



HAL
open science

Validation d'un agent d'imagerie TEP, le 68 Ga-sCD146, permettant l'évaluation in vivo de l'expression de l'angiotensine

Anaïs Moyon

► **To cite this version:**

Anaïs Moyon. Validation d'un agent d'imagerie TEP, le 68 Ga-sCD146, permettant l'évaluation in vivo de l'expression de l'angiotensine. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01591575

HAL Id: dumas-01591575

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01591575>

Submitted on 21 Sep 2017

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.



MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE DES COLLECTIVITES

Soutenu le 08 septembre 2017

Par Mme Anais MOYON
Né(e) le 10/10/1989

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988
tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---oOo---

TITRE :
**Validation d'un agent d'imagerie TEP, le ^{68}Ga -sCD146,
permettant l'évaluation *in vivo* de l'expression de l'angiotensine**

---oOo---

JURY :

Président :

Pr. Benjamin GUILLET

Membres :

Pr. David TAIEB

Dr. Fabienne GIRAUD

Dr. Sophie LANCELOT

Dr. Philippe GARRIGUE

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIQUE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE
----------------------------	-------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY
Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARDCHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUESM. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANACHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIEM. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1^{er} décembre 2015

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Françoise Dignat-George,

Pour m'avoir permis de réaliser ces travaux au sein de son unité de recherche, pour son soutien et pour son expertise.

Soyez assurée de ma plus grande gratitude et de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Benjamin Guillet,

Pour m'avoir accueilli dans son équipe aussi bien à l'hôpital qu'à la faculté et pour avoir dirigé cette thèse.

Je vous remercie pour votre encadrement sans faille « chef », pour votre disponibilité, pour votre écoute, pour votre confiance. Pour m'avoir tant appris durant ces 4 années passées dans votre service et votre équipe. Vous m'avez transmis la passion pour ce métier. Sachez que je vous témoigne ma plus grande gratitude et admiration. J'espère avoir l'honneur de continuer à travailler avec vous.

A Monsieur le Professeur David Taïeb,

Pour me faire le grand honneur de donner votre expertise sur ce travail. Pour votre disponibilité au sein du service de médecine nucléaire et tous ces précieux conseils scientifiques ou médicaux. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et mon plus grand respect.

A Madame le Docteur Fabienne Giraud,

Je vous remercie pour votre accueil et votre encadrement au sein de la radiopharmacie de la Timone et pour votre gentillesse au quotidien. Pour me faire l'honneur de juger ce travail. Je tiens à vous exprimer ma plus grande gratitude.

A Madame le Docteur Sophie Lancelot,

Pour m'avoir fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail, veuillez agréer mes remerciements les plus sincères. Je vous souhaite aussi toutes mes félicitations pour cet heureux événement.

A Monsieur le Docteur Philippe Garrigue

Pour cette soif constante de travail, pour votre temps, pour vos précieux conseils, pour vos précieuses relectures et pour cet humour... Je vous remercie de me faire l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. Ce fut un réel plaisir d'être votre interne durant cette année à l'hôpital nord. Je tiens à vous

exprimer ma plus grande gratitude.

A Monsieur le Docteur Marcel Blot-Chabaud,

Pour votre expertise sur le sCD146 et son partenaire AMOT, pour votre soutien constant et votre disponibilité. Je vous remercie également pour tous vos précieux conseils et je tiens à vous agréer mes respects et remerciements les plus sincères.

A Guillaume, Ahlem, Marie, Jimmy, Sandrine et Samy pour votre soutien, votre aide et pour tous les moments passés au sein du laboratoire de pharmacodynamie.

A Samantha, Laure et Michel pour votre écoute, votre aide tout au long de ce projet. Je tiens cependant à ne pas vous remercier pour les tentations sucrées présentes dans vos bureaux respectifs.

A Pauline, pour ton écoute constante et pour l'extrême patience dont tu fais preuve face à la multitude de surnoms que j'ai pour toi. Je tiens à te remercier pour ton aide et ton soutien dans ce projet.

A Aude, pour cette année à être interne à tes côtés, pour la qualité de ton enseignement, pour ta rigueur et ta motivation permanente.

A Cathy, merci pour ton accueil, ta gentillesse et ton soutien.

A Marie, Vincent et Robin, pour ces semestres de radiopharmacie ensemble. Cela aura été un réel plaisir de travailler avec vous. Merci pour votre aide dans ce projet.

A Marjory, Marine et Sophie, merci pour votre amitié sans faille datant du primaire ou de la fac. Merci de toujours montrer de l'intérêt quand je vous raconte mes péripéties, merci de comprendre quand j'ai peu de temps à vous consacrer.

A mes parents, mon frère et ma famille, pour m'avoir toujours soutenu et donné les moyens d'aller jusqu'au bout. Je vous suis éternellement reconnaissante pour tout et j'espère vous rendre fier.

A Nicolas, mon conjoint, mon compagnon et mon confident dans cette aventure qu'est la vie. Merci pour ton amour, ton soutien constant, ton écoute, ta patience face à mes journées parfois longues. Ta compréhension face à mes contrariétés et face à mes difficultés pour décrocher. Merci de ce que tu as construit pour nous et merci d'avoir tout assumer afin que je puisse me consacrer à mon accomplissement professionnel. Merci de rendre notre vie si magique mon Monsieur parfait. Et ce n'est que le début !

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	13
1^{ère} partie :.....	15
Ciblage de l'angiogenèse à des fins diagnostiques et thérapeutiques : intérêts et état de l'art.....	15
<i>1.ANGIOGENESE.....</i>	<i>16</i>
1.1 Le vaisseau.....	16
1.2 L'endothélium.....	18
1.3 L'angiogenèse et la vasculogenèse.....	19
1.3.1 Evénements moléculaires.....	21
1.3.1.1. Vasodilatation et perméabilité vasculaire.....	21
1.3.1.2 Dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire.....	21
1.3.1.3 Prolifération et migration des cellules endothéliales.....	21
1.3.1.4 Maturation des vaisseaux.....	22
1.3.2 Régulation de l'angiogenèse : switch angiogénique.....	22
1.3.2.1. Les facteurs angiogéniques.....	24
1.4 L'angiogenèse en contexte physiopathologique.....	29
1.4.1 Angiogenèse post-ischémique.....	29
1.4.1.1 Physiopathologie de l'ischémie artérielle des membres inférieurs (IAMI).....	29
1.4.1.2 Particularités de l'angiogenèse post-ischémique.....	30
1.4.2 Angiogenèse tumorale.....	31
<i>2.CD146, sCD146 et angiomotine : trois acteurs moléculaires avec un rôle clé dans l'angiogenèse.....</i>	<i>32</i>
2.1 CD146, acteur majeur de l'angiogenèse physiologique et pathologique.....	32
2.1.1 Historique et structure.....	32
2.1.2 Localisation et fonction.....	33
2.2 sCD146 : une Forme soluble du CD146.....	34
2.3 L'angiomotine : recepteur du sCD146.....	36
2.3.1 Structure.....	36
2.3.2 AMOT et angiogenèse.....	37
2.3.3 AMOT et cancer.....	37
2.3.4 Les ligands d'AMOT.....	38
<i>3.Imagerie de l'angiogenese : état de l'art.....</i>	<i>39</i>
3.1 Ciblage des intégrines.....	39
3.1.1 Peptides monomériques.....	40
3.1.2 Peptides multimériques.....	44
3.2 Ciblage Du VEGF et de son recepteur VEGFR.....	47
3.2.1 Radiomarquage d'anticorps anti-VEGF.....	47
3.2.2 Radiomarquage du VEGF.....	48
<i>4.Hypothèses et Objectif.....</i>	<i>49</i>

2^{ème} partie :	51
Travaux EXperimentaux	51
1.MATERIELS et METHODES	52
1.1 Modèles animaux	52
1.1.1 Modèle murin d'ischémie périphérique	52
1.1.2 Modèle murin de glioblastome orthotopique	53
1.2 Immunohistochimie	53
1.3 Western Blot	54
1.4 Principe général du radiomarquage	54
1.5 Couplage du CD146 soluble à un chélateur	55
1.6 Mise au point du radiomarquage du sCD146	56
1.7 Contrôle de la pureté radiochimique.	57
1.8 Contrôle de la stabilité en milieu biologique.	58
1.9 Contrôle de l'intégrité du conjugué ⁶⁸ Ga-sCD146	59
1.10 Contrôle de la spécificité du conjugué ⁶⁸ Ga-sCD146	59
1.11 Imagerie PET/CT	60
1.11.1 Préparation des animaux et injection	60
4.11.1.1 Modèle d'ischémie périphérique	60
4.11.1.2 Modèle de glioblastome	60
1.11.2 Equipement et paramètres d'acquisition	61
1.11.3 Reconstructions et quantifications	62
2.RESULTATS	63
2.1 Evaluation de la perfusion tissulaire post chirurgie	63
2.2 Immunohistochimie : surexpression précoce et prolongée d'AMOT en situation post ischémique	64
2.3 Western blot : surexpression de l'isoforme angiogénique P80 et P130 à J5 post ischémie.	65
2.4 Conjugaison sCD146-NODAGA	66
2.5 Mise au point du radiomarquage du conjugué sCD146-NODAGA	66
2.6 Stabilité en milieu biologique	67
2.7 Conservation de l'Intégrité du conjugué ⁶⁸ Ga-sCD146	67
2.8 Conservation de la spécificité du ⁶⁸ Ga-sCD146 pour sa cible	68
2.9 Imagerie PET/CT	69
2.9.1 Biodistribution du conjugué ⁶⁸ Ga-sCD146 chez la souris saine	69
2.9.2 Evaluation de la biodistribution du ⁶⁸ Ga-sCD146 sur un modèle d'ischémie périphérique chez la souris	73
2.9.3 Evaluation de la biodistribution du ¹⁸ FDG sur un modèle d'ischémie périphérique chez la souris	74
2.9.4 Comparaison des profils des rapports <i>i/c</i> des différents traceurs	75
2.9.5 Test de compétition <i>in vivo</i> du ⁶⁸ Ga-sCD146	75
2.9.6 Un signal TEP à J5 corrélé à l'expression d'AMOT est pronostique de la revascularisation tissulaire.	76
2.9.7 Evaluation dans un modèle murin de xélogreffe orthotopique de glioblastome	78
3.DISCUSSION	79

AVANT-PROPOS

L'angiogenèse est un processus permettant le développement des vaisseaux sanguins, notamment dans des processus critiques comme la croissance tumorale et la dissémination métastatique, mais aussi dans les processus cicatriciels et régénératifs post-ischémiques.

L'évaluation notamment par imagerie du potentiel pro-angiogénique d'un tissu présente donc un intérêt évident dans sa caractérisation métabolique, pouvant aider la décision de prise en charge thérapeutique dans de nombreux domaines. Elle répondra en partie à la nécessité de développer de nouveaux outils innovants permettant la réalisation d'une prise en charge personnalisée des patients. A ce jour, aucune modalité d'imagerie n'a été validée pour la réalisation de la quantification directe de l'angiogenèse tissulaire. Certaines permettent de quantifier la vascularisation résultante des processus angiogéniques grâce à l'évaluation de la perfusion, la volémie, ou encore la perméabilité capillaire. Parmi les différentes modalités d'imagerie, l'imagerie isotopique, qui repose sur la détection *in vivo* de la biodistribution d'un radiotracer isotopique offre l'avantage de quantifier l'intensité d'un processus physiologique grâce à la spécificité de la vectorisation du traceur avec une sensibilité de l'ordre du picomolaire.

Ainsi, différents radiotraceurs ciblant des biomarqueurs impliqués dans le processus angiogénique sont actuellement en cours d'évaluation mais la cible ainsi que le radiotracer optimal n'ont pas encore été validés. Nous avons très récemment identifié l'angiomotine (AMOT) comme une nouvelle cible innovante pour l'imagerie du processus angiogénique. Cette étude a pour objectif de valider *in vivo* chez le rongeur un agent d'imagerie le ^{68}Ga -sCD146, développé au sein de notre équipe, permettant l'évaluation de l'angiogenèse tissulaire, processus majeur aussi bien dans la progression tumorale, l'extension métastatique que dans les processus régénératifs de récupération post-ischémique ou post-traumatique.

Les travaux expérimentaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés de manière coordonnée entre la Radiopharmacie de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, le Centre Européen de Recherche en Imagerie Médicale (CERIMED) et le *Vascular Research Center of Marseille* (VRCM, Inserm UMR_S 1076). L'ensemble de ce travail a été effectué sous la direction du Pr Benjamin GUILLET.

La première partie de ce mémoire sera consacrée à un état de l'art concernant l'intérêt d'imager et de cibler l'angiogenèse du fait de son implication dans la récupération post-ischémique ainsi que dans le développement tumoral. Dans une seconde partie, nous présenterons le design et la synthèse d'un agent d'imagerie TEP innovant qui a fait l'objet d'un dépôt de brevet, le ^{68}Ga -sCD146, ainsi que son

évaluation dans différents modèles murins, notamment un modèle d'ischémie périphérique et un modèle tumoral. Nous détaillerons les différentes méthodes expérimentales ainsi que les résultats obtenus avant de discuter des différentes perspectives que nous offrent ce travail.

1^{ERE} PARTIE :

CIBLAGE DE L'ANGIOGENESE A DES FINS DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES : INTERETS ET ETAT DE L'ART

1. ANGIOGENESE

L'angiogenèse correspond au phénomène de formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux sanguins préexistants. Ce phénomène est impliqué physiologiquement dans de nombreux contextes comme le développement embryonnaire, la cicatrisation, le cycle ovarien mais aussi lors des processus enclenchés lors de la réparation tissulaire en situation post ischémique ou péri-inflammatoire [1][2].

La dérégulation de l'angiogenèse contribue au développement de nombreuses pathologies comme les rétinopathies diabétiques, l'athérosclérose, la progression tumorale et la dissémination métastatique [1][3][4].

1.1 LE VAISSEAU

Le système vasculaire permet l'approvisionnement sanguin des différents organes. Physiologiquement la circulation sanguine est réalisée du cœur vers les organes dans les artères et des organes vers le cœur pour les veines. Les artères transportent ainsi le sang oxygéné et les veines le sang désoxygéné sauf dans certaines situations particulières comme dans l'artère pulmonaire qui draine le sang désoxygéné du ventricule droit jusqu'aux alvéoles ainsi que dans le système ombilical.

Histologiquement les vaisseaux sont constitués par trois tuniques distinctes :

- l'adventice ou *externa*: couche externe du vaisseau, elle est composée essentiellement par du tissu conjonctif et des fibres élastiques. Elle constitue la source nourricière du vaisseau via un réseau capillaire appelé *vasa vasorum*.
- La média : tunique médiane, elle est composée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques permettant la vasodilatation ou la vasoconstriction du vaisseau.
- L'intima : la plus interne est composée par une monocouche d'épithélium en contact direct avec la lumière vasculaire et donc avec le sang circulant.

Au sein du réseau vasculaire, on distingue deux types d'artères :

- Les artères élastiques (diamètre 1cm, épaisseur 1mm) présentent une haute teneur en fibres élastiques et constituent les troncs artériels principaux.
- Les artères musculaires (diamètre 6mm, épaisseur 1mm) sont pauvres en fibres élastiques et se situent majoritairement au niveau des organes.

L'interface entre les artères et le lit capillaire est assurée par les artérioles (diamètre $37\mu\text{m}$, épaisseur $6\mu\text{m}$). Leur paroi est principalement composée d'une monocouche de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses permettant un contrôle de la vasomotricité et de la résistance périphérique au sein de l'arbre vasculaire.

En aval des capillaires, on retrouve les veinules (diamètre $20\mu\text{m}$, épaisseur $1\mu\text{m}$) et les veines (diamètre 5mm , épaisseur $0,5\text{mm}$) assurant le retour sanguin vers le cœur. Elles sont constituées d'une paroi moins épaisse et moins musculeuse que les artères.

Les capillaires (diamètre $9\mu\text{m}$, épaisseur $0,5\mu\text{m}$) présentent une monocouche de cellules endothéliales pour paroi permettant la diffusion des éléments du sang vers les tissus.

On retrouve trois types de capillaires dont la structure et la localisation diffèrent :

- Les capillaires continus présentent une monocouche de cellules endothéliales très jointives et une lame basale externe entourée de péricytes. Ils sont peu perméables et sont les plus répandus au sein du réseau vasculaire (peau, muscles, tube digestif, appareil respiratoire).
- Les capillaires fenestrés présentent une perméabilité plus importante grâce à la présence de pores au sein des cellules endothéliales et l'absence de péricytes. Ils sont localisés dans les reins, l'intestin grêle, les glandes endocrines.
- Les capillaires discontinus ou sinusoides sont plus larges et plus tortueux et présentent une lame basale incomplète, des cellules endothéliales fenestrées et séparées par de grandes fentes intercellulaires. On retrouve ce type de capillaires dans le foie, la moelle osseuse et la rate.
-
-

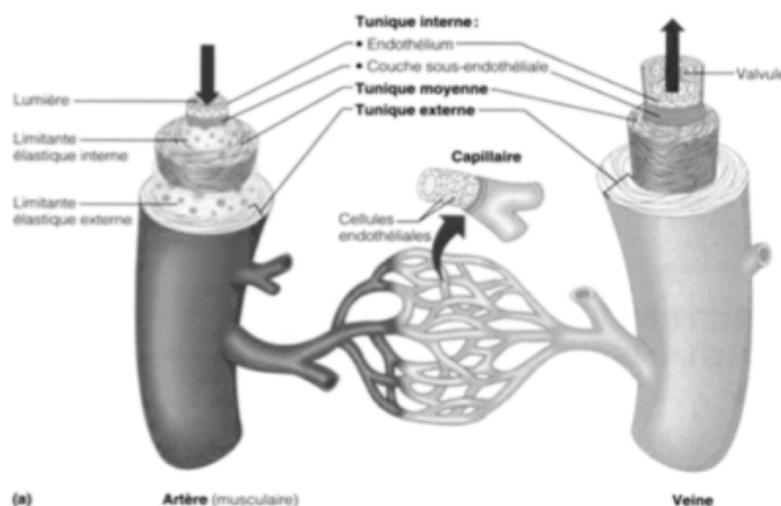


Figure 1 : Composition d'une artère, d'une veine et de capillaires. [5]

1.2 L'ENDOTHELIUM

L'endothélium est présent à la surface des vaisseaux sanguins et constitue une interface entre le sang circulant et les tissus. Les cellules endothéliales qui le composent sont agencées en un épithélium pavimenteux simple, plus ou moins perméable aux échanges gazeux, liquidiens, et métaboliques. Les cellules endothéliales sont polarisées : face apicale côté luminal, face basale côté limitante interne. [6]

Les cellules endothéliales sont reliées entre elle par [7]:

- Des jonctions communicantes (*gap*) permettant le passage de petites molécules entre leurs cytoplasmes.
- Des jonctions d'ancrage ou jonctions adhérentes assurant la cohésion mécanique de la tunique vasculaire.
- Des jonctions serrées (*tight junctions*) permettant la fusion du feuillet externe de chaque membrane plasmique, retrouvées notamment au niveau des capillaires et du système nerveux central.

Les cellules endothéliales sont reliées depuis leur cytosquelette d'une part (filaments intermédiaires) à la matrice extracellulaire basale d'autre part via des jonctions de type hémidesmosome. Il s'agit donc d'un tissu pouvant résister à de fortes sollicitations mécaniques (notamment dans les troncs artériels proches du cœur et les artérioles), mais perméable aux substances dissoutes de petites tailles et à l'eau. Les cellules telles que les hématies ne peuvent pas les traverser mais les leucocytes, très déformables, le peuvent.

Les cellules endothéliales développent des activités multiples en regard et en échange du flux sanguin : elles réagissent aux activateurs transportés par le plasma comme au contact des éléments figurés, et sont sensibles aux pressions résultant du flux sanguin.

L'endothélium, au contact du sang circulant, subit trois types de forces hémodynamiques :

- La pression hydrostatique générée directement par le volume de liquide sur la paroi vasculaire.
- L'étirement cyclique (*cyclic stretching*) qui correspond à une distension de la paroi induite par un gradient de pression transmurale. Le principal effet de l'étirement cyclique est

l'induction d'un stress oxydatif au niveau des cellules endothéliales ;

- Les contraintes de cisaillement (*shear stress*) qui correspondent aux forces frictionnelles exercées par le flux sanguin contre la paroi vasculaire.

De manière physiologique, l'endothélium présente des propriétés antithrombosantes et anti-adhésives ce qui permet d'assurer la fluidité sanguine. Lors d'agressions multifactorielles, l'endothélium va inverser ces fonctions, d'abord par le biais de matériel stocké, puis plus tardivement via la transcription de gènes jusque-là réprimés. L'endothélium déclenche un « réflexe » qui a pour objectifs d'arrêter le saignement par oblitération de microvaisseaux, et permettre le transit cellulaire qui résulte de l'effet chémo-attractant de l'inflammation. Ces effets, bénéfiques *a priori* dans le saignement, deviennent au contraire délétères au cours de l'ischémie et de la thrombose en générant une anoxie prolongée qui elle-même, va rétro-contrôler positivement cette activation. Ainsi, au cours de la réimperméabilisation, des agonistes, cytokines, et radicaux libres sont libérés, provoquant les phénomènes d'ischémie-reperfusion. [6]

1.3 L' ANGIOGENESE ET LA VASCULOGENESE

Lors du développement de l'embryon, il existe plusieurs processus de formation des vaisseaux sanguins [1]:

La vasculogénèse correspond à la différenciation des précurseurs hémangioblastiques en plexus vasculaire primitif.

L'angiogénèse qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Pendant l'embryogénèse, l'origine de l'organe définit le processus de néovascularisation. La vasculogénèse est le mécanisme prépondérant dans les ébauches d'organes constitués d'endoderme (poumon, pancréas, rate) et de mésoderme tandis que la vascularisation s'établit par angiogénèse dans les organes composés de mésoderme et d'ectoderme (cerveau, rein)[8].

En plus du rôle qu'elle joue dans le développement embryonnaire, l'angiogénèse, après la naissance, contribue à la croissance des organes. Durant la vie adulte la néovascularisation s'effectue principalement par angiogénèse [9]. Les vaisseaux sont majoritairement quiescents et l'angiogénèse a alors lieu uniquement durant le cycle ovarien, dans le placenta durant la gestation ou bien lors des processus enclenchés lors d'une réparation tissulaire ou suite à une ischémie[1][2].

L'angiogenèse est un processus complexe et finement régulé, qui a pour acteurs les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules inflammatoires, la matrice extracellulaire, ainsi qu'une série de facteurs régulateurs :

Trois modes d'angiogenèse ont été décrits (Fig. 2) [10] :

- Le bourgeonnement ou *sprouting*, mode le plus communément rencontré pendant le développement, la croissance, et de manière dérégulée dans les tumeurs : les cellules endothéliales activées vont induire une dégradation de la matrice extracellulaire sous-jacente ; après une migration guidée et une prolifération, les cellules endothéliales s'organisent en structure capillaire.
- L'intussusception qui consiste en un élargissement et une séparation par cloisonnement des vaisseaux déjà formés. Ce phénomène est décrit durant le développement de la microvasculature embryonnaire [82, 84].
- La septation ou cooptation ou *bridging* : les cellules endothéliales poussent à l'intérieur du vaisseau préexistant, créant des canaux vasculaires séparés. Initialement décrit durant l'embryogenèse, ce phénomène a également été retrouvé dans diverses situations tumorales [83].

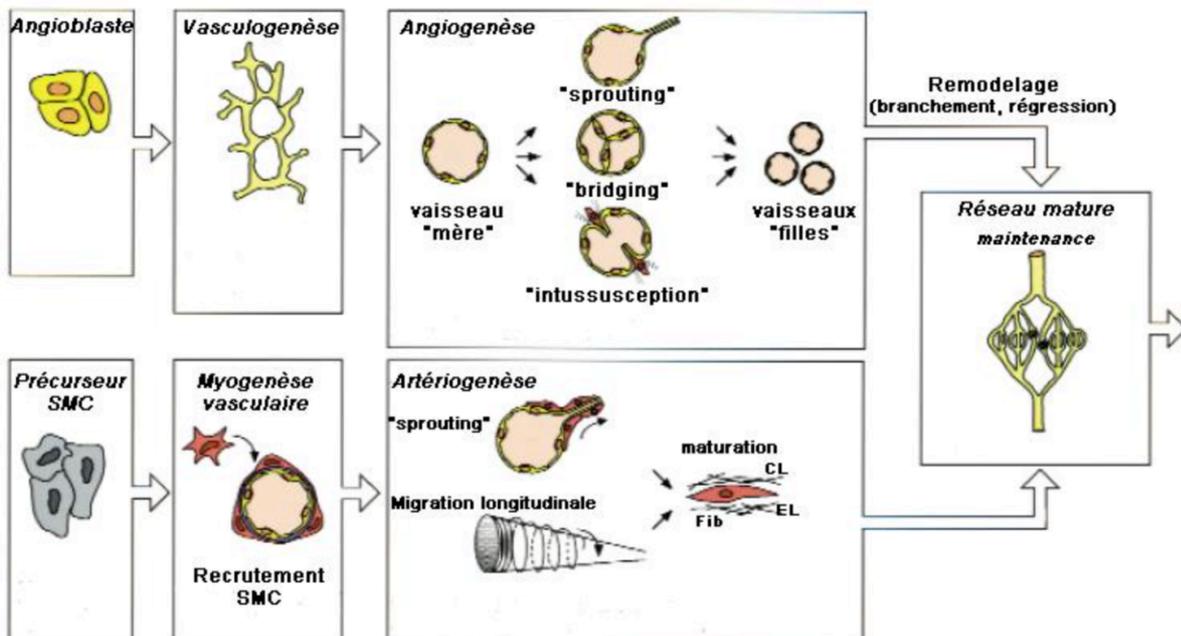


Figure 2 : Angiogenèse et vasculogenèse. Les différents mécanismes angiogéniques. Fib : fibrilline ; Ci, collagène ; EI élastine. [11]

1.3.1 Événements moléculaires

1.3.1.1 Vasodilatation et perméabilité vasculaire.

Durant le mécanisme de néovascularisation bourgeonnante, les vaisseaux existants se dilatent et deviennent perméables au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sous l'action du monoxyde d'azote (NO) et de l'angiopoïétine-1 (Ang-1). L'induction par le VEGF permet d'augmenter la perméabilité vasculaire et entraîne l'extravasation des protéines plasmatiques qui serviront de matrice lors de la migration des cellules endothéliales vasculaires [11][12][13].

1.3.1.2 Dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire et la membrane basale sont dégradées suite à l'activation de protéases parmi lesquelles on peut citer les héparinases, les métalloprotéinases (MMP-2, 3 et 9), l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA). Lors de la dégradation de la matrice extracellulaire on retrouve une sécrétion de VEGF, de FGF (*Fibroblast Growth Factor*) au niveau de la matrice interstitielle [11][13]. La déstabilisation des vaisseaux matures entraîne ainsi le détachement des cellules musculaires lisses et le relâchement de la matrice ce qui permet la migration des cellules endothéliales au niveau interstitiel. L'angiopoïétine-2 (Ang-2) joue un rôle prépondérant durant ce processus [12].

1.3.1.3 Prolifération et migration des cellules endothéliales.

La dégradation des barrières physiques permet aux cellules endothéliales de migrer et de proliférer en fonction du gradient de chémokines établi par les stimulants pro-angiogéniques. Les cellules migrantes s'allongent et s'alignent afin de former un bourgeon capillaire [14]. La survie et la prolifération des cellules endothéliales sont favorisées par l'activation de la voie PI3K/Akt qui est régulée par de nombreux régulateurs du cycle cellulaire, parmi lesquels la cycline D1, Bcl-X2 et p27. De plus, les voies de signalisation MAPK (*mitogen activated protein kinase*), JNK (c-jun N-terminal kinase) et p38 régulent l'effet des facteurs de croissance et la prolifération des cellules endothéliales vasculaires. L'expression membranaire des intégrines à la surface des cellules endothéliales facilite l'adhésion à la matrice extracellulaire durant la migration. Ainsi, l'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ augmente dans les cellules endothéliales en prolifération grâce à la stimulation par le bFGF (*basic FGF*) et le VEGF [15].

1.3.1.4 Maturation des vaisseaux.

Après la migration et la prolifération, les cellules endothéliales se rassemblent sous forme de tubes puis il y a formation du lumen[15]. Il existe, au niveau moléculaire, plusieurs facteurs régulant la formation du lumen : les isoformes du VEGF, les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, le récepteur EGD1(*endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor-1*), ainsi que l'angiopoïétine-1 qui, en collaboration avec le VEGF, augmente le diamètre du lumen [12].

