® (violet, n = 11), traitées par une irradiation 5 heures après l'injection intraveineuse de AGuIX® (turquoise, n = 11) et traitées par irradiation 1 h après l'injection intra-tumorale de AGuIX® (vert, n = 11). L'irradiation a été effectuée au jour 12 et le jour 34 à 10 et 5 Gy respectivement. **a ;** surveillance du volume de la tumeur mesurée avec un pied à coulisse. **b** ; élargissement de la surveillance du volume tumoral mesurée avec un pied à coulisse entre les deux irradiations (lignes rouges).

En dépit de la deuxième irradiation, le volume de la tumeur a augmenté constamment dans chaque groupe irradié. A partir du jour 53, le groupe de souris traitées avec une irradiation 5 heures après l'administration d'AGuIX® présente une augmentation de la croissance de la tumeur par rapport aux autres groupes irradiés. Il n'y a pas de différence dans la progression tumorale entre les autres groupes irradiés pendant les 60 premiers jours. Néanmoins, à partir du jour 64, 30 jours après la seconde irradiation, une croissance plus lente de la tumeur dans le groupe irradié 24h après l'administration AGuIX® est observé, par rapport aux groupes irradiés seul et irradiés 1h après l'administration intra-tumorale AGuIX®. Le volume tumoral a même commencé à diminuer légèrement dans ce groupe à partir du jour 69. Cependant, ces différences entre les groupes ne sont pas significatives (figure 45).

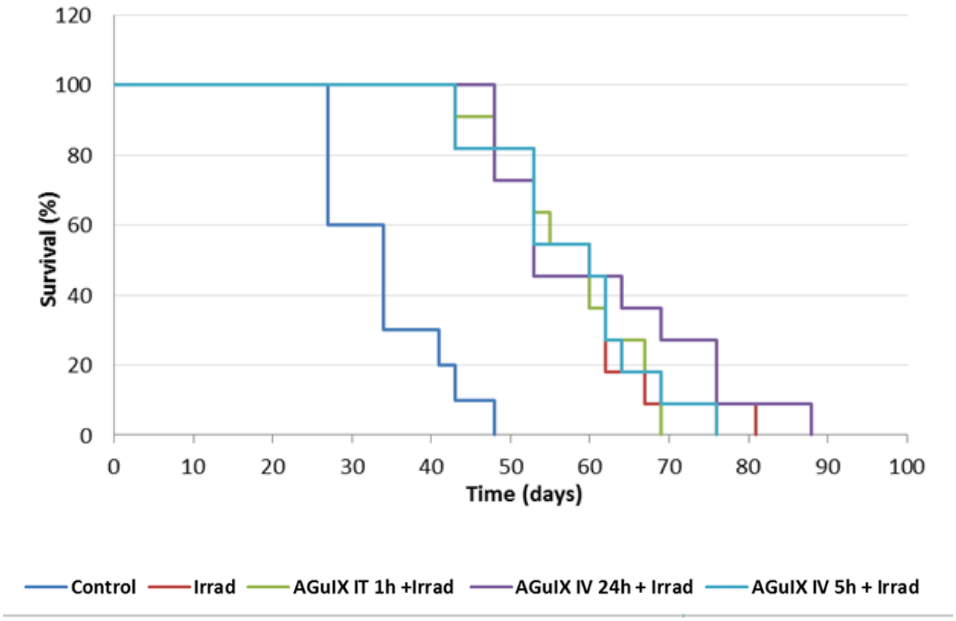


Figure 45: Courbes de survie chez des souris porteuses de tumeurs CAL33-LUC; sans traitement (bleu, n = 10) traité par irradiation seule (rouge, n = 11) traité par irradiation 24 heures après l'injection intraveineuse de AGuIX® (violet, n = 11), traité par une irradiation 5 heures après l'injection intraveineuse de AGuIX® (turquoise, n = 11) et traité par irradiation 1 h après l'injection intra-tumorale de AGuIX® (vert, n = 11). L'irradiation a été effectuée au jour 12 et le jour 34 à 10 et 5 Gy respectivement.

La médiane de survie présentée par le groupe contrôle était de 35 jours et il a été étendu à 62 jours dans le groupe irradié 24h après l'injection AGuIX® intraveineuse, et à 58 jours dans les trois autres groupes (figure 45).

L'irradiation, dans tous les groupes traités, induit une augmentation de la durée de vie d'environ 170% ($p < 0,0001$) comparé au groupe témoin, mais aucune augmentation significative de la durée de vie entre les groupes irradiés n'a été observée.

La surveillance des tumeurs a été faite trois fois par semaine en utilisant le pied à coulisse et une fois par semaine par échographie et imagerie par bioluminescence. Les mesures obtenues à partir des différents examens ont été similaires. Nous avons utilisé des images échographiques en tant que norme pour la mesure du volume de la tumeur pour valider les mesures obtenues avec le pied à coulisse.

- Suite à cette expérience et dans le souci de se rapprocher le plus de la problématique clinique des cancers des VADS, l'étude de l'efficacité thérapeutique des AGuIX® a été faite sur une rechute tumorale après exérèse macroscopique de la tumeur.

2) Effet de la nanoparticule sur la rechute d'une tumeur primaire de cancer VADS

Après injection de 200 µl d'une solution d'AGuIX® ([Gd^{3+}] à 50 mM) dans la veine caudale de la souris, les souris sont anesthésiées chimiquement par injection de 100µL/g d'une solution de Médétomidine/Kétamine décrite précédemment. L'irradiation est réalisée 15 minutes après l'injection des nanoparticules, à 10 Gy.

Les souris ont été randomisées en fonction du volume tumoral au moment de l'irradiation.

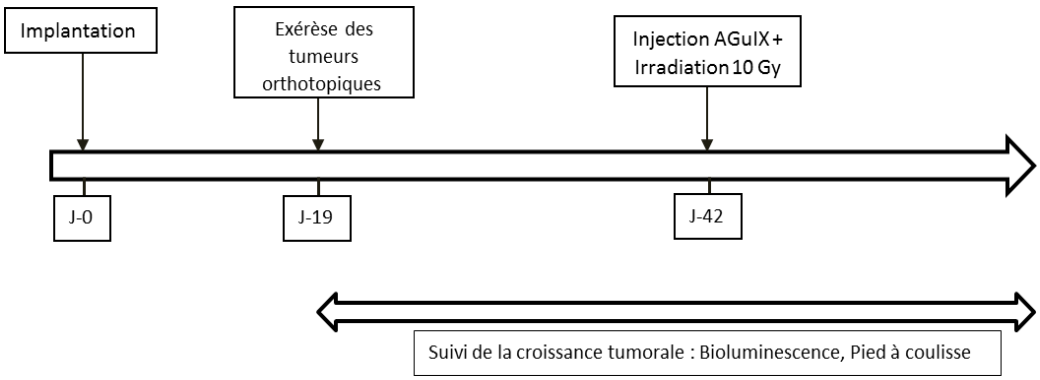


Figure 46 : Protocole expérimental d'irradiation.

Après irradiation, le volume tumoral est suivi par mesures au pied à coulisse et par mesure de bioluminescence.

Pendant le suivi, le groupe contrôle a montré une rechute tumorale précoce et une progression rapide de la croissance tumorale. 100 jours après la chirurgie, 9 souris sur 10 ont rechutées. Dans le groupe irradié, sans administration de nanoparticules AGuIX®, la rechute tumorale apparait quelques jours après la chirurgie comme dans le cas des souris contrôle, mais un ralentissement de la progression de la tumeur est observé. 100 jours après la chirurgie, 7 souris sur 13 ont rechutées. Le groupe traité par irradiation après injection d'AGuIX® semble montrer une rechute tumorale plus tardive ainsi qu'une croissance tumorale légèrement moins rapide. 100 jours après la chirurgie, 5 souris sur 13 ont rechutées (figure 47).

