



Thèse

2003

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Modulation de l'incorporation de la 5-[¹²⁵I]-iodo-2'-désoxyuridine dans des glioblastomes

Dupertuis, Yves Marc

How to cite

DUPERTUIS, Yves Marc. Modulation de l'incorporation de la 5-[¹²⁵I]-iodo-2'-désoxyuridine dans des glioblastomes. Doctoral Thesis, 2003. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:211

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:211>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:211](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:211)

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de Biologie Cellulaire

FACULTE DES SCIENCES
Professeur Didier Picard

Département de Radiologie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Daniel O. Slosman
Docteur Franz Buchegger

Modulation de l'incorporation de la 5-[¹²⁵I]-iodo-2'-désoxyuridine dans des glioblastomes

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences, mention biologique

par

Yves Marc DUPERTUIS
de
Ormont-Dessous (VD)

Thèse n° Sc. 3456

Atelier de reproduction de la Section de Physique

Genève 2003

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans la Division de Médecine Nucléaire des Hôpitaux Universitaires de Genève.

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Franz Buchegger pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail de thèse, fait confiance et prodigué les conseils nécessaires pour concrétiser mes idées.

Je remercie le Professeur Daniel O. Slosman de m'avoir accueilli au sein de son équipe médicale et d'avoir accepté la responsabilité de ce travail, les Professeurs Gerd Beyer et Robin Offord d'avoir accepté mon parrainage, ainsi que les Professeurs Jean-Pierre Mach et Didier Picard d'avoir accepté, malgré leurs nombreuses sollicitations, de participer au jury de thèse.

Les Dr Franz Buchegger et Claude Pichard, de même que le Professeur Jean-Pierre Mach, ont tous trois contribué grandement à m'initier aux subtilités de la rédaction scientifique. Je tiens à remercier en particulier le Dr Claude Pichard pour m'avoir encouragé à maintes reprises durant la rédaction de cette thèse.

Un remerciement particulier à tous mes collègues et amis pour leurs coups de main ou conseils : Andreas Schaffland, Bruno Robert, Corinne Ponce-Billet, Ioulia Alekxandrova, Laurence Paniagua, Maryse Jaunin, Nicole Pittet-Weimer, Sophie Namy, Wei-Hong Xiao et tous les autres.

Enfin, j'aimerai encore remercier toutes les personnes, qui, en dehors du milieu professionnel, m'ont soutenu et aidé durant toutes ces années, mes amis, mes parents, ma famille et surtout mes filles, Natacha, et aussi Maëlys et Catlyne, qui ont vu le jour durant cette période fructueuse.

Table des Matières

Remerciements	1
Table des Matières	2
Liste des Figures	4
Liste des Tableaux	5
Abréviations	6
CHAPITRE 1	7
Résumé	7
1.1 [¹²⁵ I]IdUrd et Bloquage de la Synthèse de dThd	7
1.2 [¹²⁵ I]IdUrd et IdUrd non-marquée	9
1.3 [¹²⁵ I]IdUrd et Mélange de Désoxyribonucléosides	10
CHAPITRE 2	11
Introduction	11
2.1 Ciblage Tumoral	11
2.2 Cycle Cellulaire	12
2.3 Régulation du Cycle Cellulaire	14
2.3.1 Synthèse et destruction cycliques de protéines	14
2.3.2 Complexes CDK4 et CDK6 - cycline D	15
2.3.3 Protéines pRB et E2Fs	16
2.3.4 Complexes CDK2 - cyclines A et E	17
2.3.5 Autres complexes enzymatiques	18
2.3.6 Protéine p21 ^{CIP1}	18
2.3.7 Protéine p27 ^{KIP1}	18
2.3.8 Protéines p16 ^{INK4a} , p15 ^{INK4b} , p18 ^{INK4c} , et p19 ^{INK4d}	19
2.3.9 Protéine p53	20
2.4 Synthèse et Réparation de l'ADN	22
2.4.1 Transmission de l'information génétique	22
2.4.2 Structure des nucléotides	23
2.4.3 Structure des acides nucléiques	24
2.4.4 Réplication de l'ADN	24
2.4.5 Réparation de l'ADN	26
2.5 Régulation Allostérique de la Synthèse des Nucléotides	26
2.6 Inhibition de la Synthèse de Thymidine	27
2.7 La 5-Iodo-2'-désoxyuridine	29
2.7.1 Synthèse et radiomarquage	30
2.7.2 Radioisotopes de l'iode	31
2.7.3 Considérations sur une application clinique	33
2.7.4 Les glioblastomes comme cibles potentielles	34
2.8 Objectifs du Travail	35
CHAPITRE 3	39
Méthodologie Générale	39
3.1 Radiomarquage de la IdUrd	39
3.2 Contrôle de Qualité du Radiomarquage	40
3.3 Lignées Cellulaires et Conditions de Culture	41
3.4 Évaluation de la Cytotoxicité	42
3.4.1 Essais Colorimétriques MTT	42
3.4.2 Essais Clonogéniques	42
3.5 Test d'Incorporation dans l'ADN	43
3.6 Cytofluorométrie en Flux	44
3.7 Souris et Modèle de Tumeur	45
3.8 Biodistributions	46
3.9 Évaluation du Perchlorate de Potassium	47
3.10 Histologie et Autoradiographie	47
3.11 Extraction de l'ADN de la Tumeur et de l'Intestin	48
3.12 Activité Enzymatique de la TS et la TK	48
3.13 Marquage de l'Apoptose par test «TUNEL»	49
3.14 Scintigraphies	51
3.15 Estimation dosimétrique	51

CHAPITRE 4	53
$[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et Fluorodésoxyuridine	53
4.1 Résumé	53
4.2 Introduction	54
4.3 Matériel et Méthodes	55
4.4 Résultats	57
4.4.1 Modulation de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et $[^3\text{H}]\text{dThd}$ dans l'ADN par la FdUrd	57
4.4.2 Modulation de la cytotoxicité de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ par la FdUrd	58
4.4.3 Distribution dans le cycle cellulaire après exposition courte ou prolongée à la FdUrd	59
4.4.4 Biodistribution de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans des souris xénogreffées après pré-injections de FdUrd	60
4.4.5 Pourcentage de la radioactivité mesurée dans le tissu qui est effectivement incorporé dans l'ADN	62
4.4.6 Cytotoxicité d'une administration combinée de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et FdUrd	63
4.4.7 Détection tumorale par scintigraphie après traitement avec FdUrd et KClO_4	65
4.4.8 Dosimétrie préclinique d'une scintigraphie avec la $[^{123}\text{I}]\text{IdUrd}$	67
4.5 Discussion	71
CHAPITRE 5	77
$[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et IdUrd non-marquée	77
5.1 Résumé	77
5.2 Introduction	78
5.3 Matériel et Méthodes	80
5.4 Résultats	82
5.4.1 Survie cellulaire après traitement avec $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$	82
5.4.2 Modulation de la cytotoxicité de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ par la IdUrd	83
5.4.3 Modulation de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ par la IdUrd	85
5.4.4 Incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ en présence d'analogues de la IdUrd	87
5.4.5 Modulation de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ par la IdUrd en fonction de la densité cellulaire	87
5.4.6 Distribution des cellules dans le cycle cellulaire après exposition avec la IdUrd	88
5.4.7 Biodistribution de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans les souris xénogreffées après pré-injections de IdUrd	89
5.5 Discussion	92
CHAPITRE 6	97
$[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et Mélange de Désoxyribonucléosides	97
6.1 Résumé	97
6.2 Introduction	98
6.3 Matériels et Méthodes	100
6.4 Résultats	101
6.4.1 Incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN après co-incubation avec des désoxyribonucléosides	101
6.4.2 Incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN après pré-incubation avec le mélange AUGC	103
6.4.3 Incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN en fonction du temps d'incubation	103
6.4.4 Incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN en fonction de la densité cellulaire	104
6.4.5 Distribution des cellules confluentes dans le cycle cellulaire	106
6.5 Discussion	107
CHAPITRE 7	111
Conclusions	111
CHAPITRE 8	119
Bibliographie	119
CHAPITRE 9	129
Annexes	129
9.1 Liste des publications personnelles	129
9.2 Dupertuis Y.M. et col. Cancer Res 61, 7971-7977 (2001)	131
9.3 Buchegger F. et col. Eur J Nucl Med 30, 239-246 (2003)	132
9.4 Xiao W.-H. et col. Nucl Med Commun 21, 947-953 (2000)	133
9.5 Dupertuis Y.M. et col. Eur J Nucl Med 29, 499-505 (2002)	134
9.6 Dupertuis Y.M. et col. Cancer Biother Radiopharm 18, 7-16 (2003)	135

Liste des Figures

	Page
1. Les quatre phases du cycle cellulaire	13
2. Régulation du cycle cellulaire par les cyclines	14
3. Régulation de la transcription nécessaire à l'entrée en phase S	16
4. Expression de p27 et des cyclines dans le cycle cellulaire	19
5. Arrêt du cycle cellulaire par p53 après des dommages dans l'ADN	21
6. Structure chimique des nucléotides	23
7. Inhibition de la synthèse <i>de novo</i> de thymidine	28
8. Structure de la 5-Iodo-2'-désoxyuridine	30
9. Cassure du double brin d'ADN par rayonnements Auger	32
10. Contrôle de qualité de la pureté radiochimique de la [¹²⁵ I]IdUrd	41
11. Incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en présence de FdUrd	57
12. Incorporation de [³ H]dThd dans l'ADN en présence de FdUrd	58
13. Distribution des cellules LN229 dans le cycle cellulaire en présence de FdUrd	60
14. Biodistribution de la [¹²⁵ I]IdUrd dans des souris xénotransplantées après pré-traitement avec FdUrd	62
15. Autoradiographies de tumeurs de souris injectées avec [¹²⁵ I]IdUrd et FdUrd	63
16. Histologie de tumeurs de souris injectées avec [¹²⁵ I]IdUrd et FdUrd	64
17. Taux de fragmentation de l'ADN dans la tumeur et l'intestin après pré-traitement avec FdUrd	65
18. Scintigraphie corps-entier sur souris xénotransplantées après injections de [¹²⁵ I]IdUrd et FdUrd	66
19. Biodistribution à différents temps après injection de la [¹²⁵ I]IdUrd dans des souris xénotransplantées	68
20. Cytotoxicité de la [¹²⁵ I]IdUrd dans les lignées cellulaires U251 et LN229	82
21. Effet de la IdUrd non-marquée sur la cytotoxicité de la [¹²⁵ I]IdUrd dans la lignée U251	83
22. Effet de la IdUrd non-marquée sur la cytotoxicité de la [¹²⁵ I]IdUrd dans la lignée LN229	84
23. Taux d'incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en présence de IdUrd non-marquée	85
24. Inhibition de l'incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN par la dThd	86
25. Incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en présence d'analogues de la IdUrd non-marquée	87
26. Incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en fonction de la densité cellulaire	88
27. Distribution des cellules U87 dans le cycle cellulaire en présence de IdUrd non-marquée	89
28. Biodistribution de la [¹²⁵ I]IdUrd dans des souris xénotransplantées après pré-traitement avec IdUrd	91
29. Incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en présence d'un mélange de désoxyribonucléosides	101
30. Incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en fonction des désoxyribonucléosides utilisés	102
31. Modulation de l'incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en fonction du temps d'incubation	104
32. Modulation de l'incorporation de [¹²⁵ I]IdUrd dans l'ADN en fonction de la densité cellulaire	105
33. Modulation de la distribution des cellules confluentes dans le cycle cellulaire	106