Lors du processus de maturation, le recrutement des cellules mésenchymateuses qui se différencient en cellules péri-endothéliales (péricytes, cellules musculaires lisses) ainsi que la génération de la matrice extracellulaire stabilisent les vaisseaux néo-formés. De nombreuses molécules régulent ce processus comme le récepteur PDGFR- β ainsi que le facteur PDGF-B, l'EDG1 et la S1P1 (sphingosine-1phosphate-1), l'angiopoïétine-1 et son récepteur à activité tyrosine kinase Tie-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin-2 and EGF-like domain), le TGF- β (*Transforming Growth Factor-Beta*) ainsi que le PIGF (*Placental Growth Factor*) [13]. L'activation du VEGFR-1 sur les cellules musculaires lisses et les péricytes stimule la stabilisation des capillaires et leur recouvrement [15]. Les cellules endothéliales formant les néo-vaisseaux deviennent quiescentes et peuvent survivre des années. De ce fait, les vaisseaux matures sont moins sensibles à la déstabilisation et à la régression.

1.3.2 Régulation de l'angiogenèse : switch angiogénique.

Chez l'homme adulte, le réseau vasculaire est « quiescent » en condition physiologique. La mise en œuvre du processus angiogénique dépend de stimuli en faveur du switch angiogénique entraînant une perte de l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Cette perte d'équilibre peut provoquer un défaut ou un excès d'angiogenèse.

Voici un résumé de ces différents facteurs (tableau 1 et 2) :

Facteur pro-angiogénique	Fonctions
Membres de la famille VEGF	VEGF-A : Stimulent l'angiogenèse, la vasculogenèse, la perméabilité vasculaire et l'adhésion des leucocytes; VEGF-C : stimule la lymphangiogenèse; PlGF : rôle dans l'angiogenèse pathologique
Récepteurs du VEGF	VEGFR-2; récepteur induisant un signal angiogénique; VEGFR-3 : récepteur induisant un signal lymphangiogénique
Angiopoïétine-2	Antagoniste de Ang1 : induit la régression des vaisseaux en absence d'un signal angiogénique
PDGF-BB et ses récepteurs	Recrute les cellules du muscle lisse et péricytes
TGF-β1, endogline et les récepteurs du TGF-β	Stabilise les vaisseaux en stimulant la production de matrice extracellulaire
FGF, HGF, MCP-1	Stimulent l'angiogenèse (FGF, HGF) et l'artériogenèse (FGF, MCP-1)
Intégrines αvβ3, αvβ5, α5β1	Récepteurs pour les macromolécules et métalloprotéases de matrice (MMP2)
VE-cadhérine, PECAM (CD31)	Molécules de la jonction endothéliale; essentielles à la survie des cellules endothéliales; des anticorps peuvent bloquer l'angiogenèse tumorale
Éphrines	Régule la spécification artérielle/veineuse
Activateur du plasminogène, métalloprotéases de matrice	Protéases impliquées dans la migration cellulaire et le remodelage de la matrice; libèrent le bFGF et le VEGF de la matrice; activent le TGF- β 1; génèrent l'angiotatine
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)	Stabilise les nouveaux vaisseaux en prévenant la dissolution de la matrice; mauvais pronostic de cancer
Synthèse du monoxyde d'azote, cyclooxygénase	Le monoxyde d'azote et les prostaglandines stimulent l'angiogenèse et la vasodilatation; des inhibiteurs de Cox2 inhibent l'angiogenèse tumorale
Autres activateurs	Interleukine 8; leptine; AC133 (récepteur orphelin impliqué dans la différenciation des angioblastes); chimiokines (rôle pléiotropique dans l'angiogenèse); certains inhibiteurs de la différenciation cellulaire

Tableau 1 : facteurs pro-angiogéniques [16]

Facteur anti-angiogénique	Fonctions
VEGFR-1, VEGFR-1 soluble et NRP-1 soluble	Réquisitionne le VEGF, VEGF-B et PlGF
Angiopoïétine-1 et récepteur Tie2	Ang1 : stabilise les vaisseaux en resserrant l'interaction endothéliale-muscle lisse; diminue la perméabilité
Thrombospondine-1 (TSP-1)	Protéine de matrice extracellulaire; inhibe la migration, la croissance, l'adhésion et la survie des cellules endothéliales; la protéine similaire TSP-2 inhibe aussi l'angiogenèse
Meth-1, Meth-2	Inhibiteurs contenant des domaines montrant des similitudes avec les métalloprotéinases, les thrombospondines et les disintégrines
Angiostatine et Related plasminogen kringles	Fragments protéolytiques du plasminogène; inhibent la migration et la survie des cellules endothéliales
Endostatine	Fragment du collagène de type XVIII, inhibe la migration et la survie des cellules endothéliales

Tableau 2: facteurs anti-angiogéniques [16]

1.3.2.1. Les facteurs angiogéniques.

VEGF et récepteurs du VEGF

On distingue 6 ligands VEGF (de A à E et le PlGF) et 3 récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR (de 1 à 3) homo- ou hétérodimériques

Le VEGF est impliqué aussi bien dans l'angiogenèse physiologique que pathologique. Il stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales tout en les protégeant de l'apoptose [17]. Outre les cellules endothéliales, le VEGF a montré une capacité de type chémokine, à induire le recrutement des monocytes/macrophages vers les sites inflammatoires et mobilise les cellules souches hématopoïétiques. A l'origine, le VEGF-A (VPF, *Vascular Permeability Factor*) a été décrit pour ses exceptionnelles propriétés de perméabilisation vasculaire.

La transcription du VEGF peut être modulée par de multiples stimuli parmi lesquels l'hypoxie via l'activation de la voie des *hypoxia inducible factors* (HIF) [18][19]. Ainsi en cas d'hypoxie, l'isoforme HIF-1 α rejoint le noyau cellulaire pour former un hétérodimère avec l'isoforme HIF-1 β capable d'activer la transcription du VEGF via une région promotrice HRE [20]. De nombreuses cytokines et facteurs de croissance stimulent l'expression du VEGF dans diverses lignées cellulaires [21], parmi elles le bFGF et TGF- β 1 induisent l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales [22] [23].

VEGFR3 étant essentiellement impliqué dans la lymphangiogenèse et l'angiogenèse embryonnaire, VEGFR1 et VEGFR2 sont les deux récepteurs les plus impliqués dans l'angiogenèse physiopathologique de l'adulte. VEGFR1 est plus impliqué dans la perméabilité vasculaire, VEGFR2

dans la prolifération-migration des cellules endothéliales [24].

Le VEGF est sécrété par de nombreuses cellules tumorales notamment en raison d'une hypoxie locale et son niveau d'expression corrèle à la vascularisation et à la progression tumorale [9]. D'autres lignées comme les leucémies aiguës myéloïdes expriment le récepteur VEGFR [25].

Ainsi le VEGF fait l'objet de recherches dans le cadre du développement de thérapies ciblées antiangiogéniques en oncologie. Ces travaux ont abouti à la mise sur le marché de 6 molécules dans le domaine de l'oncologie.

Un anticorps monoclonal :

- Bevacizumab (Avastin[®]), anti-VEGF, indiqué toujours en association dans le cancer colorectal métastatique, dans le cancer du sein métastatique, dans le cancer bronchique non à petites cellules non épidermoïde avancé/métastatique, dans le cancer du rein avancé/métastatique en 1^{ère} ligne, dans le cancer de l'ovaire ou des trompes en 1^{ère} ligne et dans le carcinome du col de l'utérus en seconde ligne.

Des inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinase :

- Sunitinib (SUTENT[®]), anti-PDGFR α et β , VEGFR1, 2, 3, FLT3, CSF-1R, RET, c-KIT, indiqué dans les GIST non résecables et/ou métastatiques en 2^{ème} ligne et dans le cancer du rein avancé/métastatique.
- Sorafenib (NEXAVAR[®]), anti-VEGFR2, 3, PDGFR β , CRAF, BRAF, c-KIT, FLT3, indiqué dans le carcinome hépatocellulaire, dans le carcinome rénal avancé en 2^{ème} ligne et dans le carcinome thyroïdien différencié.
- Pazopanib (VOTRIENT[®]), anti-VEGFR1, 2, 3, PDGFR α et β , c-KIT, indiqué dans le cancer du rein avancé en 1^{ère} ligne, et dans les sarcomes des tissus mous avancés en 2^{ème} ligne.
- Vandetanib (CAPRELSA[®]), anti-VEGFR2, anti-pan-EGFR, anti-RET, indiqué dans le cancer médullaire de la thyroïde agressif et symptomatique.
- Axitinib (INLYTA[®]), anti-VEGFR1, 2, 3, indiqué dans le cancer du rein avancé en 2^{ème} ligne après sunitinib ou cytokine.
- Regorafenib (STIVARGA[®]), anti-VEGFR1, 2, 3, TIE2, c-KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAF^{V600E}, PDGFR, FGFR, indiqué dans le cancer colorectal métastatique après échec des

premières lignes et dans les GIST non résécables ou métastatiques en seconde ligne.

Deux autres molécules ont reçu une AMM en ophtalmologie pour la prise en charge de la forme humide de la dégénérescence maculaire liée à l'âge :

- pegaptanib (MACUGEN[®]), anti-VEGF165
- ranibizumab (LUCENTIS[®]), anti-VEGF-A,

Dans le contexte de l'ischémie myocardique, l'étude clinique de phase I « VIVA » (pour Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis) a évalué sur 178 patients angineux l'injection de rhVEGF *versus* placebo : bien toléré, le bras rhVEGF haute dose a obtenu à partir de 3 mois une amélioration significative des symptômes angineux dans leur intensité et dans leur fréquence et une meilleure tolérance à l'effort par rapport au groupe placebo [26].

Fibroblast Growth Factors FGF

Cette famille comprend 24 membres mais seulement deux d'entre eux, le α FGF et le β FGF, présentent un rôle majeur dans l'angiogenèse et l'oncogenèse. Ces 2 protéines stimulent l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, en activant la voie MAP kinase et p38 kinase au niveau des cellules endothéliales. De plus, le β FGF a été décrit comme un acteur de l'angiogenèse tumorale et de la lymphangiogenèse par sa liaison au VEGF-C. Il existe 4 récepteurs à activité tyrosine kinase décrits comme liant l' α FGF et le β FGF. Ce sont les FGFR-1, -2, -3 et -4 [27]

Platelet Derived Growth Factor PDGF

La famille des PDGF est constituée de 4 membres, le PDGF-A, -B, -C et -D, qui se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase, PDGFR- α et β . Ces récepteurs sont exprimés sur les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses. Ils jouent un rôle crucial dans la stabilisation des néo-vaisseaux sanguins en permettant leur recouvrement par les cellules musculaires lisses. La production de PDGF-B par les cellules endothéliales stimule la prolifération et la croissance des cellules progénitrices mésenchymateuses exprimant le PDGFR- β et permet leur recrutement autour des néo-vaisseaux. Le PDGF-C permet le développement du réseau vasculaire pendant l'embryogenèse et chez l'adulte lors des phénomènes de cicatrisation et d'angiogenèse des tissus avasculaires. Le PDGF-D, quant à lui, a été décrit comme un stimulant de l'angiogenèse tumorale [28].

Transforming Growth Factor TGF- β

Il s'agit d'une cytokine sécrétée sous forme d'un précurseur inactif activé par protéolyse. Le TGF- β est exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses. Ses effets pro- ou

anti-angiogéniques sont dépendants du contexte et de sa concentration [13]. En effet, à faible concentration, il est pro-angiogénique et augmente la production de facteurs angiogéniques, tels que le VEGF, et de protéases. A l'inverse, à forte dose il inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales vasculaires en favorisant la reconstruction de la membrane basale ainsi que la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules murales.

Le TGF- β stimule aussi la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses en augmentant la production de SMC α actine (smooth muscle α) et SMC22 α [28].

Angiopoïétines et récepteurs Tie

Les ligands Ang-1 et Ang-2 ainsi que leur récepteurs Tie-1 et Tie-2 sont des protéines essentielles dans la formation et la stabilisation des vaisseaux sanguins. Elles sont principalement produites par les cellules endothéliales et les cellules murales [13]. L'angiopoïétine 1 est une glycoprotéine de 70kDa qui se lie au récepteur à activité tyrosine kinase Tie-2 présent sur la membrane plasmique des cellules endothéliales, favorisant ainsi les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules murales [29][30].

L'angiopoïétine 2, inhibiteur de Tie - 2 est un facteur pro-angiogénique. En effet, par sa fonction d'antagoniste à la fonction stabilisatrice d'Ang-1, il rend l'endothélium vasculaire plus sensible à d'autres facteurs angiogéniques tels que le VEGF (7). En l'absence de VEGF, l'angiopoïétine 2 déstabilise les vaisseaux, ce qui entraîne la régression de celui-ci [13].

Intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques associant une chaîne α et une chaîne β . Avec 18 chaînes α et 8 chaînes β , on retrouve 24 isoformes d'intégrines décrites. Exprimées par les cellules endothéliales, elles constituent des foyers d'adhérence focale avec la matrice : le domaine extracellulaire se lie aux protéines de la matrice extracellulaire, le côté intracellulaire étant lié à des protéines associées au cytosquelette d'actine (talin et paxilline). Couplées à des protéines G et capables de recruter des tyrosine-kinases cytoplasmiques, les intégrines se positionnent comme de véritables organes de communication entre la cellule endothéliale et son environnement proche [31]. Chaque intégrine est capable de reconnaître des ligands bien définis (vitronectine, fibronectine, fibrinogène, laminine, thrombo-spondine, Facteur de von Willebrand).

Parmi les intégrines induites au cours de l'angiogenèse, $\alpha_v\beta_3$ y joue un rôle critique : elle est surexprimée dans les vaisseaux tumoraux et dans les zones inflammatoires et subit l'influence de divers facteurs proangiogéniques (bFGF). L'interaction entre l' $\alpha_v\beta_3$ et son ligand la fibronectine par son motif

RGD (Arg-Gly-Asp) va induire une transduction intracellulaire du signal favorisant prolifération, différenciation et motilité cellulaires [32][33][34].

L'intégrine $\alpha_v\beta_5$, largement décrite elle aussi dans l'angiogenèse tumorale, est structurellement proche de $\alpha_v\beta_3$ mais est induite par le VEGF, et son ligand, la vitronectine, n'a pas de motif RGD.

Au vu de leurs implications dans l'angiogenèse et de l'inflammation, les intégrines font l'objet de nombreuses études visant à développer de nouvelles thérapeutiques ciblées [35] [36].

Le Cilengitide (CILCANE[®], à l'essai) est un dérivé du motif RGD sous forme de pentapeptide cyclique qui inhibe les intégrines $\alpha_v\beta_3$, 5, 6 et leurs signalisations associées. Des essais ont été effectués sur différents types de cancer notamment sur le glioblastome (phase III en association avec le temozolomide)[37] [38].

L'angiomotine (AMOT) et le sCD146

L'angiomotine (AMOT), est une protéine membranaire exprimée à la surface des vaisseaux, qui présente des propriétés pro-angiogénique et pro-migratoire. Elle intervient à la fois dans la migration des cellules endothéliales et la formation de pseudo-capillaires que dans les fonctions de maturation et de stabilisation vasculaire[39], [40]. AMOT est capable d'interagir avec deux molécules, l'angiostatine et le CD146s, régulateurs respectivement positif et négatif du récepteur. La réponse de l'interaction entre l'angiostatine et AMOT est l'inhibition de la migration de cellules endothéliales accompagnée de l'inhibition de la formation de pseudo-capillaires, processus indispensable de l'angiogenèse [41]. Plus récemment, notre équipe a démontré une régulation positive d'AMOT par le sCD146, entraînant à l'inverse une potentialisation des propriétés angiogéniques *in vitro* des progéniteurs endothéliaux [42]. A la vue de l'intérêt de ce facteur pro-angiogénique, un exposé complète ce paragraphe dans la suite de cette thèse.

1.4 L'ANGIOGENESE EN CONTEXTE PHYSIOPATHOLOGIQUE

1.4.1 Angiogenèse post-ischémique

1.4.1.1 Physiopathologie de l'ischémie artérielle des membres inférieurs (IAMI)

L'ischémie est définie comme étant la diminution ou l'arrêt de la circulation artérielle dans une région donnée d'un tissu ou d'un organisme, entraînant une privation en nutriments et oxygène de ces tissus. Ce phénomène peut conduire à une nécrose du tissu et peut compromettre l'intégrité du membre ou sa fonction. L'ischémie aiguë peut avoir différentes étiologies comme la rupture d'une plaque athéromateuse, une thrombose aiguë, une embolie ou bien par anévrisme disséquant. A l'inverse, l'ischémie est dite chronique si l'obstruction survient de manière progressive notamment dans le cas du développement d'une plaque athéromateuse, jusqu'à apparition des symptômes semblables à ceux d'une ischémie aiguë.

L'IAMI a une prévalence d'environ 13 à 17 cas pour 100 000 habitants par an, et est associée à une morbi-mortalité importante [43]. L'IAMI fait suite à l'interruption brutale du flux artériel. Les sites les plus atteints sont la bifurcation fémorale, les artères fémorales et les artères iliaques. La tolérance des différents tissus à l'ischémie est variable, des lésions nerveuses sont susceptibles d'apparaître dès la deuxième heure post-ischémie [44], tandis que le muscle squelettique a une tolérance à l'ischémie d'environ 6 heures [45]. La peau a une viabilité qui peut aller de 24 à 48 heures ce qui rend l'aspect des tissus cutanés faussement rassurant. L'élément le plus important de la réaction ischémique est le muscle strié capable d'induire des réactions métaboliques graves dès le début de la revascularisation. Les principaux facteurs pouvant influencer sur les lésions ischémiques sont la durée de l'ischémie et la température du membre (l'hypothermie ralentissant le métabolisme tissulaire) [46].

L'IAMI a deux causes majeures, les embolies artérielles représentant 40% des cas les plus graves, et les thromboses artérielles locales en représentant 60% [47].

L'ischémie des membres inférieurs (IAMI) est une pathologie fréquente et grave, représentant un problème de santé publique majeur. Ainsi, les traitements d'urgence ont pour finalité de limiter l'extension de la nécrose des tissus lésés afin de préserver les fonctions associées à ces tissus.

1.4.1.2 Particularités de l'angiogenèse post-ischémique

Différents mécanismes compensatoires de néovascularisation sont mis en jeu dans le cadre des phénomènes de récupération post-ischémique.

Une obstruction vasculaire va donner lieu à deux phénomènes de compensation distincts :

- Une ischémie d'aval, qui va entraîner une hypoxie tissulaire, élément déclencheur du processus angiogénique via HIF-1. Ce processus d'angiogenèse réactionnelle conduit essentiellement au développement de nouveaux capillaires [48][20].
- Une modification des contraintes physiques associées au flux : l'occlusion d'une artère entraîne de façon mécanique une déviation du sang vers des artéioles collatérales, déjà plus ou moins développées, dans lesquelles les forces de cisaillement liées au flux vont considérablement augmenter. Ce stimulus mécanique perçu par les cellules endothéliales va entraîner directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes [140] parmi lesquels bon nombre codent pour des cytokines chémo-attractives et activatrices (MCP-1, VEGF) ainsi que des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1). Suite à l'activation locale de l'endothélium, des monocytes circulants sont recrutés, adhèrent et infiltrent la paroi artériolaire. Cet afflux de monocytes activés, sécréteurs de protéases (MMPs) et de facteurs de croissance (FGF, PDGF), est un facteur clé du processus artériogénique. La paroi artériolaire va ainsi subir un remodelage intense associant dégradation et néosynthèse de matrice extracellulaire, prolifération des cellules endothéliales, musculaires lisses et fibroblastes. *In fine*, une artéiole peut ainsi voir son diamètre multiplié par 20 et participer plus efficacement au flux collatéral [48].

Cependant, ces mécanismes de compensation « physiologiques » s'avèrent rapidement insuffisants pour maintenir un apport sanguin (et donc un métabolisme) suffisant lors d'une ischémie sévère aiguë ou chronique.

La découverte progressive des mécanismes conduisant au développement de nouveaux vaisseaux sanguins, la diversité des approches (protéines, gènes, cellules), la combinaison des molécules ainsi qu'une meilleure maîtrise de leur biodisponibilité *in vivo* devrait permettre à terme le développement d'une alternative thérapeutique pour les pathologies vasculaires ischémiques.

1.4.2 Angiogenèse tumorale

Dans le monde, plus de 6 millions de personnes meurent tous les ans des complications d'un cancer. La lutte contre cette pathologie est donc devenue durant ces dernières décennies un enjeu majeur pour la santé publique.

Au niveau cellulaire, le cancer est défini comme une pathologie ayant pour origine des altérations d'ordre génétique de cellules somatiques entraînant des modifications moléculaires, cellulaires et physiologiques des cellules. Ces modifications permettent aux cellules de proliférer de façon incontrôlée, phénomène qui caractérise les cellules cancéreuses.

Au niveau de l'angiogenèse tumorale, le switch pourra être induit par de multiples facteurs :

- L'hypoxie, dépendante de la croissance tumorale : elle induit notamment le VEGF et le PDGF;
- Les facteurs de croissance, dont la production peut être augmentée soit par la tumeur sécrétante soit par le recrutement d'autres types cellulaires (monocytes-macrophages,...) ;
- Plus en amont, des mutations activant des proto-oncogènes (exemple : *ras*) ou inhibant des gènes onco-suppresseurs (exemple : *p53*) peuvent être responsables de dérégulations du processus angiogénique.

L'architecture vasculaire ainsi construite, anarchique et instable, se distinguera notablement des réseaux bâtis dans des conditions physiologiques. Le microenvironnement tumoral est ainsi ponctué de « lacs vasculaires », de shunts artério-veineux induisant un flux sanguin turbulent, avec une moindre couverture péricytaire témoignant une moindre maturité, ainsi qu'une plus grande perméabilité vasculaire pouvant entraîner des micro-hémorragies locales [13].

2. CD146, sCD146 ET ANGIOMOTINE : TROIS ACTEURS MOLECULAIRES AVEC UN ROLE CLE DANS L'ANGIOGENESE

2.1 CD146, ACTEUR MAJEUR DE L'ANGIOGENESE PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE

CD146 fait partie des nombreuses protéines qui composent la jonction de l'endothélium vasculaire. Récepteur membranaire, il semble jouer un rôle actif dans l'angiogenèse, la perméabilité, la transmigration monocyttaire et dans le maintien des jonctions endothéliales, mais toutes ces données de la littérature ont été acquises sur des modèles *in vitro* de cellules en culture. Le rôle de CD146 *in vivo* est encore en cours d'étude.

2.1.1 Historique et structure

MCAM, Sendo-1, Muc18 sont différentes dénominations de CD146.

La molécule MCAM a été pour la première fois mise en évidence en 1987. Elle a été identifiée comme un marqueur de progression du mélanome. Muc18, un anticorps dirigé contre MCAM a permis d'identifier la protéine transmembranaire de 113kDa comme un marqueur de cellules cancéreuses [49]. Les premières attributions nominatives de CD146 furent donc MCAM et Muc18.

En 1991, l'équipe du Pr F. Dignat-George a identifié Sendo-1 comme étant un marqueur des cellules endothéliales circulant dans le sang grâce à la technique de cytométrie de flux. Ceci a été rendu possible grâce à la génération d'un anticorps monoclonal de souris nommé Sendo-1 obtenu suite à l'immunisation d'une souris avec un lysat cellulaire d'HUVEC [50].

CD146, pour Cluster of Differentiation 146, est la dénomination officielle regroupant Sendo-1/Muc18/MCAM/gicérine/HEMCAM faisant suite à un rapport établi en 1997 (Sendo-Muc18 preCD, workshop Report).

La structure protéique du CD146 se compose d'un peptide signal de 28 acides aminés (AA), d'une région transmembranaire hydrophobe (AA 561 à 585), des cinq domaines immunoglobulines. Le CD146 est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines de 113000 Daltons [51].

Il existe deux isoformes membranaires du CD146 : une isoforme courte et une isoforme longue qui sont obtenues par épissage alternatif. La forme courte de CD146 serait associée à des phénomènes pro-angiogéniques tandis que la forme longue serait plutôt liée à la stabilisation des structures vasculaires nouvellement formées. [51]. Une forme soluble de CD146, a été découverte à partir de surnageant de culture d'HUVEC.

2.1.2 Localisation et fonction

CD146 est exprimé physiologiquement :

- Au niveau de l'arbre vasculaire, avec une surexpression au niveau des jonctions endothéliales quelque soit la localisation anatomique des vaisseaux et leur calibre [52]. Au niveau de l'endothélium, le CD146 joue un rôle très important dans le contrôle de la cohésion cellulaire [53], dans la perméabilité membranaire, dans la transmigration endothéliale des lymphocytes [54] lors du processus d'angiogenèse.
- Par des cellules lymphocytaires : certaines populations de lymphocyte B, T et de cellules NK (Natural Killers) surexpriment le CD146 [55]. Ces cellules CD146+ ont une cytotoxicité et une production d'interféron gamma diminuée [56][57].
- Par des cellules mésenchymateuses ayant la capacité de se différencier en chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes et cellules stromales supportant l'hématopoïèse. Le CD146 et l'angiopoïétine-1 participent ainsi à l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules stromales [58].

CD146 est surexprimé dans certaines pathologies notamment :

- Dans les pathologies inflammatoires cutanées : comme le psoriasis où les kératinocytes suprabasaux expriment du CD146. L'expression de CD146 est aussi détectée dans le lichen plan, sur l'épiderme recouvrant des néoplasmes cutanés ou dans les dermatites chroniques ou aiguës [59].
- Dans les pathologies inflammatoires rénales : On retrouve une augmentation de l'expression de CD146 membranaire sur les cellules endothéliales provenant de biopsies de patients atteints de néphropathie [60]. De plus, il existe une corrélation entre l'expression de CD146 et

l'augmentation de la protéinurie, la prolifération endocapillaire et le syndrome inflammatoire.

Dans les pathologies oncologiques :

- Le CD146 a été initialement découvert dans des cellules de mélanomes humains ou son expression est un facteur de mauvais pronostic. [49][61]
- Il est aussi exprimé dans de nombreux cancers, tels que les sarcomes de Kaposi, les angiosarcomes, les tumeurs de cellules de Schwann et les leiomyosarcomes.
- Dans le cas du cancer de la prostate, la surexpression de CD146 sur des lignées cancéreuses prostatiques augmente leur pouvoir invasif et métastatique [62]. On retrouve ces résultats sur des cancers ovariens où l'expression de CD146 est corrélée avec l'augmentation du pouvoir métastatique de la tumeur.
- Il a été démontré que l'expression de CD146 est augmentée dans des ostéosarcomes par rapport à des ostéoblastes non-pathologiques [63]. L'injection d'anticorps dirigés contre CD146 dans un modèle de souris immunodéficientes diminue la quantité de métastases pulmonaires induites par une injection de cellules dérivées d'ostéosarcome humain [64].
- Dans le cancer du sein, une étude a rapporté que CD146 agirait comme un suppresseur de tumeur [65], mais d'autres études contradictoires ont fait de CD146 un marqueur de mauvais pronostic [66].

2.2 sCD146 : UNE FORME SOLUBLE DU CD146

Plus récemment, une forme soluble du CD146 (sCD146) de 100KDa, clivée à partir de la forme membranaire par action de métalloprotéases, a été mise en évidence dans le surnageant de culture de cellules endothéliales de sérum humain [67]. L'utilisation d'inhibiteurs non-spécifiques de métalloprotéases (GM6001) inhibe la formation de CD146 soluble [68]. L'isoforme soluble de CD146 est directement détectable dans le plasma et le sérum humain [69].

Sa concentration sérique est augmentée dans certaines pathologies inflammatoires comportant des altérations endothéliales, telles que les pathologies inflammatoires :

- De l'intestin: une augmentation des taux sCD146 est observée chez les patients présentant des pathologies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn et les colites ulcéreuses [70].
- Les grossesses pathologiques : chez lesquelles un taux élevé de sCD146 est retrouvé chez des patientes ayant subi des pertes fœtales inexplicables. Le sCD146 pourrait représenter, chez la femme, un biomarqueur attractif du développement vasculaire placentaire ainsi qu'une cible thérapeutique dans les complications obstétricales dues à une angiogenèse pathologique[71].
- L'insuffisance rénale chronique: une augmentation de la sécrétion de sCD146 qui est corrélée à la sévérité de la maladie chez des patients souffrant de néphropathie diabétique de type 2 [69].
- Dans la sclérodémie généralisée : On retrouve ainsi un taux de sCD146 plus élevé chez les patients atteints de sclérodémie que chez les contrôles. Un taux bas de sCD146 est associé à des manifestations cliniques sévères comme la gangrène et la fibrose pulmonaire. [72]

Son rôle dans l'inflammation s'effectue par l'intermédiaire de sa fixation spécifique aux monocytes, permettant la transmigration endothéliale des lymphocytes et donc leur mobilisation dans le compartiment vasculaire [54].