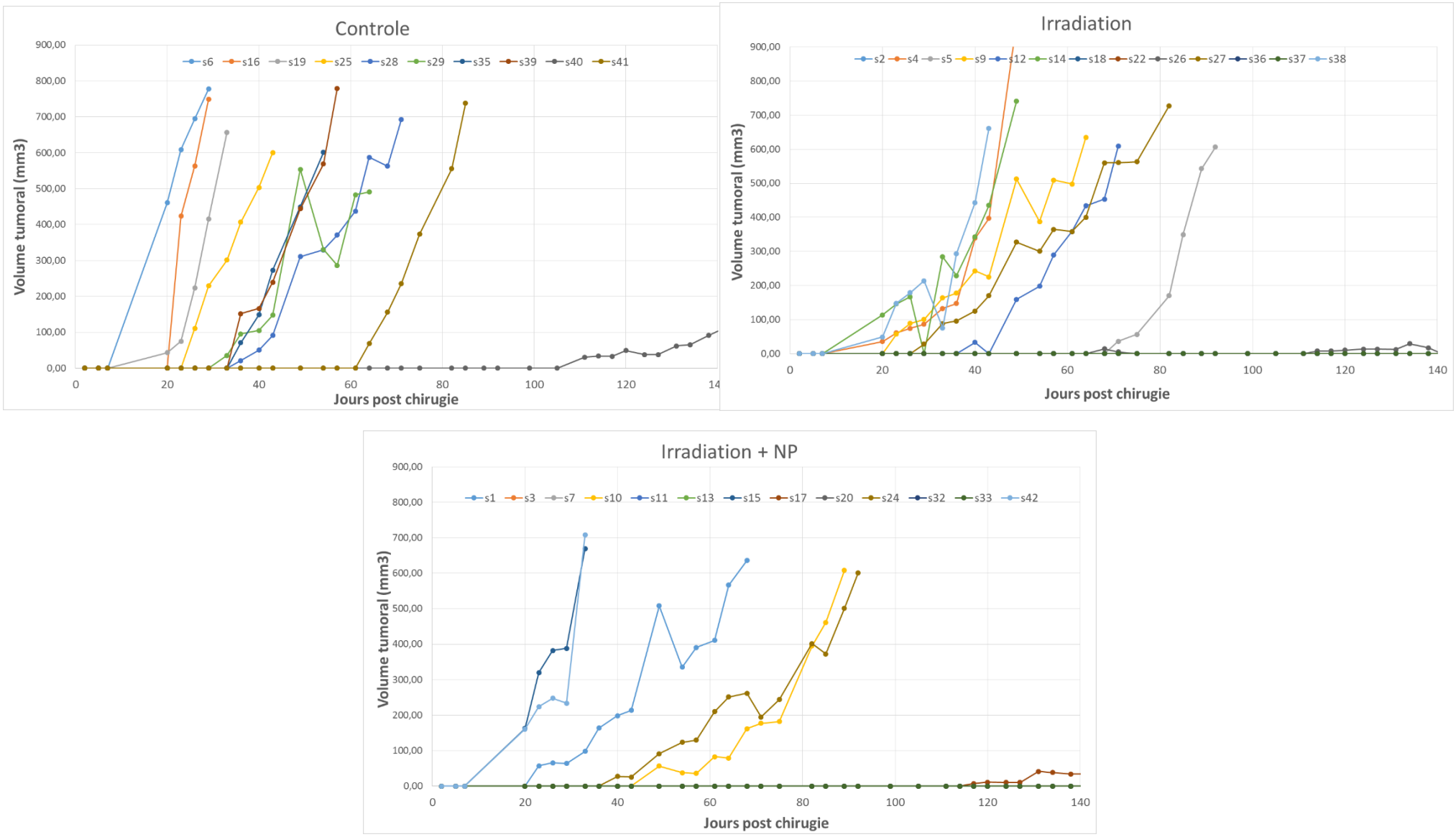
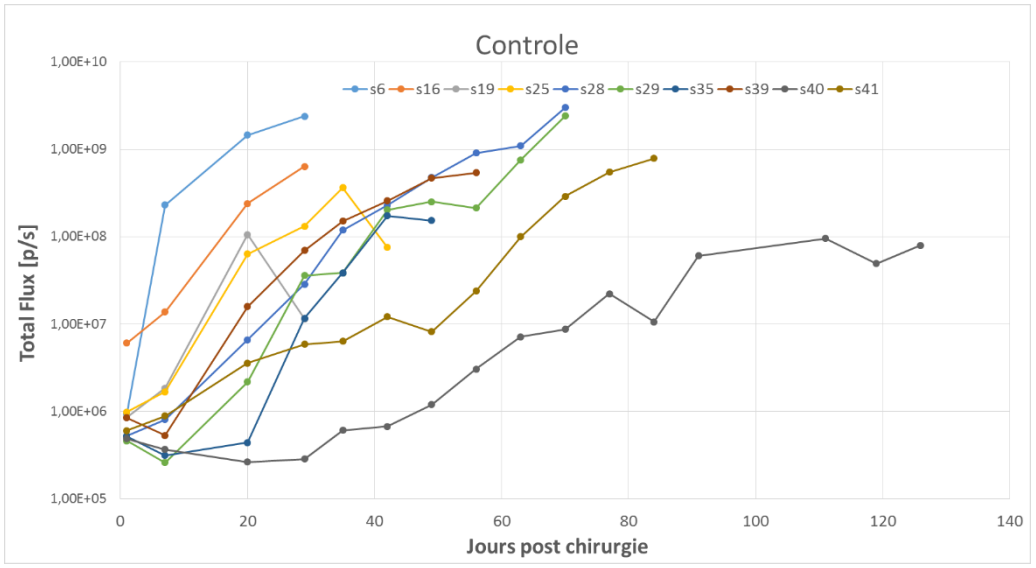
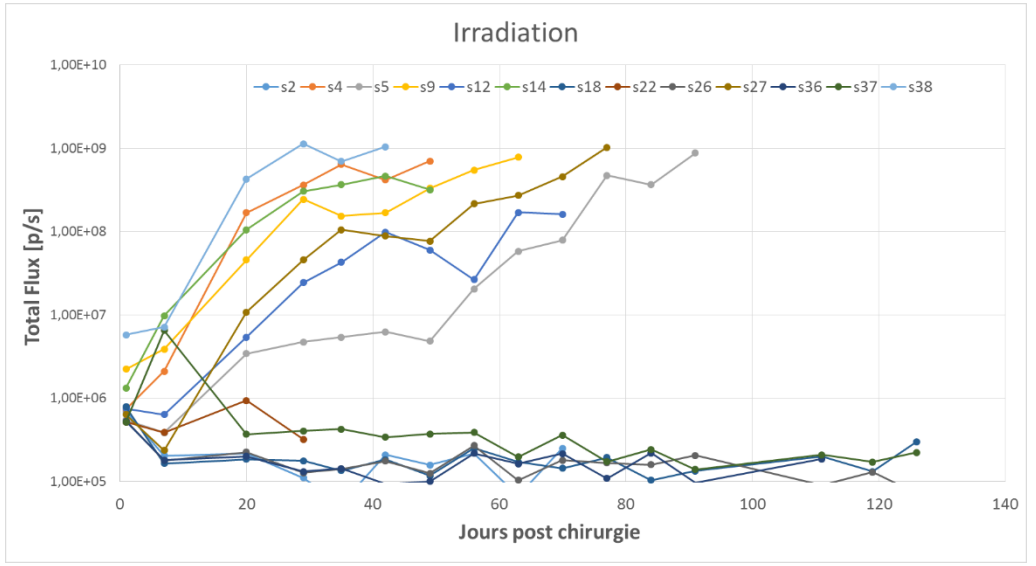


Figure 47: Courbes de croissance tumorale chez des souris porteuses de tumeurs CAL33-LUC.

Le suivi en bioluminescence montre, pour la courbe contrôle, une augmentation très nette du signal, similaire à celui de l'augmentation du volume tumoral.

Pour les groupes irradiés le signal de bioluminescence est également corrélé à la croissance tumorale ; le signal semble plus faible comparativement à une tumeur contrôle de même taille. Cela peut s'interpréter comme une différence physiologique au sein de la tumeur. L'irradiation après injection de nanoparticules induit possiblement plus de mort cellulaire à l'intérieur de la tumeur, le signal de bioluminescence étant dépendant du métabolisme ou plus particulièrement de la production d'ATP et du niveau d'oxygène (Figure 14). (Figure 48)





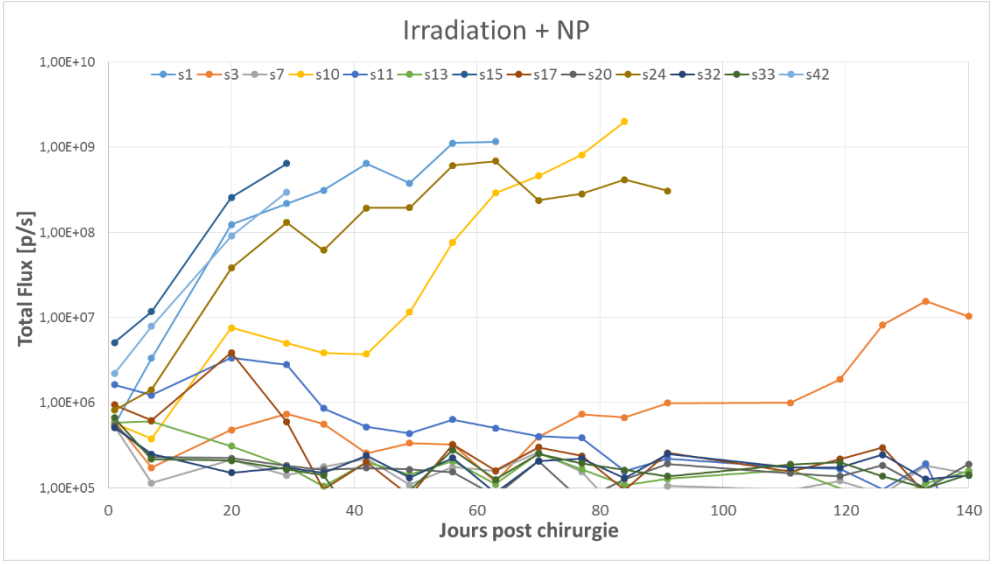


Figure 48: Courbes du signal de bioluminescence chez des souris porteuses de tumeurs CAL33-LUC