Liste des Tableaux

	Page
1. Nomenclature des nucléosides et nucléotides	24
2. Cytotoxicité de la [125 I]IdUrd mesurée après co-incubation de 48 h avec la FdUrd	59
3. Incorporation de [125 I]IdUrd dans les tumeurs xénogreffées en présence de FdUrd	61
4. Incorporation de [125 I]IdUrd dans les tumeurs xénogreffées en fonction de la dose de FdUrd	61
5. Pourcentage de la radioactivité dans le tissu qui est incorporée dans l'ADN	63
6. Doses équivalentes pour les effets stochastiques de la [123 I]IdUrd combinée à la FdUrd	69
7. Doses effectives liées aux effets stochastiques de la [123 I]IdUrd combinée à la FdUrd	69
8. Incorporation de [125 I]IdUrd dans les tumeurs xénogreffées en présence de IdUrd non-marquée	90
9. Incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN après préincubation avec des déoxyribonucléosides	103
10. Incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN en fonction de la densité cellulaire	105

Abréviations

[¹¹¹ At]AtdUrd	= 5-astatine-2'-désoxyuridine marquée à l' ¹¹¹ Astatine
BSA	= Albumine de sérum bovin
CDK	= Kinase dépendante des cyclines
CT	= Tomographie numérisée
dAdo	= désoxyadénosine
dCyd	= désoxycytidine
dGuo	= désoxyguanosine
DHFR	= dihydrofolate réductase
dThd	= thymidine
dUrd	= 2'-désoxyuridine
EBR	= efficacité biologique relative
FCS	= sérum de veau foetal
FDG	= fluoro-désoxyglucose
FdUrd	= 5-fluoro-2'-désoxyuridine
FITC	= fluorescéine isothiocyanate
FmdC	= (<i>E</i>)-2'-désoxy-2'-(fluorométhylène) cytidine
5-FU	= 5-fluorouracile
HPLC	= chromatographie liquide à haute pression
IdUrd	= 5-iodo-2'-désoxyuridine
[¹²⁵ I]IdUrd	= 5-iodo-2'-désoxyuridine marquée à l' ¹²⁵ Iode
i.p.	= intrapéritonéal
IRM	= imagerie par résonance magnétique nucléaire
i.v.	= intraveineux
MTX	= méthotrexate
PCR	= polymérase par réaction en chaîne
PI	= iodure de propidium
p.o.	= per os ou par voie orale
POL	= ADN polymérase A
pRB	= Protéine suppresseur du rétinoblastome
s.c.	= souscutané
TEP	= tomographie par émission de positons
TdT	= transférase désoxynucléotide terminale
TK	= thymidine kinase
TLC	= chromatographie sur couche mince
TS	= thymidylate synthétase
TUNEL	= TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (en anglais)

Chapitre 1

Résumé

Une division cellulaire incontrôlée est une des principales caractéristiques du cancer et l'arrêt de cette division peut constituer un signe précoce de l'efficacité d'un traitement. C'est pourquoi, le développement d'un diagnostic ou d'une thérapie du cancer basée sur la prolifération cellulaire est actuellement le sujet de nombreuses publications. La thymidine (dThd) et ses analogues sont incorporés dans l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire et l'incorporation est directement proportionnelle au nombre de cellules en division. En recherche, la dThd radiomarquée est utilisée depuis des années pour mesurer *in vitro* la division cellulaire.

Parmi les analogues de la dThd, la 5-iodo-2'-désoxyuridine (IdUrd) présente un grand intérêt clinique, car elle peut être marquée quasi instantanément avec des radioisotopes de l'iode appropriés pour un diagnostic ($[^{123}\text{I}]\text{IdUrd}$, $[^{131}\text{I}]\text{IdUrd}$, $[^{124}\text{I}]\text{IdUrd}$) ou une thérapie ($[^{123}\text{I}]\text{IdUrd}$, $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$, $[^{131}\text{I}]\text{IdUrd}$) du cancer. Comme le rayon de van der Waals de l'iode est similaire au groupe 5-méthyle qu'il remplace sur la base pyrimidique de la dThd, la IdUrd peut être incorporée dans l'ADN à la place de la dThd pendant la phase S du cycle cellulaire. Toutefois, son utilisation clinique se heurte à certaines limitations, notamment sa dégradation biologique rapide, son faible taux d'incorporation dans la tumeur et son incorporation dans les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide.

Ce travail avait donc pour but d'étudier différents moyens pour remédier aux limitations de l'utilisation diagnostique ou thérapeutique de la IdUrd radiomarquée. Les expériences ont été réalisées sur trois lignées humaines de glioblastomes - U251, LN229 et U87 -, car ce type de cancer présente des caractéristiques favorables à l'utilisation de la IdUrd radiomarquée, c'est-à-dire, une forte prolifération des cellules tumorales et des vaisseaux sanguins associés avec infiltration dans un tissu cérébral majoritairement quiescent et, en principe, isolé du reste de l'organisme par une barrière hémato-encéphalique.

1.1 $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et Bloquage de la Synthèse de dThd

Une première approche consistait à empêcher la synthèse *de novo* de dThd par la thymidylate synthétase (TS) afin de favoriser l'incorporation de la IdUrd radiomarquée par la voie de récupération des nucléotides. Plusieurs études avaient déjà évalué cette stratégie dans une optique thérapeutique. Malheureusement, leurs résultats ne

montraient pas toujours une corrélation entre le taux d'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN et le taux de cytotoxicité. Ces observations laissaient supposer que l'inhibition de la synthèse de dThd permettait, dans certaines conditions, d'augmenter l'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN des cellules engagées en phase S du cycle cellulaire sans, pour autant, que le nombre de cellules engagées en phase S soit augmenté. Bien que apparemment dénuée d'intérêt pour une application thérapeutique, cette hypothèse laissait entrevoir la possibilité d'augmenter l'intensité du signal cellulaire pour une application diagnostique.

Ce travail avait donc comme objectif une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et l'évaluation du potentiel du méthotrexate (MTX) ou de la 5-fluoro-2'-désoxyuridine (FdUrd) pour améliorer la détection scintigraphique de tumeurs par la IdUrd radiomarquée.

Alors que le MTX empêchait l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN en bloquant irrémédiablement la division cellulaire, les résultats obtenus avec la FdUrd ont montré *in vitro* qu'une coincubation avec cette drogue augmentait substantiellement l'incorporation de [125 I]IdUrd et de [3 H]dThd dans l'ADN des trois lignées de glioblastomes testées. Une analyse par cytofluorométrie en flux a révélé qu'une coincubation de courte durée avec FdUrd (1 h) augmentait l'intensité du signal par cellule marquée.

Une biodistribution 24 h après injection i.v. de [125 I]IdUrd a ensuite été mesurée dans des souris nues xénotreffées s.c. avec les trois lignées de glioblastomes. Comparée à une seule injection i.v. de [125 I]IdUrd, une pré-administration i.v. de 10 mg/kg de FdUrd, 1 h avant, augmentait de 4.8 à 6.8 fois l'incorporation de [125 I]IdUrd dans les trois tumeurs. Aucun effet secondaire n'était observé sur les souris jusqu'à deux mois après un tel traitement. L'incorporation de [125 I]IdUrd dans la tumeur était même augmentée jusqu'à 13.6 fois quand la pré-administration de FdUrd était réduite par palier jusqu'à 1.1 mg/kg. L'augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd était plus faible (entre 1.7 et 5.8 fois) dans les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide (ex : moelle osseuse, rate, intestin) que dans la tumeur et négligeable dans les tissus quiescents (ex : cœur, reins, poumon). Une extraction d'ADN a montré que 72 à 80 % de la radioactivité dans la tumeur et l'intestin étaient associés à l'ADN.

Une scintigraphie sur des souris xénotreffées a été réalisée à différents temps après injection i.v. de 3.7 MBq de [125 I]IdUrd. La détection de la tumeur était améliorée significativement après pré-administration de FdUrd, alors qu'elle restait faible 24 h après l'injection de [125 I]IdUrd seule. De plus, l'activité non spécifique était grandement réduite par une administration p.o. de KClO₄ en addition au KI. En conclusion, ces résultats indiquent qu'une pré-administration de FdUrd pourrait améliorer une

scintigraphie par émission de photons ou de positons avec des traceurs de la division cellulaire, comme la IdUrd ou d'autres analogues radiomarqués de la dThd.

1.2 [^{125}I]IdUrd et IdUrd non-marquée

Dans une approche thérapeutique cette fois-ci, la deuxième partie de ce travail a consisté à étudier la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd. Les rayonnements Auger de l' ^{125}I ode, une fois que la [^{125}I]IdUrd est incorporée dans l'ADN, provoquent des cassures du double brin d'ADN avec une efficacité biologique relative élevée (EBR = 7), équivalente à celle de rayonnements α . En dehors de l'ADN, la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd se réduit toutefois à celle des rayons X (EBR = 1), alors que les rayonnements α de la [^{111}At]AtdUrd circulante, par exemple, restent toxiques.

La cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd a donc été évaluée sur les trois lignées humaines de glioblastomes. Lors de cette évaluation, il est apparu que la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd pouvait encore être augmentée par une co-administration de IdUrd non-marquée. Les résultats ont montré, de manière surprenante, que des concentrations de 0.3 à 10 μM de IdUrd non-marquée augmentaient *in vitro* la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd dans les cellules U251 et, dans une moindre mesure, LN229. De plus, cette observation était corrélée avec une augmentation du taux d'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans l'ADN. En présence de 10 μM de IdUrd, cette dernière augmentation était, respectivement, de 2.0, 2.7 et 4.4 fois dans les cellules U87, LN229 et U251. Par contre, la dThd bloquait de façon compétitive l'augmentation de la cytotoxicité et de l'incorporation nucléaire de [^{125}I]IdUrd induite par la IdUrd. D'autre part, l'effet de la IdUrd sur l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans l'ADN n'était pas reproduit par des analogues de la IdUrd, tels que la 2'-désoxyuridine ou le 5-iodo-1,3-diméthyluracile, suggérant que le mécanisme sous-jacent n'est pas une protection contre la dégradation de [^{125}I]IdUrd.

Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans des souris nues xénogreffées. Après 8 pré-injections i.p. de 0.1 mg de IdUrd, l'incorporation dans la tumeur était augmentée, respectivement, de 1.5, 2.3 et 2.8 fois dans les lignées U251, U87 et LN229. Toutefois, l'effet de la IdUrd sur l'incorporation de [^{125}I]IdUrd n'était pas sélectif sur la tumeur et des augmentations de 1.3 à 2.8 fois étaient observées dans les tissus à renouvellement cellulaire rapide, tels que la rate, la moelle osseuse, l'estomac, l'intestin ou la peau. L'administration de dThd permettait aussi *in vivo* de bloquer l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans la tumeur et les tissus normaux. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'administration combinée de IdUrd radiomarquée et non-marquée pourrait améliorer son potentiel non seulement thérapeutique mais aussi diagnostique contre le cancer.

1.3 [¹²⁵I]IdUrd et Mélange de Désoxyribonucléosides

L'effet surprenant observé avec la IdUrd non-marquée a stimulé la réalisation du troisième volet de ce travail, dont l'objectif était de mieux étudier l'effet des désoxyribonucléosides sur l'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN. Dans ce contexte, il a été rapporté à plusieurs reprises qu'une administration d'un mélange de nucléotides restaurait et soutenait la prolifération des leucocytes et des entérocytes. Comme les cellules cancéreuses sont supposées utiliser plus efficacement les nucléotides exogènes que les cellules normales, il se peut qu'une administration de nucléotides puisse aussi stimuler la prolifération des cellules cancéreuses, augmentant ainsi le nombre de cellules potentiellement ciblées par la [¹²⁵I]IdUrd.