Plus récemment notre équipe a montré que les cellules cancéreuses sont capables de sécréter du sCD146 en grande quantité.

Son implication lors du processus angiogénique est multiple. Il a été démontré *in vitro* que le sCD146 présente des propriétés chémo-attractantes sur différents types cellulaires impliqués dans la formation des vaisseaux (cellules endothéliales matures et progéniteurs endothéliaux). Ces données *in vitro* ont été confortées *in vivo* par une étude montrant que le traitement par du sCD146 recombinant local d'un modèle murin d'ischémie périphérique entraîne une augmentation significative du débit sanguin, de la formation de néo-vaisseaux, accompagnée d'une diminution de la nécrose du membre ischémié [73]. Les propriétés angiogéniques du sCD146 semblent passer par la présence de sa forme membranaire et implique l'augmentation de gènes codant pour l'angiogenèse.

Actuellement, le mécanisme d'action moléculaire des propriétés précédemment observées reste encore peu documenté, mais notre équipe a récemment mis en évidence que les effets angiogéniques du sCD146 s'effectuent par la liaison à son récepteur, l'angiomotine [42].

2.3 L'ANGIOMOTINE : RECEPTEUR DU sCD146

2.3.1 Structure

L'angiomotine est une protéine transmembranaire de 675 acides aminés appartenant à la famille des angiomotines caractérisée par un domaine *coiled-coil* conservé et un motif de liaison au PDZ au niveau de son extrémité C-terminale.

Trois membres de cette famille sont actuellement décrits (figure 3) :

- l'angiomotine proprement dite (AMOT) présentant deux isoformes distinctes (la p80 et la p130). L'isoforme p80 est constituée de 675 acides aminés dont le poids moléculaire est de 80kDa. L'isoforme p130 est constituée de 1084 acides aminés dont le poids moléculaire est de 130kDa. L'isoforme p130 présente un domaine N-terminal et intracellulaire plus important contenant 3 domaines L/P-PXY absents de l'isoforme p80 [41].
- Il existe deux polypeptides présentant une forte homologie avec la séquence d'AMOT appelés angiomotin-like 1 (Amotl1) et angiomotin-like 2 (Amotl2) : respectivement constitués de 956 et 780 acides aminés pour un poids moléculaire de 106 et 86kDa. Ces deux protéines présentent les 3 motifs L/P-PXY conservés sur leur partie N-terminale, seul le troisième motif diffère sur l'Amotl2 [74].

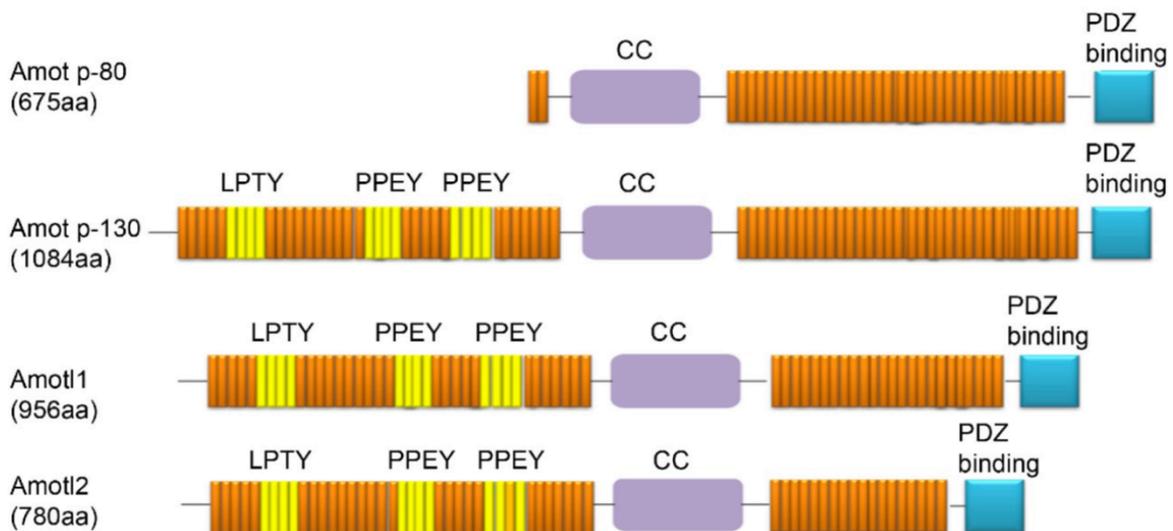


Figure 3 : Structure des protéines constituant la famille protéique d'AMOT [75].

2.3.2 AMOT et angiogenèse

Les deux isoformes d'AMOT sont exprimées par les cellules endothéliales, au niveau de la jonction cellulaire étroite et sont impliquées dans la polarité de la cellule ainsi que dans la stabilité du cytosquelette [76] [77]. Les deux isoformes d'AMOT présentent des propriétés pro-angiogéniques, mais ne sont pas exprimées de manière similaire durant les différentes phases de l'angiogenèse [41].

L'isoforme p80 est exprimée dans les phases précoces de la formation vasculaire où elle stimule la migration des cellules endothéliales, tandis que l'isoforme p130 n'apparaît que dans les phases tardives de maturation et de stabilisation du vaisseau [78].

En effet l'isoforme p80 stimule la migration des cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro* et présente donc une fonction angiogénique et pro-migratoire. L'isoforme p80 est capable de réguler les fonctions de l'isoforme p130, permettant ainsi au vaisseau d'entrer ou de sortir de la phase de stabilisation vasculaire[40], [79].

2.3.3 AMOT et cancer

De nombreuses lignées tumorales surexpriment significativement AMOT, mais son implication comme suppresseur de tumeur ou comme protéine pro-oncogénique dépend du type tumoral ainsi que de l'isoforme considérée (tableau 3).

Amot Family	Cancer Types	Function	Possible Mechanism
Amot	Breast cancer	Oncogene	Increasing the expression of YAP, TAZ and LATS1 and enhancing ERK1/2 pathway
	Osteosarcoma	Oncogene	Unknown
Amot-p80	Prostate cancer	Oncogene	Unknown
	HNSCC	Oncogene	Unknown
Amot-p130	Hepatic carcinoma	Oncogene	Augmenting the activity of YAP
	Renal cell cancer	Oncogene	Increasing the YAP-related TEAD promoter activity.
	Ovarian cancer	Tumor suppressor	Inhibiting the activation of YAP target genes
	Lung cancer	Tumor suppressor	Sequestering oncogenic YAP/TAZ and decreasing Cyr61 expression

Tableau 3 : Fonction d'AMOT dans les cancers [75].

AMOT est surexprimée dans différents types de cancers, notamment :

- Dans le cancer du sein, où l'expression d'AMOT corrèle avec le grade tumoral et avec le Ki-67, marqueur de la prolifération tumorale [80] : l'évaluation préclinique d'un vaccin anti-AMOT montre une inhibition de la néo-angiogenèse et la croissance tumorale [81]. Un effet préventif est aussi retrouvé dans la descendance de souris ayant reçu une vaccination[82] .

- Dans l'ostéosarcome : on retrouve une surexpression de l'ARNm d'AMOT liée à la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion tumorale [83] [84].
- Dans le cancer de la prostate : l'isoforme p80 d'AMOT semble être responsable d'une augmentation de la migration cellulaire et de la croissance tumorale [85].
- Dans le cas du carcinome squameux de la tête et du cou (HNSCC) la transfection de l'isoforme p80 entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules HNSCC [86].
- Dans le carcinome hépatique et rénal : l'isoforme p130 de l'Angiomotine agit comme un oncogène en augmentant l'activité de YAP [87] [88].
- Dans le cancer des ovaires et pulmonaire : l'isoforme p130 joue au contraire un rôle suppresseur de tumeur en inhibant l'activation des gènes cibles de YAP [89] [90].

2.3.4 Les ligands d'AMOT

AMOT est capable d'interagir avec deux molécules, l'angiostatine et le CD146s, régulateurs respectivement négatifs et positifs du récepteur. La réponse de l'interaction entre l'angiostatine et AMOT est l'inhibition de la migration de cellules endothéliales accompagnée de l'inhibition de la formation de pseudo-capillaires, processus indispensable de l'angiogenèse [41]. Ces propriétés anti-angiogéniques ont été confirmées par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'angiomotine, entraînant *in vivo* l'inhibition de la néovascularisation et de la migration vasculaire [91].

Plus récemment notre équipe a démontré une régulation positive d'AMOT par le sCD146, entraînant à l'inverse une potentialisation des propriétés angiogéniques *in vitro* des progéniteurs endothéliaux [42]. Cette observation conforte les effets protecteurs de sCD146 recombinant, que nous avons préalablement observés lors de son injection locale quotidienne au niveau du membre inférieur de rats présentant une ischémie périphérique : augmentation de la densité capillaire et du taux de perfusion sanguine, diminution significative du taux d'amputation du membre ischémié [73].

Ainsi, le sCD146 semble jouer un rôle pivot dans l'angiogenèse, que ce soit en contexte post-ischémique comme en contexte tumoral. Cette propriété pro-angiogénique s'effectuerait grâce à l'interaction entre le sCD146 et son récepteur AMOT.

3. IMAGERIE DE L'ANGIOGENESE : ETAT DE L'ART

De nombreuses méthodes permettent d'explorer directement ou indirectement le processus angiogénique, comme par exemple l'évaluation de la perfusion, de la volémie ou de la perméabilité capillaire. Parmi toutes les modalités d'imagerie disponibles, notre choix s'est porté sur l'imagerie radio-isotopique et plus particulièrement vers la modalité TEP (Tomographie par Emission de Positrons) qui présente de nombreux avantages, tel que celui d'être une évaluation directe et fonctionnelle de l'angiogenèse ainsi que de permettre une quantification *in vivo* des processus biologiques ciblés et ce avec une excellente sensibilité. De plus, le système de camera PET est couplé à une camera microCT permettant un recalage anatomique. La fusion des deux images issues simultanément des modalités obtenues permet ainsi d'avoir un signal localisé avec une faible atténuation, une haute sensibilité (de l'ordre du femtomolaire) et qui peut être aisément quantifié.

La recherche et la mise au point d'un outil d'imagerie permettant de quantifier l'angiogenèse tissulaire constituent aujourd'hui un axe de recherche soutenu. Ce type d'imagerie représenterait un atout majeur dans l'évaluation de patient souffrant de pathologies cardiovasculaires ischémiques mais également celles relevant du domaine de l'oncologie. Un tel outil pourrait constituer un test compagnon pour la mise en place et l'évaluation de la réponse thérapeutique anti-angiogénique en oncologie, ou bien d'évaluer la régénération tissulaire lors de la prise en charge de patients atteints de pathologies cardiovasculaires.

De nombreux travaux se sont intéressés à l'utilisation d'un radiotracer ciblant l'angiogenèse permettant l'imagerie isotopique monophotonique (SPECT) ou par émission de positons (TEP). Les premières études remontent à 1999, et ont principalement débouché sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ via le motif RGD, et sur le ciblage de la voie de signalisation du VEGF.

3.1 CIBLAGE DES INTEGRINES

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est très largement impliquée dans l'angiogenèse qu'elle soit post-ischémique ou tumorale. On retrouve une surexpression importante de cette intégrine au niveau des cellules endothéliales activées des vaisseaux en formation, ce qui en fait une cible de choix pour l'imagerie fonctionnelle de l'angiogenèse.

Le développement du ciblage des intégrines par imagerie s'est principalement axé sur le radiomarquage du motif RGD aussi bien comme traceur TEP (marqué au ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu), qu'en traceur SPECT (marqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{111}In).

3.1.1 Peptides monomériques

Théoriquement les motifs RGD qu'ils soient linéaires ou cycliques sont capables de cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Les inconvénients principaux des peptides linéaires sont qu'ils présentent une faible affinité ($\text{IC}_{50} < 100\text{nmol/L}$), ainsi qu'une faible spécificité (ils fixent aussi l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) [92].

Ainsi la cyclisation du RGD par l'intermédiaire d'un linker ou d'un cercle rigide aromatique a permis d'augmenter l'affinité et la spécificité du traceur pour sa cible. Le premier essai de ciblage des intégrines $\alpha_v\beta_3$ par un peptide RGD monomérique cyclique a été réalisé en 1999 avec un marquage avec un isotope radioactif de l'iode [92] [93].

L'importante concentration hépatobiliaire de ce traceur a conduit à de nombreuses optimisations afin d'améliorer sa pharmacocinétique et d'orienter son métabolisme vers une excrétion majoritairement urinaire :

- La glycosylation : l'ajout d'un motif sucré permet une meilleure clairance plasmatique et une élimination majoritairement rénale. Deux traceurs ont été décrits, le ^{123}I -Gluco-RGD [94] et le ^{18}F -Galacto-RGD, ayant bénéficié d'un développement plus poussé au vu de sa stabilité *in vivo* et de son affinité aussi bien dans des modèles précliniques tumoraux exprimant l' $\alpha_v\beta_3$ que dans des tumeurs fortement angiogéniques.

Le ^{18}F -Galacto-RGD fut donc le premier traceur dérivant du RGD à bénéficier d'un développement clinique. Les résultats de l'étude sur une petite cohorte de patients cancéreux avant résection (mélanome, glioblastome, tête, cou et sein) montrent un bon ciblage du traceur pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$, avec un bon rapport tumeur sur muscle (7.7 ± 5.4). Le signal tumoral SUV (Standardized Uptake Value) corrèle avec l'expression tumorale des intégrines $\alpha_v\beta_3$ évaluée par immunohistochimie après excrèse [95], [96]. D'autres études cliniques ont confirmé l'intérêt du ^{18}F -Galacto-RGD dans l'imagerie des intégrines $\alpha_v\beta_3$ [97], [98], [99].

Ce traceur présente aussi un intérêt dans la caractérisation des glioblastomes exprimant eux même l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cependant il ne permet pas de différencier les formes bénignes de types inflammatoires (favorisant l'angiogenèse) des formes tumorales malignes. Ainsi le ^{18}F -Galacto-RGD montre un signal important aussi bien dans le cas des synovites villonodulaires, dans les modèles précliniques inflammatoires que dans les lésions de glioblastomes multiformes.

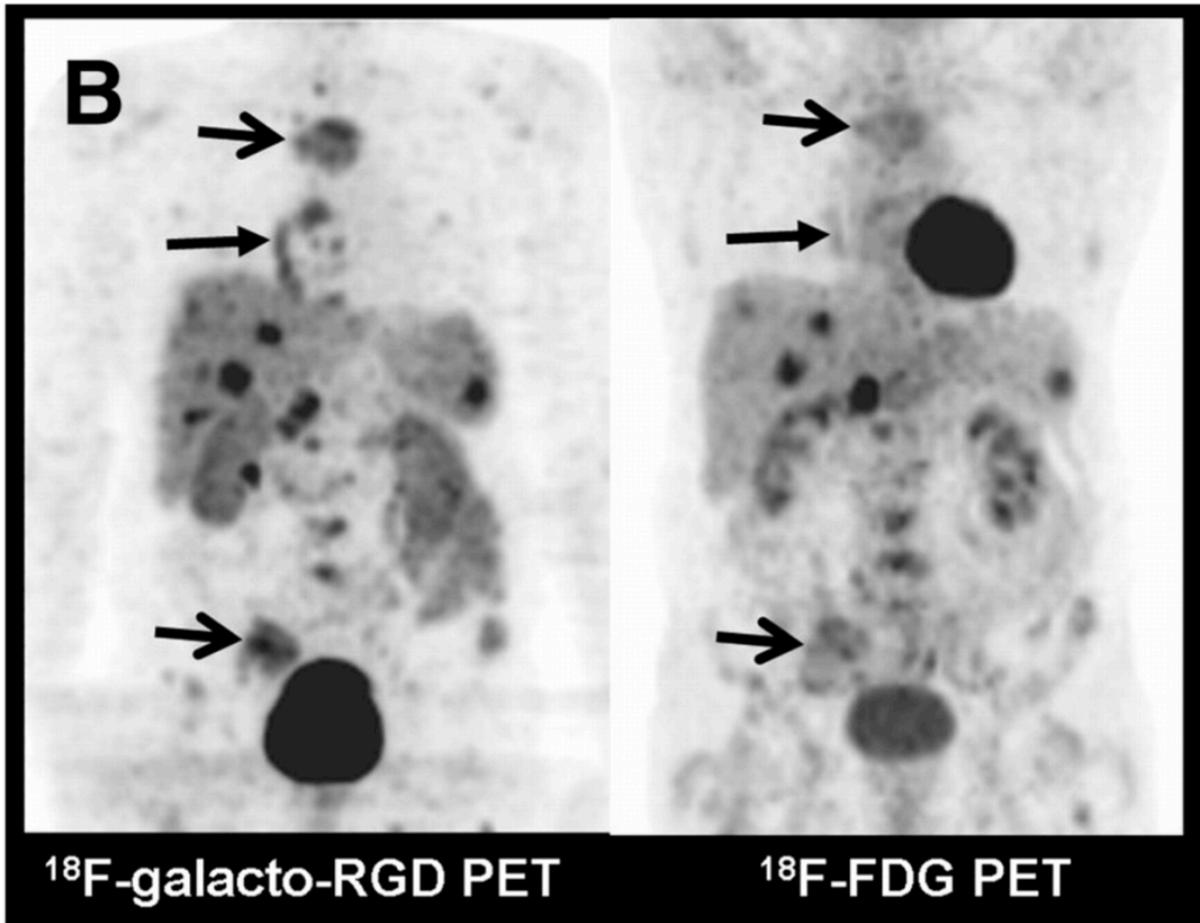


Figure 4 : Comparaison entre une imagerie TEP au ^{18}F -Galacto-RGD et au ^{18}F -FDG d'un patient avec une tumeur neuroendocrine primitive des bronches (lobe inférieur droit) présentant des métastases osseuses, hépatiques, au niveau de la rate et des nodules lymphatiques. On remarque ainsi un uptake plus intense avec le ^{18}F -Galacto-RGD en comparaison au ^{18}F -FDG dans ce type de tumeurs [100].

- La PEGylation : ajout d'un spacer de nature PEG (polyéthylène glycol) à la structure monomérique RGD. Le ^{18}F -AH111585 ou ^{18}F -Fluciclatide est le représentant le plus emblématique de cette classe de traceurs dérivant du RGD. L'évaluation de ce traceur montre une stabilité in vivo importante et un profil pharmacocinétique favorable. Il présente une affinité supérieure pour l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ par rapport à l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ et un signal tumoral comparable au ^{18}F -Galacto-RGD. Le développement de ce traceur est allé jusqu'à un essai de phase II comparant l'imagerie TEP de ce traceur aux données histologiques d'angiogenèse et au DCE-CT de perfusion chez 39 patients présentant différentes formes de cancer (gliome, poumon, tête et cou, sarcome et mélanome). Les résultats de cet essai montrent des lésions mesurables chez 26 des 39 patients dont le SUV moyen est de 4.63 ± 2.34 65 minutes après injection du radiotracer [101].



Figure 5 : Imagerie TEP/CT au ^{18}F -Fluciclatide, d'un patient de 39 ans avec un diagnostic positif de mélanome. La flèche montrant un signal intense au niveau d'une métastase pulmonaire [101].

Concernant les traceurs fluorés, leur utilisation clinique en routine reste limitée par un coût de synthèse important et une chimie de complexation compliquée. C'est pourquoi de nombreuses études se sont focalisées sur le développement de traceurs dérivés du RGD couplés au ^{68}Ga . Le ^{68}Ga est un isotope productible sur site via l'élution d'un générateur dont les marquages sont réalisables directement au sein de la radiopharmacie grâce à des chélateurs bi fonctionnels dont le NOTA (acide 1,4, 7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique), DOTA (1,4,7,10-tétraazacyclododécane), NODAGA (acide 4,7-triazacyclononane-1-glutarique acide-4,7-diacétique)...

Les traceurs galliés présentant le motif RGD ont fait l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques rapportées dans les tableaux 4 et 5 :

Table 1 Animal Studies of ⁶⁸Ga-Labeled RGD Peptides

Chelate	RGD Form	No. of RGD	Addon Agent	Subjects	Purpose/Target Disease	
NOTA	c(RGDyK)	1	None	Mouse	Biodistribution	
				Mouse	Feasibility: SiPM PET	
				Rat	Myocardial infarct	
				Mouse	Atherosclerosis	
	c(RGDyK)	2	None	Mouse	Glioblastoma	
				Mouse	Glioblastoma	
	c(RGDyK)	1, 2, and 4	None	Mouse	Glioblastoma	
	c(RGDyK)	1	BBN	Mouse	Biodistribution	
	c(RGDfK)	1	None	GE11	Mouse	Biodistribution
					Mouse	Development
					Mouse	Prostate cancer
					Mouse	Glioblastoma, breast cancer
					Mouse	Fibrosarcoma, colon cancer
					Mouse	Biodistribution
Rat					Myocardial infarct	
DOTA	c(RGDfK)	1	None	Mouse	Melanoma	
	c(RGDfK)	2	None	Rat	Myocardial infarct	
	c(RGDfK)	2	None	Mouse	Melanoma, breast cancer	
	c(RGDfK)	2	None	Mouse	Therapeutic response	
	c(RGDfK)	2	None	Mouse	Feasibility: Ga generator	
	c(RGDfK)	1,2	None	Rat	Comparison: NOTA	
	c(RGDfK)	1,2,4	None	Mouse	Renal cell cancer	
	c(RGDfC)	1,2,4,8,16	None		Development	
NODAGA	c(RGDyK)	1	None	Mouse	Feasibility: automated process	
	c(RGDyK)	2	None	Mouse	Carcinoid, glioblastoma	
	c(RGDyK)	1	None	Mouse	Pancreatic cancer	
	c(RGDfK)	1	None	Mouse	Comparison: DOTA	
	c(RGDfK)	1	None	Mouse	Therapeutic response	
	c(RGDfK)	2	None	Mouse	Comparison: DOTA	
FSC	c(RGDfK)	3	None		Development	
			None	Mouse	Comparison: NODAGA	
PTCA	c(RGDyK)	1	None	Mouse	Comparison: NOTA	
(NH ₂) ₂ sar	c(RGDfK)	2	None	Mouse	Biodistribution	
NS3	c(RGDfK)	1	None	Mouse	Biodistribution	
Oxo-DO3A	c(RGDfK)	1	None	Mouse	Biodistribution	
TRAP	c(RGDfK)	3	None	Mouse	Biodistribution	
H2dedpa	c(RGDyK)	1,2	None	Mouse	Biodistribution	

Tableau 4 : Etudes précliniques évaluant les différentes formes de RGD marquées au gallium 68 chez l'animal [102].

Chelate	RGD Form	No. of RGD	Purpose/Target Disease
NOTA	c(RGDyK)	1	Dosimetry Cerebral infarct Atherosclerosis Breast cancer Moyamoya disease
	c(RGDyK)	2	Myocardial infarct Glioma Lung cancer
DOTA	c(RGDfK)	2	Breast cancer

Tableau 4 : Etudes cliniques évaluant les différentes formes de RGD marquées au gallium 68 chez l'Homme [102].

D'un point de vue général, ces traceurs monomériques présentent certaines limites notamment une captation tumorale limitée et une fixation hépatique importante. L'importance de l'implication des processus angiogéniques dans les pathologies tumorales et ischémiques ainsi que la possibilité d'évaluer la réponse aux anti-angiogéniques, justifient la forte implication industrielle et académique autour du développement de ce type de radiotraceur.

3.1.2 Peptides multimériques

L'interaction entre les intégrines et leurs ligands dans la matrice extracellulaire implique plusieurs sites de liaison. La deuxième stratégie de développement a consisté à optimiser l'affinité pour l'intégrine en radiomarquant des multimères du motif RGD.

L'un des premiers dérivés, le [^{99m}Tc]-HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ montre une affinité 10 fois supérieure pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ainsi qu'un uptake tumoral plus important et une clairance rénale améliorée en comparaison avec la version monomérique [^{99m}Tc]-HYNIC-c(RGDfK) [103],[104].

L'équipe de Wester et Kessler synthétise par la suite la forme monomérique, dimérique et tétramérique du RGD en connectant un ou plusieurs c(RGDfE) via un linker PEG. L'évaluation de ces traceurs dans une étude de biodistribution chez la souris montre une augmentation du signal tumoral allant dans le sens de l'augmentation du nombre de motifs RGD [105].

Par la suite, de nombreux travaux se sont focalisés sur la multimérisation, montrant ainsi qu'au delà de la forme dimérique la qualité des images est diminuée par une augmentation [106] des fixations hépatiques, intestinales et rénales. Ainsi, la forme dimérique semble être le meilleur compromis entre les contraintes et les avantages de la multimérisation.

Une récente étude clinique menée sur 91 patients atteints de cancers pulmonaires montre que ^{68}Ga -NOTA-PRGD₂ est un meilleur facteur prédictif négatif et positif que ^{18}F -FDG dans l'évaluation des métastases lymphatiques ganglionnaires (Figure 6) [107].

D'autres essais cliniques se sont attachés à évaluer le ^{68}Ga -NOTA-PRGD₂ dans le cancer du poumon, le gliome, l'ischémie myocardique, l'ischémie cérébrale et l'arthrite rhumatoïde, soit pour une utilisation dans le diagnostic initial ou dans l'évaluation de l'évolution de la pathologie [106], [108],[109] .

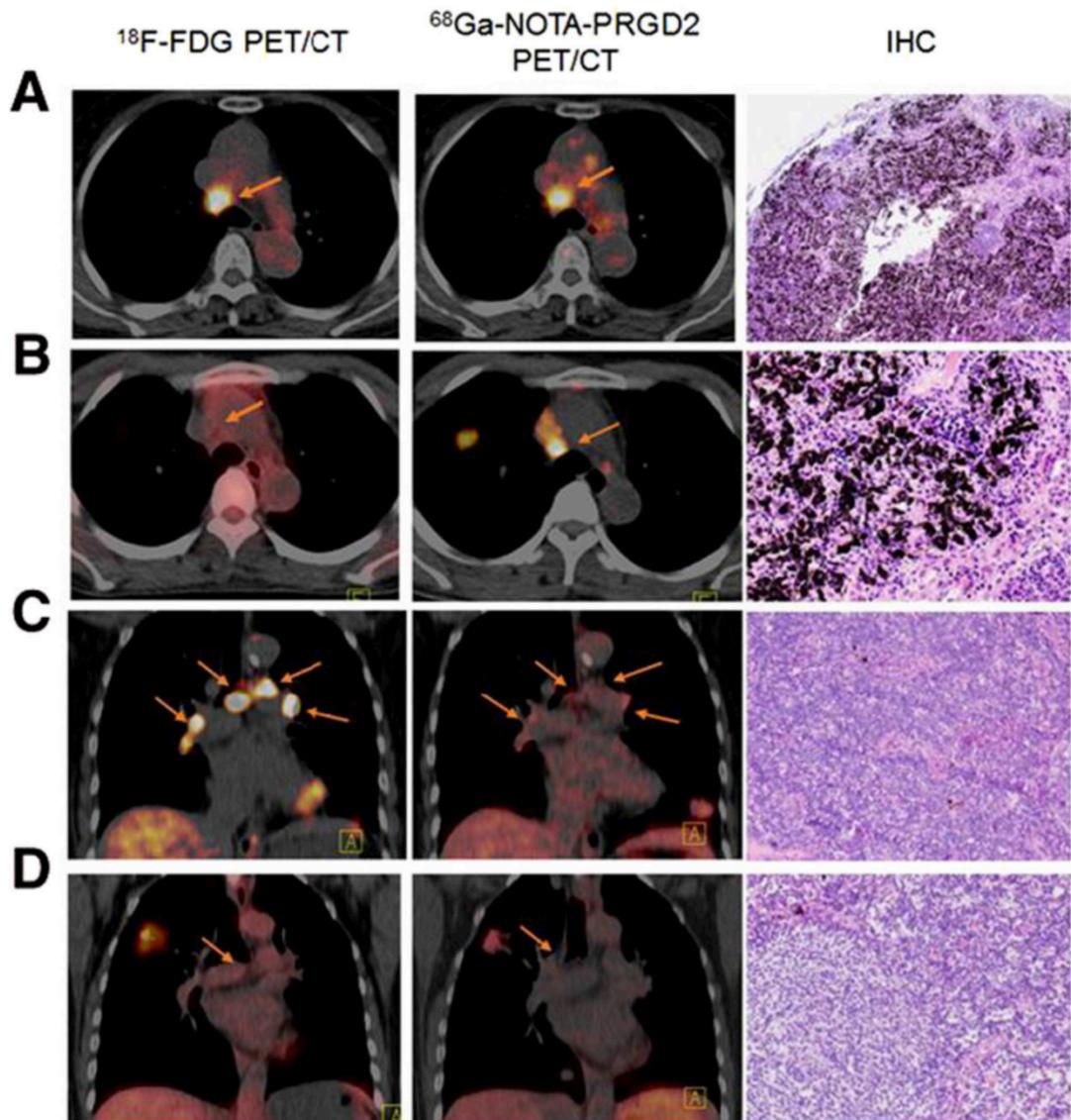


Figure 6 : comparaison entre l'imagerie TEP/CT obtenue avec le ¹⁸F-FDG et celle obtenue avec le ⁶⁸Ga-NOTA-PRGD2 et l'évaluation de l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_3$ par immunohistochimie des ganglions lymphatiques (IHC). (A) Femme de 69 ans présentant un adénocarcinome modérément différencié et des métastases au niveau des ganglions lymphatiques. Le ¹⁸F-FDG et le ⁶⁸Ga-NOTA-PRGD2 montrent tous deux un uptake important au niveau des ganglions lymphatiques dont l'analyse IHC montre un marquage des intégrines $\alpha_5\beta_3$ positif. (B) Femme de 44 ans présentant un adénocarcinome hautement différencié et des métastases au niveau des ganglions lymphatiques. Le ¹⁸F-FDG ne montre pas d'uptake tandis que le ⁶⁸Ga-NOTA-PRGD2 montre un uptake important au niveau des ganglions lymphatiques dont l'analyse IHC est positive. (C) Femme de 58 ans adénocarcinome sans métastase au niveau des ganglions lymphatiques. Alors que le ¹⁸F-FDG montre un uptake positif au niveau des ganglions lymphatiques, le ⁶⁸Ga-NOTA-PRGD2 montre des résultats négatifs pour ces ganglions lymphatiques dont l'analyse IHC est négative. (D) Femme de 62 ans présentant un adénocarcinome hautement différencié sans métastase. Le ¹⁸F-FDG et le ⁶⁸Ga-NOTA-PRGD2 montrent tous deux un uptake négatif au niveau des ganglions lymphatiques dont l'analyse IHC est négative [107].