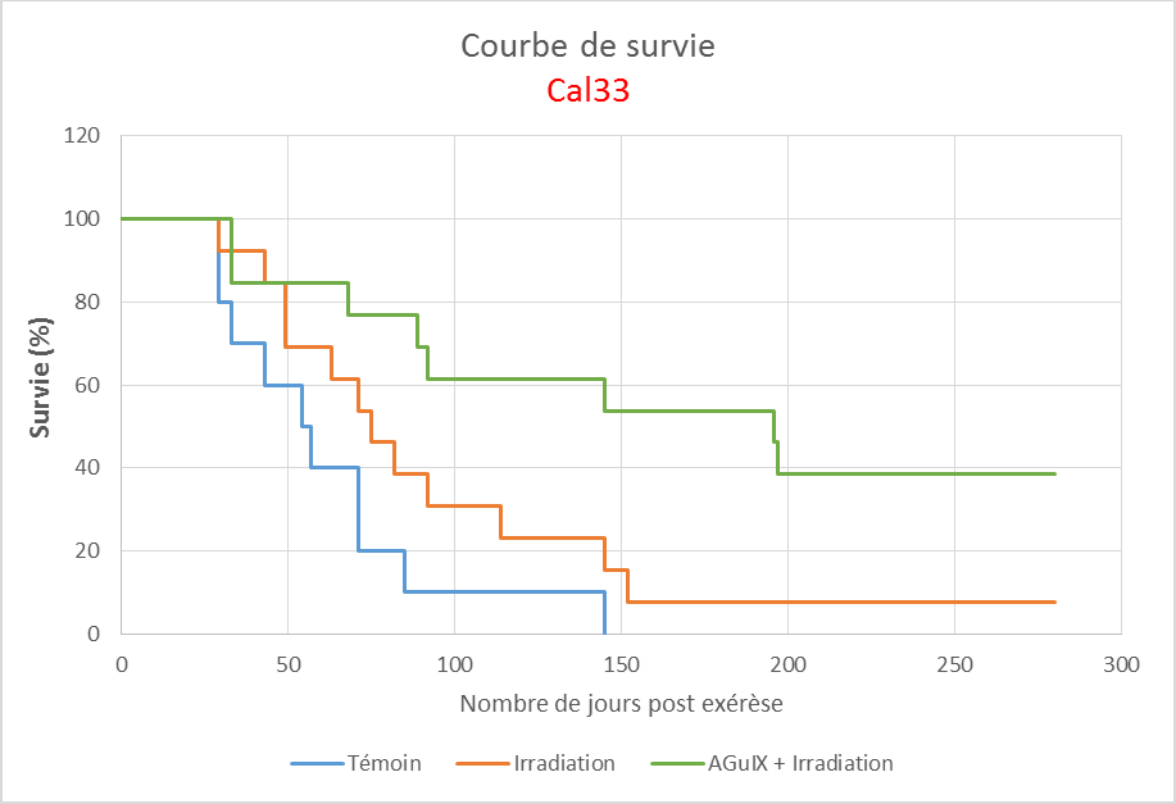


Figure 49: Courbes de survie chez des souris porteuses de tumeurs CAL33-LUC

On appelle « survie 50% » le moment où 50% des souris du groupe ont été euthanasiées. Cette survie est déterminée par une courbe de type Caplan-Meier (ci dessus)

La durée médiane de survie présentée par le groupe contrôle était de 57 jours et il a été étendu à 75 jours dans le groupe irradié sans injection d'AGuIX®, contre 196 jours dans le groupe irradié avec injection d'AGuIX® 15 minutes avant irradiation.

L'irradiation, induit une augmentation de la survie d'environ 131% comparé au groupe témoin. L'irradiation avec l'injection de nanoparticules AGuIX® ([Gd3 +] à 50 mM), induit une augmentation de la médiane de survie d'environ 344% par rapport au groupe témoin. (Figure 49)

Au vue de l'évolution de la rechute tumorale qui n'apparait pas chez les dernières souris, et par souci de bien-être animal, le suivi des souris a été stoppé 280 jours après la chirurgie.

Dans les différents groupes suivis, toutes les souris du groupe contrôle ont eu une rechute tumorale, 1 souris du groupe ayant reçu comme traitement une dose d'irradiation n'as pas rechuté et 5 souris du groupe traité avec la nanoparticule AGuIX® restent sans rechute tumorale à la fin de notre étude.

3. Conclusion sur les effets *in vivo* de la nanoparticule AGuIX®.

Pour ce qui est de la distribution dans l'organisme, la nanoparticule AGuIX® présente un profil optimal pour une injection *in vivo.*
En effet sa petite taille permet une bonne clairance rénale, comme observé dans l'étude de biodistribution. Ce résultat est très important.

L'effet radiosensibilisant des nanoparticules sur les tumeurs primaires de cancers des VADS n'est pas observé. L'effet de la radiothérapie sur la croissance tumorale est bien confirmé mais il n'y a aucune différence entre une irradiation seule où combinée à l'injection de nanoparticules. La voie d'inoculation de la nanoparticule n'a pas d'effet non plus. L'injection intra-tumorale était supposée augmenter la quantité de nanoparticules au sein de la tumeur comparativement à l'injection intraveineuse, et ainsi accroitre l'effet de la radiothérapie. Or aucune différence de l'effet de l'irradiation n'a été observée.

Dans le cas de l'injection d'AGuIX® sur la rechute tumorale, les effets sont très satisfaisants. Nous observons un effet de la nanoparticule sur la vitesse de croissance tumorale ainsi que sur le signal de bioluminescence qui indique une mort cellulaire intra-tumorale accrue.

L'étude de la survie 50% montre aussi que la nanoparticule induit une augmentation de cette survie de 344% par rapport aux souris sans traitement et de 261% comparativement aux souris irradiées.

III. Discussion et perspectives

1. Synthèse de macromolécules ciblant l'angiogenèse.

Pour cette étude, des sondes polymères fluorescentes ont été élaborées afin de cibler l'angiogenèse tumorale. Pour cela, des systèmes de ciblage multivalents à deux niveaux ont été développés en combinant les polymères avec des clusters de ligands peptidiques Raft(cRGD)4. Ces polymères peptidiques présentent 4 ligands RGD cycliques, capables de se lier sélectivement et avec une très forte affinité à l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, protéine transmembranaire surexprimée à la surface de cellules du microenvironnement tumoral dans un grand nombre de cancers.

De manière très intéressante, les premières évaluations biologiques *in vitro* ont montré que les conjugués présentant plusieurs clusters Raft(cRGD)$_4$ le long de la chaine polymère (soit 2 niveaux de multivalence) possèdent une affinité vis-à-vis des intégrines $\alpha_V\beta_3$ supérieure à celle du cluster Raft(cRGD)4 libre, (que la concentration soit exprimée vis-à-vis du conjugué ou des clusters Raft(cRGD)4). Lors des essais *in vitro* d'inhibition de l'adhésion cellulaire à la vitronectine, il a été montré que la présentation multivalente des clusters peptidiques le long de la chaine polymère permet d'augmenter considérablement cette affinité (un conjugué porteur de 4 clusters par chaine en moyenne a une affinité 23 fois supérieure à celle du cluster seul). Cette amélioration significative a été attribuée à l'augmentation de la concentration locale en motifs cRGD,

L'utilisation de la microscopie confocale et de la cytométrie en flux a permis la mise en évidence de l'internalisation des conjugués fluorescents et du marquage préférentiel des cellules exprimant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (plus important que le cluster Raft(cRGD)$_4$ libre a concentration équivalente). Cette augmentation du marquage provient d'une part de la brillance plus importante des conjugués et d'autre part d'une plus grande affinité pour les intégrines $\alpha_V\beta_3$. La sélectivité des conjugués semble proche de celle observée pour le cluster Raft(cRGD)$_4$.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal Bioconjugate Chemistry (57).

Au niveau de l'étude *in vivo*, comme attendu, la composition du polymère peptidique modifie sa distribution et sa rétention dans l'organisme. Cette différence de rétention dans les organes entraine une différence de spécificité pour la tumeur, les conjugués Cy5.5 sulfonatés ont une élimination rapide qui est bénéfique puisqu'elle permet une rétention passive plus faible dans les autres organes et donc une accumulation plus spécifique dans la tumeur.

La cinétique sanguine confirme cette différence de vitesse d'élimination. Dans cette étude, nous observons un effet du Raft(cRGD)$_4$ et de la cyanine sur le temps de demi-vie du conjugué dans l'organisme. En effet le Raft(cRGD)$_4$ et la Cy5.5 sulfonatée induisent, indépendamment, une élimination accrue du conjugué.

Le conjugué 5 et le conjugué 6 semblent intéressants pour une injection *in vivo* et le ciblage spécifique des cellules tumorales. En effet ils présentent une bonne sélectivité ainsi qu'une élimination rapide, la différence des deux polymères se situant au niveau de la voie d'évacuation : conjugué 5 suit principalement la voie rénale, tandis-que le conjugué 6 est lui éliminé par la voie hépatique et induit une légère accumulation dans les autres organes.