L'influence de différents mélanges de désoxyribonucléosides sur l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN a donc été évaluée dans trois lignées cellulaires humaines de glioblastomes. Les résultats ont montré que le taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN des cellules LN229, U87, et U251 était augmenté, respectivement, de 8.5, 6.2, et 2.0 fois, après une coincubation de 4 h avec un mélange à concentration égale, de 10 µM, de 2'-désoxyadénosine, 2'-désoxyuridine, 2'-désoxyguanosine et 2'-désoxycytidine (AUGC). Un mélange sans 2'-désoxyuridine (AGC) permettait également d'augmenter de 2.2 fois l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN des cellules LN229, alors que son remplacement par la dThd (ATGC) inversait l'effet du mélange. De plus, l'effet sur l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN augmentait conjointement avec le temps de coincubation avec le mélange de désoxyribonucléosides. Le taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN des cellules LN229 et U87 était augmenté, respectivement, de 19.9 et 9.4 fois, par une coincubation de 9 h avec 10 µM de AUGC. L'effet était encore plus marqué lorsque les cellules atteignaient la confluence dans les puits. Le taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN des cellules confluentes LN229 et U87 était augmenté, respectivement, de 40.9 et 26.8 fois après une coincubation de 4 h avec 10 µM de AUGC. Une analyse par cytofluorométrie en flux a montré que le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire était augmenté après exposition des cellules confluentes à 10 µM de AUGC pendant 4 h. Ces résultats suggèrent qu'une co-administration d'un mélange équilibré de désoxyribonucléosides pourrait améliorer l'utilisation d'analogues de nucléotides radiomarqués, comme la [¹²⁵I]IdUrd, pour le ciblage des cellules cancéreuses.

Ce travail de thèse présente donc trois approches distinctes, parfois complémentaires, pour améliorer l'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN de glioblastomes à des fins diagnostiques ou thérapeutiques.

Chapitre 2

Introduction

2.1 Ciblage Tumoral

Bien que d'impressionnantes avancées aient été enregistrées ces dernières décennies dans le développement de vecteurs anti-tumoraux, le ciblage des cellules cancéreuses, que ce soit dans l'optique d'un diagnostic ou d'une thérapie, reste un redoutable défi. La difficulté réside essentiellement dans le fait que les cellules cancéreuses conservent des critères d'appartenance au soi : elles ne se distinguent que faiblement des cellules saines qui les entourent et échappent ainsi au contrôle du système immunitaire. La recherche en Oncologie doit donc se focaliser sur les quelques caractéristiques propres au cancer, telle l'altération structurelle du tissu, l'état de dé-différentiation des cellules cancéreuses entraînant la sur-expression d'antigènes ou de récepteurs normalement présents à certaines étapes de la maturation cellulaire ou encore la perturbation et l'accélération du métabolisme et du cycle cellulaire. Concernant le diagnostic clinique, le scanner, l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) ou la tomographie numérisée (CT) détectent certaines altérations structurelles au niveau du tissu. Il est aussi possible de cibler des marqueurs tumoraux par des vecteurs radiomarqués, comme les anticorps ou les analogues d'agonistes ou d'antagonistes de récepteurs de surface cellulaire (1). Par exemple, certains anticorps monoclonaux peuvent favoriser la localisation scintigraphique de carcinomes surexprimant l'antigène carcino-embryonnaire (2, 3). D'autres ont même démontré des propriétés thérapeutiques aussi bien lorsqu'ils étaient radiomarqués que non-marqués. C'est le cas, par exemple, de l'anticorps monoclonal anti-B₁, qui est dirigé contre l'antigène CD20 exprimé dans les lymphomes B non-Hodgkiniens (4). Certaines tumeurs neuroendocrines peuvent aussi être ciblées par l'octréotide, un analogue de la somatostatine, lorsqu'elles surexpriment le récepteur de ce dernier (5). Enfin, l'accélération du métabolisme tumoral est mise en évidence au moyen d'une tomographie par émission de positons (TEP) avec du fluorodésoxyglucose marqué au ¹⁸Fluor ([¹⁸F]FDG) (6).

L'une des caractéristiques principales des cellules malignes est leur aptitude à proliférer rapidement. Bien que la radiothérapie ou certaines chimiothérapies avec des inhibiteurs de la division cellulaire, comme le méthotrexate (MTX) ou le 5-fluorouracile (5-FU), reposent sur cette caractéristique, il n'existe à l'heure actuelle aucun diagnostic non-invasif de la division cellulaire applicable *in vivo*. Pourtant, une telle information

serait de toute première importance quant à l'orientation et le pronostic du traitement oncologique. Ce travail se fixe donc comme but, l'étude et le développement d'un marquage de la prolifération cellulaire à des fins non seulement diagnostiques mais aussi thérapeutiques.

2.2 Cycle Cellulaire

La division cellulaire est à la base du développement et de la maintenance d'un organisme vivant. Pour qu'une cellule en engendre deux, elle doit accomplir un parcours complexe, composé de plusieurs phases caractérisées par des événements cellulaires distincts : les phases G_0 , G_1 , S, G_2 et M (Figure 1). En phase G_0 , les cellules sont dites au repos ou quiescentes. Soit elles se différencient pour accomplir des tâches spécifiques, nécessaires au fonctionnement de l'organisme. Soit elles attendent un moment favorable pour s'engager dans une division. Ou enfin, elles sont devenues sénescents et proches de la mort. La phase G_1 est caractérisée par la mise en route du programme de division, qui se traduit par la synthèse d'ARN et de protéines nécessaires à la réplication de l'ADN. Ce n'est que dans cette phase du cycle, que des mécanismes de régulation répondant à des signaux extracellulaires déterminent si la cellule s'engage dans une nouvelle division cellulaire ou si elle interrompt son cycle pour entrer en phase de repos G_0 . La progression en phase G_1 nécessite une stimulation continue par des mitogènes et peut être stoppée par des cytokines antiprolifératives. Une fois qu'un point critique est franchi dans la phase G_1 , les cellules deviennent réfractaires à tout signal de régulation de la croissance cellulaire et s'engagent dans un processus autonome de division (7). En phase S, une réplication semi-conservative de l'ADN assure la pérennité de l'information génétique dans les cellules filles. Elle se termine lorsque chaque chromosome est composé de 2 chromatines sœurs identiques. La phase G_2 est une phase de transition entre la fin de la synthèse de l'ADN et la division même de la cellule. Durant cette transition, les liaisons phosphates entre protéines augmentent considérablement, indiquant que la phosphorylation constitue un mécanisme important pour les profondes réorganisations structurales qui accompagnent l'entrée des cellules dans la mitose (8). La phase M, qui commence par une division nucléaire (mitose) et s'achève par une division cytoplasmique (cytodérèse), est divisée en prophase, métaphase, anaphase et télophase. La prophase est caractérisée par la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, la formation du fuseau mitotique et la condensation des chromosomes. En métaphase, les chromosomes se rassemblent sur la ligne médiane du fuseau mitotique. En anaphase, les chromatines sœurs se séparent et migrent chacune d'un côté du fuseau. En télophase, le fuseau mitotique se défait, deux nouvelles enveloppes nucléaires se forment et le cytoplasme se scinde en deux pour donner naissance à deux cellules filles. Le mode d'enchaînement et la durée des phases du

cycle cellulaire peuvent varier grandement d'un type cellulaire à un autre. Des signaux extérieurs contrôlent à la fois l'entrée dans le cycle à partir de l'état de repos (phase G_0) et la sortie du cycle cellulaire vers la différenciation terminale. Plusieurs points de contrôle assurent le bon déroulement des événements dans le cycle cellulaire.

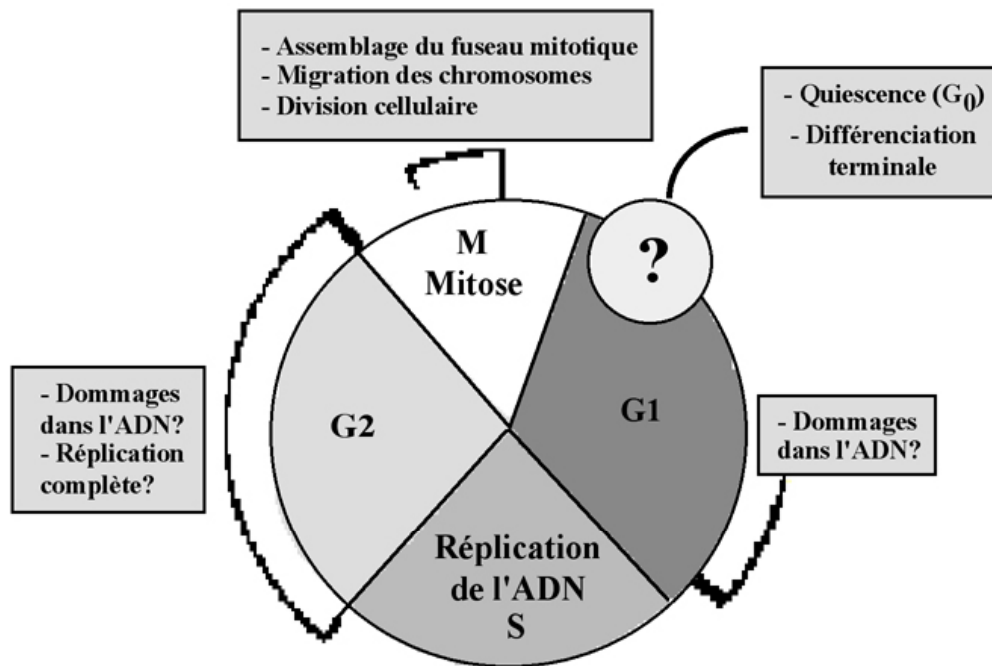


Figure 1. Les quatre phases du cycle cellulaire

En cas de problème, des mécanismes de régulation complexes provoquent l'arrêt du cycle au niveau de ces points de contrôle pour permettre, par exemple, la réparation de dommages dans l'ADN, le réajustement des chromosomes sur le fuseau mitotique ou encore pour enclencher un programme de suicide cellulaire en présence d'altérations trop importantes (9). Ces mécanismes ont donc pour but de préserver l'intégrité de l'information génétique en éliminant tout risque de présence d'un génome muté ou instable dans les cellules filles. Ils doivent être tout particulièrement élaborés et performants chez les mammifères à durée de vie longue, comme l'être humain, où l'instabilité génétique, même limitée à quelques cellules, constitue une sérieuse menace pour la survie de tout l'organisme. Malgré les garde-fous très performants que la nature a développés, il arrive parfois que des altérations génétiques se produisent dans des cellules et leur confèrent une résistance aux mécanismes de contrôle de la phase G_1 . Ces cellules tendent à rester perpétuellement en division. Il en découle une perturbation considérable des processus de maturation et de différenciation cellulaire qui se produisent normalement lors de la phase G_0 . Le processus de dégénérescence maligne

est enclenché et peut entraîner de redoutables conséquences. La lutte contre le cancer passe donc forcément par une compréhension des mécanismes de régulation du cycle cellulaire, tout particulièrement en phase G_1 .

2.3 Régulation du Cycle Cellulaire

2.3.1 Synthèse et destruction cycliques de protéines

Le cycle cellulaire est régulé de façon très complexe par un enchaînement de synthèses et de destruction de protéines appelées cyclines (Figure 2).

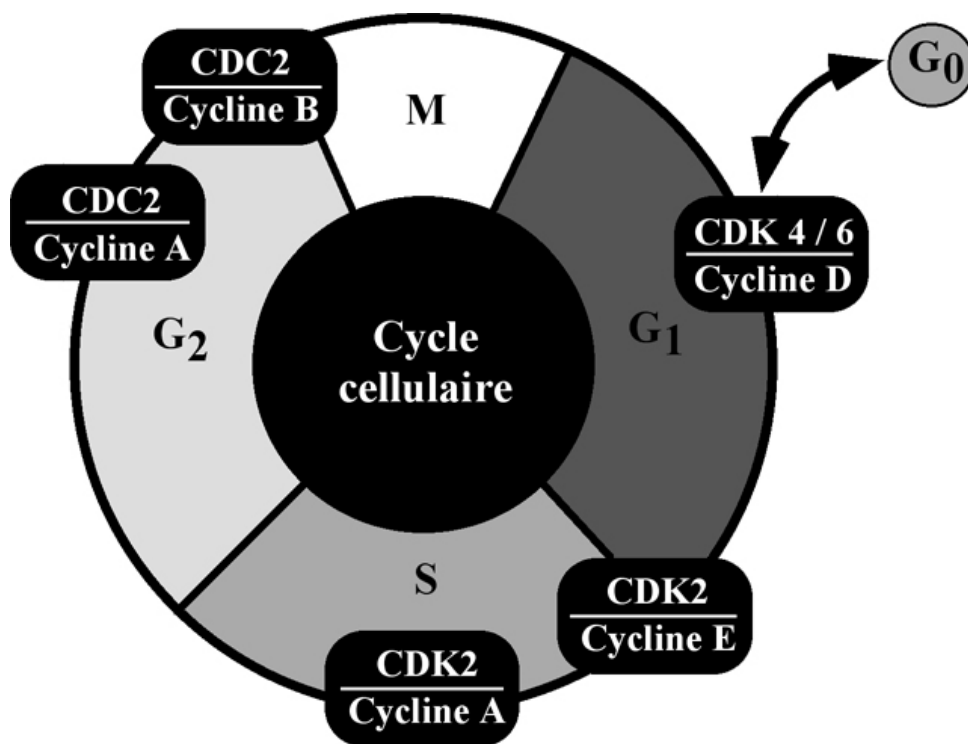


Figure 2. Régulation du cycle cellulaire par les cyclines.