3.2 CIBLAGE DU VEGF ET DE SON RECEPTEUR VEGFR

De nombreux essais cliniques utilisant les antiangiogéniques ont prouvé leur potentiel dans la lutte contre le cancer. Cependant de nombreux patients échappent à ce type de traitement notamment en raison d'une faible expression de la cible de l'antiangiogénique et à la prévalence d'une autre voie de l'angiogenèse dans le développement tumoral. L'imagerie moléculaire semble donc une méthode de choix afin d'évaluer de manière non invasive l'éligibilité des patients à un traitement antiangiogénique ainsi que d'évaluer la réponse au traitement.

Deux types d'approches permettent de cibler la voie du VEGF en imagerie, le radiomarquage d'anticorps anti-VEGF et le marquage du VEGF permettant de cibler le VEGFR

3.2.1 Radiomarquage d'anticorps anti-VEGF

L'approche anti-VEGF met principalement en jeu des anticorps anti-VEGF marqués avec des isotopes de l'iode ou du zirconium-89.

Un essai de phase I, évalue la biodistribution chez l'homme d'une version humanisée de l'anticorps monoclonal anti-VEGF murin MV833, ^{124}I -HuMV833 [110]

Une autre étude clinique chez des patients atteints de cancer colorectal avec métastases hépatiques montre un manque de corrélation entre *l'uptake* obtenu par imagerie au ^{111}In -bevacizumab et l'expression du VEGF-A au sein des lésions [111].

D'autres études sur des patients atteints de carcinome rénal et de cancer du sein, ont montré un excellent rapport tumeur sur bruit de fond avec des images optimales 4 jours après injection de ^{89}Zr -bevacizumab [112] [113].

L'évaluation préclinique du ^{86}Y -CHx-A00-DTPA-bevacizumab permettant la sélection de patients destinés à la radiothérapie interne vectorisée au ^{90}Y -CHx-A00-DTPA-bevacizumab montre qu'il peut être utilisé afin de déterminer le risque d'exposition et la dose absorbée par la tumeur [114].

L'ensemble de ces résultats est à confronter avec les différentes limites de l'utilisation d'un vecteur sous forme d'anticorps :

En effet la biodistribution de ces différents traceurs reste très hétérogène aussi bien au niveau des individus, qu'au sein de la tumeur [110]. Le signal tumoral n'est pas forcément corrélé au niveau d'expression du VEGF [111]. De plus l'encombrement stérique ainsi que la cinétique de fixation d'un anticorps pour sa cible imposent des délais importants (plusieurs heures voir idéalement quelques jours)

entre l'injection et l'acquisition, afin d'obtenir une fixation suffisante au niveau de la cible comparativement au bruit de fond.

3.2.2 Radiomarquage du VEGF

Cette approche consiste à radiomarquer le VEGF-A afin d'imager les récepteurs VEGFR.

De nombreux agents d'imagerie dérivant du VEGF-A ont été développés ces 10 dernières années, aussi bien pour l'imagerie SPECT [115], [116] que pour la TEP [117], [118], [119].

L'isoforme VEGF₁₂₁ est l'isoforme du VEGF-A qui a suscité le plus d'intérêt dans le développement d'un agent d'imagerie en raison de sa forte solubilité et de sa faible liaison à l'héparine. En imagerie préclinique, le ⁶⁴Cu-wtVEGF₁₂₁ a montré un uptake spécifique sur un modèle murin, mais une forte accumulation rénale de ce traceur limite son utilisation [120].

De nombreuses optimisations ont donc pour objectif de diminuer la fixation rénale du traceur en diminuant la spécificité pour le VEGFR-1 tout en conservant celle pour le VEGFR-2. Un mutant du VEGF₁₂₁ a donc été développé, le ⁶⁴Cu-DOTA-VEGF_{DEE} montrant un signal tumoral équivalent et une fixation moindre que son analogue *wild-type* [118].

Les radiotraceurs dérivant du motif RGD ou du VEGF ont donc fait l'objet de nombreuses optimisations visant à augmenter leur spécificité, leur pharmacocinétique, et leur rendement de marquage, mais aucune n'a dépassé le stade d'essai clinique à ce jour.

Ces éléments nous ont conduit à rechercher un marqueur tissulaire de l'angiogenèse pouvant constituer une cible d'imagerie innovante : AMOT.

Le sCD146 constitue de par le ciblage d'AMOT, molécule angiogénique, un candidat de choix pour la réalisation d'un traceur de l'angiogenèse innovant.

4. HYPOTHESES ET OBJECTIF

Notre hypothèse de travail a été formulée à partir d'observations réalisées au sein de notre unité (Figure 7) rapportant pour la première fois un effet régénératif de l'administration locale répétée de sCD146 favorisant ainsi la néovascularisation *in vivo post-ischémique*. En effet, une injection locale répétée de sCD146 recombinant chez des rats présentant une ischémie périphérique montre une diminution significative du nombre d'auto-amputation, d'inflammation, de fibrose, de nécrose et une augmentation significative de la perfusion tissulaire et de la formation de néo-vaisseaux après 12 jours de traitement [73]. Plus récemment notre équipe a démontré que les propriétés pro-angiogéniques du sCD146 s'effectuent par la liaison à son récepteur, AMOT [42].

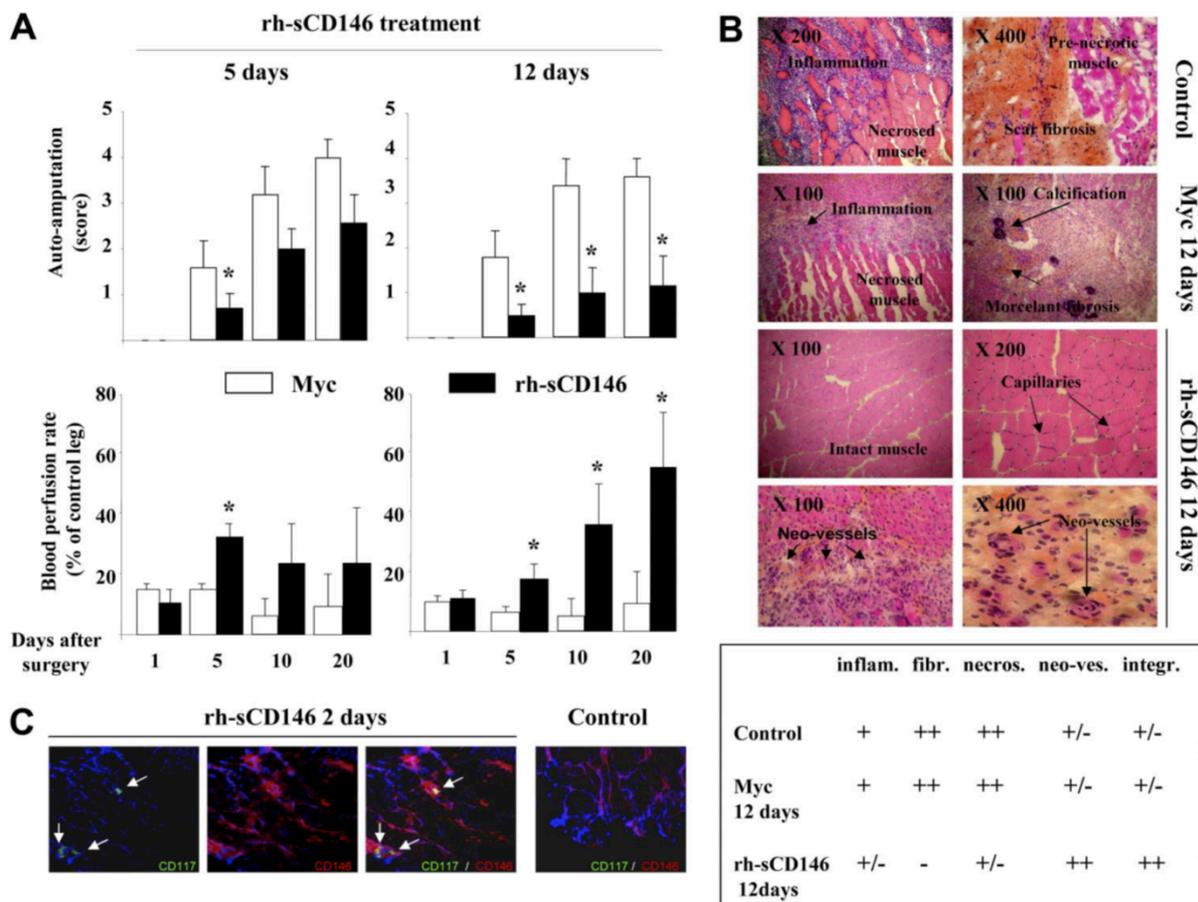


Figure 7 : Effet de l'injection locale de sCD146 recombinant chez des rats présentant une ischémie périphérique. Une injection locale et journalière de 10µg/mL de rh-sCD146 ou de peptide contrôle c-myc a été réalisée dans les pattes ischémiques de rats pendant 5 et 12 jours consécutifs. (A) Résultats du niveau d'auto-amputation et de perfusion tissulaire à J1, 5, 10 et 20 post ischémie. (n=9, P<0.05) (B) Analyse histologique des muscles gastrocnémiens à J12 post ischémies. Expression semi quantitative de l'analyse histologique de l'inflammation, de la fibrose, de la nécrose, de la présence de néo-vaisseaux et de l'intégrité des coupes de muscles ischémiques contrôles ou après 12 jours de traitement par rh-sCD146, par peptide c-myc. (C) Co-marquage par immunofluorescence réalisée avec un anticorps anti-CD117 (vert) et un anti-CD146 (rouge) [73].

L'effet régénératif du sCD146, son affinité pour AMOT ainsi que l'implication naissante dans la littérature d'AMOT dans l'angiogenèse, nous ont permis de formuler l'hypothèse de ce travail consistant en l'évaluation de l'expression d'AMOT dans un contexte post-ischémique et la valeur de biomarqueur de sa surexpression sur la régénération tissulaire. Nous avons donc développé un nouveau radiotracer permettant d'évaluer *in vivo* l'expression d'AMOT, par imagerie TEP-CT.

Ainsi, nous avons supposé que l'expression d'AMOT était directement corrélée à l'angiogenèse tissulaire et notre étude avait pour objectif de valider *in vivo* chez le rongeur un agent d'imagerie par émission de positons (TEP) permettant l'évaluation de l'expression tissulaire de l'angiomotine (AMOT). Au-delà de l'appréciation *in vivo* de l'angiogenèse qui a initialement motivée ce projet, de très récentes stratégies de pharmacomodulation d'AMOT en oncologie émergent. Dans ce nouveau contexte, l'imagerie d'AMOT pourrait représenter un « test compagnon » de cette nouvelle voie thérapeutique, « test compagnon » dont le développement est fortement incité par la FDA dans le cadre d'une prise en charge personnalisée des patients.

Après avoir validé par immunohistologie que l'effet protecteur du sCD146 était obtenu suite à une surexpression d'AMOT en situation post-ischémique, nous avons initié le développement du radiotracer. Pour cela nous avons réalisé la conception et la synthèse d'un variant de sCD146 pour l'imagerie TEP, la validation de son radiomarquage au ⁶⁸Ga, ainsi que la validation *in vivo* en tant que radiotracer TEP sur un modèle d'ischémie périphérique.

2^{EME} PARTIE :

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 MODELES ANIMAUX

Ethique : approbation des protocoles par le CE 14 Aix Marseille université et réalisation des expérimentations dans un établissement agréé (DDPP 13 n° A13 055 32)

1.1.1 Modèle murin d'ischémie périphérique

Notre approche étant de mettre en évidence l'implication du sCD146 lors du processus d'angiogenèse, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'ischémie unilatérale du membre inférieur résultant de la ligature chirurgicale de l'artère fémorale [121], [122].

Après anesthésie halogénée de souris BALB/c (16 semaines) à l'isoflurane (5% en induction et 1-2% en entretien), celles-ci sont placées sur un tapis thermorégulateur couvert par un champ stérile.

Elles sont ensuite tondues au niveau des membres inférieurs et du bas ventre, et désinfectées sur ces zones avec de la povidone iodée. Après une incision inguinale de 1 cm de long, l'artère fémorale droite est disséquée de la veine et du nerf voisin. Deux nœuds au fil non résorbable de soie tressé 7.0 sont serrés ; un à l'extrémité proximale, se situant entre l'artère épigastrique superficielle et le ligament inguinal ; l'autre à l'extrémité distale en aval de l'artère épigastrique superficielle. La prise en charge analgésique est réalisée par irrigation de la plaie par 0,2mL de ropivacaïne (20mg/ml).

Le défaut de perfusion ainsi induit est vérifié par LASER-Doppler (Perimed, France) au premier jour post-ischémie (J1) puis avant chaque acquisition TEP (J2, J5, J10, J15, J21 et J30) afin de corrélérer la perfusion et le signal obtenu par imagerie TEP. Une évaluation de la récupération clinique du membre inférieur a été réalisée aux mêmes temps (score : 1 : récupération complète ; 2 : rigidité légère ; 3 : rigidité importante 4 : amputation d'une partie du membre ; 5 : amputation complète du membre).

1.1.2 Modèle murin de glioblastome orthotopique

Des cellules humaines de glioblastome (U87) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) complémenté avec 10% de sérum bovin foetal, 1% pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non essentiels. Ces cellules étaient incubées à 37°C dans un milieu humide sous 5% de CO₂. La xénogreffe a été réalisée par injection stéréotaxique de 3.10⁵ cellules sous anesthésie à l'isoflurane, dans le crâne de souris nude athymiques males BALB/C de 7 semaines (Envigo).

Les animaux ont été traités dans des conditions conformes aux recommandations publiées par le NIH (*Guide for the care and use of laboratory animals*). Les conditions d'expérimentation ont été approuvées par le Comité local d'Ethique en expérimentation animale dont dépend notre établissement (CE14 numéro d'autorisation de projet : 2015061112039708).

1.2 IMMUNOHISTOCHIMIE

Nous avons sacrifié des souris à différents temps, J5, J10, J21 et J30 post-ischémie, prélevé les muscles gastrocnémiens de chaque patte (ischémiée et controlatérale) et réalisé une immunohistochimie pour évaluer l'expression d'AMOT.

Les muscles gastrocnémiens ont été immergés dans de la formaline tamponée 10% (Tissue-Tek VIP, Sakura) pour fixation. Les échantillons ont ensuite été inclus en paraffine (Tissue-Tek VIP5 Jr, Sakura) avant d'être coupés en tranche de 5µm d'épaisseur et montés sur lame. Les marquages IHC ont été réalisés sur un automate BOND-III (Leica) utilisant un kit de détection (Novocastra Bond Polymer Refine Detection) contenant un réactif post-primaire de blocage de la peroxydase, un chromogène DAB (diaminobenzidine), un contre-colorant hématoxyline, un anticorps primaire anti-AMOT (C-18 Santa Cruz 1/500^{ème}), puis un anticorps secondaire (1/300^{ème}).

Pour chaque série de marquage nous avons réalisé un contrôle négatif (sans ajout de l'anticorps primaire). Enfin, les lames ont été déshydratées, stabilisées par la colleuse de film (Sakura, Tissue-Tek Film) avant leur lecture grâce à la station de microscopie optique (Nikon, Eclipse Ni et NIS-Elements) et ce en utilisant la détection de marquage par intensité de teinte après seuillage et calibration de la saturation (grossissement ×100, sur des champs de 545292 µm²). Les résultats sont exprimés en µm² mesurés sur une surface constante de 545292 µm²

1.3 WESTERN BLOT

Nous avons sacrifié une série de souris à J5 post ischémie, prélevé le muscle gastrocnémien ischémié et controlatéral de chaque souris afin de réaliser un Western blot sur les lysats musculaires. Chaque muscle a été broyé mécaniquement à froid dans un tampon de lyse (Tris 1M pH8 (10mM), EDTA 0,5M pH8 (1mM), NaCl 5N (150mM) et NP40 10% 1mL

Dans une première étape nous avons quantifié la matière présente dans chaque lysat par dosage protéique (BCA protein assay kit, Pierce). 30µg de protéines ont été alors mis en contact avec du tampon de lyse NuPAGE lithium dodecylsulfate (Invitrogen) et de l'agent réducteur (Invitrogen). Les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel de migration 4-12% Novex Bis-Tris gels NuPAGE (Invitrogen) et les protéines, une fois séparées sont transférées sur une membrane en nitrocellulose. La membrane a été ensuite mise à incuber *overnight* avec un anticorps primaire spécifique (anti-AMOT isoformes p130 et p80 ABCAM ab85143 dilution au 1/1000) et avec un anticorps contrôle (anti-GAPDH 1/5000), suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase permettant la révélation. Le blot est révélé à l'aide d'un ECL substrat (Pierce). L'exposition et la détection du signal sont réalisées sur Genesys.

1.4 PRINCIPE GENERAL DU RADIOMARQUAGE

L'objectif de ce travail étant de développer un outil permettant de quantifier l'expression des récepteurs au sCD146, parmi toutes les modalités d'imagerie disponibles, notre choix s'est porté sur l'imagerie radio-isotopique et plus particulièrement vers la modalité TEP (Tomographie par Emission de Positons) qui présente l'avantage de pouvoir quantifier *in vivo* des processus biologiques ciblés avec une excellente sensibilité. Elle est de ce fait qualifiée d'imagerie fonctionnelle.

Le principe de l'imagerie TEP repose sur la détection par les scintillateurs de la caméra, de deux photons d'annihilation émis en coïncidence (à 180° l'un de l'autre) par un radiotraceur administré à l'homme ou l'animal. Ce signal, émis par le traceur ciblant le processus biologique étudié, constitue notre image.

Le système de camera TEP est couplé à une camera microCT permettant une imagerie anatomique. La fusion des deux images issues simultanément des modalités obtenues permet ainsi d'avoir un signal localisé avec une faible atténuation, une haute résolution (de l'ordre du femto molaire) et qui peut être aisément quantifié.

Concernant le radioisotope, parmi ceux utilisés et décrits en clinique pour l'imagerie radio-isotopique TEP, notre choix s'est porté sur le gallium 68 (⁶⁸Ga), qui est un isotope présentant une période physique

courte (68 minutes). Le ^{68}Ga se désintègre par émission de positon en Zinc 68, il émet une particule β^+ à plus de 89%, dont l'énergie maximale est de 1899 keV et ayant un parcours moyen de 2.4mm. La rencontre d'un électron du milieu par ce positon produit deux photons d'annihilation de 511 KeV émis à 180° l'un de l'autre (phénomène d'annihilation). De plus, nous sommes équipés au sein du service de radiopharmacie de l'AP-HM Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, d'un générateur de $^{69}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ couplé à un module de synthèse automatisé.

Les radionucléides peuvent être utilisés seuls comme éléments de diagnostic, ou couplés à des molécules organiques présentant une affinité avec un récepteur, un organe, une fonction. Le schéma classique de radiomarquage utilisant le principe de la complexation (le ^{68}Ga étant un métal) s'articule autour de quatre éléments fondamentaux :

- **Le peptide**, dans ce cas précis le sCD146 apportant la spécificité d'adressage vis-à-vis d'une cible
- **Le radiométal**, dont la nature chimique dicte le choix du chélateur et du type d'imagerie utilisée par la suite.
- **Le chélateur** : permettant la liaison du peptide d'intérêt au radiométal. Il s'agit d'un élément bifonctionnel présentant d'une part une cage au sein de laquelle le radiométal peut se complexer et d'autre part un groupement capable d'établir une liaison covalente au peptide d'adressage.
- **Le spacer ou linker**, chaîne organique permettant de jouer sur la pharmacocinétique du radiotraceur en modifiant l'hydrophilie de la molécule.

1.5 COUPLAGE DU CD146 SOLUBLE A UN CHELATEUR

La première partie de mon travail consiste à réaliser le couplage de notre molécule d'intérêt à un chélateur capable de lier le radiométal permettant l'imagerie isotopique.

Nous avons choisi de coupler le CD146 soluble au 2,2'-(7-(1-carboxy-4-((4-isothiocyanatobenzyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid connu sous la dénomination de p-NCS-benzyl-NODA-GA.

Le p-NCS-benzyl-NODA-GA est un chélateur permettant d'une part de former une liaison amide (avec une amine primaire) avec un peptide ou un anticorps et d'autre part de chélater la plupart des radiométaux comme le (^{68}Ga). La réaction entre le p-NCS-benzyl-NODA-GA et le ^{68}Ga est très rapide (15 minutes) et s'effectue à température ambiante ce qui présente un avantage pour notre réaction car le sCD146 est une molécule sensible à la chaleur et le ^{68}Ga qui présente une demi-vie très courte ne permet pas des réactions de radiomarquage longues.

Le couplage du sCD146 avec le p-NCS-benzyl-NODA-GA s'effectue en trois étapes essentielles :

- **Purification de l'échantillon contenant le sCD146**

Elimination du milieu de conservation du sCD146 recombinant (Biocytex, Marseille)

Etape réalisée grâce à l'utilisation d'Amicon[®] Ultra-0.5 3KDa Centrifugal Filter Devices de 500 μ L (Millipore Corporation. All rights reserved). L'échantillon est centrifugé pendant 15 minutes à température ambiante à 14000G, il est ensuite récupéré par une deuxième centrifugation de 2 minutes à 1000g après retournement de l'Amicon sur un nouvel eppendorf.

- **Couplage du sCD146**

Incubation du sCD146 avec le p-NCS-benzyl-NODA-GA (20 équivalents molaires) dans un tampon bicarbonate 0.2M à pH=9, pendant 3H à 37°C.

- **Elimination du tampon de réaction**

Elimination du tampon bicarbonate par ultrafiltration grâce à l'utilisation d'Amicon Ultra-0.5 3KDa Centrifugal Filter Devices de 500 μ L (Millipore Corporation). L'échantillon est centrifugé pendant 15 minutes, à température ambiante, à 14000g. Nous avons ensuite effectué une opération de dessalage avec 500 μ L d'eau milliQ suivie d'une centrifugation de 15 minutes, à température ambiante, à 14000g, cette opération a été renouvelée deux fois. L'échantillon est récupéré par une dernière centrifugation de 2 minutes à 1000g après retournement de l'Amicon sur un nouvel eppendorf.

Enfin nous avons dilué nos échantillons dans de l'eau milliQ afin d'obtenir une concentration de 0.5mg/mL, puis nous avons aliquoté sous un volume de 60 μ L (30 μ g) et conservé à -80°C nos échantillons.

1.6 MISE AU POINT DU RADIOMARQUAGE DU sCD146

L'élution du générateur de gallium 68 a été réalisée au sein du service de la radiopharmacie de l'AP-HM, grâce à la présence d'un module d'élution automatisé (Elusynth[®], Iason). Après réalisation d'une élution fractionnée, nous avons obtenu des éluats de ⁶⁸Ga d'environ 550MBq/1.5mL. Au cours de cette phase du développement, il fut nécessaire de mettre au point et de déterminer les conditions optimales de radiomarquage: notamment le volume et l'activité à mettre en contact; la quantité de protéine couplée; le pH optimal de la réaction. Il est à noter que le pH joue un rôle déterminant dans la chimie de complexation de la réaction, ainsi que dans la formation de colloïdes d'hydroxydes de ⁶⁸Ga. Le pH a été

contrôlé à chaque radiomarquage grâce à l'utilisation d'un pH-mètre. Les différentes conditions que nous avons testées sont les suivantes :

- Activité : 40-60 / 120-140 / 160-180 MBq
- Quantité de sCD146-NODA-GA : 50 / 10 / 5 / 2,5 µg
- Le pH : 3 / 4 / 4,5 / 5 / 5,5 / 6 / 6,5

La réaction de radiomarquage s'effectue pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation toutes les 5 minutes.

Nous obtenons ainsi le radiotracer d'intérêt : ^{68}Ga -sCD146- p-NCS-benzyl-NODA-GA (^{68}Ga -sCD146)

1.7 CONTROLE DE LA PURETE RADIOCHIMIQUE.

La pureté radiochimique est définie par le rapport (exprimé en pourcentage) de la quantité de radioactivité du radionucléide couplé au vecteur d'intérêt et de la quantité de radioactivité totale de ce même radionucléide présent dans la source.

La pureté radiochimique a été déterminée dans cette étude avec l'aide de chromatographie sur couche mince par la technique d'ITLC-SG. La phase mobile étant constituée par mélange vol/vol d'acétate d'ammonium 1M (10mL) et de méthanol (10mL).

Après migration, les activités des différentes formes chimiques radioactives (^{68}Ga -sCD146 et ^{68}Ga libre) ont été quantifiées avec un radiochromatographe (RayTest miniGITA Star, RayTest). (Figure 8)

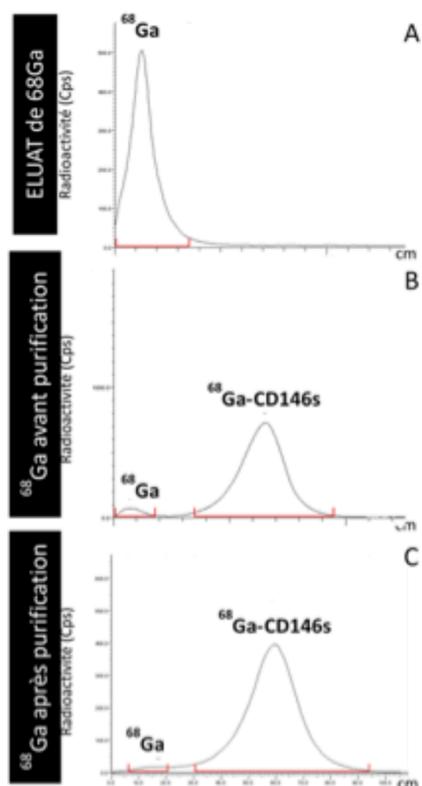


Figure 8 :
Radiochromatographes
 représentatifs de l'éluat de ^{68}Ga (A), de la synthèse de sCD146- ^{68}Ga , avant (B) et après (C) purification sur t-C18. Phase stationnaire : ITLC-SG et phase mobile : méthanol/Acétate d'ammonium (1:1)

1.8 CONTROLE DE LA STABILITE EN MILIEU BIOLOGIQUE.

La stabilité du composé radiomarqué (^{68}Ga -sCD146) dans le sérum est un élément indispensable à l'utilisation du radiotraceur *in vivo*, ainsi 50 μL (soit 0.75 μg) de sCD146 radiomarqué ont été mis en contact avec 50 μL de sérum humain. Nous avons effectué le contrôle de la pureté radiochimique 1 heure et 2 heures après la mise en contact avec le sérum.