L'étude devra être complétée avec des conjugués contrôles porteurs de Raft(cRAD)$_4$ pour confirmer la spécificité de l'interaction due au motif RGD. Il serait également intéressant d'explorer une gamme de conjugués plus vaste, notamment en augmentant la taille du copolymère et/ou le nombre moyen de clusters Raft(cRGD)$_4$ par chaine afin de mieux étudier l'influence de la densité en cluster peptidique le long de la chaine polymère, sur l'affinité envers les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

2. Evaluation de la nanoparticule AGuIX

Le traitement des cancers des VADS repose actuellement sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Le traitement des cancers des VADS à un stade avancé, fait appel à plusieurs de ces techniques diversement associées.

L'objectif de cette étude est de développer une nanoparticule théranostique qui permettrait d'allier au sein d'un seul et même objet des agents d'imagerie et de thérapie.

La nanoparticule AGuIX montre de bons résultats dans ces applications.
En effet, elle permet un bon ciblage de la tumeur grâce à une bonne distribution dans l'organisme et une bonne accumulation passive tumeur.

D'un point de vue thérapeutique la nanoparticule est également très intéressante. La particule n'a pas montré d'efficacité dans le cas d'un traitement d'une tumeur primaire par radiothérapie. Mais dans le cas du traitement par radiothérapie lors de la rechute tumorale, la nanoparticule montre un effet sur la croissance des tumeurs et sur la fréquence des rechutes.

Cette nanoparticule est donc un bon outil pour l'association de la chirurgie et de la radiothérapie postopératoire en fonction des critères histologiques défavorables dont l'exérèse incomplète de la tumeur.

Il serait intéressant de réaliser à nouveau cette étude avec une particule greffé avec un Raft$(cRGD)_4$, ce qui permettrai une meilleur rétention au sein de la tumeur. Cela permettrait de trouvé un temps plus optimal pour la radiothérapie c'est-à-dire un temps où la quantité de particule dans les organes sains est la plus faible tout en conservant une quantité nécessaire dans la tumeur la tumeur reste suffisante. Cela permettrait également de diminuer la dose de rayons délivré pour un effet thérapeutique similaire.

Bibliographie

1. Atallah I, Milet C, Henry M, Josserand V, Reyt E, Coll J-L, et al. Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves recurrence-free survival rate in novel orthotopic animal model of head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. avr 2016;38 Suppl 1:E246-255.

2. Grammatikakis I, Gorospe M, Abdelmohsen K. Modulation of Cancer Traits by Tumor Suppressor microRNAs. Int J Mol Sci. 16 janv 2013;14(1):1822‑42.

3. Luo B-H, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. Curr Opin Cell Biol. oct 2006;18(5):579‑86.

4. Boturyn D, Coll J-L, Garanger E, Favrot M-C, Dumy P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. J Am Chem Soc. 12 mai 2004;126(18):5730‑9.

5. Gerlag DM, Borges E, Tak PP, Ellerby HM, Bredesen DE, Pasqualini R, et al. Suppression of murine collagen-induced arthritis by targeted apoptosis of synovial neovasculature. Arthritis Res. 2001;3(6):357‑61.

6. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. Nat Rev Cancer. août 2008;8(8):604‑17.

7. Danhier F, Le Breton A, Préat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. Mol Pharm. 5 nov 2012;9(11):2961‑73.

8. Garanger E, Boturyn D, Renaudet O, Defrancq E, Dumy P. Chemoselectively addressable template: a valuable tool for the engineering of molecular conjugates. J Org Chem. 17 mars 2006;71(6):2402‑10.

9. Dufort S, Sancey L, Hurbin A, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, et al. Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors in vivo. J Drug Target. août 2011;19(7):582‑8.

10. Sancey L, Lux F, Kotb S, Roux S, Dufort S, Bianchi A, et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobes to improve radiotherapy efficacy. Br J Radiol. 2014;87(1041):20140134.

11. InfraStructures - Mai 2010 - Les nanoparticules pour le traitement des eaux [Internet]. [cité 3 janv 2017]. Disponible sur: http://www.infrastructures.com/0510/nano.htm

12. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. J Controlled Release. 1 mars 2000;65(1–2):271‑84.

13. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. déc 1986;46(12 Pt 1):6387‑92.

14. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc Natl Acad Sci U S A. 14 avr 1998;95(8):4607‑12.

15. Hashizume H. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am J Pathol. 2000;156:1363‑80.

16. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. Drug Discov Today. sept 2006;11(17–18):812‑8.

17. Park JW, Benz CC, Martin FJ. Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. Semin Oncol. déc 2004;31(6 Suppl 13):196‑205.

18. Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. Cancer Res. 1 juill 2006;66(13):6732‑40.

19. Orive G, Ali OA, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterial-based technologies for brain anti-cancer therapeutics and imaging. Biochim Biophys Acta. août 2010;1806(1):96‑107.

20. Li S, Wang A, Jiang W, Guan Z. Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-fluorouracil loaded nanoparticles. BMC Cancer. 15 avr 2008;8:103.

21. Fattal E, Barratt G. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. Br J Pharmacol. mai 2009;157(2):179‑94.

22. Hart SL. Multifunctional nanocomplexes for gene transfer and gene therapy. Cell Biol Toxicol. févr 2010;26(1):69‑81.

23. Schroeder A, Levins CG, Cortez C, Langer R, Anderson DG. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. J Intern Med. janv 2010;267(1):9‑21.

24. Li L, Wartchow CA, Danthi SN, Shen Z, Dechene N, Pease J, et al. A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 15 mars 2004;58(4):1215‑27.

25. Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kalef-Ezra JA, Smilowitz HM. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. Phys Med Biol. 7 juin 2010;55(11):3045‑59.

26. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. J Biosci Bioeng. juill 2005;100(1):1‑11.

27. Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Böhmer D, Henkel T, Kahmann F, et al. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy--feasibility, tolerance and achieved temperatures. Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group. déc 2006;22(8):673‑85.

28. Huang H-C, Rege K, Heys JJ. Spatiotemporal temperature distribution and cancer cell death in response to extracellular hyperthermia induced by gold nanorods. ACS Nano. 25 mai 2010;4(5):2892‑900.

29. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. Adv Drug Deliv Rev. 14 déc 2008;60(15):1627‑37.

30. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. Chem Rev. 8 sept 1999;99(9):2293‑352.

31. Bianchi A, Dufort S, Lux F, Fortin P-Y, Tassali N, Tillement O, et al. Targeting and in vivo imaging of non-small–cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents. Proc Natl Acad Sci. 24 juin 2014;111(25):9247‑52.

32. Miladi I, Duc GL, Kryza D, Berniard A, Mowat P, Roux S, et al. Biodistribution of ultra small gadolinium-based nanoparticles as theranostic agent: application to brain tumors. J Biomater Appl. sept 2013;28(3):385‑94.

33. Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. Phys Med Biol. 21 sept 2004;49(18):N309-315.

34. Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. Br J Radiol. mars 2006;79(939):248‑53.

35. Dufort S, Bianchi A, Henry M, Lux F, Le Duc G, Josserand V, et al. Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. Small Weinh Bergstr Ger. 14 janv 2015;11(2):215‑21.

36. Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Bräuer-Krisch E, Bouchet A, et al. Toward an Image-Guided Microbeam Radiation Therapy Using Gadolinium-Based Nanoparticles. ACS Nano. 27 déc 2011;5(12):9566‑74.

37. Tassali N, Bianchi A, Lux F, Raffard G, Sanchez S, Tillement O, et al. MR imaging, targeting and characterization of pulmonary fibrosis using intra-tracheal administration of gadolinium-based nanoparticles. Contrast Media Mol Imaging. sept 2016;11(5):396‑404.

38. Plissonneau M, Pansieri J, Heinrich-Balard L, Morfin J-F, Stransky-Heilkron N, Rivory P, et al. Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for ß-amyloid plaques targeting. J Nanobiotechnology. 25 juill 2016;14(1):60.

39. Mehanna H, Paleri V, West CML, Nutting C. Head and neck cancer-part 1: epidemiology, presentation, and preservation. Clin Otolaryngol Off J ENT-UK Off J Neth Soc Oto-Rhino-Laryngol Cervico-Facial Surg. févr 2011;36(1):65‑8.

40. Boing AF, Antunes JLF, de Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P, et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? J Epidemiol Community Health. août 2011;65(8):709‑14.

41. Conway DI, Hashibe M, Boffetta P, INHANCE consortium, Wunsch-Filho V, Muscat J, et al. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. Oral Oncol. sept 2009;45(9):743‑6.

42. Guide santé : Les cancers ORL (nez, bouche, gorge, oreilles) : toutes les informations sur les cancers ORL, e-sante.fr - Cancer ORL (nez, bouche, gorge, oreilles) – e-sante.be [Internet]. [cité 5 janv 2017]. Disponible sur: http://www.e-sante.be/cancers-orl-facteurs-risque/guide/621

43. Le Tourneau C, Jung G-M, Borel C, Bronner G, Flesch H, Velten M. Prognostic factors of survival in head and neck cancer patients treated with surgery and postoperative radiation therapy. Acta Otolaryngol (Stockh). juin 2008;128(6):706‑12.