Les cyclines sont des sous-unités régulatrices positives de kinases (CDK) impliquées dans la régulation de la progression dans le cycle cellulaire. Chez les vertébrés, 9 cyclines (A à I) ont été actuellement découvertes et au moins 8 CDKs (CDK1 à CDK8) semblent impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (10). Une cycline donnée peut s'associer à différents partenaires CDKs et vice-versa (11), ce qui rend l'attribution de fonctions pour chaque complexe CDK-cycline très compliquée. La plupart des cyclines des vertébrés semblent plutôt ubiquitaires, exceptées les cyclines de type D : les cellules expriment, selon leur fonction, soit une association D2 et D1, soit une association D2 et D3, sans doute fonctionnellement non-équivalente (12). L'apparition et la disparition périodiques de complexes CDK-cycline distincts assurent

l'alternance des phases S et M dans les cellules en division (13). Les niveaux des complexes CDK-cyclines durant les différentes phases du cycle cellulaire sont déterminés par la combinaison d'induction et de répression transcriptionnelles et par le minutage de la destruction protéolytique (14). La phosphorylation réversible des CDKs peut contrôler, en fonction du site de phosphorylation, soit positivement soit négativement l'activité de ces kinases. L'activité des enzymes qui phosphorylent ou déphosphorylent les CDKs est, elle-même, contrôlée par phosphorylation. Quelques facteurs de transcription tels que MYC jouent un rôle important pour la progression dans le cycle cellulaire, en régulant directement les phosphatases (CDC) qui contrôlent l'activité des CDKs et aussi, probablement, indirectement l'expression des cyclines (15). Bien que la régulation des complexes CDK-cyclines soit relativement bien connue (14), il reste encore beaucoup à apprendre sur les substrats physiologiques de ces kinases.

2.3.2 Complexes CDK4 et CDK6 - cycline D

La progression dans la phase G_1 peut être soit stimulée par des mitogènes ou facteurs de croissance soit bloquée par des cytokines antiprolifératives. Pour permettre l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire depuis la phase G_0 , un mitogène doit stimuler l'expression des cyclines de type D (D1, D2 et D3). Ces cyclines vont s'assembler, toujours sous stimulation mitogénique, avec des kinases dépendantes des cyclines D (CDK4 et CDK6), pour former un holoenzyme cataboliquement actif dès le milieu de la phase G_1 avec un maximum atteint lors de la transition de G_1 à S (12). Bien que l'activité du complexe n'influence le cycle que pendant le point critique de la phase G_1 , elle persiste tout au long du premier cycle et des cycles suivants si la stimulation mitogénique continue. Par contre, en l'absence de stimulation mitogénique, l'activité enzymatique chute rapidement à cause de la nature particulièrement labile des cyclines D et les cellules en phase G_1 sortent rapidement du cycle.

La cycline D1 est surexprimée dans beaucoup de cancers humains comme résultat d'amplifications de gènes ou de translocations ciblées sur le locus D1 (CCND1) du chromosome 11q13 (16). L'amplification du chromosome 11q13 est fréquente dans un large spectre de cancers, mais pas dans les gliomes (17). Ces derniers, de même que les sarcomes, présentent plutôt une amplification du gène codant pour le partenaire catalytique CDK4 de la cycline D1. Toutefois, la région amplifiée comprend plusieurs autres oncogènes potentiels incluant MDM2, antagoniste du gène p53, de telle sorte qu'il n'est pas possible d'évaluer l'impact d'une sur-expression de CDK4 sur la malignité des gliomes et des sarcomes. Concernant les cyclines D2 et D3, leur sur-expression n'a pas été rapportée, probablement parce que leurs gènes se situent dans des régions chromosomiques stables (7).

2.3.3 Protéines pRB et E2Fs

Les complexes CDK4-cycline D ou CDK6-cycline D phosphorylent certains substrats, dont la modification est nécessaire pour le passage en phase S (Figure 3). La protéine suppresseur du rétinoblastome (pRB) est l'une de ces cibles (18). La pRB et d'autres protéines similaires, comme p130 et p107, contrôlent l'expression de gènes nécessaires à l'entrée en phase S par l'entremise d'une famille de régulateurs transcriptionnels hétérodimériques appelés E2Fs (19). Sous sa forme hypophosphorylée, pRB empêche la transactivation des gènes cibles des E2Fs en formant un complexe répresseur avec ces derniers. La phosphorylation de pRB par les CDKs dépendantes des cyclines D libère les E2Fs, leur permettant d'activer leurs gènes cibles (20). Les CDKs dépendantes des cyclines A ou B maintiennent probablement pRB dans son état hyperphosphorylé jusqu'à ce que les cellules aient effectué une mitose complète et soient retournées dans les phases G₁ ou G₀ (21).

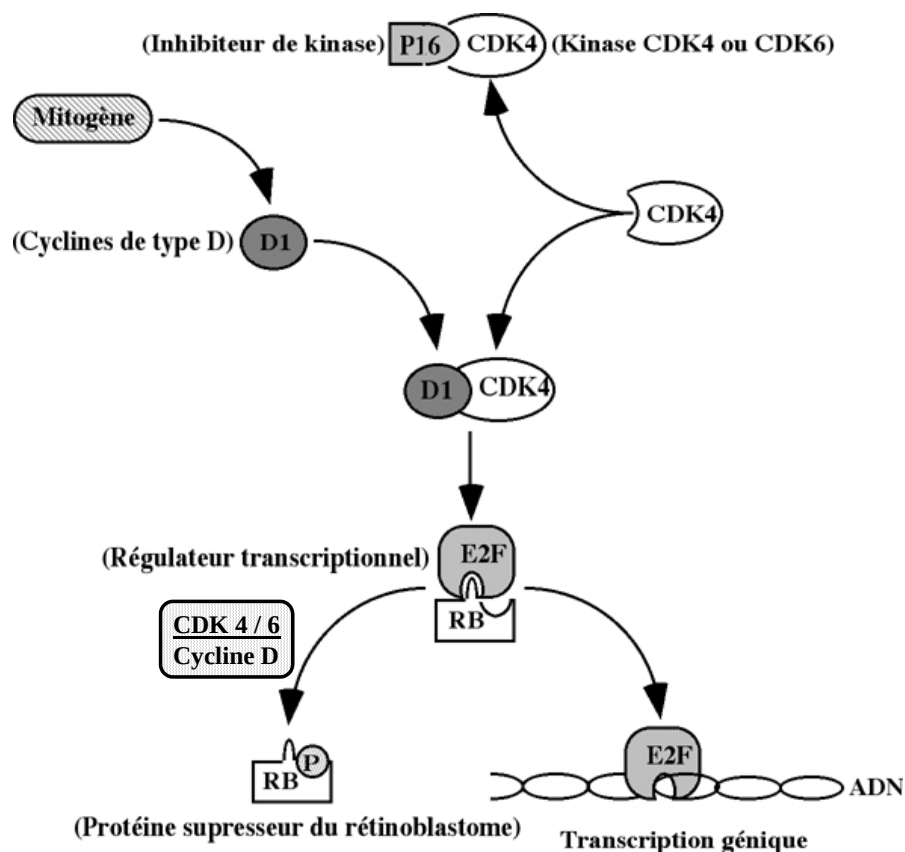


Figure 3. Régulation de la transcription nécessaire à l'entrée en phase S.

Les régulateurs transcriptionnels E2Fs déclenchent, entre autres, l'expression des gènes codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidine kinase (TK), la thymidylate synthétase (TS), l'ADN polymérase- α (POL), la CDC2, la cycline E et probablement aussi la cycline A. De plus, certains E2Fs, comme E2F-1, stimulent

rétroactivement leur propre transcription. Dans le cas où pRB se révèle non-fonctionnelle, les E2Fs peuvent transactiver librement les gènes nécessaires pour dépasser le point critique entre la phase G_1 et S. L'activation des CDKs n'est donc plus indispensable et les protéines INK4 ne peuvent plus bloquer le cycle en phase G_1 (Voir plus loin). De plus, une stimulation par un signal extracellulaire ou des facteurs de croissance n'est plus nécessaire, la durée de la phase G_1 est réduite et les cellules diminuent de taille (22). Ce dysfonctionnement est souvent observé dans certains types de cancers.

Concernant les gènes E2Fs, bien qu'ils soient le dernier maillon de la voie de régulation de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, leur sur-expression, mutation ou inactivation n'est actuellement pas démontrée dans les cancers humains (7).

2.3.4 Complexes CDK2 - cyclines A et E

Le processus enclenché par le complexe CDK4-cyclines D ou CDK6-cyclines D est ensuite accéléré par un autre holoenzyme, le complexe CDK2-cycline E, qui est indépendant des mitogènes. Dans les cellules en division, l'expression de la cycline E est périodique et maximale lors de la transition de la phase G_1 à S, où elle forme un complexe actif avec son partenaire catalytique CDK2 (23). Son renouvellement incessant est nécessaire à cause d'une protéolyse rapide, dépendante de l'ubiquitine E (24). Comme l'expression du gène de la cycline E est contrôlée par les E2Fs, le complexe CDK2-cycline E, en activant les E2Fs par phosphorylation de pRB, stimule rétroactivement la transcription de la cycline E (21). Cet effet rétroactif positif, couplé à la stimulation par certains E2Fs de leur propre transcription, produit une rapide augmentation de l'expression génique nécessaire à l'entrée en phase S.

La combinaison CDK2-cycline E qui permet la transition entre les phases G_1 et S doit faire place ensuite à la combinaison CDK2-cycline A pour permettre la progression en phase S (25). La synthèse de la cycline A débute tardivement dans la phase G_1 . Le complexe formé, CDK2-cycline A, se lie aux E2Fs régulés par pRB et phosphoryle un de leurs composants hétérodimériques, empêchant ainsi leur liaison à l'ADN (26). L'annulation de la transactivation induite par les E2Fs dépend de la présence du complexe CDK2-cycline A, car le complexe CDK2-cycline E ne peut en faire autant. Il se peut aussi que le complexe CDK2-cycline A agisse sur des protéines dont la phosphorylation pourrait promouvoir la synthèse d'ADN ou empêcher la reformation des complexes CDKs préexistants (7).

Des altérations dans les gènes des cyclines E et A sont très rares dans les cancers humains (17). Dans des conditions expérimentales, la sur-expression de la cycline E est tolérée (27).

2.3.5 *Autres complexes enzymatiques*

La cycline A s'associe ensuite à CDC2 pour permettre la progression dans la phase G₂, puis le complexe se dissocie et c'est au tour de la cycline B de s'associer à CDC2 pour permettre le passage de la phase G₂ à M (28). Cette kinase phosphoryle beaucoup de protéines, dont l'histone H1, pRb ou le CTD de l'ARN polymérase II (29). Une de ses actions les mieux étudiées est la phosphorylation des lamines, qui entraîne le désassemblage de la lamina nucléaire (29).