1.9 CONTROLE DE L'INTEGRITE DU CONJUGUE ⁶⁸GA-SCD146

Le maintien de la reconnaissance du sCD146 par un anticorps spécifique a été réalisé après le radiomarquage, pour cela nous avons utilisé un kit « cy-quant ELISA sCD146 » (Biocytex, Marseille, France), que nous avons ensuite révélé par autoradiographie.

Pour cela, 200 µL d'albumine issue de sang bovin (BSA 3%) ont été mis en contact avec le fond des puits pendant 30 min, afin de saturer les sites de fixation aspécifique. La BSA est ensuite retirée et les puits sont rincés à trois reprises avec du PBS. 50 µL de ⁶⁸Ga-sCD146, à différentes concentrations (60-120-360 ng) ont été mis en contact pendant 1 heure avec un anticorps anti-sCD146 coaté au fond des puits ELISA. Les puits sont ensuite rincés trois fois avec du PBS.

Un test de compétition a été réalisé, par ajout d'une quantité 50 fois plus importante de sCD146 recombinant froid (18000 ng) au fond des puits. Nous avons laissé le ⁶⁸Ga-sCD146 froid pendant 1 heure puis nous avons rincé chaque puits.

Une gamme a été réalisée (comprenant 3 puits : 80, 8 et 0.8 kBq), afin de pouvoir quantifier le signal obtenu.

La révélation se fait par un contact de 30 minutes, dans l'obscurité, entre les puits et un film phosphore. Le film est ensuite placé dans un autoradiographe Cyclone Plus Storage Phosphor® System permettant la détection et la quantification des rayonnements présents sur le film phosphore.

Les résultats obtenus sont exprimés en densité optique lumineuse par mm² (DLU/mm²) et sont corrigés par la DLU/mm² obtenue avec le contrôle correspondant.

1.10 CONTROLE DE LA SPECIFICITE DU CONJUGUE ⁶⁸GA-SCD146

Afin de valider l'affinité du ⁶⁸Ga-sCD146 pour AMOT, nous avons réalisé une autoradiographie sur coupe de muscles gastrocnémiens à J5 post-ischémie (temps pour lequel nous avons démontré une surexpression importante d'AMOT au niveau du muscle ischémié). Les muscles sont fixés dans 10% de paraformaldehyde (PFA) toute la nuit et inclus en paraffine (Tissue-Tek VIP5 Jr, SAKURA). Des coupes de 5-micron de section sont ensuite déparaffinées, réhydratées et incubées avec 10-15kBq de ⁶⁸Ga-sCD146 (2.05nM dans du PBS) pendant 30 minutes avec ou sans pré-incubation pendant 60 minutes avec 1µM d'anticorps bloquant anti AMOT (Goat polyclonal anti C-18 Angiotensin, sc-82491, Santa-Cruz). L'activité due au ⁶⁸Ga-sCD146 restant fixée à la coupe de muscle après plusieurs rinçages au PBS est évaluée par autoradiographie sur un Cyclone phosphor system scanner (Perkin-Elmer).

1.11 IMAGERIE PET/CT

1.11.1 Préparation des animaux et injection

4.11.1.1 Modèle d'ischémie périphérique

Les souris sont maintenues sous anesthésie halogénée par isoflurane (induction 5%, entretien 1-2%) dès l'injection jusqu'à la fin des acquisitions sous caméra TEP-CT.

L'activité injectée dans la veine latérale caudale est de 5 à 10MBq, l'injection est répétée un jour avant l'ischémie puis 1, 2, 5, 10, 15, 21 et 30 jours post-ischémie. Les acquisitions sont réalisées 40 minutes après injection du radiotracteur.

Les souris sont réparties en 3 groupes, auxquels on a injecté en post-ischémique :

- ^{68}Ga -sCD146, correspondant au traceur d'intérêt (n=11)
- ^{68}Ga libre correspondant à un premier contrôle, afin d'exclure la possibilité d'une affinité du gallium pour les sites d'angiogénèse. (n=5)
- ^{18}F Fluoro-desoxyglucose (^{18}FDG) traceur de référence du métabolisme cellulaire, utilisé en clinique pour mettre en évidence une consommation accrue de glucose, comme dans les cas d'inflammation ou de prolifération cellulaire (n=5).

Le test de compétition *in vivo* a été réalisé en injectant un excès de 100 équivalents de sCD146 non radiomarké 30 minutes avant l'imagerie au ^{68}Ga -sCD146. Les images obtenues lors de cette acquisition sont comparées à des images obtenues chez ces mêmes souris la veille par injection simple du ^{68}Ga -sCD146.

4.11.1.2 Modèle de glioblastome

Les souris sont maintenues sous anesthésie halogénée par isoflurane (induction 5%, entretien 2 à 1%) dès l'injection jusqu'à la fin des acquisitions sous caméra TEP-CT. L'activité injectée en intra-caudale est de 5 à 9MBq, l'injection est répétée à J 23 et J21 post implantation. Les acquisitions sont réalisées 1h30 après injection du radiotracteur.

Les souris reçoivent respectivement :

- à J23 du ^{68}Ga -sCD146, correspondant au traceur d'intérêt (n=6)
- à J21 du ^{68}Ga -RGD traceur « référence » en cours de validation clinique dans l'évaluation des glioblastomes (n=6).

1.11.2 Equipement et paramètres d'acquisition

Les acquisitions ont été réalisées sur une caméra nanoScan[®]PC PET/CT, les paramètres des différentes modalités CT, PET et PET dynamique sont résumés dans le tableau 5.

Pour les acquisitions PET et CT les souris sont positionnées par trois sur un « lit » comportant trois masques d'anesthésie et un système de maintien de la température corporelle. Les acquisitions ont été réalisées 40 min après l'injection du traceur. Une biodistribution du conjugué ⁶⁸Ga-sCD146 chez la souris saine a été réalisée 20 et 40 min après l'injection du traceur par des acquisitions statiques. Une dernière acquisition dynamique pendant les 2 heures qui suivent l'injection a permis de déterminer la cinétique de biodistribution du traceur pendant cette durée.

CT	<ul style="list-style-type: none">• 480 projections• Méthode de scan : semi circulaire• Voltage : 35 kVp• Temps d'exposition : 450 ms• Binning : 1:4• Nombre de rotations : 2• Zoom intermédiaire : 112.3-210.8 mm
PET	<ul style="list-style-type: none">• Tera-Tomo 3D Full Detector Model• Détection radioactive total• Filtre : prise en compte unique des itérations• Nombre d'itérations : 4• Taille de pixel : 0.4• Coincidence : 1-3• Taille de l'image FOV : 169 x 170 x 246
PET dynamique	<ul style="list-style-type: none">• Images de 10 secondes x 12; 30s x 4; 60s x 12; 120s x 2; 300s x 6; 600 x 4; 900 x 2 durant les 2 heures suivant l'injection.

Tableau 5: Paramètres d'acquisitions CT et PET

1.11.3 Reconstructions et quantifications

Les images CT ont été reconstruites en temps réel dans NuCline® avec le filtre Cosine. Les images PET statiques et dynamiques ont été reconstruites après l'acquisition avec le logiciel Tera-Tomo™ 3D PET reconstruction. Les quantifications ont été réalisées avec le module 3D-ROI du logiciel InterView™FUSION, sous la forme de régions d'intérêt en 3D (ROI) reprenant les contours du membre inférieur au niveau de la jambe (gastrocnémien seul) ou les contours de la masse tumorale. Les résultats sont classiquement exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%ID/g de tissu). En considérant que la densité des tissus soit de 1 g/mL, l'activité retrouvée dans la ROI exprimée en Bq/mL est convertie en Bq/g puis divisée par la dose injectée à l'animal, afin d'obtenir des %ID/g de tissu.

2. RESULTATS

2.1 EVALUATION DE LA PERFUSION TISSULAIRE POST CHIRURGIE

L'évaluation de la perfusion tissulaire évaluée par LASER doppler représentée dans la figure 9 a montré un défaut de perfusion de $-61.4 \pm 14.1\%$ du membre ischémié sur le membre controlatéral à J1 post chirurgie, ce qui permet de conforter la reproductibilité de l'acte chirurgical. On a remarqué une reperfusion progressive du membre $-37.8 \pm 9.3\%$, $-17.8 \pm 8.6\%$, $-12.0 \pm 15.0\%$ et $-6.5 \pm 12.5\%$ respectivement à J5, 15, 21 et 30 post ischémie.

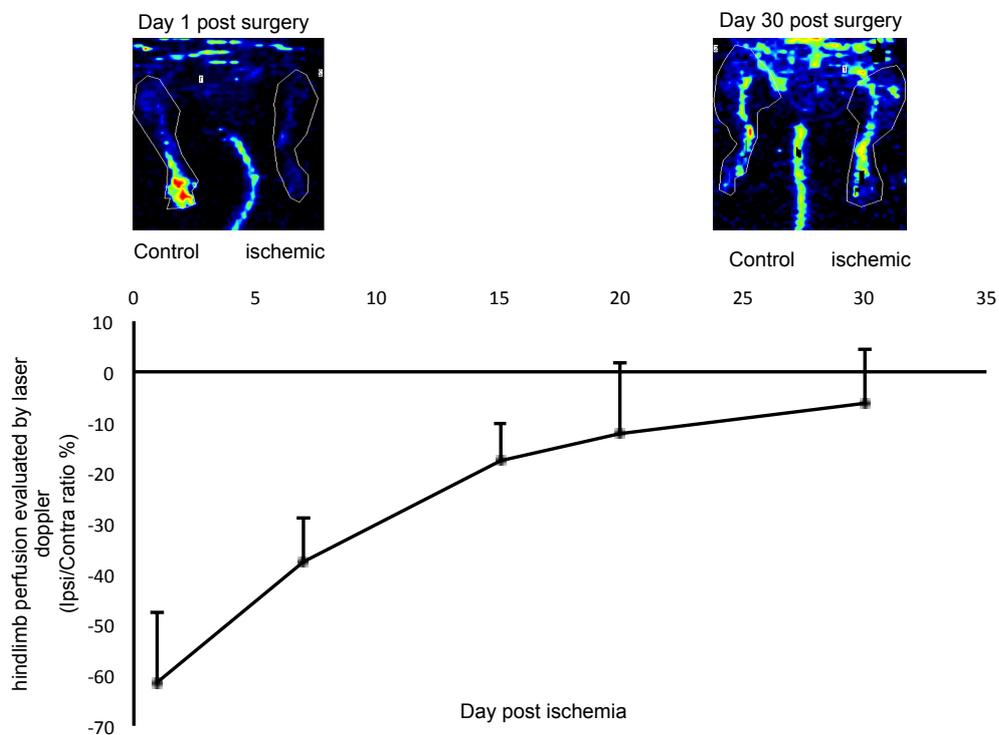


Figure 9: Images obtenues par LASER doppler montrant une reperfusion progressive du membre ischémié (n=7). Les résultats sont exprimés en ratio muscle ischémié/controlatéral (%), moyenne \pm écart type).

2.2 IMMUNOHOSTOCHIMIE : SUREXPRESSON PRECOCE ET PROLONGEE D'AMOT EN SITUATION POST ISCHEMIQUE

Les résultats de la quantification immunohistochimique des coupes des muscles gastrocnémiens ipsi et controlatéral sont représentés dans la figure 10.

Nous avons mis en évidence une différence significative de surface de marquage entre le membre ischémié et le membre controlatéral, pour les temps J5 (Ipsi =**444,18**±102,2 μm^2 ; Contro =**18,69**±4,66 μm^2 ; P<0.0001), J10 (Ipsi =**321,38**±147,95 μm^2 ; Contro =**19,59**±5,55 μm^2 ; P<0.0001), J21 (Ipsi =**22,88**±8,59 μm^2 ; Contro =**15,10**±3,89 μm^2 ; P=0,048). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les deux membres pour J30 post-ischémie (Ipsi =**46,18**±2,90 μm^2 ; Contro =**30,53**±4,46 μm^2 ; P<0.0001).

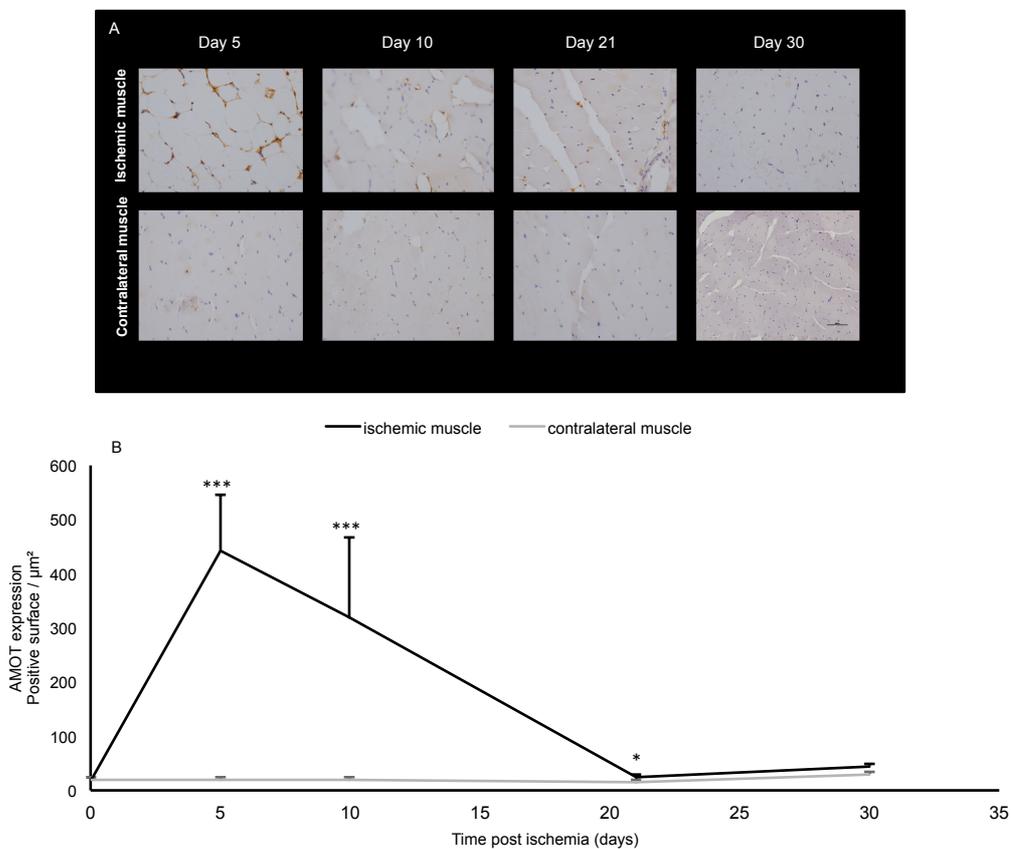


Figure 10 : (A) Marquage d'AMOT dans un muscle ischémié et dans un muscle controlatéral. (B) L'analyse quantitative montre une surexpression significative d'AMOT dans le membre ischémié en comparaison au membre controlatéral. n=3; *: P<0.0001 et * : P<0.05.**

2.3 WESTERN BLOT : SUREXPRESSION DE L'ISOFORME ANGIOGENIQUE P80 ET P130 A J5 POST ISCHEMIE.

Les résultats de la quantification des Western blots de lysats musculaires obtenus après sacrifice de souris à J5 post ischémie sont présentés dans la figure 11. Nous avons mis en évidence une surexpression significative ($p=0.008$; $n=14$) de l'expression de l'isoforme p80 d'AMOT dans le membre ischémié (1.77 ± 2.28) en comparaison au membre controlatéral (0.88 ± 1.91). Avec l'utilisation du même anticorps dirigé contre les deux isoformes d'AMOT, nous avons mis en évidence une expression 3,65 fois plus importante de l'isoforme p80 que de l'isoforme p130 dans les muscles ischémiés à J5 post chirurgie. Nous avons observé une surexpression significative ($p=0.003$; $n=8$) de l'isoforme p130 dans le muscle ischémié (0.48 ± 0.47) par rapport au membre controlatéral (0.22 ± 0.24).

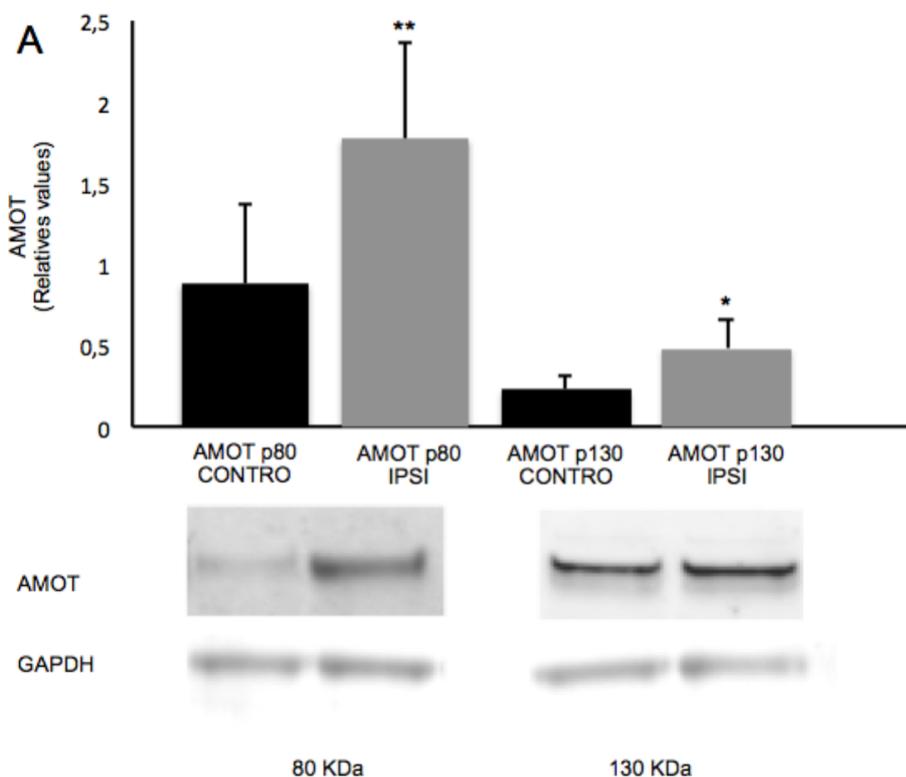


Figure 11 : (A) Analyse quantitative rapportée à la GAPDH, montrant une surexpression significative de l'expression de l'isoforme p80 et p130 d'AMOT à J5 post ischémie $n=8$; **: $P<0.001$ et * : $P<0.05$.

2.4 CONJUGAISON SCD146-NODAGA

Deux sessions de conjugaison ont été réalisées selon la méthode présentée dans le chapitre matériels et méthodes.

- 1) 1 mg de sCD146 a été conjugué avec 10 mg de NODAGA
20 aliquots de 50µg stockés à -20°C
- 2) 500 µg de sCD146 ont été conjugués avec 5 mg de NODAGA
17 aliquots de 30 µg stockés à -20°C

2.5 MISE AU POINT DU RADIOMARQUAGE DU CONJUGUE SCD146-NODAGA

Différentes valeurs de pH (tableau 12A), quantités de sCD146 (tableau 12B) et activités en ^{68}Ga (tableau 12C) ont été testées. Les conditions de synthèse optimales (pureté radiochimique = $93,12\% \pm 2.0$ n = 4) ont été pH=6 / 10µg de protéine / 170 MBq de ^{68}Ga (soit 400µl). Après purification sur une colonne C18 Sep-Pak[®], la PRC a été de $97,49\% \pm 0.7$. Le rendement de marquage corrigé par la décroissance radioactive a été de $69,30\% \pm 1.66\%$.

A	pH	Activité (MBq)	sCD146 (µg)	Température (°C)	Temps d'incubation (min)	PRC moyenne (%)	Ecart type (%)	n
	3	120-140	10	27	15	73.5	13.85	2
	4	120-140	10	27	15	82.55	5.17	2
	4.5	120-140	10	27	15	75.70	7.43	2
	5	120-140	10	27	15	80.09	10.91	2
	5.5	120-140	10	27	15	81.21	4.65	3
	6	120-140	10	27	15	88.58	2.56	6
	6.5	120-140	10	27	15	85.31	3.98	2

B	pH	Activité (MBq)	sCD146 (µg)	Température (°C)	Temps d'incubation (min)	PRC moyenne (%)	Ecart type (%)	n
	6	40-50	10	27	10	79.31	4.84	4
	6	120-140	10	27	10	89.59	2.57	6
	6	160-180	10	27	10	93.12	2.02	4

C	sCD146 (µg)	pH	Activité (MBq)	Température (°C)	Temps d'incubation (min)	PRC moyenne (%)	Ecart type (%)	n
	50	6	120-140	27	15	73.5	16.53	4
	10	6	120-140	27	15	89.6	2.57	6
	2.5	6	120-140	27	15	0.23	2.02	1

Tableau 12: Puretés radiochimiques obtenues en fonction des différentes conditions de réaction. A: variation du pH. B: variation de la quantité de sCD146-NODAGA mis en contact. C: variation de la quantité d'activité ^{68}Ga incubé.

2.6 STABILITE EN MILIEU BIOLOGIQUE

Les conditions de synthèse utilisées pour effectuer la stabilité en milieu biologique (tableau 13A) ne correspondent pas aux conditions de synthèse optimales. Nous avons obtenu pour ce radiomarquage une pureté radiochimique de $88,04\% \pm 2,30$; $n=3$.

Les résultats de la stabilité dans le sérum sont représentés dans le tableau 13B avec lors de la mise en contact ($88,57\% \pm 1,41$; $n=3$), après 1h de contact ($84,00\% \pm 1,26$; $n=3$) et après 2h de contact ($84,01\% \pm 0,18$; $n=3$).

A	pH	Quantité de sCD146-NODA-GA (μg)	Quantité d'activité (MBq)	Temps d'incubation (min)	Température ($^{\circ}\text{C}$)
	6	10,0	120-140	15	25
B	PRC (%)	PRC (%) serum	PRC (%) 1h serum	PRC (%) 2h serum	
Moyenne (%)	88.04	88.57	84.00	84.01	
Ecart type (%)	2.30	1.41	1.26	0.18	
Nombre	3	3	3	3	

Tableau 13 : Stabilité dans le sérum du ^{68}Ga -sCD146. A: conditions du radiomarquage B: Puretés radiochimique avant la mise en contact avec le sérum puis 0,1 et 2h après la mise en contact avec le sérum.

2.7 CONSERVATION DE L'INTEGRITE DU CONJUGUE ^{68}GA -SCD146

La réalisation d'un test ELISA suivi d'une révélation par autoradiographie nous a permis de valider la conservation de l'intégrité du sCD146 après conjugaison (figure 14).

La pré-incubation des membranes avec 18 μg de sCD146 a entraîné une diminution de 48,9% du signal obtenu avec ^{68}Ga -sCD146 (360 ng)

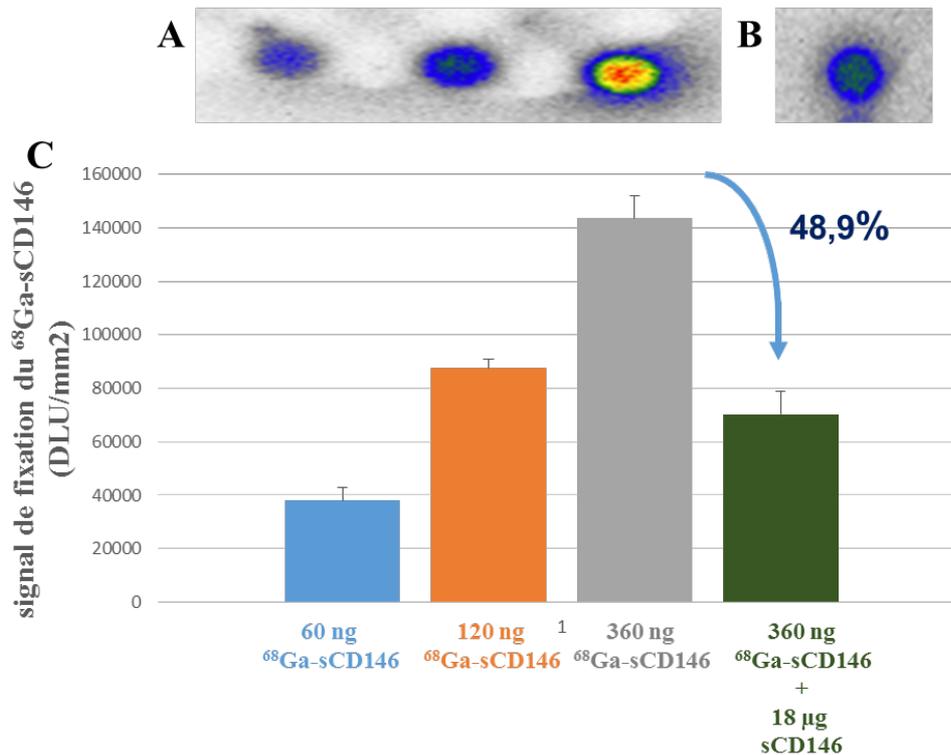


Figure 14: A : signal radioactif obtenu par autoradiographie suite à la fixation par Elisa pour 60, 120 et 360ng de $^{68}\text{Ga-sCD146}$. B : fixation par ELISA suite à la pré-incubation avec 18µg de sCD146 froid et 360ng de $^{68}\text{Ga-sCD146}$. C : Quantification de l'intensité du signal de fixation pour chaque concentration de $^{68}\text{Ga-sCD146}$.