44. Vincent N, Dassonville O, Chamorey E, Poissonnet G, Pierre C-S, Nao E-E-M, et al. Clinical and histological prognostic factors in locally advanced oral cavity cancers treated with primary surgery. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. déc 2012;129(6):291‑6.

45. Argiris A, Karamouzis MV, Johnson JT, Heron DE, Myers E, Eibling D, et al. Long-term results of a phase III randomized trial of postoperative radiotherapy with or without carboplatin in patients with high-risk head and neck cancer. The Laryngoscope. mars 2008;118(3):444‑9.

46. Mousavie Anijdan SH, Mahdavi SR, Shirazi A, Zarrinfard MA, Hajati J. Megavoltage X-ray Dose Enhancement with Gold Nanoparticles in Tumor Bearing Mice. Int J Mol Cell Med. 2013;2(3):118‑23.

47. Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. Eur J Cancer Clin Oncol. sept 1988;24(9):1445‑55.

48. Hughes M, Health JBS of P. The Principles of Humane Experimental Technique [Internet]. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. [cité 5 janv 2017]. Disponible sur: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc

49. Aubry K, Paraf F, Monteil J, Bessede JP, Rigaud M. Characterization of a new rat model of head and neck squamous cell carcinoma. Vivo Athens Greece. août 2008;22(4):403‑8.

50. Lu S-L, Herrington H, Wang X-J. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. Head Neck. oct 2006;28(10):945‑54.

51. Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ. An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. janv 2002;8(1):293‑8.

52. Brovko LYu null, Romanova NA, Ugarova NN. Bioluminescent assay of bacterial intracellular AMP, ADP, and ATP with the use of a coimmobilized three-enzyme reagent (adenylate kinase, pyruvate kinase, and firefly luciferase). Anal Biochem. 1 août 1994;220(2):410‑4.

53. James ML, Gambhir SS. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. Physiol Rev. 1 avr 2012;92(2):897‑965.

54. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature. 5 juin 1997;387(6633):569‑72.

55. Garanger E, Boturyn D, Jin Z, Dumy P, Favrot M-C, Coll J-L. New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. déc 2005;12(6):1168‑75.

56. BD ACCURI C6 PLUS - overview | BD Biosciences-US [Internet]. [cité 6 janv 2017]. Disponible sur: http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/cell-analyzers/bd-accuri/m/1294932/overview?cc=US

57. Duret D, Grassin A, Henry M, Jacquet T, Thoreau F, Denis-Quanquin S, et al. « Polymultivalent » Polymer-Peptide Cluster Conjugates for an Enhanced Targeting of Cells Expressing αvβ3 Integrins. Bioconjug Chem. 20 sept 2017;28(9):2241-5.

Bioconjugate Chemistry

Communication

pubs.acs.org/bc

"Polymultivalent" Polymer–Peptide Cluster Conjugates for an Enhanced Targeting of Cells Expressing $\alpha_v\beta_3$ Integrins

Damien Duret,[†,‡] Adrien Grassin,[§] Maxime Henry,[∥] Thibault Jacquet,[∥] Fabien Thoreau,[§,∥] Sandrine Denis-Quanquin,[⊥] Jean-Luc Coll,[*,∥] Didier Boturyn,[*,§] Arnaud Favier,[*,†,‡] and Marie-Thérèse Charreyre[†,‡]

[†]Univ Lyon, Université Lyon 1, INSA de Lyon, CNRS, Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères, UMR5223, F-69621 Villeurbanne, France

[‡]Univ Lyon, Ens de Lyon, CNRS, Laboratoire Joliot-Curie, USR3010, F-69364 Lyon, France

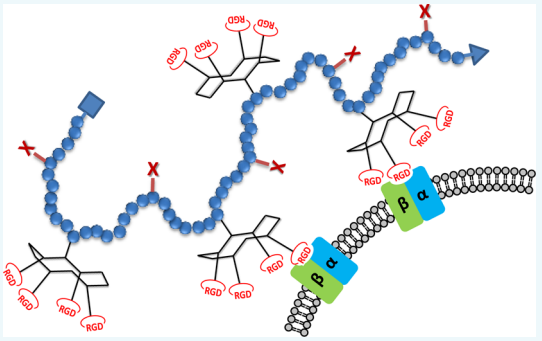
[§]Université Grenoble Alpes, CNRS, DCM UMR 5250, F-38000 Grenoble, France

[∥]Centre de Recherche UGA-INSERM U1209 - UMR CNRS 5309, Institute for Advanced Biosciences, F-38700 Grenoble, France

[⊥]Univ Lyon, Ens de Lyon, CNRS, Université Lyon 1, Laboratoire de Chimie, UMR5182, F-69342 Lyon, France

Supporting Information

ABSTRACT: A new class of "polymultivalent" ligands combining several ligand clusters and a water-soluble biocompatible polymer is introduced. These original conjugates bear two levels of multivalency. They are prepared by covalent coupling of a controlled number of tetrameric cRGD peptide clusters along a well-defined copolymer synthesized by RAFT polymerization. The presence of multiple copies of peptide clusters on the same polymer backbone resulted in a much-higher relative potency than the free cluster reference. Thanks to the "polymultivalency", up to ∼2 orders of magnitude potency enhancement was reached in a competitive cell adhesion assay (nanomolar-range IC_{50} values). In addition, confocal microscopy and flow cytometry demonstrated that fluorescent "polymultivalent" conjugates (emitting in the far-red/near-infrared region) were able to specifically and selectively label cells expressing $\alpha_v\beta_3$-integrin, the natural receptor of cRGD.



Biospecific molecular recognition plays a pivotal role in many life processes and often relies on the multivalent interactions between ligands and their target receptors.[1] For several years now, the concept of multivalency has been taken over by chemists to design a wide range of multivalent ligands consisting of several monovalent ligands grafted onto a multifunctional scaffold for diagnostic and therapeutic applications.[2]

As reported by Kiessling et al., multivalent ligands can interact with their target through various mechanisms, including chelating, subsite binding, statistical rebinding, steric stabilization. and clustering effects.[3] Considering ligand systems either soluble or dispersible in water, two categories can be distinguished depending on the size of the scaffold. On the one hand, a large number of clusters of ligands have been prepared from different low-molecular-weight scaffolds (ca. <5 000 g·mol^{-1}) such as saccharides, cyclens, linear and cyclic peptide and peptoids, porphyrins, cyclodextrins, and calixarenes. These clusters have demonstrated an enhanced avidity and selectivity for their target in comparison with the corresponding monovalent ligand. Their interaction with the target is governed by characteristics such as valency, rigidity and spatial organization. On the other hand, a large number of conjugates have been prepared by grafting multiple copies of monovalent ligands on larger scaffolds including polymers, dendrimers, and organic and inorganic nanoparticles as well as self-assemblies, liposomes, and viruses. Structural and physicochemical properties of these conjugates, such as size, shape and type of scaffold, nature, and density and accessibility of the ligands, were proven to be key parameters for their efficiency in biological media. Some of these systems have been used to obtain so-called super-selective targeting properties.[4]

To further increase biospecificity, it would be relevant to develop bio-inspired conjugates bearing two levels of multivalency, i.e., combining a large multifunctional scaffold (first level of multivalency) and multiple clusters of ligands (second level of multivalency).[5] To our knowledge, there have been very few systems described in the literature. They exclusively refer to nanoparticles or micelles, functionalized with carbohydrate ligand dendrons. Gillies et al.[6] compared nanoparticles functionalized with dendritic and nondendritric displays of mannose. Similarly, Stenzel et al.[7] compared polymer micelles

Received: June 26, 2017
Revised: July 27, 2017
Published: August 2, 2017

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00362
Bioconjugate Chem. 2017, 28, 2241–2245

presenting at the surface either glycodendrons (eight glucose residues per dendron) or linear glycopolymer blocks (each bearing, on average, nine glucose residues). Moreover, Davis et al.[8] introduced glyco-dendri-protein nanoparticles with a so-called "nested polyvalency" that were able to potently block viral infections. In all those cases, the two-level multivalent glyconanoparticles demonstrated an enhanced avidity for their targets.

In this study, we designed and evaluated a new class of macromolecular conjugates that can be termed "polymultivalent" ligands. They combine a water-soluble, multifunctional, and flexible polymer chain and several ligand clusters (here, peptide clusters with four cyclic RGD ligands consisting of −Arg−Gly−Asp−DPhe−Lys−, named cRGD) (Figure 1). As introduced by Ringsdorf,[9] polymer chains represent an important scaffold family, enabling the preparation of a wide array of bioactive conjugates.

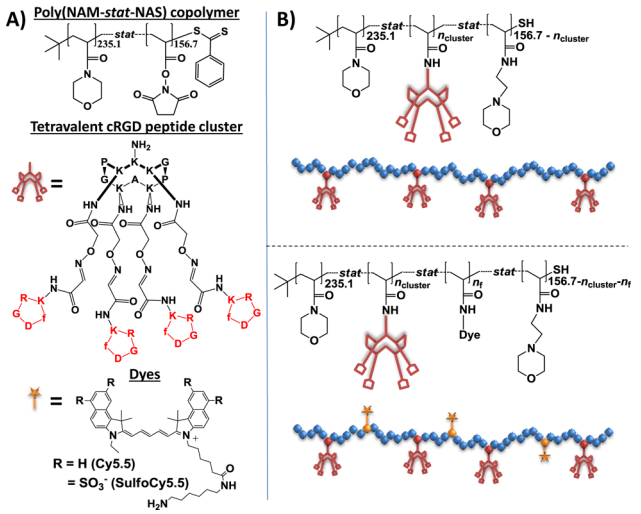


Figure 1. (A) Structure of the reactive copolymer, the tetravalent cRGD peptide cluster, and the cyanine 5.5 dyes. (B) Structure and schematic representation of the polymultivalent conjugates.