Il est probable que des complexes CDK-cycline régulent l'activité d'autres complexes CDK-cycline. CDK7 s'est par exemple révélée être la sous-unité catalytique d'une kinase activant les CDK (CAK) (30), qui active CDC2 en phosphorylant le résidu thréonine 161 localisé dans un domaine « T-loop » et présent dans la plupart des CDKs (31, 32). Un des deux autres polypeptides de CAK a été identifié comme étant la cycline H (33).

Les informations concernant les autres cyclines et CDKs sont plus éparses et moins bien documentées. Leurs partenaires catalytiques ne sont pas toujours connus.

2.3.6 *Protéine p21^{CIP1}*

La protéine p21 est surexprimée dans les cellules en sénescence. Elle est le produit du gène *CIP1* dont l'expression peut être induite par p53 (16). La protéine p21 peut se lier à différents complexes CDK-cyclines, en particulier les complexes avec CDK2 ou CDK4, et bloquer leur interaction avec des substrats et/ou CAK (34). Cependant, on la trouve aussi dans des complexes actifs CDK-cycline. Ainsi, p21 pourrait jouer un rôle bivalent, en fonctionnant soit comme facteur d'assemblage, soit comme inhibiteur, en fonction de la stoichiométrie du complexe CDK-cycline-p21 (35). Cette protéine interagit aussi avec la sous-unité δ de l'ADN polymérase (PCNA), inhibant ainsi la réplication de l'ADN sans affecter la réparation (36). La protéine p21 peut en outre être régulée par d'autres voies indépendantes de p53, en particulier durant le développement lors de la différenciation terminale (37).

2.3.7 *Protéine p27^{KIP1}*

Le gène *KIP1* pourrait être directement impliqué dans le contrôle au niveau du point de restriction de la phase G₁. Son produit, p27, de structure similaire à p21, est exprimé à des taux élevés dans les cellules quiescentes, mais dès que celles-ci entrent dans un cycle cellulaire, ces niveaux chutent (Figure 4) (38). Cette protéine est

impliquée dans l'inhibition de la prolifération induite par TGF- β ou par contact (39). L'expression de p27 ne semble pas être régulée au niveau transcriptionnel, mais plutôt au niveau translationnel ou post-translationnel. Son renouvellement peut être accéléré par la phosphorylation induite par le complexe CDK2-cycline E. La protéine p27 inactive plusieurs complexes CDK-cycline différents, en particulier les complexes avec CDK2 et CDK4, et l'on a suggéré que sa disponibilité pour l'inhibition des complexes CDK2-cyclines E et A dépendait de l'abondance du complexe CDK4-cycline D, lequel, à son tour, était régulé par TGF- β . Lorsque des fibroblastes en prolifération sont privés de sérum contenant des mitogènes, non seulement la synthèse de l'inhibiteur p27 augmente, mais en plus celui-ci est relâché par les complexes CDK-cycline D, étant donné que les cyclines D sont dégradées (7). La perte de l'activité kinase dépendante des cyclines D couplée à l'inhibition de CDK2 induite par p27 provoque un arrêt en phase G₁-G₀. L'inhibition anti-sens de la synthèse de p27 dans le cycle cellulaire empêche les cellules de devenir quiescentes (40). Une inactivation homozygote des gènes *KIP1* et *CIP1* n'a pas été rapportée.

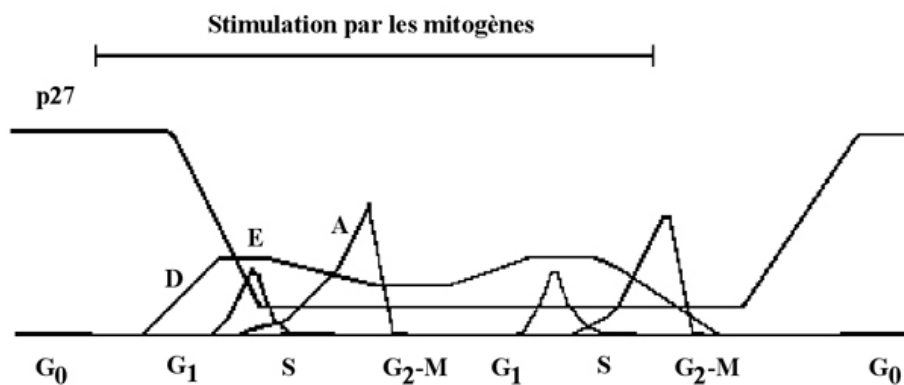


Figure 4. Expression de p27 et des cyclines dans le cycle cellulaire.

2.3.8 Protéines $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$, et $p19^{INK4d}$

Les produits des gènes *INK4* sont des inhibiteurs polypeptidiques des CDK structuellement et fonctionnellement distincts de p21 et p27. Les quatre protéines connues, $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$, et $p19^{INK4d}$ se lient exclusivement à CDK4 et

CDK6 et bloquent leur interaction avec les cyclines, entraînant un arrêt du cycle cellulaire en G₁ (41). Plus particulièrement, p15 pourrait être un médiateur clé de l'arrêt de la prolifération induit par des facteurs de croissance négatifs, tels que TGF- β (42). Quant à p16, elle pourrait jouer un rôle non-essentiel mais important dans le contrôle de la réponse à certains types de dommage ou à des signaux inappropriés dus à des oncogènes ou des mitogènes. D'autre part, p16 pourrait être une protéine de sénescence comptant le nombre de divisions cellulaires, puisqu'elle s'accumule dans les cellules au fur et à mesure qu'elles se divisent (43).

Beaucoup de cancers présentent des mutations qui inactivent la fonction inhibitrice du gène *INK4a* sur les CDKs (17). Comme le produit d'*INK4a* régule non-seulement les CDKs associées à la cycline D1, mais aussi celles associées aux cyclines D2 et D3, et que ces complexes phosphorylent à leur tour non seulement la protéine pRB, mais aussi d'autres protéines apparentées, *INK4a* est donc plus fréquemment impliqué dans l'oncogenèse que les gènes des protéines se trouvant en aval dans la voie de régulation. Des délétions homozygotes du locus *INK4a* apparaissent communément, notamment dans les gliomes (7).

2.3.9 Protéine p53

Le produit du gène *p53* possède des caractéristiques propres aux facteurs de transcription, c'est-à-dire des signaux de localisation nucléaire dans la région COOH-terminale et un domaine acide dans la partie NH₂-terminale. Il se combine en tétramère qui se comporte comme un activateur transcriptionnel aussi bien *in vitro* que *in vivo* et sa liaison avec l'ADN se fait de façon séquentiellement spécifique. Habituellement, sa concentration cellulaire est faible et régulée temporellement et spatialement en fonction du cycle cellulaire. Cependant, lors d'un dommage dans l'ADN ou en réponse à un certain stress, la protéine p53 s'accumule dans les cellules (44). La voie de transduction du signal qui recrute p53 n'est pas totalement élucidée, mais elle inclut certains gènes tels que *ATM* (Figure 5) (7). Quant au mécanisme de contrôle endogène capable de réguler le niveau de protéines p53, il pourrait impliquer l'autorégulation de *p53* sur son propre promoteur (45) ou alors la stabilisation d'une molécule p53 dont la demi-vie est normalement très courte. Son accumulation dans une cellule aboutit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ tardive (44). Au lieu de se diviser, la cellule croît en taille et peut acquérir de multiples noyaux, rappelant en cela les effets de beaucoup d'agents cytotoxiques, comme les inhibiteurs de la synthèse des nucléotides. En fait, p53 induit un arrêt en phase G₁ en déclenchant l'activation d'une cascade de gènes, tels que *CIP1*, le gène codant pour p21, l'inhibiteur de CDK (46). Comme p21 limite l'hyperphosphorylation de pRB, celle-ci peut se lier aux E2Fs et inactiver ainsi la transcription des gènes nécessaires au passage en phase S. La cellule tente alors de

réparer son ADN avant de le répliquer. Si la réparation échoue à cause de dommages trop sévères dans l'ADN, de drogues chimio-thérapeutiques ou encore à cause de la sur-expression de *MYC* et *E1A*, p53 peut alors induire l'apoptose. Le lancement du programme d'apoptose ne semble, cette fois-ci, pas dépendre de p21, mais p53 pourrait activer directement des gènes de mort cellulaire tels que *BAX*, ou inhiber l'expression de gènes de survie tels que *BCL-2* (47). Il semble donc qu'il y ait une coopération entre la voie de régulation par pRB et p53 qui détermine si p53 induit l'arrêt en G₁ ou l'apoptose. En effet, si la fonction de pRB est défectueuse, p53 induira l'apoptose par une autre voie.

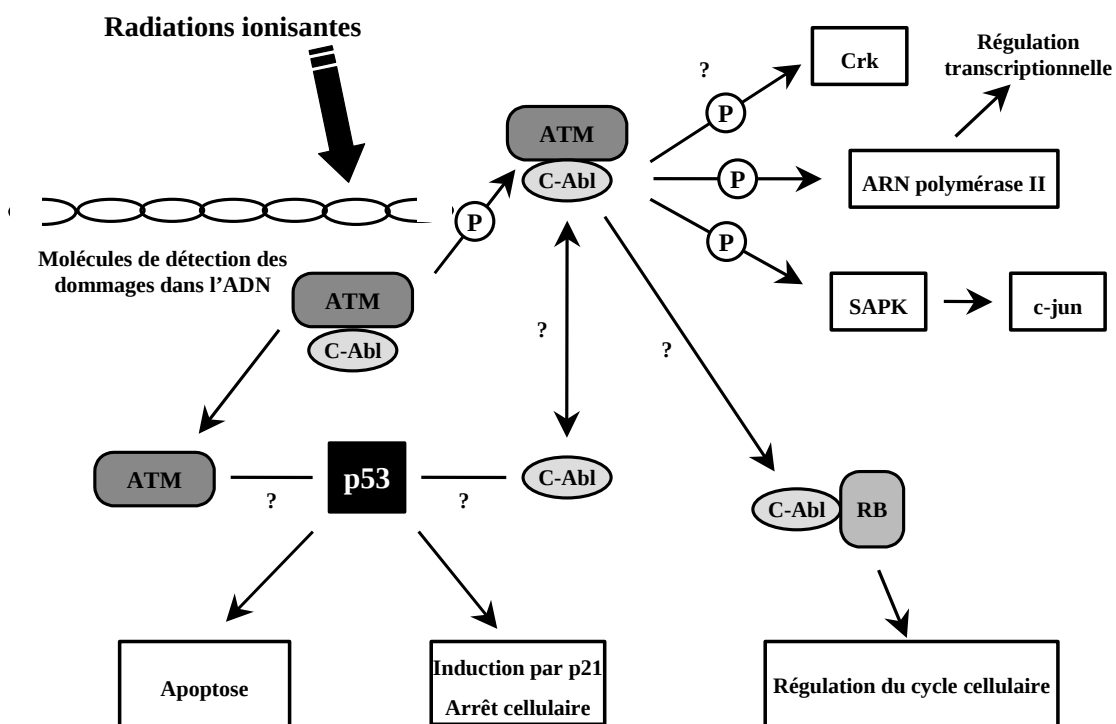


Figure 5. Arrêt du cycle cellulaire par p53 après des dommages dans l'ADN.