2.8 CONSERVATION DE LA SPECIFICITE DU $^{68}\text{GA-SCD146}$ POUR SA CIBLE

Le signal dû à la fixation du $^{68}\text{Ga-sCD146}$ (figure 15) sur des coupes de muscles gastrocnémiens autoradiographiés est de 477.43 ± 201.11 DLU/mm² au niveau du muscle ischémié et de 115.10 ± 134.16 DLU/mm² au niveau du membre controlatéral. ($p < 0.05$ en comparaison au membre controlatéral). Le signal est abaissé à 93.97 ± 116.08 DLU/mm² suite à une pré-incubation de 60 minutes avec un anticorps C-18 anti-AMOT. Nous avons observé une diminution significative de la fixation du $^{68}\text{Ga-sCD146}$ sur le muscle ischémié ($-79.63 \pm 27.9\%$, $p < 0.001$; $n=8$)

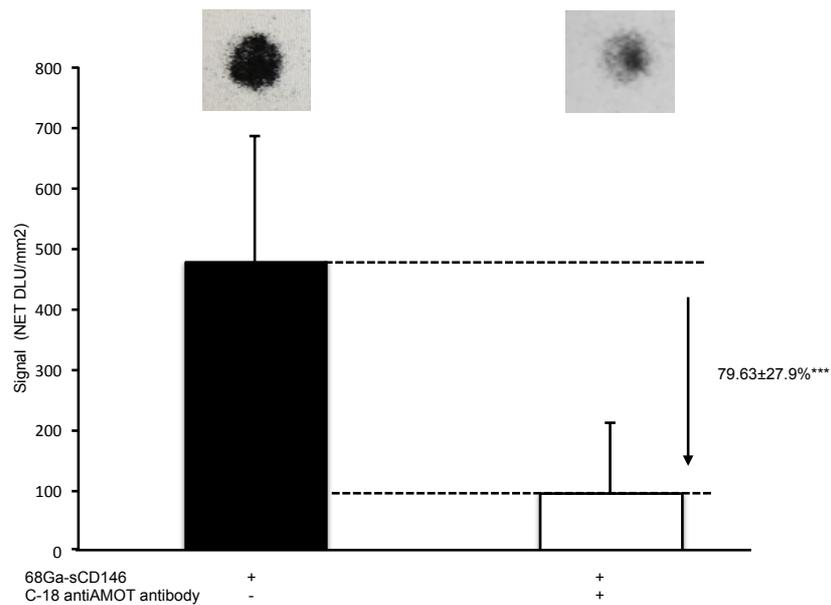


Figure 15: quantification d'une autoradiographie de coupes de muscles gastrocnémiens a J5 post-ischémie après 30 minutes incubation avec 10-15kBq de ⁶⁸Ga-sCD146 (2,05nM dans du PBS), avec ou sans une pré-incubation avec un anticorps C-18 anti AMOT (1µM), (n= 8), *p<0.001**

2.9 IMAGERIE PET/CT

2.9.1 Biodistribution du conjugué ⁶⁸Ga-sCD146 chez la souris saine

La cinétique de biodistribution en fonction du temps post injection dans les différents organes d'une souris saine, est obtenue suite à une acquisition dynamique, sur les deux premières heures suivant l'injection du radiotracer, est représentée par les figures 16, 17 et 18

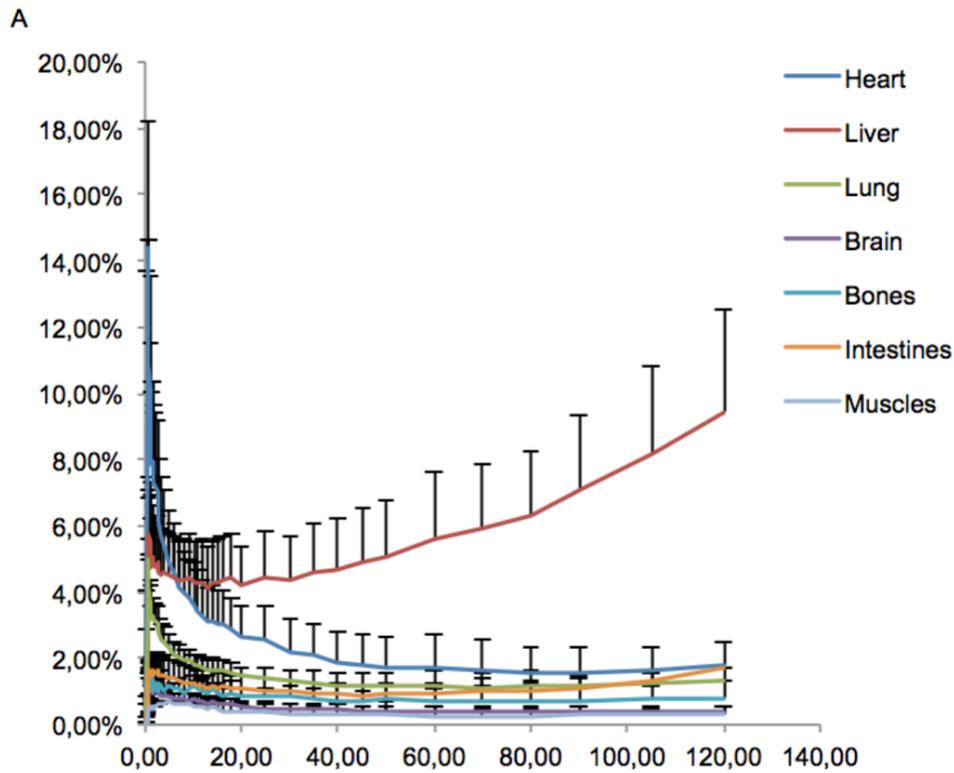


Figure 16 : Etude de biodistribution obtenue par imagerie TEP/CT. Courbes activité/ temps pour le cœur, le foie, les poumons, le cerveau, les os, les intestins et les muscles. (n=3).

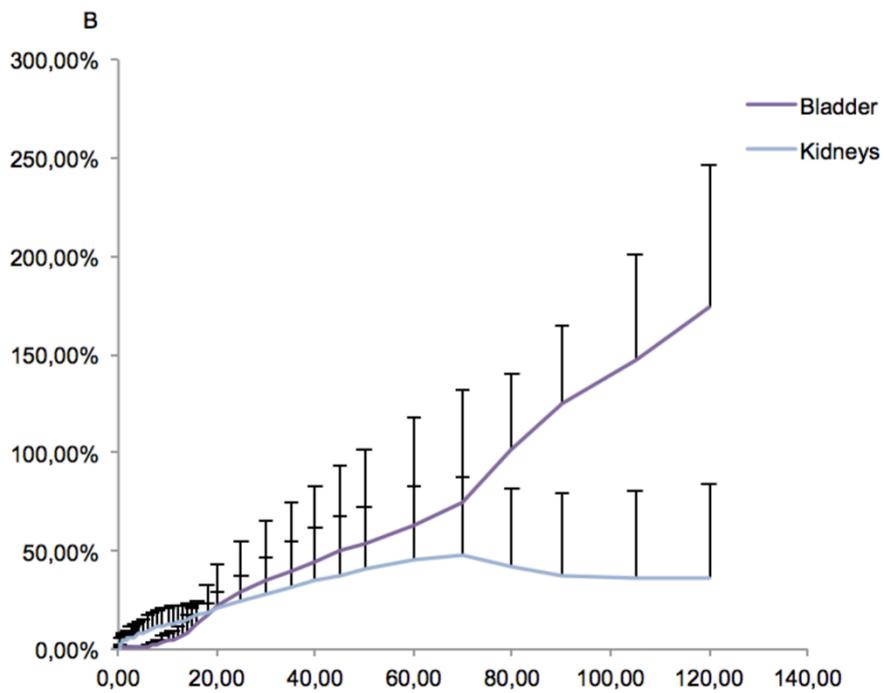


Figure 17 : Etude de biodistribution obtenue par imagerie TEP/CT. Courbes activité/ temps pour la vessie et les reins. (n=3).

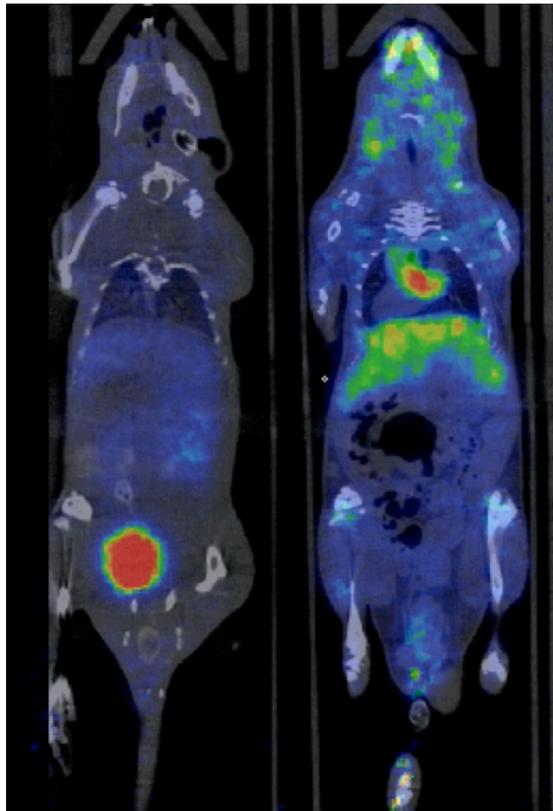


Figure 18 : Image TEP/CT de deux souris saines représentant la biodistribution du ^{68}Ga -sCD146. La coupe de la souris de gauche met en évidence l'élimination rénale tandis que la coupe de celle de droite, centrée sur le foie, montre l'élimination hépatique du traceur.

La figure 19 présente les résultats de biodistribution du ^{68}Ga -sCD146 après injection intraveineuse chez la souris saine. Les résultats sont classiquement exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissus ($\%ID/g$).

Nous avons pu observer une élimination majoritaire par voie urinaire, d'abord par les reins $8,55\pm 7,48\%ID/g$ puis la vessie $49,91\pm 30,18\% ID/g$ et une élimination hépatobiliaire moindre avec pour le foie $9,43\pm 2,04\% ID/g$ et pour les intestins $2,03\pm 0,65\% ID/g$ 40 minutes après injection du traceur. Nous avons noté la présence d'un signal très faible dans les membres inférieurs $0,54\pm 0,35\% ID/g$ chez la souris saine. Il n'y a pas de différence significative entre la biodistribution du radiotracer dans les différents organes à 20 ou à 40 minutes après l'injection. Nous avons aussi évalué la biodistribution du traceur à 120 minutes post injection en effectuant un gamma comptage de chacun des organes. L'ensemble des résultats exprimés en $\%ID/g$ sont représentés dans la figure 20.

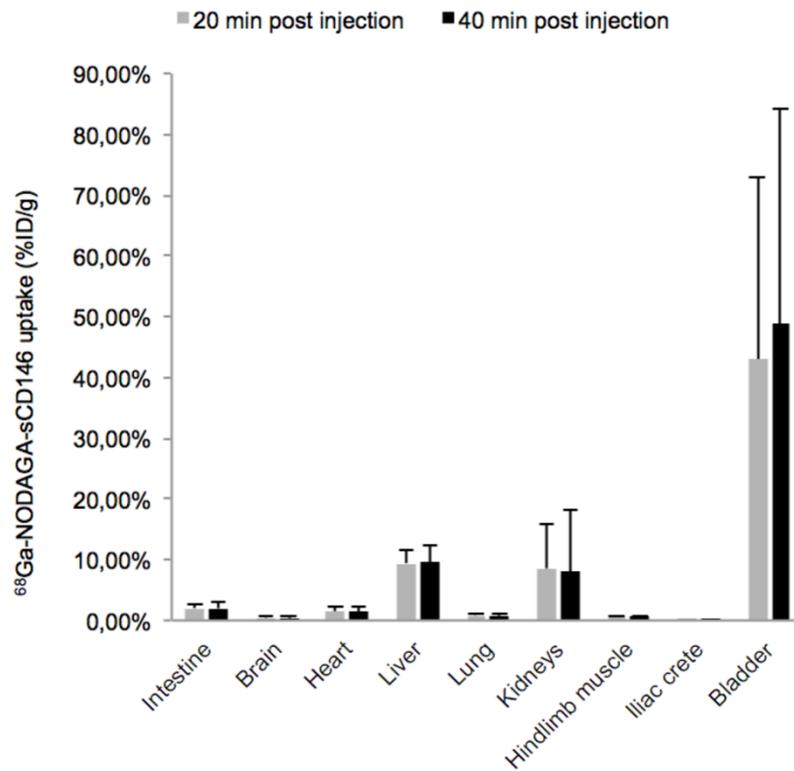


Figure 19 : Etude de biodistribution obtenue par imagerie TEP/CT à 20 et 40 minutes post injection, montrant une élimination rénale majoritaire (n=5).

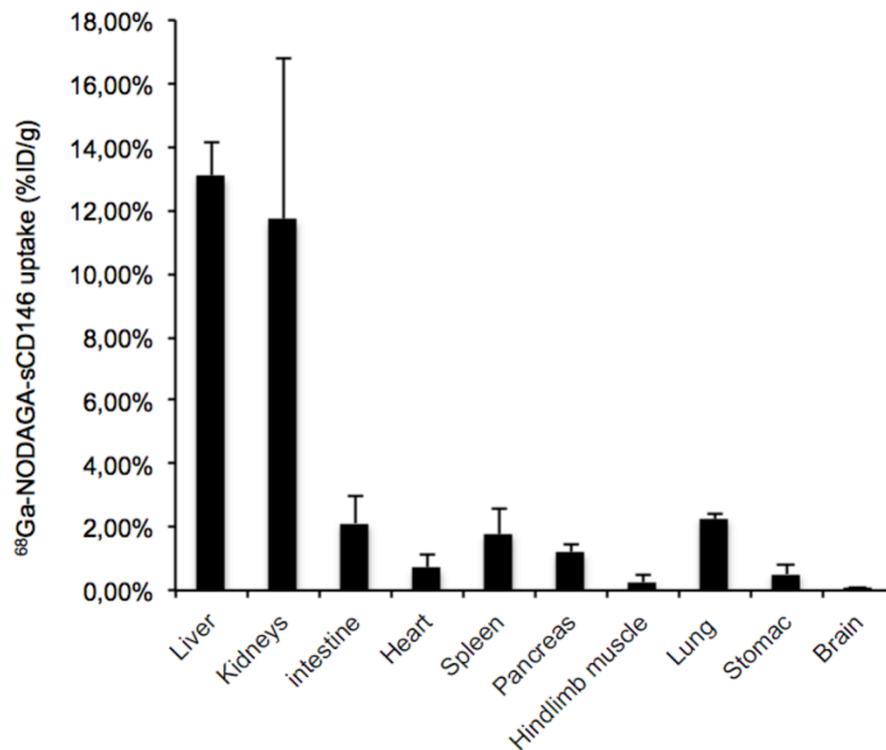


Figure 20: Etude de biodistribution obtenue par gamma comptage à 120 minutes post injection, montrant une élimination rénale et hépatique (n=3).

2.9.2 Evaluation de la biodistribution du ^{68}Ga -sCD146 sur un modèle d'ischémie périphérique chez la souris

Nous avons déterminé, après correction de la décroissance radioactive, le rapport ipsilatéral sur controlatéral (*i/c*) de la quantification du signal TEP dans les membres inférieurs avant et jusqu'à 30 jours après l'induction d'une ischémie périphérique du membre inférieur droit (figure 21). Les valeurs observées ont été comparées avec le rapport *i/c* obtenu à J-1 avant la chirurgie (Rapport *i/c* = $0,90 \pm 0,20$, $n=11$).

Nous avons observé des augmentations significatives des rapports *i/c* chez les animaux ischémiés en comparaison aux souris non ischémiées ; à J1 ($1,85 \pm 0,6$; $n=11$; $p<0,05$), J2 ($1,84 \pm 0,66$; $n=9$; $p<0,001$), J5 ($2,67 \pm 1,1$; $n=7$; $p<0,001$), J10 ($1,95 \pm 0,4$; $n=7$; $p<0,01$), J15 ($1,94 \pm 0,4$; $n=7$; $p<0,01$), J21 ($1,64 \pm 0,50$; $n=7$; $p<0,01$). A J30 nous n'avons pas observé de différence significative avec les valeurs des souris contrôles (*i/c* : $1,13 \pm 0,1$; $n=7$).

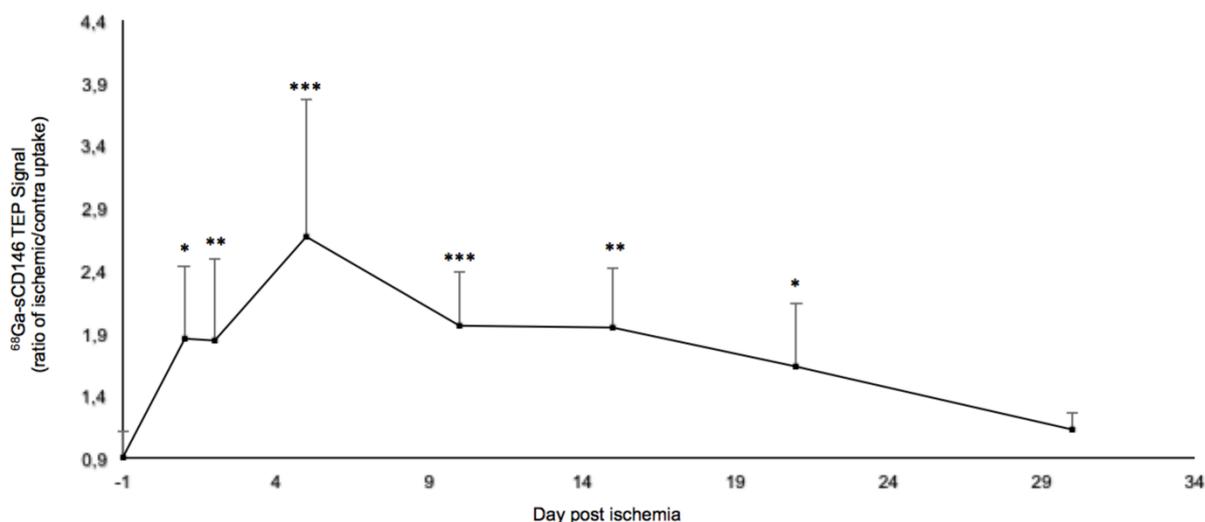


Figure 21 : Quantification de l'activité 40 minutes après l'injection de ^{68}Ga -sCD146 exprimée comme ratio du signal dans le membre ischémié / controlatéral a J1, 5, 10, 15, 21 et 30 post chirurgie. ($n=7$, * : $p<0,05$ vs J-1, ** : $p<0,01$ vs J-1 et *** : $p<0,001$ vs J-1).

2.9.3 Evaluation de la biodistribution du ^{18}F FDG sur un modèle d'ischémie périphérique chez la souris

De manière identique, nous avons déterminé le rapport *i/c* des membres inférieurs de la veille jusqu'à 30 jours après l'induction d'une ischémie périphérique du membre droit (Figure 22). Les valeurs observées ont été comparées au rapport *i/c* obtenu à partir d'un groupe de souris non ischémisées (rapport *i/c* = $0,90 \pm 0,03$, $n=5$). Nous avons observé des augmentations significatives des rapports *i/c* chez les animaux ischémisés par rapport aux souris contrôles à J5 ($1,63 \pm 0,15$; $n=5$; $P < 0,01$), J10 ($1,64 \pm 0,58$; $n=5$; $P < 0,01$).

Pour les autres temps d'acquisition, nous n'avons pas observé de différence significative avec les valeurs obtenues pour les souris contrôles, à J1 (*i/c* : $0,98 \pm 0,42$; $n=5$), J15 ($1,18 \pm 0,33$; $n=5$), J21 ($1,13 \pm 0,28$; $n=5$), J30 ($0,99 \pm 0,09$; $n=5$).

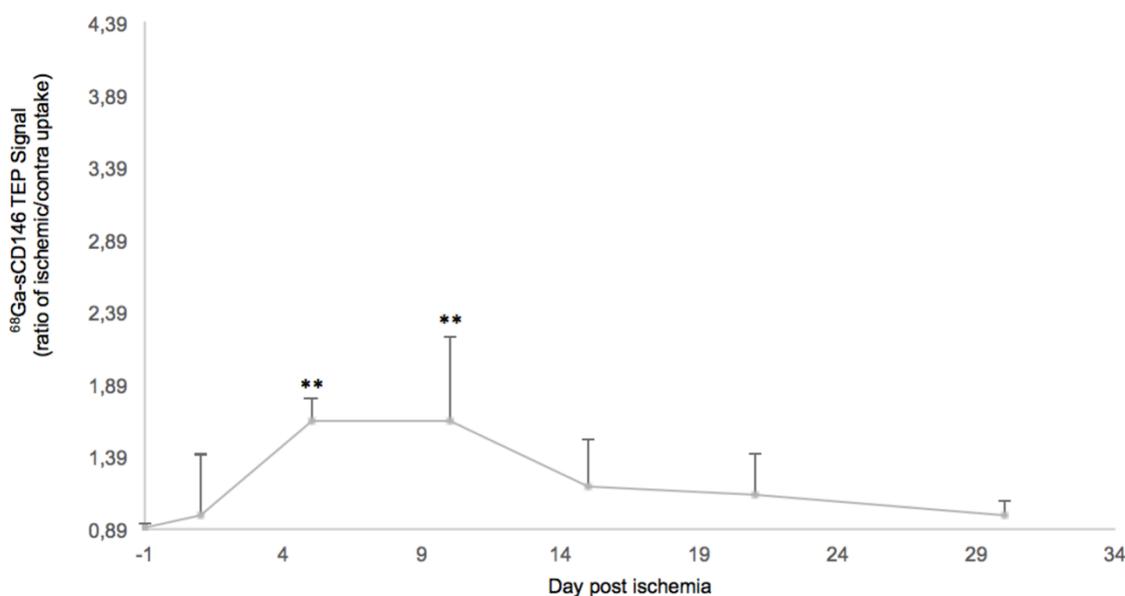


Figure 22: Quantification de l'activité 40 minutes après l'injection de ^{18}F FDG exprimé comme le ratio du signal dans le membre ischémisé / controlatéral à J1, 5, 10, 15, 21 et 30 post chirurgie ($n=5$, ** : $p < 0,01$ vs J-1).

2.9.4 Comparaison des profils des rapports *i/c* des différents traceurs

La comparaison des biodistributions du ^{68}Ga -sCD146 et du ^{18}F FDG jusqu'à 30 jours suivant l'ischémie est représentée dans la figure 23.

La comparaison des rapports *i/c* des signaux TEP obtenus dans les membres inférieurs avec le ^{68}Ga -sCD146 avec ceux du ^{18}F FDG a montré des différences significatives à J1 ($P=0.018$) et à J5 ($P=0.017$) post-ischémie. Nous n'avons pas observé de différence significative pour les autres temps post-ischémie.

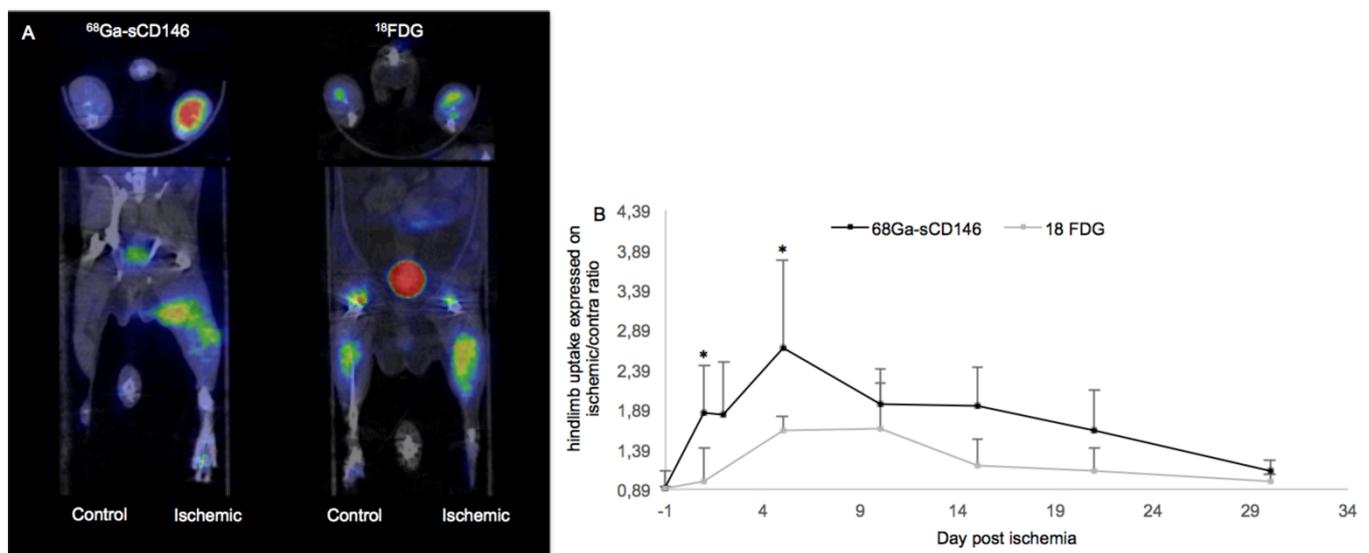


Figure 23: (A) Images représentatives d'une TEP/CT, 40 min après injection de ^{68}Ga -sCD146 et de ^{18}F -FDG à J5 post ischémie. (B) quantification de l'activité 40 minutes après l'injection de ^{68}Ga -sCD146 ou de ^{18}F -FDG, exprimé comme le ratio du signal dans le membre ischémié / controlatéral à J1, 5, 10, 15, 21 et 30 post chirurgie. (n=7, * : $p < 0.05$ vs ^{18}F -FDG).

2.9.5 Test de compétition *in vivo* du ^{68}Ga -sCD146.

Chez les mêmes animaux, nous avons observé un ratio *i/c* de 2.87 ± 0.29 sans blocage et une diminution de ce ratio à 1.68 ± 0.14 après blocage avec un excès de sCD146 froid (figure 23). Le test de compétition *in vivo* conforte la spécificité de notre traceur en montrant une diminution significative de $62.57 \pm 11.13\%$ ($p < 0.05$; n=3) du signal après blocage par un excès de sCD146 froid.

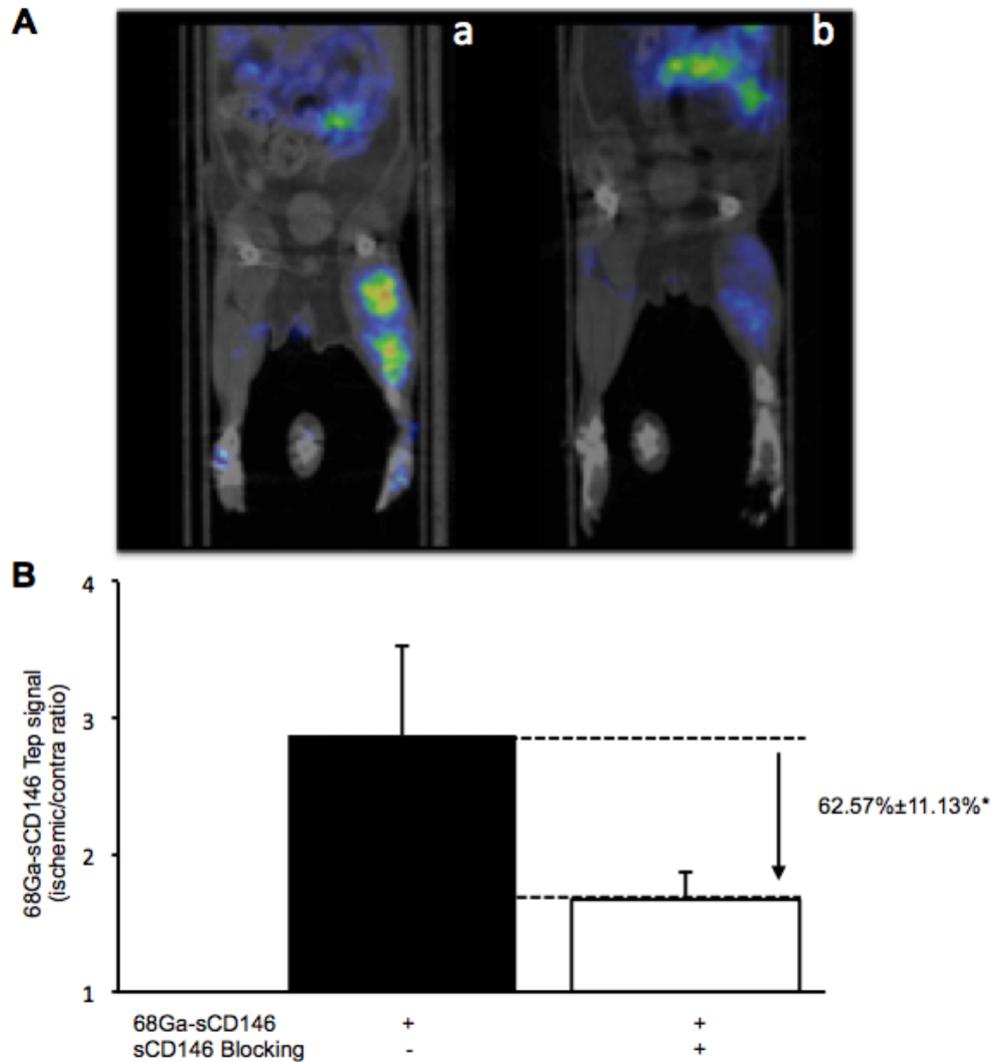


Figure 24 : (A) images représentatives d'une TEP/CT après injection de ^{68}Ga -sCD146, sans blocage (Aa) et avec un excès de 100 équivalents de peptide froid injecté 30 min avant l'injection du traceur. (B) quantification du signal ^{68}Ga -sCD146 obtenu exprimé comme ratio membre ischémié/controlatéral à J5 post ischémie et 40 min après injection. Nous retrouvons une diminution significative du signal après injection de sCD146 froid $62.57 \pm 11.13\%$ ($p < 0.05$; $n=3$)

2.9.6 Un signal TEP à J5 corrélé à l'expression d'AMOT est pronostique de la revascularisation tissulaire.

Nous avons pu mettre en évidence une corrélation significative ($p < 0.05$) entre les rapports *ipsi/contro* obtenus par imagerie TEP après injection de ^{68}Ga -sCD146 et l'intensité d'expression d'AMOT évaluée par immunohistochimie et ce pour tous les temps post-ischémie ($R^2=0,85$; $n=5$) ; (figure 24A).