RGD, and especially cRGD,[10] peptides are particularly attractive because they exhibit a high affinity for integrins actively involved in processes such as cell adhesion and physiological and tumor angiogenesis.[11] These ligands were shown to efficiently bind integrins both in vitro and in vivo and are now being clinically evaluated.[12a] RGD ligands are widely used for the targeted delivery of several types of drugs and diagnostic agents and the impact of their multivalent presentation has clearly been established.[12b]

The tetravalent cRGD peptide cluster used in this study (Figure 1A) was prepared from a cyclodecapeptide platform that displays, in a spatially controlled manner, (i) a clustered ligand domain for integrin recognition and, on the opposite side, (ii) a lysine primary amine group enabling the regioselective conjugation with different types of entities.[14,15] Thanks to the constrained multivalency, such a peptide cluster has already demonstrated a higher avidity for $\alpha_v\beta_3$ integrins (increased statistical rebinding effects) than the corresponding monovalent cRGD peptide.[14,16] Negative controls with cRAD peptide clusters ensured that integrin recognition was specific.[14] In addition, the benefit of the tetrameric cluster compared to the monomeric ligand was confirmed on grafted surfaces.[16c,d] The multivalent effect at a 1 nm length scale (provided by the cluster) could be discriminated from the one at a larger scale (provided by the grafted surface).[16d]

Several cRGD peptide clusters were covalently bound along a well-defined reactive copolymer. Poly(*N*-acryloylmorpholine−*stat*−*N*-acryloxysuccinimide), poly(NAM−*stat*−NAS) (Figure 1A), was synthesized by reversible addition−fragmentation chain transfer (RAFT) controlled radical polymerization[17] using a previously optimized procedure.[18] In addition to the inherent advantages of RAFT polymerization, this copolymer exhibits several interesting features. First, NAM units ensure good water solubility and biocompatibility. Poly(*N*-acryloylmorpholine) indeed exhibits similar properties to polyethylene glycol (PEG), known to limit nonspecific biointeractions.[19] Moreover, NAS units provide lateral reactive groups (activated esters) that are regularly distributed along the polymer backbone at the chosen 60/40 mol % NAM/NAS azeotropic composition.[18a] Due to the size of the cRGD peptide cluster (ca. 4 500 g·mol^{-1}), a 60 kg mol^{-1} copolymer backbone was selected to bind several clusters while limiting the effects of steric hindrance on the coupling yield. The conjugation of a controlled number of clusters was achieved by reacting the amine group of the lysine side chain of the peptide cluster with the activated ester functions of the copolymer, resulting in stable amide bonds. Finally, the remaining activated ester functions were capped with a hydrophilic moiety, aminoethylmorpholine (AEM) (Scheme S1).

In addition to a copolymer bearing no peptide cluster used as control for the bioassays, three polymer−peptide cluster conjugates (named polymer−cluster below) were prepared with an increasing average number of clusters per conjugate ($n_{cluster}$ = 1.5, 4.2, and 5.9, respectively) (Table 1, left). Because all of the conjugates were highly soluble in aqueous media, they could be thoroughly purified by dialysis.

To quantify the coupling yield, $n_{cluster}$ and to check the efficiency of the purification procedure, the purified conjugates were characterized using both ^{1}H NMR (500 MHz) and

Table 1. Characteristics and IC_{50} Values of the Various Polymer−Peptide Cluster Conjugates (Left) and Characteristics of the Fluorescent Conjugates (Right)

conjugate	M_n[a] (g mol^{-1})	$n_{cluster}$[b]	IC_{50}[c] (nM cluster) [relative potency][e]	IC_{50}[d] (nM conjugate) [relative potency][e]
free cluster	4 447	1	190 ± 30 [1]	190 ± 30 [1]
C0	62 100	0	none [0]	none [0]
C1.5	76 500	1.5	440 ± 70 [0.4]	290 ± 50 [0.6]
C4.2	77 900	4.2	33 ± 5 [5.6]	8 ± 1 [23]
C5.9	84 300	5.9	100 ± 20 [1.9]	17 ± 4 [11]

fluorescent conjugate	M_n[a] (g mol^{-1})	n_f[f]	$n_{cluster}$[b]
free cluster[g]	5 454	1	1
C0−Cy5.5[h]	63 900	3.1	0
C0−SulfoCy5.5[g]	65 800	3.7	0
C4.2−Cy5.5[h]	79 900	3.6	4.2
C4.8−SulfoCy5.5[g]	83 800	3.7	4.8

[a]M_n: number-average molecular weight. [b]$n_{cluster}$: average number of peptide clusters per conjugate determined by ^{1}H NMR. [c]Values expressed in molar concentration of peptide cluster. [d]Values expressed in molar concentration of conjugate (peptide cluster concentration/$n_{cluster}$). [e]Relative potency is calculated by dividing the IC_{50} value of the free peptide cluster by one of the polymer−peptide cluster conjugates. [f]n_f: average number of dyes per polymer chain determined by SEC−UV.[13] [g]Labeled with SulfoCy5.5. [h]Labeled with Cy5.5.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00362
Bioconjugate Chem. 2017, 28, 2241−2245