Le type sauvage de *p53*, lorsqu'il est exprimé dans des cellules transformées avec un mutant *p53* endogène ou dans des cellules nullizygotes pour *p53*, exerce un effet antiprolifératif et antitumorigène. Cela explique pourquoi *p53* est l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains (48). L'inactivation par mutation non-sens de *p53* est une caractéristique fréquente de beaucoup de néoplasmes humains. En ce qui concerne les glioblastomes, des pertes alléliques sur le bras court du chromosome 17 se produisent à des fréquences équivalentes à toutes les étapes du développement tumoral astrocytaire (49). Il en résulte une recombinaison mitotique de la région 17p13-17pter contenant le gène *p53* (45). La malignité astrocytaire progresse donc par expansion clonale de sous-populations cellulaires avec des degrés croissants

d'altération du gène *p53*. La plupart des mutations ponctuelles du gène *p53* altèrent la conformation et prolongent la demi-vie de la protéine produite, si bien que, lorsque les formes sauvage et mutante coexistent, la protéine mutante agit de façon trans-dominante en séquestrant la protéine sauvage par oligomérisation et en atténuant sa fonction. Il existe aussi des cas de cancers où la fonction de *p53* est altérée sans toutefois que le gène *p53* n'ait subi de mutation. La sur-expression du type sauvage de *p53* dans certaines tumeurs pourrait être une conséquence de la perte d'un autre gène suppresseur de tumeur, tel que *WAF1/Cip*, dans la région distale du chromosome p17. Les lésions dans ce gène provoqueraient une dérégulation transcriptionnelle de *p53*, soit par des perturbations dans sa voie de dégradation, soit par une phosphorylation modifiée altérant sa conformation (50). Il se peut aussi, dans certains cancers, que des défauts de transcription ou de translation du gène *p53* empêchent la synthèse d'une protéine *p53* sauvage fonctionnelle. Dans des sarcomes à tissu mou, *p53* est apparemment rendue inactive par le produit de MDM2, un proto-oncogène qui peut être induit et amplifié par *p53*. Celui-ci neutralise l'action de *p53* en se liant et inhibant le domaine de transactivation acide de *p53* (45).

Bien que l'on ne puisse détecter que peu d'effets de *p53* sur la sensibilité aux radiations de cultures de cellules poussant asynchroniquement, l'inactivation de *p53* résulte en une forte augmentation de la survie clonogénique, quand les cellules synchronisées par sélection mitotique ont été irradiées dans la phase précoce G_1 . Pour réduire la clonogénicité cellulaire par un log 1, il a été montré qu'il fallait passer d'une dose d'irradiation de 3.26 ± 0.12 Gy dans les cellules exprimant le *p53* fonctionnel à une dose de 7.41 ± 0.44 Gy dans les cellules où le *p53* était inactivé. La protéine *p53* pourrait donc arrêter les cellules en phase G_1 , ce qui serait le facteur déterminant pour la sensibilité des cellules aux radiations ionisantes (51).

2.4 Synthèse et Réparation de l'ADN

2.4.1 Transmission de l'information génétique

L'acide désoxyribonucléique (ADN) contient l'information génétique nécessaire à la construction et au fonctionnement d'une cellule et de l'ensemble de l'organisme. La duplication précise de cette information, d'une génération à l'autre, assure la continuité génétique de chaque espèce. En fait, l'ADN est un polymère linéaire composé de seulement quatre types de bases, appelées nucléotides (Figure 6). Cependant, leurs multiples combinaisons permettent la transmission de l'information génétique sous forme de code. Chez les mammifères, l'ADN est composé d'un assemblage de plus d'une centaine de millions de nucléotides. L'importante taille du génome le rend vulnérable à toute une collection d'agents endogènes ou exogènes pouvant provoquer

des dommages dans l'ADN. Les accidents potentiellement mutagéniques et cytotoxiques nécessitent donc constamment l'excision et le remplacement des nucléotides endommagés par des mécanismes de réparation de l'ADN. Ces derniers doivent être particulièrement fiables et performants, puisque l'ADN est le garant de l'information génétique. Toutefois, le degré d'exactitude des procédures de correction n'exclut pas totalement les erreurs.

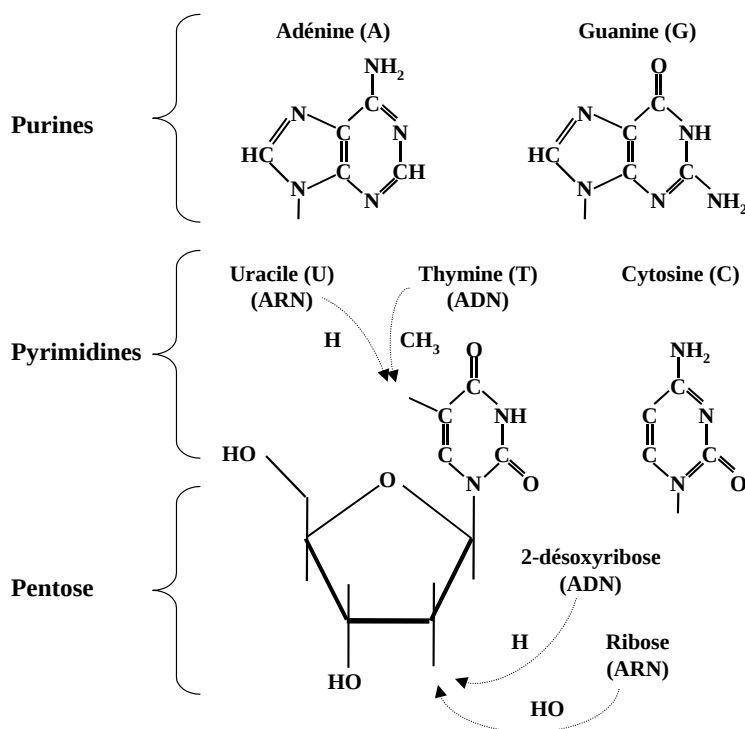


Figure 6. Structure chimique des nucléotides.

2.4.2 Structure des nucléotides

Un nucléotide est formé d'un sucre à cinq atomes de carbone (pentose) dont le carbone 1' est relié à une base organique et le carbone 5' à un groupe phosphate. Le type de pentose des nucléotides constitue la principale différence entre l'ARN (ribose) et l'ADN (désoxyribose). La seule autre différence est le remplacement d'une base organique dans l'ARN (uracile) par une autre base dans l'ADN (thymine). Les bases organiques composant les acides nucléiques sont soit des purines constituées de deux cycles condensés (adénine et guanine) soit des pyrimidines constituées d'un seul cycle (cytosine, uracile et thymine). La présence d'atomes d'azote dans les cycles de ces molécules hétérocycliques leur confère un caractère basique, bien qu'aucune ne soit protonée à pH neutre. Le caractère acide des nucléotides est en fait dû à la présence du phosphate, qui se dissocie dans les conditions physiologiques, pour libérer des protons et laisser une charge négative sur le groupe phosphoryle. Les cellules et le milieu

extracellulaire renferment une faible concentration de nucléosides, une combinaison de sucre et de base dépourvue de groupe phosphoryle. Le tableau 1 présente la nomenclature des quatre types de ribonucléosides et désoxyribonucléosides.

Tableau 1. *Nomenclature des nucléosides et nucléotides*

Bases	Nucléoside	Nucléotide	mono-, di-, tri-phosphate		
Dans l'ARN					
Adénine (A)	Adénosine	Adénylate	AMP	ADP	ATP
Guanine (G)	Guanosine	Guanylate	GMP	GDP	GTP
Cytosine (C)	Cytidine	Cytidylate	CMP	CDP	CTP
Uracile (U)	Uridine	Uridylate	UMP	UDP	UTP
Dans l'ADN					
Adénine (A)	Désoxyadénosine	Désoxyadénylate	dAMP	dADP	dATP
Guanine (G)	Désoxyguanosine	Désoxyguanylate	dGMP	dGDP	dGTP
Cytosine (C)	Désoxycytidine	Désoxycytidylate	dCMP	dCDP	dCTP
Thymine (T)	Thymidine	Thymidylate	dTMP	dTDP	dTTP

2.4.3 Structure des acides nucléiques

La polymérisation des nucléotides en acides nucléiques est obtenue par liaison phosphodiester, avec perte d'une molécule d'eau, entre l'hydroxyle du carbone 3' du pentose d'un nucléotide et le groupe phosphoryle d'un autre nucléotide. Un brin d'acide nucléique est donc un polyester avec orientation chimique 5'-3' dont les groupes latéraux sont des bases puriques ou pyrimidiques. L'ADN se compose de deux brins d'acides nucléiques torsadés l'un autour de l'autre en forme d'hélice bicaténaire, avec une orientation anti-parallèle (sens 5'-3' opposés). Les deux brins sont maintenus ensemble par l'appariement strict d'une base d'un brin à une base de l'autre brin par l'entremise d'interactions hydrophobes, de van der Waals et de liaisons hydrogènes. La géométrie d'une double hélice nécessite l'appariement d'une purine (A ou G), plus volumineuse, avec une pyrimidine (C ou T), plus petite, comme A est apparié à T et G à C dans l'ADN cellulaire. Les bases sont régulièrement espacées de 0.34 nm le long de l'axe de l'hélice, d'où la présence de 10 bases par tour.

2.4.4 Réplication de l'ADN

Dans la cellule, la synthèse d'ADN bicaténaire procède par réplication des deux brins originaux, selon les règles d'appariement de Watson-Crick, et formation de deux nouveaux double brins consistant en un brin original et sa réplique. La synthèse d'ADN

bicaténaire est donc semi-conservatoire. Elle nécessite des désoxyribonucléotides triphosphates comme précurseurs, car l'hydrolyse du pyrophosphate libéré lors de la formation de la liaison diester entre le nucléotide entrant et le brin naissant, fournit l'énergie nécessaire à l'élongation de la chaîne. La synthèse d'ADN bicaténaire progresse généralement dans les deux sens à partir de points particuliers, appelés origines de réplication. Dans chacun des sens se forme une fourche de réplication composée d'au moins 20 protéines différentes, toutes chargées d'assister les ADN polymérases dans la construction du nouveau chromosome. Les interactions entre ces molécules et l'ADN sont très complexes et encore sujettes à beaucoup d'interprétations et d'interrogations (52). C'est pourquoi, seule une description sommaire des mécanismes généralement acceptés est présentée ici. En premier lieu, les hélicases et les topo-isomérases détordent les deux brins appariés par leurs bases et torsadés, de façon à les rendre accessible au complexe enzymatique. Les topo-isomérases, en incisant l'ADN, relâchent la tension résultant de l'enroulement de l'hélice bicaténaire et permettent ainsi aux brins de tourner l'un autour de l'autre (53). Elles colmatent ensuite les incisions dans l'ADN pour permettre la migration de la fourche de réplication. Lorsque la réplication est terminée, elles désenchevêtrent les chromosomes-fils. En plus du déroulement d'une portion de l'hélice bicaténaire, l'initiation de la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase α associée à une primase nécessite une amorce préexistante d'acide nucléique, c'est-à-dire le groupe hydroxyle de l'extrémité 3' d'un ADN ou d'un ARN conjugué aux brins originaux, appelés matrices. Dans une fourche de réplication, les deux brins-matrices sont ensuite copiés simultanément dans le sens 5'-3' par différentes polymérases. Toutefois, comme les deux brins-matrices sont antiparallèles, la réplication d'un d'entre eux est obtenue par polymérisation discontinue, afin de respecter le sens 5'-3'. Un brin-fils est donc synthétisé de façon continue dans le sens du déplacement de la fourche de réplication, alors que l'autre est synthétisé de façon discontinue dans le sens opposé à la progression de la fourche de réplication et à mesure que de nouvelles zones du brin-matrice deviennent accessibles. Cette synthèse discontinue nécessite la conjugaison sur le brin-matrice de courtes amorces d'ARN par des ARN primases, afin de permettre la polymérisation de segments discontinus d'ADN, appelés fragments d'Okazaki. L'ADN polymérase dégrade alors les amorces d'ARN par l'entremise de son activité de nucléase et comble les lacunes par insertion de désoxyribonucléotides. Enfin, une ligase scelle l'un à l'autre les fragments d'Okazaki adjacents. En outre, une télomérase pallie tout raccourcissement qui pourrait toucher les brins-fils.