Une corrélation significative ($p < 0.05$) est retrouvée entre ce même rapport à J5 et le pourcentage de récupération de perfusion sanguine (Doppler J30 / Doppler J1) des souris ischémiées ($R^2=0,75$; $n=6$; figure 24B). D'un point de vue clinique, on a retrouvé également une corrélation significative

($P < 0.001$) entre le rapport *ipsi/contro* obtenu par imagerie TEP post injection de ^{68}Ga -sCD146 et le score clinique de l'animal à la fin de l'expérimentation. ($R^2 = 0,80$; $n = 15$; figure 24C)

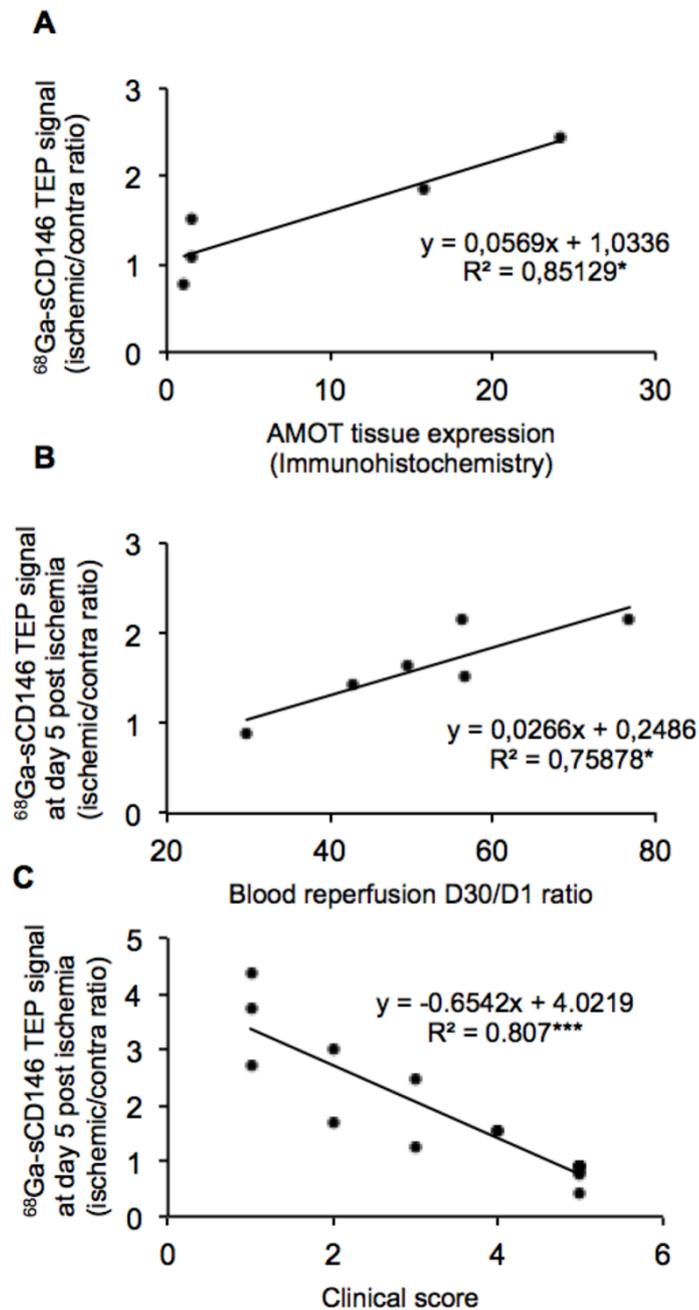


Figure 25 : (A) corrélation entre l'expression d'AMOT par immunohistochimie et le signal obtenu par imagerie TEP au ^{68}Ga -sCD146 ($p < 0.05$; $n = 5$). (B) corrélation entre la reperfusion tissulaire et l'imagerie TEP à J5 post ischémie ($p < 0.05$; $n = 6$). (C) Corrélation entre le score clinique de l'animal à la fin de l'expérimentation et l'imagerie TEP à J5 post ischémie ($p < 0.001$; $n = 15$).

2.9.7 Evaluation dans un modèle murin de xénogreffe orthotopique de glioblastome

Nous avons déterminé, après correction de la décroissance radioactive, l'activité présente au sein de la tumeur cérébrale à J21 et J23 post-implantation respectivement 1H30 après injection de ^{68}Ga -sCD146 et du ^{68}Ga -RGD. On retrouve une fixation tumorale intense ($1.58 \pm 0.70\% \text{ID/g}$; $n=3$) après injection de ^{68}Ga -sCD146. Cette fixation est significativement supérieure ($p < 0.05$; $n=5$) à celle retrouvée après injection de ^{68}Ga -RGD ($0.48 \pm 0.14\% \text{ID/g}$; $n=5$) ; (figure 25).

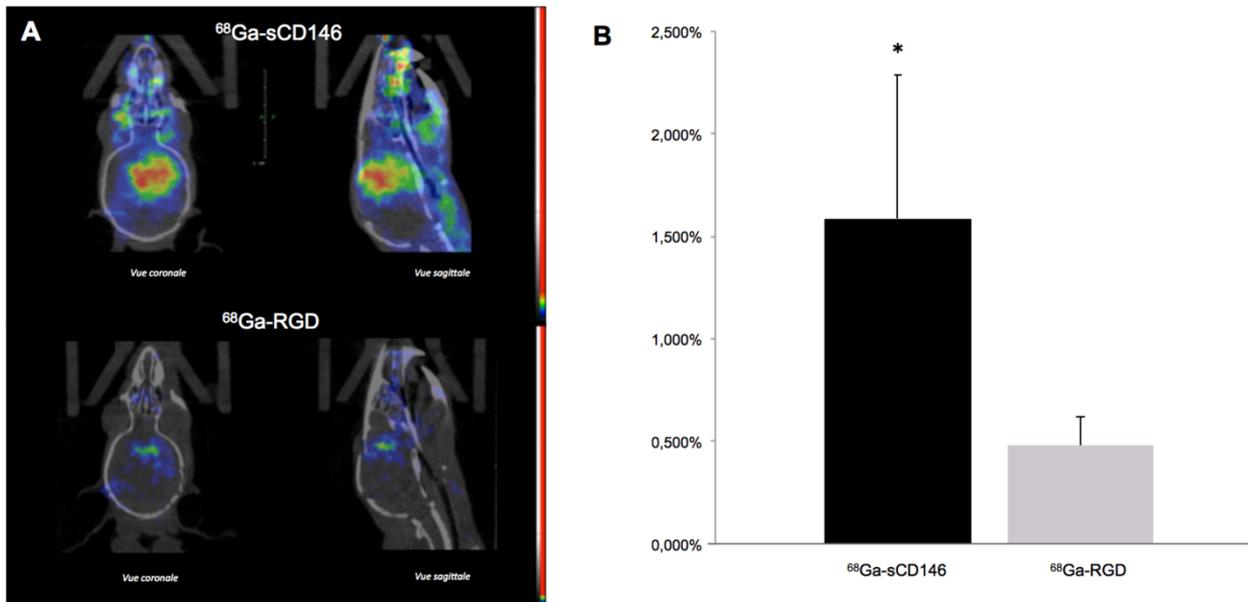


Figure 26 : (A) Images représentatives d'une TEP/CT, 1H30 après injection de ^{68}Ga -sCD146 et de ^{68}Ga -RGD à J21 post implantation. (B) quantification du signal radioactif 1H30 après l'injection de ^{68}Ga -sCD146 ou de ^{68}Ga -RGD. Les résultats sont exprimés en %ID/g à J21 post implantation. On retrouve un marquage tumorale significativement plus intense avec le ^{68}Ga -sCD146 qu'avec le ^{68}Ga -RGD ($n=5$: $p < 0.05$).

3. DISCUSSION

Au cours de ce travail nous avons mis en évidence pour la première fois qu'une situation ischémique entraînait une élévation de l'expression d'AMOT. En effet, les résultats obtenus par immunohistochimie et par Western blot ont permis de valider notre première hypothèse : l'effet thérapeutique local du sCD146 en situation post ischémique [73] est dû à la surexpression de son récepteur AMOT.

Nous avons retrouvé par immunohistochimie une surexpression intense et précoce, dès J5, d'AMOT dans le membre ischémié et cette surexpression persiste de manière prolongée jusqu'à 21 jours post-ischémie pour ensuite se normaliser à J30. De même on remarque que le profil de la cinétique d'expression d'AMOT coïncide temporellement avec la cinétique de reperfusion tissulaire évaluée par LASER Doppler. (Figure 27).

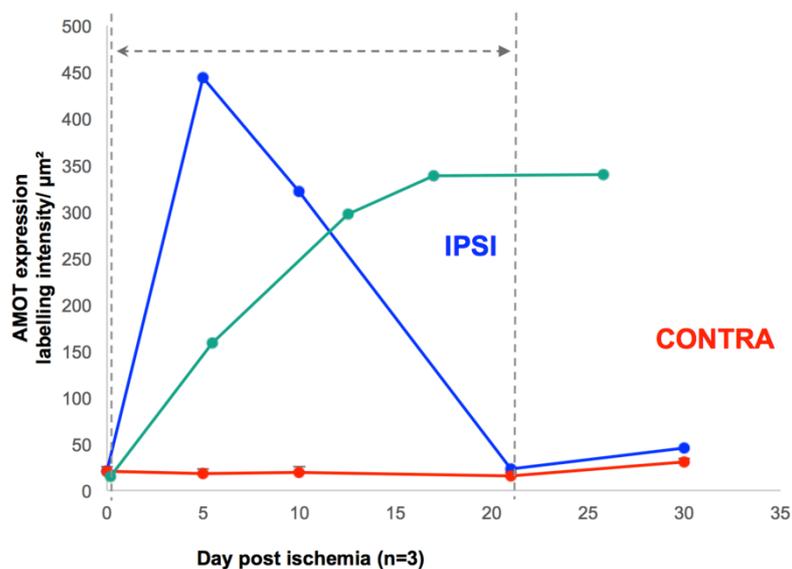


Figure 27 : Représentation des cinétiques d'expression d'AMOT obtenues par immunohistochimie dans les membres ischémiés (courbe rouge) et dans les membres controlatéraux (courbe bleue). Représentation de la cinétique de reperfusion tissulaire évaluée par LASER Doppler (courbe verte). Le profil d'expression d'AMOT présente un profil cinétique comparable à la cinétique de reperfusion tissulaire évaluée par LASER doppler.

D'autres travaux rapportent une augmentation du ratio angiostatine/AMOT après luminothérapie chez des souris $Tsk^{-/+}$ ayant subi une ischémie du membre inférieur [123]. Bien que les auteurs n'en fassent

pas explicitement état, dans le groupe contrôle des souris C57BI/6J, les images d'histologie semblent montrer une augmentation de l'expression d'AMOT 14 jours après induction de l'ischémie.

L'élévation de l'expression d'AMOT de J1 à J21 que nous rapportons, peut également expliquer l'effet protecteur de l'injection locale quotidienne de 10µg de sCD146 que nous avons préalablement rapporté sur ce même modèle d'ischémie avec une diminution de l'auto-amputation, de l'inflammation, de la calcification et de la fibrose des fibres musculaires, ainsi qu'une augmentation significative du débit de perfusion du membre ischémié à J20. [73].

L'intensité de la surexpression de l'isoforme p80 par rapport à celle de l'isoforme p130 à ce stade (J5) de la revascularisation conforte les données décrivant des profils de variation de l'expression de chacune des isoformes variant durant les différentes phases d'angiogenèse. Ainsi à J5 post ischémie on observe par Western blot une surexpression de l'isoforme p80, agissant comme stimulant la formation de nouveaux vaisseaux et la migration des cellules endothéliales, ainsi qu'une surexpression de l'isoforme p130 jouant sur la maturation et la stabilisation des vaisseaux [40].

Suite à la confirmation de notre première hypothèse, nous avons initié le développement d'un nouveau radiotracer (^{68}Ga -sCD146) permettant l'évaluation *in vivo* de l'expression d'AMOT par imagerie TEP.

Après détermination des conditions de radiosynthèse optimales, le ^{68}Ga -sCD146 a été obtenu avec un rendement de marquage proche de 70 % et une pureté radiochimique de plus de 90% ne nécessitant pas de purification post radiomarquage. L'absence de purification permet de raccourcir les temps de synthèse, qui en raison de la courte demi vie du ^{68}Ga (68 min) est un des paramètres clés dans le développement des agents d'imagerie TEP.

La bonne stabilité en milieu biologique du ^{68}Ga -sCD146 observée ainsi qu'une biodistribution favorable (circulation plasmatique courte, élimination rénale rapide, captation hépatique modérée) nous ont permis de poursuivre à l'étape de validation de la vectorisation. Ces données de biodistribution ont conforté le choix du p-NCS-benzyl-NODA-GA, car à contrario d'autres chélateurs (comme le DOTA et le NOTA), il présente une captation plus faible par les organes cibles [124], notamment le foie, et une toxicité déjà validée en clinique. De plus la présence d'un signal très faible au niveau pulmonaire et osseux (caractéristique du ^{68}Ga libre) confirme la stabilité du radiotracer dans le sérum.

La validation de l'intégrité et de la spécificité du ^{68}Ga -SCD146 après la conjugaison avec le NODAGA et de la vectorisation pour AMOT ont été respectivement confortées *in vitro* par ELISA ainsi que par autoradiographie sur coupe de muscle et *in vivo* sur un modèle d'ischémie périphérique.

Une corrélation entre l'intensité du signal ^{68}Ga -sCD146 à tous les temps et la quantité d'AMOT mise en évidence par immunohistochimie a également été mise en évidence figure 25.

Nous avons obtenu un profil d'évolution de l'expression d'AMOT superposable par imagerie TEP avec le ^{68}Ga -sCD146.

L'analyse des images obtenues avec le ^{68}Ga -sCD146, montre une surexpression précoce d'AMOT dès le premier jour post-ischémie et qui perdure de manière significative jusqu'à J21. La quantification du signal *in vivo* nous informe que l'intensité maximale de fixation pour le ^{68}Ga -sCD146 a lieu à J5, où elle est près de 3 fois plus importante dans le membre ischémié que dans le membre controlatéral.

En comparaison avec la cinétique de fixation du ^{18}F FDG, le signal TEP du ^{68}Ga -sCD146 dans le membre ischémié montre un signal plus précoce, plus intense et plus prolongé.

Le ^{18}F FDG, traceur aspécifique (reflétant la consommation tissulaire en glucose) met en évidence l'inflammation et la prolifération cellulaire post-ischémique [125].

L'élévation plus précoce d'AMOT semble montrer une implication de la voie CD146/AMOT en amont de la phase inflammatoire. Bien que le sCD146 soit impliqué dans l'inflammation [54], les fonctions de cette activation post ischémie ne sont pas clairement identifiées. Nous pouvons supposer qu'une de ces fonctions soient impliquées dans les processus de régénération du fait que nous avons observé une corrélation positive significative entre le signal ^{68}Ga -sCD146 à J5 et le pourcentage de revascularisation du membre ischémié. Ainsi le signal ^{68}Ga -sCD146 obtenu à J5, ou bien la persistance de l'augmentation d'expression d'AMOT semble être un facteur pronostique d'une meilleure revascularisation. Nous observons aussi que la surexpression du traceur à J5 présente une corrélation significative avec une meilleure récupération fonctionnelle de l'animal telle qu'évaluée à la fin de l'expérimentation. La mise en évidence de la surexpression d'AMOT à J5 post-ischémie permet donc de prédire une meilleure revascularisation et un meilleur rétablissement clinique de l'animal. La surexpression d'AMOT jusqu'à J21 post ischémie peut être comparée une nouvelle fois à nos précédents travaux où nous avons montré que l'injection quotidienne de CD146s devait être poursuivie 12 jours pour entraîner un effet bénéfique [73].

Ainsi dans la première partie de ces travaux, nous avons montré pour la première fois une surexpression précoce d'AMOT dans un modèle murin d'ischémie périphérique. Nous avons mis au point et évalué l'intégrité et la spécificité d'un nouveau radiotracer, le ^{68}Ga -sCD146. L'injection de ce traceur chez un modèle murin d'ischémie périphérique a permis de confirmer la surexpression d'AMOT évaluée par immunohistochimie et par western blot. Le signal ^{68}Ga -sCD146 obtenu à J5 semble être un facteur prédictif d'une meilleure revascularisation et d'une meilleure récupération

fonctionnelle post ischémique, ce qui fait du ^{68}Ga -sCD146, un agent d'imagerie intéressant dans l'évaluation des patients souffrant de pathologies cardiovasculaires ischémiques ou dans l'évaluation clinique de nouvelles approches de thérapies régénératives.

De la même manière, l'implication de l'angiogénèse est déterminante dans le développement tumoral. Ainsi le développement d'un outil permettant d'apprécier le niveau de vascularisation d'une tumeur ou de constituer un facteur pronostic de l'agressivité d'une tumeur est un élément majeur dans la stadification et le suivi thérapeutique des patients en oncologie.

La littérature montre une implication importante d'AMOT [75], [126] et de son ligand [127], [128] dans différentes pathologies tumorales notamment le cancer de sein [80], l'ostéosarcome [84], [129], le cancer de la prostate [80], le carcinome squameux de la tête et du cou [81] et les carcinomes hépatiques [130], et rénaux [88], que ce soit à la fois dans la néo-angiogénèse mais aussi dans le développement tumoral [131].

L'implication d'AMOT dans le glioblastome ne reste peu décrit, mais une surexpression importante d'AMOT par les cellules U87 a été rapportée par Western blot et RT-PCR. On retrouve un niveau encore plus important d'AMOT dans le phénotype de tumeur dormante de U87 [126], [132]. Ce phénotype correspond à l'un des premiers stades du développement tumoral, à l'état par exemple, de micro-métastases dans les organes distants, de maladie minimale résiduelle après ablation chirurgicale ou première ligne de traitement [133], [134]. Les tumeurs dormantes ne sont pas identifiables par la plupart des technologies d'imagerie [135], ce qui correspond actuellement à un défi majeur dans le traitement du cancer [136]. Ces tumeurs peuvent cependant passer à tout moment dans leur développement à un phénotype de croissance rapide, avec une clinique bruyante et AMOT semble jouer un rôle important dans ce switch [126],[132].

Ces données nous ont donc poussées à évaluer l'imagerie TEP au ^{68}Ga -sCD146 dans un modèle de glioblastome (U87) orthotopique chez la souris (figure 25). Lors de cette preuve de concept, nous avons observé une fixation tumorale intense de notre traceur au niveau des lésions cérébrales.

Le signal obtenu avec le ^{68}Ga -sCD146 s'avère être significativement plus important que le signal obtenu avec du ^{68}Ga -RGD, traceur actuellement en développement clinique dans l'imagerie de l'angiogénèse, au niveau du site tumoral et ce chez les mêmes animaux. Nous avons donc validé la fixation de notre traceur *in vivo* au niveau de glioblastome U87 à un stade tardif du développement tumoral. Nous sommes actuellement en train de valider l'expression d'AMOT sur ces mêmes tumeurs. Il semblerait donc intéressant de réaliser une cinétique de fixation du ^{68}Ga -sCD146 au cours du développement

tumoral, afin d'identifier la participation d'AMOT dans les deux phénotypes décrits. Le ^{68}Ga -sCD146 pourrait permettre ainsi d'imager des glioblastomes à un stade de tumeur dormante, soit à un stade très précoce dans l'évolution de la pathologie.

AMOT est impliquée dans la néo angiogenèse tumorale mais elle est aussi exprimée par les cellules tumorales elles-mêmes. Il est ainsi difficile de déterminer si le signal obtenu avec le ^{68}Ga -sCD146 caractérise l'expression tumorale d'AMOT ou son implication dans la néo angiogenèse. Afin de répondre à cette question nous réalisons actuellement des marquages immunohistochimiques sur des coupes de cerveaux présentant des xénogreffes de glioblastome.

A ce jour, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation du ^{68}Ga -sCD146 dans un modèle murin de glioblastome. Sur la base d'une récente revue décrivant l'implication d'AMOT dans de nombreux types de pathologies tumorales [75], Il semble essentiel d'évaluer ce nouveau radiotracer dans les pathologies tumorales dans lesquelles AMOT est surexprimée et corrèle avec le grade de sévérité tumoral, comme dans le cancer du sein, l'ostéosarcome et le carcinome squameux de la tête et du cou.

Le suivi de l'évolution d'AMOT semble donc être un potentiel biomarqueur et pourrait aider le développement de thérapeutiques anti-cancéreuses ciblant la voie du sCD146/AMOT. En effet, différentes thérapeutiques ciblent directement AMOT comme la vaccination contre AMOT-p80 [81] et l'utilisation d'anticorps B06 [91], ou indirectement en utilisant des anticorps bloquant le sCD146, ligand pro-angiogénique d'AMOT [128]. Notre traceur s'inscrit donc dans une démarche de « *Companion Diagnostic Devices* » recommandée par la Food and Drug Administration (FDA) depuis Août 2014, et qui incite fortement le co-développement d'outils compagnons diagnostiques de toutes les nouvelles thérapeutiques ciblées anticancéreuses.

Un tel test permettrait de sélectionner les patients éligibles à une thérapeutique ciblant la voie du sCD146/AMOT.

En conclusion, notre étude montre pour la première fois, qu'il y a une surexpression d'AMOT dans des situations ischémiques et que cette surexpression est impliquée dans les phénomènes angiogéniques et régénératifs post ischémiques. Nous avons aussi montré qu'il était possible d'imager *in vivo* l'expression d'AMOT dans des modèles murins d'ischémie périphérique et de glioblastome. Le ^{68}Ga -sCD146 est un outil d'imagerie PET/CT qui présente des propriétés intéressantes au niveau diagnostique et pronostique dans des situations ischémiques. L'intérêt potentiel en théranostique de ce nouveau radiotracer est abordé ici dans les tumeurs de glioblastomes, il reste cependant encore à définir dans de nombreuses pathologies cancéreuses. Nous avons ainsi réalisé une preuve de concept

montrant que le ^{68}Ga -sCD146 est le premier agent d'imagerie permettant d'évaluer l'expression tissulaire d'AMOT, et que cette imagerie peut avoir des applications en exploration clinique des pathologies cardiovasculaires et en oncologie. Un brevet a été enregistré pour cet agent d'imagerie auprès de l'Office Européen des Brevets (n°EP17305198.8).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. Carmeliet, "Angiogenesis in life, disease and medicine.," *Nature*, vol. 438, no. December, pp. 932–936, 2005.
- [2] D. Hanahan and J. Folkman, "Patterns and Emerging Mechanisms Review of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis," *Cell*, vol. 86, pp. 353–364, 1996.
- [3] J. Folkman, "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease," *Nat Med*, vol. 1, no. 1, pp. 27–30, Jan. 1995.
- [4] J. Folkman, "Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications," *N. Engl. J. Med.*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186, Nov. 1971.
- [5] E. Marieb and R. Lachaine, *Biologie humaine: Principes d'anatomie et de physiologie*. Pearson, 2008.
- [6] H. Guénard, *Physiologie humaine*. Pradel, 2001.
- [7] P. Huber, "Endothelial cell-cell junctions in vessel formation.," *Journal-Societe Biol.*, vol. 203, no. 2, pp. 119–123, 2009.
- [8] N. Ortega, S. Sordello, and J. Plouet, "Tumoral vascularization: physiopathology and therapeutic prospects," *Bull. Cancer*, vol. 84, no. 4, pp. 391–395, 1997.
- [9] N. Ferrara and R. S. Kerbel, "Angiogenesis as a therapeutic target," *Nature*, vol. 438, no. 7070, p. 967, 2005.
- [10] G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, and J. S. Rudge, "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation," *Nature*, vol. 407, no. 6801, p. 242, 2000.
- [11] P. Carmeliet, "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis," *Nat. Med.*, vol. 6, no. 4, p. 389, 2000.
- [12] E. M. Conway, D. Collen, and P. Carmeliet, "Molecular mechanisms of blood vessel growth," *Cardiovasc. Res.*, vol. 49, no. 3, pp. 507–521, 2001.
- [13] R. K. Jain, "Molecular regulation of vessel maturation," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 685–693, 2003.
- [14] M. S. Pepper, "Manipulating Angiogenesis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, no. 4, p. 605 LP-619, Apr. 1997.
- [15] M. Milkiewicz, E. Ispanovic, J. L. Doyle, and T. L. Haas, "Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, no. 3, pp. 333–357, 2006.
- [16] L. Pelletier, "Biologie cellulaire de l'angiogenèse," *cours PACES, Univ. Grenoble*.

- [17] D. J. Hicklin and L. M. Ellis, "Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 5, pp. 1011–1027, Feb. 2005.
- [18] Y. Liu, S. R. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas, "Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells," *Circ. Res.*, vol. 77, no. 3, p. 638 LP-643, Sep. 1995.
- [19] J. A. Forsythe, B. H. Jiang, N. V Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, and G. L. Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 4604–4613, Sep. 1996.
- [20] C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe, "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 677–684, 2003.
- [21] L. Pertovaara, A. Kaipainen, T. Mustonen, A. Orpana, N. Ferrara, O. Saksela, and K. Alitalo, "Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells.," *J. Biol. Chem.* , vol. 269, no. 9, pp. 6271–6274, Mar. 1994.
- [22] G. Ferrari, G. Pintucci, G. Seghezzi, K. Hyman, A. C. Galloway, and P. Mignatti, "VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF- β 1 to induce endothelial cell apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 46, pp. 17260–17265, Nov. 2006.
- [23] G. Seghezzi, S. Patel, C. J. Ren, A. Gualandris, G. Pintucci, E. S. Robbins, R. L. Shapiro, A. C. Galloway, D. B. Rifkin, and P. Mignatti, "Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in the Endothelial Cells of Forming Capillaries: An Autocrine Mechanism Contributing to Angiogenesis ," *J. Cell Biol.*, vol. 141, no. 7, pp. 1659–1673, Jun. 1998.
- [24] H. Gille, J. Kowalski, B. Li, J. LeCouter, B. Moffat, T. F. Zioncheck, N. Pelletier, and N. Ferrara, "Analysis of Biological Effects and Signaling Properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): A REASSESSMENT USING NOVEL RECEPTOR-SPECIFIC VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR MUTANTS ," *J. Biol. Chem.* , vol. 276, no. 5, pp. 3222–3230, Feb. 2001.
- [25] T. Kessler, F. Fehrmann, R. Bieker, W. E. Berdel, and R. M. Mesters, "Vascular endothelial growth factor and its receptor as drug targets in hematological malignancies," *Curr. Drug Targets*, vol. 8, no. 2, pp. 257–268, 2007.
- [26] T. D. Henry, B. H. Annex, G. R. McKendall, M. A. Azrin, J. J. Lopez, F. J. Giordano, P. K. Shah, J. T. Willerson, R. L. Benza, and D. S. Berman, "The VIVA trial," *Circulation*, vol. 107, no. 10, pp. 1359–1365, 2003.
- [27] A. Bikfalvi, "Tumor angiogenesis," *Bull. Cancer*, vol. 90, no. 5, pp. 449–458, 2003.
- [28] P. Carmeliet, "Manipulating angiogenesis in medicine," *J. Intern. Med.*, vol. 255, no. 5, pp. 538–561, 2004.
- [29] P. Carmeliet, "Angiogenesis in health and disease," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 653–660, 2003.

- [30] M. S. Pepper, "Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire: de la biologie cellulaire à la clinique.," 2000.
- [31] C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, and J. A. Varner, "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 8, p. 604, 2008.
- [32] L. Contois, A. Akalu, and P. C. Brooks, "Integrins as 'functional hubs' in the regulation of pathological angiogenesis," in *Seminars in cancer biology*, 2009, vol. 19, no. 5, pp. 318–328.
- [33] D. S. Harburger and D. A. Calderwood, "Integrin signalling at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 2, pp. 159–163, 2009.
- [34] P. R. Somanath, A. Ciocca, and T. V Byzova, "Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 53, no. 2, pp. 53–64, 2009.
- [35] D. Cox, M. Brennan, and N. Moran, "Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 10, pp. 804–820, 2010.
- [36] J. S. Desgrosellier and D. A. Cheresh, "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 1, pp. 9–22, 2010.
- [37] K. Kurozumi, T. Ichikawa, M. Onishi, K. Fujii, and I. Date, "Cilengitide treatment for malignant glioma: current status and future direction," *Neurol. Med. Chir. (Tokyo).*, vol. 52, no. 8, pp. 539–547, 2012.
- [38] R. Stupp, M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y.-K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, and D. Grujcic, "Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial," *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 10, pp. 1100–1108, 2014.
- [39] M. Ernkvist, K. Aase, C. Ukomadu, J. Wohlschlegel, R. Blackman, N. Veitonmäki, A. Bratt, A. Dutta, and L. Holmgren, "p130-Angiomotin associates to actin and controls endothelial cell shape," *FEBS J.*, vol. 273, no. 9, pp. 2000–2011, 2006.
- [40] M. Ernkvist, O. Birot, I. Sinha, N. Veitonmaki, S. Nyström, K. Aase, and L. Holmgren, "Differential roles of p80- and p130-angiomotin in the switch between migration and stabilization of endothelial cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, no. 3, pp. 429–437, 2008.
- [41] B. Troyanovsky, T. Levchenko, G. Månsson, O. Matvijenko, and L. Holmgren, "Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation.," *J. Cell Biol.*, vol. 152, no. 6, pp. 1247–1254, 2001.
- [42] J. Stalin, K. Harhour, L. Hubert, C. Subrini, D. Lafitte, J. C. Lissitzky, N. Elganfoud, S. Robert, A. Foucault-Bertaud, E. Kaspi, F. Sabatier, M. Aurrand-Lions, N. Bardin, L. Holmgren, F. Dignat-George, and M. Blot-Chaubaud, "Soluble melanoma cell adhesion molecule (sMCAM/sCD146) promotes angiogenic effects on endothelial progenitor cells through angiomotin," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 13, pp. 8991–9000, 2013.