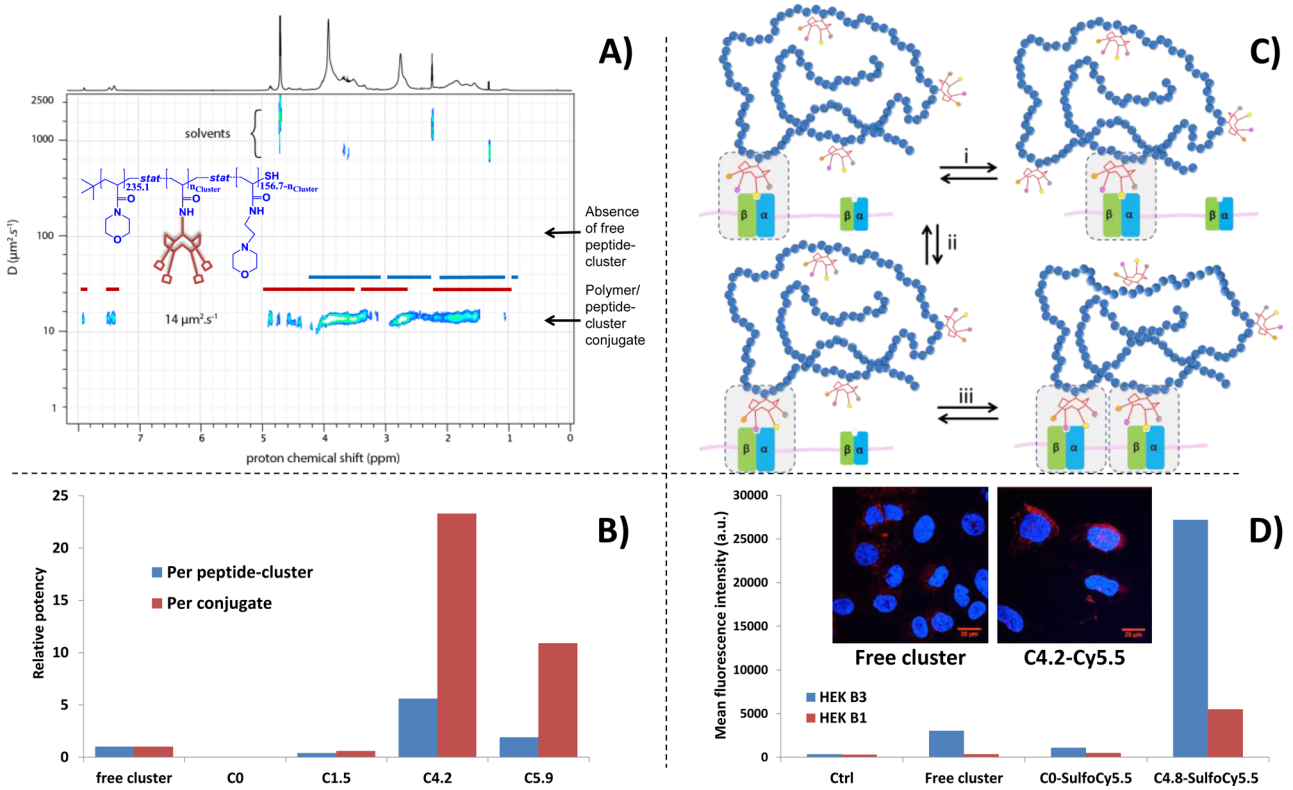


Figure 2. (A) Typical ^{1}H DOSY NMR spectrum of a purified polymer−peptide cluster conjugate (D_2O−CD_3CN, 70:30, v/v, 500 MHz, 298 K) showing aligned peptide and polymer signals at a diffusion coefficient of D = 14 μm^2 s^{-1}. Peptide cluster peaks (shift range highlighted in red) partially overlap polymer backbone peaks (shift range highlighted in blue). (B) Relative potency (calculated by dividing the IC_{50} value of the free peptide cluster by the one of the polymer−peptide cluster conjugate for the various conjugates) expressed either in terms of peptide cluster concentration, $C_{cluster}$ (blue), or in terms of conjugate concentration, C_{conj} (red), with $C_{cluster} = C_{conj} \times n_{cluster}$; see also Table 1 and the Supporting Information. (C) Schematic representation of possible interactions between a polymultivalent polymer−peptide cluster conjugate and a $\alpha_v\beta_3$-integrin-presenting target: panels i and ii illustrate the increased statistical rebinding effect, and panel iii illustrates the ability of a polymultivalent conjugate to bind several integrins. Dotted boxes: zoomed-in region showing cRGD−integrin interaction. (D) Cell labeling quantified by flow cytometry: Mean fluorescence intensity of HEKβ3 (blue histograms) and HEKβ1 (red histograms) cells after incubation with the free cluster, the copolymer without cluster C0−SulfoCy5.5, and the polymer−peptide cluster conjugate C4.8−SulfoCy5.5 at 0.1 μM (peptide cluster concentration). Ctrl: control with cells only; λ_{exc} = 640 nm. Inserts: Confocal microscopy images of HEKβ3 cells labeled with the free cluster (left) and the conjugate C4.2−Cy5.5 (right) at 0.1 μM (peptide cluster concentration). Dyes (red, λ_{exc} = 633 nm), nuclei (blue, λ_{exc} = 405 nm). Scale bar: 20 μm. See also the Supporting Information.

diffusion-ordered NMR spectroscopy (^{1}H DOSY NMR) (see the Supporting Information). ^{1}H DOSY NMR is indeed able to discriminate peptide clusters bound along the polymer chain from free peptide clusters (Figure 2A). The coupling was confirmed as the peptide cluster, and the polymer signals appeared aligned at a same diffusion coefficient (14 μm^2 s^{-1}), significantly lower than the one of the free peptide clusters (131 μm^2 s^{-1}, Figure S3). Moreover, no signal corresponding to the free cluster was detected, indicating that the purification procedure was very efficient.

The polymultivalent polymer−cluster conjugates were then evaluated in vitro in comparison with the free peptide cluster reference. The ability of the various conjugates to interact with $\alpha_v\beta_3$-positive cells (HEKβ3) was first investigated in a competitive cell adhesion assay against vitronectin, the natural ligand of $\alpha_v\beta_3$ integrins.[20] The inhibition of HEKβ3 cell adhesion onto vitronectin-coated plates was quantified in the presence of increasing concentrations of conjugates from 0.1 to 10 000 nM (Figure S4; each data point was acquired in triplicates).

These assays provided several important insights (Table 1, left and Figure 2B). As expected, there were no nonspecific interactions between the polymer backbone and the integrins. The copolymer C0 without peptide ($n_{cluster}$ = 0) did not inhibit cell adhesion (Figure S5). Inhibition of cell adhesion was exclusively observed with the polymer−cluster conjugates. For conjugate C1.5 with $n_{cluster}$ = 1.5 (IC_{50} = 400 nM), the relative potency was lower than for the free cluster (IC_{50} = 200 nM) (Table 1, left). This is probably due to steric effects because the polymer chain may limit the accessibility of the lateral peptide cluster (Scheme S2). However, further increasing $n_{cluster}$ resulted in a significant decrease of the IC_{50} value and, thus, in a much-higher integrin binding efficiency and relative potency. The polymultivalent conjugate C4.2 with $n_{cluster}$ = 4.2 offered the best compromise (C5.9 conjugate with $n_{cluster}$ = 5.9 exhibited a slightly higher IC_{50} value probably due to crowding effects). The inhibition of cell adhesion was effective for C4.2 concentrations as low as 10 nM. Interestingly, each individual peptide cluster within the C4.2 conjugate exhibited a relative potency 6-fold higher than the free peptide cluster. Considering the relative potency of the conjugate itself, it was 23-fold higher compared to the same reference.

This remarkable result was attributed to several synergetic effects originating from the polymultivalent structure of the

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00362
Bioconjugate Chem. 2017, 28, 2241−2245

polymer−cluster conjugate. Statistical rebinding effects[3] increase with the local concentration of cRGD. Rebinding may occur with cRGD from the polymer chain (Figure 2C,i) and within the peptide cluster (Figure 2C,ii). Moreover, stabilization of the conjugate-cell interaction is increased by the ability of the conjugate to bind several integrins (Figure 2C,iii). It is important to note that this cooperative (or "zip") effect greatly contributes to the enhanced avidity and may favor integrin clustering at the cell surface (see also the Supporting Information)

Additional investigations using confocal fluorescence microscopy and flow cytometry were then conducted. Polymer−cluster conjugates were labeled (Scheme S1) with two different amino-modified cyanine5.5 dyes, Cy5.5 and SulfoCy5.5, following a previously described procedure.[13] SulfoCy5.5 differs from Cy5.5 by the presence of four sulfonate groups on the chromophore (Figure 1A), but both exhibit a similar fluorescence emission in the far-red/near-infrared ranges ($\lambda_{em\ max} \approx 700$ nm). A pair of fluorescent polymer−cluster conjugates, C4.2−Cy5.5 and C4.8−SulfoCy5.5, were synthesized as well as two reference copolymers without peptide clusters, C0−Cy5.5 and C0−SulfoCy5.5, for the in cellulo studies (Table 1, right).

To examine the specificity and the selectivity of the interaction with $\alpha_v\beta_3$-positive cells, the four fluorescent conjugates and the free peptide cluster (labeled with SulfoCy5.5) were incubated with either HEKβ3 or HEKβ1 cells, respectively, over-expressing $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_1$ integrins. The results obtained by both confocal microscopy and flow cytometry experiments were in good agreement (Figures 2D, S8, and S9). In addition, no significant difference was noticed between the conjugates labeled with Cy5.5 or SulfoCy5.5 dyes. First, cell labeling was highly specific. HEKβ3 cells were very efficiently labeled by the polymer−cluster conjugates C4.2−Cy5.5 and C4.8−SulfoCy5.5, whereas no labeling was observed with the reference conjugates without peptide cluster (C0−Cy5.5 and C0−SulfoCy5.5). There were no nonspecific interactions with the fluorescent polymers whatever the dye (with or without sulfonate negative charges). In addition, we observed that the cells tended to detach from the microscopy coverslips only in the presence of the polymer−cluster conjugates. Because cell-surface integrins are actively involved in adhesion mechanisms, this is an important proof that cRGD peptide−integrin interactions occurred and that, for each conjugate, the cRGD motifs are still functional. As seen by confocal microscopy, cell labeling was not restricted to the cell surface but rather distributed in the cytoplasm. This is of particular importance for targeted delivery applications. Compared to the free peptide cluster, the labeling intensity of the HEKβ3 cells, and thus, the labeling sensitivity were significantly enhanced with the polymer−cluster conjugates. This can be ascribed to a combination of two different parameters, with the higher brightness of the polymer conjugates that bear multiple dyes per chain compared to the free cluster (bearing only one dye) (see the Supporting Information) and the higher binding efficiency to $\alpha_v\beta_3$ integrins of the polymer conjugates thanks to their polymultivalency.

Finally, comparison of the results with HEKβ3 and HEKβ1 cells indicated that the labeling was also selective. Labeling intensity was systematically higher for HEKβ3 cells (expressing more $\alpha_v\beta_3$ integrins) than for HEKβ1 cells. These results were consistent with those obtained with other cells lines expressing various levels of $\alpha_v\beta_3$ integrins, the M21 and M21L pair of melanoma cell lines, and the integrin-positive U87MG glioblastoma cell line (Figure S9).

In conclusion, we have designed a new class of highly potent "polymultivalent" ligands that are very versatile. They could give rise in the future to various engineered systems such as random coils, single-chain nanoparticles, or larger assemblies. These biocompatible conjugates hold great promise for the vectorization of various kinds of diagnostic and/or therapeutic entities (attachment can be performed through a wide range of strategies) toward $\alpha_v\beta_3$-integrin-rich environments. For instance, the conjugates can be applied as biospecific fluorescent probes to study various biological processes involving $\alpha_v\beta_3$ integrins, both in vitro and in vivo. Futhermore, they may be used for the early diagnosis and the treatment of a large number of cancer tumors that over-express $\alpha_v\beta_3$ integrins, especially because of their associated neo-angiogenesis.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00362.

Detailed experimental and analytical details. Tables on peptide cluster characteristic data, average chain length, and a comparison of spectrophysical properties. Figures showing conjugate synthesis pathways, NMR data, cell adhesion inhibition, structural considerations, steric effects, statistical rebinding effects, polymultivalent conjugates, SEC/UV chromatograms, emission spectra, and cell labeling. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: arnaud.favier@univ-lyon1.fr.
*E-mail: jean-luc.coll@univ-grenoble-alpes.fr.
*E-mail: didier.boturyn@univ-grenoble-alpes.fr.