2.4.5 Réparation de l'ADN

Le maintien de l'intégrité de l'information génétique est crucial pour l'individu et pour l'espèce. Comme le génome est soumis à toute une gamme d'agents mutagéniques endogènes et environnementaux, des mécanismes de réparation très performants doivent être constamment en action. Lors de la réplication de l'ADN, les erreurs de copie sont corrigées de deux façons. D'une part, les ADN polymérases possèdent la faculté de reconnaître les bases incorrectement introduites (mésappariées) à l'extrémité 3' d'une chaîne naissante et de les éliminer grâce à leur activité d'exonucléase 3'-5'. D'autre part, les bases mésappariées du nouveau brin sont reconnues par un système de surveillance, éliminées électivement puis remplacées grâce à une synthèse de chaîne sur la matrice intacte (54). Un résidu nucléotidique altéré est en fait corrigé par le remplacement d'un court segment. En dehors de la réplication, des dommages peuvent survenir dans l'ADN à tout moment, par divers agents chimiques (ex : fumée de tabac) ou par l'hydrolyse de l'eau et la génération de radicaux hydroxyles sur la trajectoire d'une radiation ionisante (ex : lumière UV). Heureusement, un mécanisme d'excision-réparation de bases (BER) reposant sur toute une panoplie d'enzymes reconnaît les paires de bases endommagées, les excise et agrandit la brèche monocaténaire pour que l'ADN polymérase puisse recopier le brin intact et que la ligase puisse souder les bouts libres du nouveau brin. En premier lieu, une ADN glycosylase spécifique au type de dommage casse la liaison base-désoxyribose du résidu nucléotidique endommagé. L'endonucléase APE1 ou HAP1 vient ensuite déloger l'ADN glycosylase de la zone endommagée, coupe le brin du côté 5' du site abasique, puis recrute la polymérase POL β . Cette dernière libère le résidu 5'-désoxyribophosphate, insère un nouveau nucléotide, et recrute le complexe LIG3-XRCC1. La LIG3 scelle la brèche, permettant ainsi à POL β de se dissocier de l'ADN. Enfin, le complexe LIG3-XRCC1 est libéré et une ADN méthyltransférase rétablit l'état de méthylation originel de l'ADN (55). Toutefois, la réparation de dommages touchant les deux brins d'ADN provoque quelquefois une cassure du double brin. Des mutations ou des erreurs de réparation létales découlent souvent de ce type de dommage à cause de la perte de nucléotides autour de la brèche (56).

2.5 Régulation Allostérique de la Synthèse des Nucléotides

La synthèse des précurseurs nucléotidiques de l'ADN est régulée de différentes manières. Pour leur incorporation dans l'ADN, les désoxyribonucléosides doivent être phosphorylés trois fois. La quantité de désoxyribonucléotides triphosphates présents dans la cellule influence par effet rétroactif leur propre synthèse. Concernant les bases

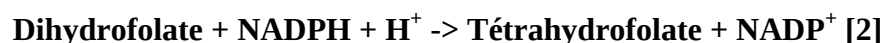
puriques, une quantité élevée de dATP inhibe la ribonucléotide réductase et donc la synthèse de tous les nucléotides destinés à l'ADN en provenance de l'ARN. À l'opposé, une quantité élevée de dGTP augmente la production de dATP tout en inhibant la synthèse des désoxyribonucléotides pyrimidiques. Pour ces derniers, une régulation sur la ribonucléotide réductase ne fait pas de distinction entre la dTTP et la dCTP. Le point « charnière » est la synthèse *de novo* de dTMP par la thymidylate synthétase (TS) à partir de dUMP. Comme la dUMP peut être produite à partir de la dCMP déaminase, une quantité élevée de dCTP ou de dUTP favorise la synthèse de dTMP et donc de dTTP. Par contre, une quantité élevée de dTTP inhibe la réduction des pyrimidines et donc la production de dCTP et de dUTP tout en favorisant la synthèse de dGTP. Outre la synthèse *de novo* par la TS, la dTTP est aussi obtenue par phosphorylations successives de la dThd par la dThd kinase (TK) à travers la voie de récupération des nucléotides. La cellule doit disposer pour cela d'une réserve préexistante de dThd. La synthèse de dTTP par la voie de récupération associée à son catabolisme régule donc directement l'équilibre entre les réserves disponibles des bases pyrimidiques (57).

2.6 Inhibition de la Synthèse de Thymidine

La thymidylate synthétase (TS), caractérisée à partir de souches de *lactobacillus casei* résistantes au méthotrexate (58), est composée de 2 sous-unités d'un poids moléculaire de 35,000 Daltons. Elle catalyse une réaction *de novo* [1], dans laquelle un groupe méthyle provenant du 5,10-méthylène-tétrahydrofolate est transféré en position C-5 sur un désoxyuridylylate (dUMP). La réduction du groupe carbone est obtenue par oxydation du tétrahydrofolate en dihydrofolate. Durant cette réaction d'oxydoréduction, l'hydrogène en position C-6 du tétrahydrofolate est transféré sur le groupe méthyle de la thymidylate (dTMP).



La constante de Michaelis (K_m) de la TS en présence ou absence de Mg^{+2} (10mM) est respectivement de 5.1×10^{-6} M ou 6.8×10^{-7} M pour le dUMP et de 3.2×10^{-5} M ou 1.2×10^{-5} M pour le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate. Une molécule de TS peut fabriquer 175 molécules de dTMP toutes les minutes. Une synthèse continue de dTMP n'est cependant possible que grâce au renouvellement du donneur du groupe méthyle via un cycle de réaction passant par la réduction de la dihydrofolate en tétrahydrofolate par la dihydrofolate réductase [2], suivie d'une autre réaction dans laquelle le 5,10-méthylène-tétrahydrofolate est généré à nouveau à partir du tétrahydrofolate.



Les cellules constamment en division, comme les cellules cancéreuses, sont particulièrement vulnérables à une inhibition de la synthèse de dTMP, car elles ont des besoins accrus de dTMP pour la synthèse d'ADN. La TS et la dihydrofolate réductase sont donc des cibles de choix pour la chimiothérapie du cancer. Concernant la TS, elle peut être inhibée irréversiblement par le 5-fluorouracile (5-FU) ou la 5-fluoro-2'-désoxyuridine (FdUrd). Ces derniers sont convertis *in vivo* en fluorodésoxyuridylate (FdUMP), un analogue de la dUMP, qui agit comme substrat non-convertible de la TS. Comme l'atome de Fluor ne peut être extrait par l'enzyme, la catalyse est bloquée au stade où la FdUMP forme un complexe covalent avec le groupe sulfhydryrique de l'enzyme et le méthylène-tétrahydrofolate. La synthèse de dTMP peut aussi être bloquée en inhibant la régénération de tétrahydrofolate. Des analogues de la dihydrofolate, tels que l'aminoptérine ou le méthotrexate (ou améthoptérine) sont de puissants inhibiteurs compétitifs ($K_i < 10^{-9}$ M) de la dihydrofolate réductase (Figure 7). Le méthotrexate est par exemple utilisé avec un certain succès dans la chimiothérapie de cancers, comme les leucémies aiguës et les choriocarcinomes.

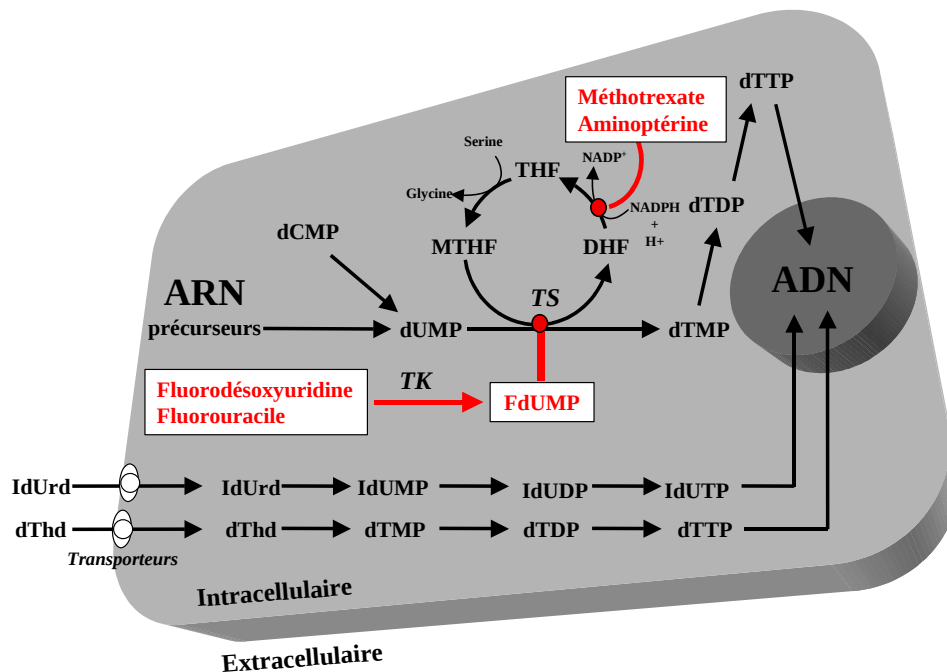


Figure 7. Inhibition de la synthèse *de novo* de thymidine.

Lorsque la synthèse de dTMP est bloquée, la déplétion de dTTP augmente la production de dCTP et de dUTP de façon incontrôlée, entraînant l'incorporation de dUTP dans l'ADN. De même, la FdUTP résultant d'un traitement avec FdUrd ou 5-FU est aussi incorporée dans l'ADN. Une incorporation erronée de dUTP ou de FdUTP

peut provoquer la mort cellulaire via excision de la base par la uracile-DNA glycosylase et tentative de réparation en absence de dTTP. Les insertions répétitives de dUTP qui s'ensuivent provoquent des dommages et finalement la fragmentation de l'ADN par induction d'endonucléases, probablement en réponse à un programme de suicide cellulaire. Dans le cas où l'incorporation erronée de dUTP est maintenue de façon stable dans l'ADN, elle peut interférer avec l'expression génique (57).

2.7 La 5-Iodo-2'-désoxyuridine

C'est en 1959 que la base pyrimidique halogénée 5-Iodo-2'-désoxyuridine (IdUrd) a été décrite pour la première fois comme marqueur de la prolifération cellulaire et donc vecteur potentiel de radioisotopes dans l'ADN (59). Il ne s'est écoulé pas plus d'une année pour que son potentiel radiosensibilisateur soit aussi démontré (60). Toutefois, l'utilisation de la IdUrd est restée, depuis, essentiellement confinée à la recherche, comme outil pour l'analyse de la cinétique cellulaire (61, 62).

La IdUrd est en fait un analogue de la dThd dans lequel le groupe 5-méthyle de la base pyrimidique de la dThd est remplacé par un atome d'iode (Figure 8). Comme les rayons de van der Waals du groupe méthyle et de l'atome d'iode sont similaires, respectivement de 2.0 Å et 2.15 Å, la IdUrd peut entrer en compétition avec la dThd pour s'incorporer dans l'ADN pendant la synthèse ou la réparation de ce dernier (63, 64).

La IdUrd emprunte la voie de récupération des désoxyribonucléosides pour s'incorporer dans l'ADN. Après son transport à travers la membrane facilité par un transporteur de nucléosides, elle est phosphorylée en IdUrd monophosphate (IdUMP) par la TK (Figure 7) (65). La IdUMP peut ensuite être soit phosphorylée en IdUTP et incorporée dans l'ADN à la place de la dTTP, soit déhalogénée en désoxyuridylate (dUMP) (66, 67) et servir de substrat pour la synthèse *de novo* de dTMP par la TS. Bien que son taux d'incorporation soit plus faible que la dThd, la IdUrd peut donc s'incorporer en grande quantité dans l'ADN de cellules en divisions, et même parfois de façon stable pendant toute la vie de la cellule et de sa progéniture (68). L'incorporation de IdUrd se produit pendant la phase de synthèse de l'ADN (phase S) du cycle cellulaire (63, 64) ou pendant la réparation de l'ADN en phase G₁ suite à des dommages sublétaux de la chromatine (69). Si la IdUrd n'est pas incorporée dans l'ADN *in vivo*, elle est rapidement déhalogénée ou déglycosylée en iodouracile (66, 67).