- [43] B. Davies, B. D. Braithwaite, P. A. Birch, K. R. Poskitt, B. P. Heather, and J. J. Earnshaw, "Acute leg ischaemia in Gloucestershire," *Br. J. Surg.*, vol. 84, no. 4, pp. 504–508, 1997.
- [44] K. N. P. Hatzipantelis Maria Albani, Konstantinos, "Effect of acute limb ischaemia on neuromuscular function in rats," *Eur. J. Surg.*, vol. 167, no. 11, pp. 831–838, 2001.
- [45] M. Belkin, R. D. Brown, J. G. Wright, W. W. LaMorte, and R. W. Hobson, "A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle," *Am. J. Surg.*, vol. 156, no. 2, pp. 83–86, 1988.
- [46] P. F. Petrasek, S. Homer-Vanniasinkam, and P. M. Walker, "Determinants of ischemic injury to skeletal muscle," *J. Vasc. Surg.*, vol. 19, no. 4, pp. 623–631, 1994.
- [47] J. L. Mills and J. M. Porter, "Basic data related to clinical decision-making in acute limb ischemia," *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 5, no. 1, pp. 96–98, 1991.
- [48] A. Cazes, "Angiogenèse et artériogenèse post-ischémiques: concepts biologiques et perspectives thérapeutiques," in *Annales de Pathologie*, 2006, vol. 26, pp. 69–70.
- [49] J. M. Lehmann, G. Riethmüller, and J. P. Johnson, "MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 24, pp. 9891–9895, 1989.
- [50] F. George, P. Poncelet, J. C. Laurent, O. Massot, D. Arnoux, N. Lequeux, P. Ambrosi, C. Chicheportiche, and J. Sampol, "Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody," *J. Immunol. Methods*, vol. 139, no. 1, pp. 65–75, 1991.
- [51] E. Taira, T. Nagino, H. Taniura, N. Takaha, C.-H. Kim, C.-H. Kuo, B.-S. Li, H. Higuchi, and N. Miki, "Expression and functional analysis of a novel isoform of gicerin, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 48, pp. 28681–28687, 1995.
- [52] A. N. Solovey, L. Gui, L. Chang, J. Enestein, P. V Browne, and R. P. Hebbel, "Identification and functional assessment of endothelial P1H12," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 138, no. 5, pp. 322–331, 2001.
- [53] N. Bardin, F. Anfosso, J. M. Massé, E. Cramer, F. Sabatier, A. Le Bivic, J. Sampol, and F. Dignat-George, "Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion," *Blood*, vol. 98, no. 13, pp. 3677–3684, 2001.
- [54] N. Bardin, M. Blot-Chabaud, N. Despoix, A. Kebir, K. Harhour, J. P. Arsanto, L. Espinosa, P. Perrin, S. Robert, F. Vely, F. Sabatier, A. Le Bivic, G. Kaplanski, J. Sampol, and F. Dignat-George, "CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 5, pp. 746–753, 2009.
- [55] M. F. Elshal, S. S. Khan, Y. Takahashi, M. A. Solomon, and J. P. McCoy, "CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood," *Blood*, vol. 106, no. 8, pp. 2923–2924, 2005.

- [56] W. F. Pickl, O. Majdic, G. F. Fischer, P. Petzelbauer, I. Faé, M. Waclavicek, J. Stöckl, C. Scheinecker, T. Vidicki, and H. Aschauer, "MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes.," *J. Immunol.*, vol. 158, no. 5, pp. 2107–2115, 1997.
- [57] N. Despoix, T. Walzer, N. Jouve, M. Blot-Chabaud, N. Bardin, P. Paul, L. Lyonnet, E. Vivier, F. Dignat-George, and F. Vély, "Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 10, pp. 2855–2864, 2008.
- [58] B. Sacchetti, A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, and M. Riminucci, "Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment," *Cell*, vol. 131, no. 2, pp. 324–336, 2007.
- [59] W. Weninger, M. Rendl, M. Mildner, C. Mayer, J. Ban, A. Geusau, G. Bayer, A. Tanew, O. Majdic, and E. Tschachler, "Keratinocytes express the CD146 (Muc18/S-endo) antigen in tissue culture and during inflammatory skin diseases," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 115, no. 2, pp. 219–224, 2000.
- [60] L. Daniel, N. Bardin, V. Moal, F. Dignat-George, Y. Berland, and D. Figarella-Branger, "Tubular CD146 expression in nephropathies is related to chronic renal failure," *Nephron Exp. Nephrol.*, vol. 99, no. 4, pp. e105–e111, 2005.
- [61] J. P. Johnson, M. Bar-Eli, B. Jansen, and E. Markhof, "Melanoma progression–associated glycoprotein MUC18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand," *Int. J. cancer*, vol. 73, no. 5, pp. 769–774, 1997.
- [62] G.-J. Wu, Q. Peng, P. Fu, S.-W. Wang, C.-F. Chiang, D. L. Dillehay, and M.-W. H. Wu, "Ectopical expression of human MUC18 increases metastasis of human prostate cancer cells," *Gene*, vol. 327, no. 2, pp. 201–213, 2004.
- [63] C. Schiano, V. Grimaldi, A. Casamassimi, T. Infante, A. Esposito, A. Giovane, and C. Napoli, "Different expression of CD146 in human normal and osteosarcoma cell lines," *Med. Oncol.*, vol. 29, no. 4, pp. 2998–3002, 2012.
- [64] E. C. McGary, A. Heimberger, L. Mills, K. Weber, G. W. Thomas, M. Shtivelband, D. C. Lev, and M. Bar-Eli, "A fully human antimelanoma cellular adhesion molecule/MUC18 antibody inhibits spontaneous pulmonary metastasis of osteosarcoma cells in vivo," *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 17, pp. 6560–6566, 2003.
- [65] L. M. Shih, M.-Y. Hsu, J. P. Palazzo, and M. Herlyn, "The cell-cell adhesion receptor Mel-CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma.," *Am. J. Pathol.*, vol. 151, no. 3, p. 745, 1997.
- [66] G. Zabouo, A.-M. Imbert, J. Jacquemier, P. Finetti, T. Moreau, B. Esterni, D. Birnbaum, F. Bertucci, and C. Chabannon, "CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines.," *Breast Cancer Res.*, vol. 11, no. 1, p. R1, 2009.
- [67] N. Bardin, V. Francès, V. Combes, J. Sampol, and F. Dignat-George, "CD146: Biosynthesis

- and production of a soluble form in human cultured endothelial cells," *FEBS Lett.*, vol. 421, no. 1, pp. 12–14, 1998.
- [68] E.-M. Boneberg, H. Illges, D. F. Legler, and G. Fürstenberger, "Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process," *Microvasc. Res.*, vol. 78, no. 3, pp. 325–331, 2009.
- [69] N. Bardin, V. Moal, F. Anfosso, L. Daniel, P. Brunet, J. Sampol, and F. D. George, "Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration," *Thromb. Haemost.*, vol. 90, no. 5, pp. 915–920, 2003.
- [70] N. Bardin, D. Reumaux, K. Geboes, J. F. Colombel, M. Blot-Chabaud, J. Sampol, P. Duthilleul, and F. Dignat-George, "Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease.," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 12, no. 1, pp. 16–21, 2006.
- [71] E. Pasquier, N. Bardin, L. De Saint Martin, M. T. Le Martelot, C. Bohec, S. Roche, D. Mottier, and F. Dignat-George, "The first assessment of soluble CD146 in women with unexplained pregnancy loss A new insight?," *Thromb. Haemost.*, vol. 94, no. 6, pp. 1280–1284, 2005.
- [72] b X. H. ToElise Kaspi, PharmD, PhDa, D. Brigitte Granel, MD, PhDc, P. M. N. Benjamin Guillet, PharmD, PhDc, e, f Jimmy Stalin, P. A. Alexandrine Bertaud-Foucault, P. A. ee Robaglia-Schlupp, MDa, b Patrice Roll, MD, PhDa, b Pierre Cau, MD, P. F. elie Leroyer, PhDc Richard Bachelier, PhDc Audrey Benyamine, MD, P. oise Dignat-George, PharmD, PhDc, g Marcel Blot-Chabaud, and M. Nathalie Bardin, PharmD, PhDc, mson, "Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in sys- temic sclerosis," *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, vol. 24, no. 2, p. 150, 2017.
- [73] K. Harhour, A. Kebir, B. Guillet, A. Foucault-Bertaud, S. Voytenko, M. D. Piercecchi-Marti, C. Berenguer, E. Lamy, F. Vely, P. Pisano, L. Ouafik, F. Sabatier, J. Sampol, N. Bardin, F. Dignat-George, and M. Blot-Chabaud, "Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia," *Blood*, vol. 115, no. 18, pp. 3843–3851, 2010.
- [74] C. Wang, J. An, P. Zhang, C. Xu, K. Gao, D. Wu, D. Wang, H. Yu, J. O. Liu, and L. Yu, "The Nedd4-like ubiquitin E3 ligases target angiotensin/p130 to ubiquitin-dependent degradation," *Biochem. J.*, vol. 444, no. 2, pp. 279–289, 2012.
- [75] M. Lv, Y. Shen, J. Yang, S. Li, B. Wang, Z. Chen, P. Li, P. Liu, and J. Yang, "Angiotensin family members: Oncogenes or tumor suppressors?," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 13, no. 6, pp. 772–781, 2017.
- [76] D. G. Drubin and W. J. Nelson, "Origins of cell polarity," *Cell*, vol. 84, no. 3, pp. 335–344, 1996.
- [77] J. Miyoshi and Y. Takai, "Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1778, no. 3, pp. 670–691, 2008.
- [78] M. Ernkvist, K. Aase, C. Ukomadu, J. Wohlschlegel, R. Blackman, N. Veitonmäki, A. Bratt, A.

- Dutta, and L. Holmgren, “p130-Angiomotin associates to actin and controls endothelial cell shape,” *FEBS J.*, vol. 273, no. 9, pp. 2000–2011, 2006.
- [79] E. Roudier, N. Chapados, S. Decary, C. Gineste, C. Le Bel, J.-M. Lavoie, R. Bergeron, and O. Birot, “Angiomotin p80/p130 ratio: a new indicator of exercise-induced angiogenic activity in skeletal muscles from obese and non-obese rats?,” *J. Physiol.*, vol. 587, no. Pt 16, pp. 4105–4119, 2009.
- [80] M. Lv, M. Lv, L. Chen, T. Qin, X. Zhang, P. Liu, and J. I. N. Yang, “Angiomotin promotes breast cancer cell proliferation and invasion,” pp. 1938–1946, 2015.
- [81] L. Holmgren, E. Ambrosino, O. Birot, C. Tullus, N. Veitonmäki, T. Levchenko, L.-M. Carlson, P. Musiani, M. Iezzi, C. Curcio, G. Forni, F. Cavallo, and R. Kiessling, “A DNA vaccine targeting angiomotin inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 24, pp. 9208–9213, 2006.
- [82] G. Barutello, C. Curcio, M. Spadaro, M. Arigoni, R. Trovato, E. Bolli, Y. Zheng, F. Ria, E. Quaglino, and M. Iezzi, “Antitumor immunization of mothers delays tumor development in cancer-prone offspring,” *Oncoimmunology*, vol. 4, no. 5, p. e1005500, 2015.
- [83] W. Ruan, P. Wang, S. Feng, Y. Xue, and Y. Li, “Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 12 (SNHG12) promotes cell proliferation and migration by upregulating angiomotin gene expression in human osteosarcoma cells,” vol. 12, no. 154, pp. 4065–4073, 2016.
- [84] W.-D. Ruan, P. Wang, S. Feng, Y. Xue, and B. Zhang, “MicroRNA-497 inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting AMOT in human osteosarcoma cells.,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 9, pp. 303–13, 2016.
- [85] L. V Albrecht, K. J. Green, and A. D. Dubash, “Cadherins in Cancer,” in *The Cadherin Superfamily*, Springer, 2016, pp. 363–397.
- [86] F. Hakami, L. Darda, P. Stafford, P. Woll, D. W. Lambert, and K. D. Hunter, “The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC),” *Br. J. Cancer*, vol. 111, no. 4, p. 807, 2014.
- [87] C. Yi, Z. Shen, A. Stemmer-rachamimov, N. Dawany, L. C. Showe, Q. Liu, A. Shimono, M. Sudol, B. Z. Stanger, J. L. K. September, C. Yi, Z. Shen, A. Stemmer-rachamimov, N. Dawany, L. Holmgren, B. Z. Stanger, and J. L. Kissil, “The p130 Isoform of Angiomotin Is Required for Yap-Mediated Hepatic Epithelial Cell Proliferation and Tumorigenesis,” vol. 6, no. September, pp. 1–13, 2013.
- [88] M. Lv, S. Li, C. Luo, X. Zhang, Y. Shen, F. Wang, X. Wang, J. Yang, P. Liu, and J. Yang, “Angiomotin promotes renal epithelial and carcinoma cell proliferation by retaining the nuclear YAP,” vol. 7, no. 11, 2015.
- [89] Y. Wang, V. Justilien, K. I. Brennan, L. Jamieson, N. R. Murray, and A. P. Fields, “PKC α regulates nuclear YAP1 localization and ovarian cancer tumorigenesis,” *Oncogene*, 2017.
- [90] Y.-L. Hsu, J.-Y. Hung, S.-H. Chou, M.-S. Huang, M.-J. Tsai, Y.-S. Lin, S.-Y. Chiang, Y.-W. Ho,

- C.-Y. Wu, and P.-L. Kuo, "Angiomotin decreases lung cancer progression by sequestering oncogenic YAP/TAZ and decreasing Cyr61 expression," *Oncogene*, vol. 34, no. 31, pp. 4056–4068, 2015.
- [91] T. Levchenko, N. Veitonmäki, A. Lundkvist, H. Gerhardt, Y. Ming, K. Berggren, A. Kvanta, R. Carlsson, and L. Holmgren, "Therapeutic antibodies targeting angiomotin inhibit angiogenesis in vivo.," *FASEB J.*, vol. 22, no. 3, pp. 880–889, 2008.
- [92] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, and H. Kessler, "Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1," *FEBS Lett.*, vol. 291, no. 1, pp. 50–54, 1991.
- [93] R. Haubner, H.-J. Wester, U. Reuning, and R. Senekowitsch-Schmidtke, "Radiolabeled (alpha v beta 3) integrin antagonists: A new class of tracers for tumor targeting," *J. Nucl. Med.*, vol. 40, no. 6, p. 1061, 1999.
- [94] R. Haubner, H.-J. Wester, F. Burkhart, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler, and M. Schwaiger, "Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics," *J. Nucl. Med.*, vol. 42, no. 2, pp. 326–336, 2001.
- [95] R. Haubner, W. A. Weber, A. J. Beer, E. Vabuliene, D. Reim, M. Sarbia, K.-F. Becker, M. Goebel, R. Hein, and H.-J. Wester, "Noninvasive visualization of the activated $\alpha\beta 3$ integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F] Galacto-RGD," *PLoS Med.*, vol. 2, no. 3, p. e70, 2005.
- [96] A. J. Beer, R. Haubner, M. Sarbia, M. Goebel, S. Luderschmidt, A. L. Grosu, O. Schnell, M. Niemeyer, H. Kessler, and H.-J. Wester, "Positron emission tomography using [18F] Galacto-RGD identifies the level of integrin $\alpha\beta 3$ expression in man," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 13, pp. 3942–3949, 2006.
- [97] A. J. Beer, R. Haubner, M. Goebel, S. Luderschmidt, M. E. Spilker, H.-J. Wester, W. A. Weber, and M. Schwaiger, "Biodistribution and pharmacokinetics of the $\alpha\beta 3$ -selective tracer 18F-galacto-RGD in cancer patients," *J. Nucl. Med.*, vol. 46, no. 8, pp. 1333–1341, 2005.
- [98] A. J. Beer, A.-L. Grosu, J. Carlsen, A. Kolk, M. Sarbia, I. Stangier, P. Watzlowik, H.-J. Wester, R. Haubner, and M. Schwaiger, "[18F] Galacto-RGD positron emission tomography for imaging of $\alpha\beta 3$ expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 22, pp. 6610–6616, 2007.
- [99] A. J. Beer, M. Niemeyer, J. Carlsen, M. Sarbia, J. Nährig, P. Watzlowik, H.-J. Wester, N. Harbeck, and M. Schwaiger, "Patterns of $\alpha\beta 3$ expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by 18F-Galacto-RGD PET," *J. Nucl. Med.*, vol. 49, no. 2, pp. 255–259, 2008.
- [100] A. J. Beer, S. Lorenzen, S. Metz, K. Herrmann, P. Watzlowik, H.-J. Wester, C. Peschel, F. Lordick, and M. Schwaiger, "Comparison of integrin $\alpha\beta 3$ expression and glucose metabolism in primary and metastatic lesions in cancer patients: a PET study using 18F-galacto-RGD and 18F-FDG," *J. Nucl. Med.*, vol. 49, no. 1, pp. 22–29, 2008.
- [101] R. Sharma, K. G. Kallur, J. S. Ryu, R. V Parameswaran, H. Lindman, N. Avril, F. V Gleeson,

- J. D. Lee, K.-H. Lee, M. J. O'Doherty, A. M. Groves, M. P. Miller, E. J. Somer, C. R. Coombes, and E. O. Aboagye, "Multicenter Reproducibility of 18F-Fluciclatide PET Imaging in Subjects with Solid Tumors," *J. Nucl. Med.*, vol. 56, no. 12, pp. 1855–61, 2015.
- [102] J. S. Eo and J. M. Jeong, "Angiogenesis Imaging Using 68Ga-RGD PET/CT: Therapeutic Implications," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 46, no. 5, pp. 419–427, 2016.
- [103] M. L. Janssen, W. J. Oyen, I. Dijkgraaf, L. F. Massuger, C. Frielink, D. S. Edwards, M. Rajopadhye, H. Boonstra, F. H. Corstens, and O. C. Boerman, "Tumor targeting with radiolabeled $\alpha\beta 3$ integrin binding peptides in a nude mouse model," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 21, pp. 6146–6151, 2002.
- [104] M. Janssen, W. J. G. Oyen, L. F. A. G. Massuger, C. Frielink, I. Dijkgraaf, D. S. Edwards, M. Radjopadhye, F. H. M. Corstens, and O. C. Boerman, "Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 17, no. 6, pp. 641–646, 2002.
- [105] T. Poethko, M. Schottelius, G. Thumshirn, M. Herz, R. Haubner, G. Henriksen, H. Kessler, M. Schwaiger, and H.-J. Wester, "Chemoselective pre-conjugate radiohalogenation of unprotected mono- and multimeric peptides via oxime formation," *Radiochim. Acta*, vol. 92, no. 4–6, pp. 317–327, 2004.
- [106] D. Li, X. Zhao, L. Zhang, F. Li, N. Ji, Z. Gao, J. Wang, P. Kang, Z. Liu, J. Shi, X. Chen, and Z. Zhu, "(68)Ga-PRGD2 PET/CT in the Evaluation of Glioma: A Prospective Study," *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 11, pp. 3923–3929, Nov. 2014.
- [107] K. Zheng, N. Liang, J. Zhang, L. Lang, W. Zhang, S. Li, J. Zhao, G. Niu, F. Li, Z. Zhu, and X. Chen, "(68)Ga-NOTA-PRGD2 PET/CT for Integrin Imaging in Patients with Lung Cancer," *J. Nucl. Med.*, vol. 56, no. 12, pp. 1823–1827, Dec. 2015.
- [108] C. Burtea, S. Laurent, T. Sanli, D. Fanfone, A. Devalckeneer, S. Sauvage, M.-C. Beckers, S. Rorive, I. Salmon, L. Vander Elst, B. R. Lauwerys, and R. N. Muller, "Screening for peptides targeted to IL-7R α for molecular imaging of rheumatoid arthritis synovium," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 18, p. 230, Oct. 2016.
- [109] Y. Luo, Y. Sun, Z. Zhu, and F. Li, "Is the change of integrin $\alpha\beta 3$ expression in the infarcted myocardium related to the clinical outcome?," *Clin. Nucl. Med.*, vol. 39, no. 7, pp. 655–657, 2014.
- [110] G. C. Jayson, J. Zweit, A. Jackson, C. Mulatero, P. Julyan, M. Ranson, L. Broughton, J. Wagstaff, L. Hakansson, and G. Groenewegen, "Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, no. 19, pp. 1484–1493, 2002.
- [111] M. G. W. Scheer, T. H. Stollman, O. C. Boerman, K. Verrijp, F. C. G. J. Sweep, W. P. J. Leenders, T. J. M. Ruers, and W. J. G. Oyen, "Imaging liver metastases of colorectal cancer patients with radiolabelled bevacizumab: lack of correlation with VEGF-A expression," *Eur. J. Cancer*, vol. 44, no. 13, pp. 1835–1840, 2008.
- [112] S. Oosting, A. H. Brouwers, S. C. Van Es, W. B. Nagengast, T. H. Oude Munnink, M. N. Lub-

de Hooge, H. Hollema, J. R. De Jong, I. J. de Jong, and S. de Haas, "89 Zr-bevacizumab PET imaging in metastatic renal cell carcinoma patients before and during antiangiogenic treatment." American Society of Clinical Oncology, 2012.

- [113] Y. Liu, R. M. Tamimi, L. C. Collins, S. J. Schnitt, H. L. Gilmore, J. L. Connolly, and G. A. Colditz, "The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 129, no. 1, pp. 175–184, 2011.
- [114] T. K. Nayak, K. Garmestani, K. E. Baidoo, D. E. Milenic, and M. W. Brechbiel, "PET imaging of tumor angiogenesis in mice with VEGF-A–targeted 86Y-CHX-A "-DTPA-bevacizumab," *Int. J. cancer*, vol. 128, no. 4, pp. 920–926, 2011.
- [115] C. Chan, J. Sandhu, A. Guha, D. A. Scollard, J. Wang, P. Chen, K. Bai, L. Lee, and R. M. Reilly, "A human transferrin-vascular endothelial growth factor (hTf-VEGF) fusion protein containing an integrated binding site for 111In for imaging tumor angiogenesis," *J. Nucl. Med.*, vol. 46, no. 10, pp. 1745–1752, 2005.
- [116] F. G. Blankenberg, M. V Backer, Z. Levashova, V. Patel, and J. M. Backer, "In vivo tumor angiogenesis imaging with site-specific labeled 99mTc-HYNIC-VEGF," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 33, no. 7, pp. 841–848, 2006.
- [117] M. V Backer, Z. Levashova, V. Patel, B. T. Jehning, K. Claffey, F. G. Blankenberg, and J. M. Backer, "Molecular imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature with single-chain VEGF-based probes," *Nat. Med.*, vol. 13, no. 4, p. 504, 2007.
- [118] H. Wang, W. Cai, K. Chen, Z.-B. Li, A. Kashefi, L. He, and X. Chen, "A new PET tracer specific for vascular endothelial growth factor receptor 2," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 34, no. 12, pp. 2001–2010, 2007.
- [119] A. R. Hsu, W. Cai, A. Veeravagu, K. A. Mohamedali, K. Chen, S. Kim, H. Vogel, L. C. Hou, V. Tse, and M. G. Rosenblum, "Multimodality molecular imaging of glioblastoma growth inhibition with vasculature-targeting fusion toxin VEGF121/rGel," *J. Nucl. Med.*, vol. 48, no. 3, pp. 445–454, 2007.
- [120] W. Cai, K. Chen, K. A. Mohamedali, Q. Cao, S. S. Gambhir, M. G. Rosenblum, and X. Chen, "PET of vascular endothelial growth factor receptor expression," *J. Nucl. Med.*, vol. 47, no. 12, pp. 2048–2056, 2006.
- [121] P. K. Shireman and M. P. Quinones, "Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia," *J. Surg. Res.*, vol. 129, no. 2, pp. 242–250, 2005.
- [122] T. Couffinhal, M. Silver, L. U. P. Zheng, M. Kearney, B. Witzembichler, and J. M. Isner, "Mouse model of angiogenesis.," *Am. J. Pathol.*, vol. 152, no. 6, p. 1667, 1998.
- [123] M. Zaidi, J. G. Krolkowki, D. W. Jones, K. a. Pritchard, J. Struve, S. D. Nandedkar, N. L. Lohr, P. S. Pagel, and D. Weihrauch, "Transient repetitive exposure to low level light therapy enhances collateral blood vessel growth in the ischemic hindlimb of the tight skin mouse," *Photochem. Photobiol.*, vol. 89, no. 3, pp. 709–713, 2013.
- [124] S. C. Ghosh, K. L. Pinkston, H. Robinson, B. R. Harvey, N. Wilganowski, K. Gore, E. M.

- Sevick-Muraca, and A. Azhdarinia, "Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for ⁶⁴Cu-labeled immunoconjugates," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 42, no. 2, pp. 177–183, 2015.
- [125] C. Love, M. B. Tomas, G. G. Tronco, and C. J. Palestro, "FDG PET of Infection," *Radiographics*, vol. 25, pp. 1357–1368, 2005.
- [126] N. Almog, L. Ma, R. Raychowdhury, C. Schwager, R. Erber, S. Short, L. Hlatky, P. Vajkoczy, P. E. Huber, J. Folkman, and A. Abdollahi, "Transcriptional Switch of Dormant Tumors to Fast-Growing Angiogenic Phenotype," no. 3, pp. 836–844, 2009.
- [127] M. Ilie, E. Long, V. Hofman, E. Selva, C. Bonnetaud, J. Boyer, N. Vénissac, C. Sanfiorenzo, B. Ferrua, C.-H. Marquette, J. Mouroux, and P. Hofman, "Clinical value of circulating endothelial cells and of soluble CD146 levels in patients undergoing surgery for non-small cell lung cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 5, pp. 1236–43, 2014.
- [128] J. Stalin, M. Nollet, P. Garigue, S. Fernandez, L. Vivancos, A. Essaadi, A. Muller, R. Bachelier, and L. Fugazza, "Targeting soluble CD146 with a neutralizing antibody inhibits vascularization , growth and survival of CD146-positive tumors," no. November 2015, pp. 1–12, 2016.
- [129] W. Ruan, P. Wang, and B. Zhang, "MicroRNA-497 inhibits cell proliferation , migration , and invasion by targeting AMOT in human osteosarcoma cells," pp. 303–313, 2016.
- [130] C. Yi, Z. Shen, A. Stemmer-Rachamimov, N. Dawany, S. Troutman, L. C. Showe, Q. Liu, A. Shimono, M. Sudol, and L. Holmgren, "The p130 isoform of angiomin is required for Yap-mediated hepatic epithelial cell proliferation and tumorigenesis," *Sci. Signal.*, vol. 6, no. 291, p. ra77, 2013.
- [131] W. G. Jiang, G. Watkins, A. Douglas-Jones, L. Holmgren, and R. E. Mansel, "Angiomin and angiomin like proteins, their expression and correlation with angiogenesis and clinical outcome in human breast cancer.," *BMC Cancer*, vol. 6, p. 16, 2006.
- [132] R. Satchi-Fainaro, S. Ferber, E. Segal, L. Ma, N. Dixit, A. Ijaz, L. Hlatky, A. Abdollahi, and N. Almog, "Prospective Identification of Glioblastoma Cells Generating Dormant Tumors," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [133] I. R. Hart, "Perspective: tumour spread—the problems of latency," *J. Pathol.*, vol. 187, no. 1, pp. 91–94, 1999.
- [134] M. J. Bissell and W. C. Hines, "Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 320–329, 2011.
- [135] W. C. Black and H. G. Welch, "Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 328, no. 17, pp. 1237–1243, 1993.
- [136] J. W. Uhr, R. H. Scheuermann, N. E. Street, and E. S. Vitetta, "Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches," *Nat. Med.*, vol. 3, no. 5, pp. 505–509, 1997.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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