ORCID

Arnaud Favier: 0000-0002-7482-7874

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Cristina Cepraga for the synthesis of poly(NAM−*stat*−NAS) copolymer; the ICMG Chemistry Nanobio Platform, Grenoble, for support on peptide synthesis; Alexei Grichine, Jacques Mazzega, and Mylene Pezet from the MicroCell imaging facility of IAB, Grenoble, for their technical help; the NMR Polymer Center of Institut de Chimie de Lyon (ICL, FR5223); and Carlos Baleizao and José-Paulo Farinha (CQFM, Instituto Tecnico Superior, Lisbon, Portugal) for the absorption and fluorescence emission spectra. We also thank Région Rhône-Alpes (ARC1 Santé) and La Ligue contre le Cancer, Comité du Rhône for financial support. D.D. acknowledges a PhD grant from the French Ministry of Research and Education.

■ REFERENCES

(1) Mammen, M., Choi, S.-K., and Whitesides, G. M. (1998) Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem., Int. Ed.* 37, 2754.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00362
Bioconjugate Chem. 2017, 28, 2241−2245

(2) (a) Krishnamurthy, V. M., Estroff, L. A., and Whitesides, G. M. Multivalency in Ligand Design. In *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; pp 11. (b) Carlson, C. B., Mowery, P., Owen, R. M., Dykhuizen, E. C., and Kiessling, L. L. (2007) Selective tumor cell targeting using low-affinity, multivalent interactions. *ACS Chem. Biol. 2*, 119. (c) Fasting, C., Schalley, C. A., Weber, M., Seitz, O., Hecht, S., Koksch, B., Dernedde, J., Graf, C., Knapp, E.-W., and Haag, R. (2012) Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. *Angew. Chem., Int. Ed. 51*, 10472. (d) Cecioni, S., Imberty, A., and Vidal, S. (2015) Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. *Chem. Rev. 115*, 525. (e) Varner, C. T., Rosen, T., Martin, J. T., and Kane, R. S. (2015) Recent Advances in Engineering Polyvalent Biological Interactions. *Biomacromolecules 16*, 43.

(3) Gestwicki, J. E., Cairo, C. W., Strong, L. E., Oetjen, K. A., and Kiessling, L. L. (2002) Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J. Am. Chem. Soc. 124*, 14922.

(4) (a) Martinez-Veracoechea, F. J., and Frenkel, D. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108*, 10963. (b) Dubacheva, G. V., Curk, T., Mognetti, B. M., Auzély-Velty, R., Frenkel, D., and Richter, R. P. (2014) Designing super selectivity in multivalent nano-particle binding. *J. Am. Chem. Soc. 136*, 1722.

(5) Poon, Z., Chen, S., Engler, A. C., Lee, H.-i., Atas, E., von Maltzahn, G., Bhatia, S. N., and Hammond, P. T. (2010) Ligand-clustered "patchy" nanoparticles for modulated cellular uptake and in vivo tumor targeting. *Angew. Chem., Int. Ed. 49*, 7266.

(6) Martin, A. L., Li, B., and Gillies, E. R. (2009) Surface functionalization of nanomaterials with dendritic groups: toward enhanced binding to biological targets. *J. Am. Chem. Soc. 131*, 734.

(7) Kumar, J., Bousquet, A., and Stenzel, M. H. (2011) Thiol-alkyne chemistry for the preparation of micelles with glycopolymer corona: dendritic surfaces versus linear glycopolymer in their ability to bind to lectins. *Macromol. Rapid Commun. 32*, 1620.

(8) Ribeiro-Viana, R., Sánchez-Navarro, M., Luczkowiak, J., Koeppe, J. R., Delgado, R., Rojo, J., and Davis, B. G. (2012) Virus-like glycodendrinanoparticles displaying quasi-equivalent nested polyvalency upon glycoprotein platforms potently block viral infection. *Nat. Commun. 3*, 1303.

(9) Ringsdorf, H. (1975) Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polym. Sci., Polym. Symp. 51*, 135.

(10) Pfaff, M., Tangemann, K., Müller, B., Gurrath, M., Müller, G., Kessler, H., Timpl, R., and Engel, J. (1994) Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J. Biol. Chem. 269*, 20233.

(11) (a) Hynes, R. O. (2002) A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Med. 8*, 918. (b) Kairbaan, H.-D. (2008) alpha v beta 3 integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment. *Curr. Opin. Cell Biol. 20*, 514. (c) Keramidas, M., Josserand, V., Feige, J.-J., and Coll, J.-L. (2013) Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using RGD-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges. *Mol. Imaging Biol. 15*, 239.

(12) (a) Danhier, F., Breton, A. L., and Préat, V. (2012) RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol. Pharmaceutics 9*, 2961. (b) Chen, X., Plasencia, C., Hou, Y., and Neamati, N. (2005) Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J. Med. Chem. 48*, 1098. Mukhopadhyay, S., Barnes, C. M., Haskel, A., Short, S. M., Barnes, K. R., and Lippard, S. J. (2008) Conjugated platinum(IV)-peptide complexes for targeting angiogenic tumor vasculature. *Bioconjugate Chem. 19*, 39. Li, Z.-B., Cai, W., Chen, K., Wu, Z., He, L., and Chen, X. (2007) (64)Cu-labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor alpha(v)beta(3) integrin expression. *J. Nucl. Med. 48*, 1162. Jin, Z. H., Josserand, V., Foillard, S., Boturyn, D., Dumy, P., Favrot, M. C., and Coll, J. L. (2007) In vivo optical imaging of integrin αV-β3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol. Cancer 6*, 41.

(13) Cepraga, C., Gallavardin, T., Marotte, S., Lanoe, P.-H., Mulatier, J.-C., Lerouge, F., Parola, S., Lindgren, M., Baldeck, P. L., Marvel, J., Maury, O., Monnereau, C., Favier, A., Andraud, C., Leverrier, Y., and Charreyre, M.-T. (2013) Biocompatible well-defined chromophore–polymer conjugates for photodynamic therapy and two-photon imaging. *Polym. Chem. 4*, 61.

(14) Boturyn, D., Coll, J.-L., Garanger, E., Favrot, M.-C., and Dumy, P. (2004) Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc. 126*, 5730.

(15) (a) Boturyn, D., Defrancq, E., Dolphin, G. T., Garcia, J., Labbe, P., Renaudet, O., and Dumy, P. (2008) RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications. *J. Pept. Sci. 14*, 224. (b) Misra, S. K., Kondaiah, P., Bhattacharya, S., Boturyn, D., and Dumy, P. (2014) Co-liposomes comprising a lipidated multivalent RGD-peptide and a cationic gemini cholesterol induce selective gene transfection in $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrin receptor-rich cancer cells. *J. Mater. Chem. B 2*, 5758.

(16) (a) Garanger, E., Boturyn, D., Coll, J.-L., Favrot, M.-C., and Dumy, P. (2006) Multivalent RGD synthetic peptides as potent alphaVbeta3 integrin ligands. *Org. Biomol. Chem. 4*, 1958. (b) Sancey, L., Garanger, E., Foillard, S., Schoehn, G., Hurbin, A., Albiges-Rizo, C., Boturyn, D., Souchier, C., Grichine, A., Dumy, P., and Coll, J.-L. (2009) Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol. Ther. 17*, 837. (c) Foillard, S., Dumy, P., and D. Boturyn, D. (2009) Highly efficient cell adhesion on beads functionalized with clustered peptide ligands. *Org. Biomol. Chem. 7*, 4159. (d) Degardin, M., Thakar, D., Claron, M., Richter, R. P., Coche-Guérente, L., and Boturyn, D. (2017) Development of a selective cell capture and release assay: impact of clustered RGD ligands. *J. Mater. Chem. B 5*, 4745.

(17) (a) Chiefari, J., Chong, Y. K., Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T. P. T., Mayadunne, R. T. A., Meijs, G. F., Moad, C. L., Moad, G., Rizzardo, E., and Thang, S. H. (1998) Living free-radical polymerization by reversible addition–fragmentation chain transfer: The RAFT process. *Macromolecules 31*, 5559. (b) Favier, A., and Charreyre, M. T. (2006) Experimental requirements for an efficient control of free-radical polymerizations via the reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) process. *Macromol. Rapid Commun. 27*, 653.

(18) (a) Favier, A., D'Agosto, F., Charreyre, M. T., and Pichot, C. (2004) Synthesis of N-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer 45* (23), 7821. (b) Favier, A., and Charreyre, M. T. *Method for controlled free-radical polymerization*; WO 04/055060, April 10, 2004.

(19) Bencini, M., Ranucci, E., Ferruti, P., Manfredi, A., Trotta, F., and Cavalli, R. (2008) Poly(4-acryloylmorpholine) oligomers carrying a β-cyclodextrin residue at one terminus. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 46*, 1607.

(20) Galibert, M., Sancey, L., Renaudet, O., Coll, J.-L., Dumy, P., and Boturyn, D. (2010) Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates. *Org. Biomol. Chem. 8* (22), 5133.

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00362
Bioconjugate Chem. 2017, 28, 2241–2245