Dans une tumeur, il y a toujours des cellules qui accomplissent un cycle cellulaire et qui sont donc susceptibles d'incorporer la IdUrd dans leur ADN lors de leur passage en phase S. Le marquage de la IdUrd avec des radioisotopes devrait donc permettre de cibler ces cellules en vue d'un diagnostic ou d'une thérapie du cancer.

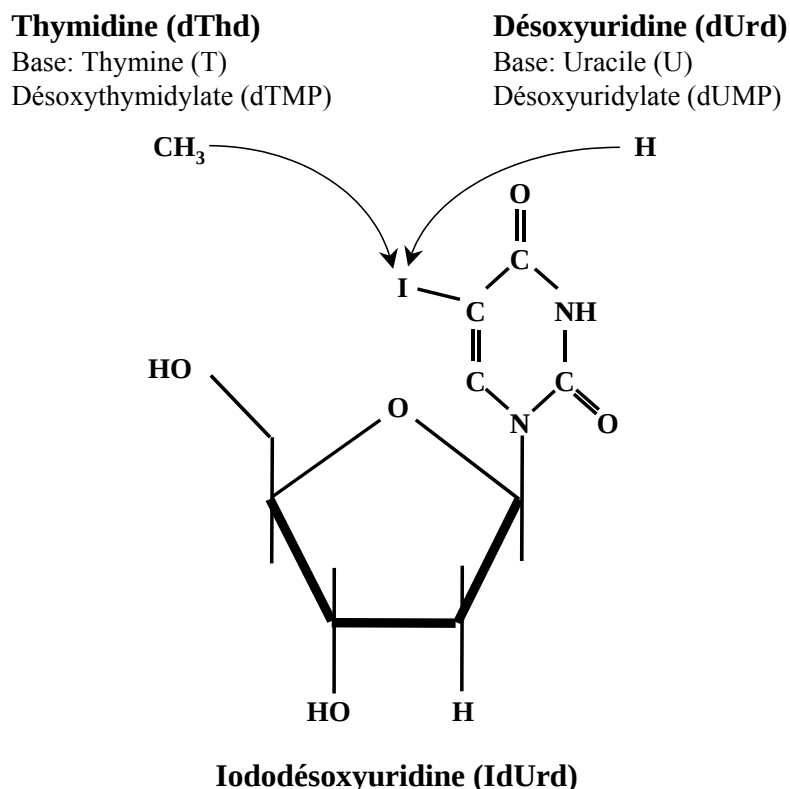


Figure 8. Structure de la 5-Iodo-2'-désoxyuridine.

2.7.1 Synthèse et radiomarquage

Comme la IdUrd possède un atome d'iode sur sa base pyrimidique, celui-ci peut être remplacé par un radioisotope de l'iode. Un radiomarquage de la IdUrd présente un grand intérêt clinique dans l'optique d'un diagnostic ou d'une thérapie de cancers à cinétique de prolifération rapide.

Lorsqu'on utilise des radioisotopes possédant une demi-vie courte, il est primordial de pouvoir synthétiser le vecteur radiomarké rapidement, afin d'éviter un déclin significatif du radioisotope et de réduire les dommages radiolytiques occasionnés sur les molécules voisines (70). Le radiomarquage de la IdUrd peut être réalisé quasi instantanément. Deux voies de synthèse sont décrites dans la littérature. Dans la première, une déstannylation est produite par oxydation d'un précurseur tributylstannyl (Bu_3SnUdR) via l'hydrogène peroxyde. Dans la deuxième, la démercuration d'un précurseur chloromercurique (ClHgUdR) est obtenue en phase aqueuse en présence de iodogène et du radioisotope. Des contrôles de qualité par HPLC ont montré que la contamination en métaux est faible et donc que ces voies de synthèse ne nécessitent aucune étape de purification supplémentaire. L'utilisation d'un précurseur mercure favorise une formulation kit, puisque le dérivé métallique est stable lorsqu'il est placé dans une solution aqueuse (71, 72).

2.7.2 Radioisotopes de l'iode

La toxicité biologique des radioisotopes se désintégrant à l'intérieur des cellules peut être attribuée aux ionisations induites par les radiations, les excitations, les transmutations chimiques et les effets de charge locale. Parmi les radioisotopes de l'iode susceptibles de marquer la IdUrd, certains présentent un intérêt clinique dans le cadre d'un diagnostic, d'autres dans le cadre d'une thérapie.

L'iode-131 ($^{131}\text{Iode}$) est un émetteur de rayonnements β^- d'une énergie maximale de 610 KeV (moy : 190 KeV) et γ de 364 KeV (80 %), avec une demi-vie de 8.05 jours. Ce radioisotope de l'iode est sans aucun doute le plus connu et le plus utilisé en clinique. Son efficacité dans le traitement de certains cancers de la thyroïde n'est plus à démontrer. D'autre part, il peut être couplé à toutes sortes de vecteurs, comme les anticorps (1-3), afin de délivrer ses puissants rayonnements β^- à proximité de la cible. La possibilité d'un suivi scintigraphique du traitement par ses rayonnements γ est aussi un atout non-négligeable (73). Toutefois, lors d'un marquage avec la IdUrd, l' $^{131}\text{Iode}$ n'est probablement pas toxique pour les cellules en division à l'intérieur desquelles il est ciblé, car ses rayonnements β^- agissent dans un rayon de 100 à 200 μm et donc 99 % de son énergie est dispersée dans les cellules environnantes (74, 75). La IdUrd marquée à l' $^{131}\text{Iode}$ semble donc appropriée pour des masses tumorales, plutôt que pour des cellules cancéreuses éparses entourées de tissu sain.

Dans le contexte d'une molécule s'incorporant directement dans l'ADN, comme la IdUrd, l'utilisation d'émetteurs Auger offre probablement une meilleure sélectivité sur les cellules en prolifération que les rayonnements β^- . En effet, une désintégration par capture d'électrons et conversion interne produit des électrons Auger de basse énergie (20 à 30 KeV), qui possèdent un rayon d'action très limité ($< 1 \mu\text{m}$), mais délivrent une très haute énergie linéaire dans la matière. Une fois donc incorporés dans l'ADN, de tels radioisotopes induisent de graves dommages aux paires de base se situant dans la proximité immédiate du site de désintégration. Il en découle, la plupart du temps, une cassure irréparable du double brin d'ADN et la mort de la cellule ciblée. Parmi les radioisotopes de l'iode, l'iode-123 et l'iode-125 sont des émetteurs Auger (Figure 9).

L'iode-125 ($^{125}\text{Iode}$) est un puissant émetteur de rayonnements Auger (21 électrons par désintégration), car il se désintègre de façon prédominante par conversion interne (93 %) (76). L'incorporation de IdUrd radiomarkée avec l' $^{125}\text{Iode}$ ($[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$) dans l'ADN cellulaire peut donc provoquer, en théorie, une cassure du double brin d'ADN par désintégration Auger (77, 78). Les résultats publiés montrent que la survie cellulaire est diminuée de façon exponentielle, sans effet d'épaule sur la courbe de survie, avec une efficacité biologique relative entre 7 et 8, c'est-à-dire de l'ordre des rayonnements α (74, 75, 79, 80). Par contre, la désintégration de l' $^{125}\text{Iode}$ dans le

cytoplasme (80, 81), dans la membrane plasmique (82) ou hors de la cellule (79, 80) ne produit pas d'effets létaux particuliers et résulte en une courbe de survie similaire à celle observée avec les rayons X, c'est-à-dire un épaulement distinct, une pente peu inclinée et une efficacité biologique relative de 1 (83). En conséquence, la [^{125}I]IdUrd est capable de provoquer d'importants dommages dans l'ADN des cellules en division, sans porter atteinte à l'intégrité des cellules environnantes qui ne se divisent pas. L'utilisation clinique de la [^{125}I]IdUrd est toutefois limitée par sa demi-vie relativement longue (60 jours) et ses rayonnements γ (35 KeV) énergétiquement trop faibles pour permettre une visualisation par caméra γ .

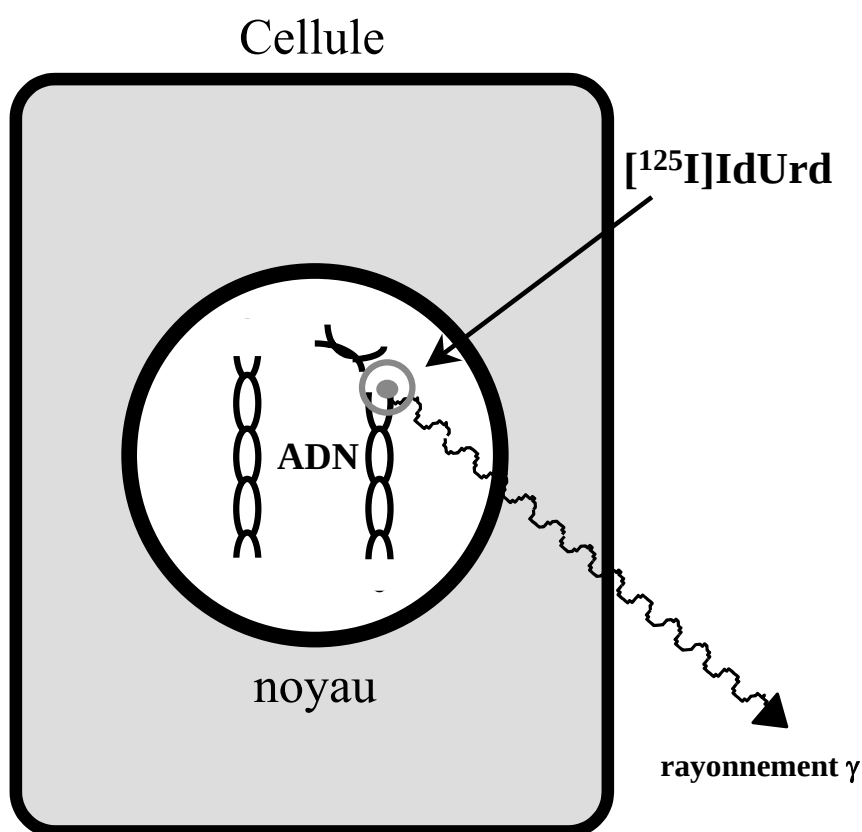


Figure 9. Cassure du double brin d'ADN par rayonnements Auger.

L'iode-123 (^{123}I) est un émetteur de rayonnements Auger et γ de 159 KeV. Ce radioisotope présente certains avantages non-négligeables par rapport à l' ^{125}I . D'une part, sa demi-vie de 13.2 h favorise un traitement plus court avec une diminution de la toxicité non-spécifique à long terme. D'autre part, ses rayonnements γ autorisent un suivi du traitement par scintigraphie. Concernant les rayonnements Auger, l' ^{123}I produit 11 électrons de basse énergie par désintégration (84). Comparé à l' ^{125}I , il faut donc deux fois plus de désintégrations d' ^{123}I pour produire autant d'électrons et donc de dégâts dans l'ADN (78, 85). L'efficacité biologique relative de l' ^{123}I avoisine les 6. Toutefois, cette efficacité moindre par rapport à l' ^{125}I est compensée

par une demi-vie plus courte qui, dans un temps donné et au même taux d'incorporation dans l'ADN, entraîne un plus grand nombre de désintégration par cellule. L'utilisation clinique de la IdUrd marquée à l' ^{123}I ode pourrait être limitée avant tout par un coût élevé, car la production d' ^{123}I ode est difficile et donc onéreuse.

L'iode-124 (^{124}I ode) est un émetteur de rayonnements γ et β^+ de 2.13 MeV, avec une demi-vie de 4.15 jours. Ce radioisotope présente essentiellement un intérêt pour le diagnostic. Une tomographie par émission de positons (TEP) offrirait une meilleure détection que les conventionnelles scintigraphies par rayonnement γ . Toutefois, ce radioisotope n'est pas non plus un pur émetteur β^+ et une étude clinique récente a montré que les rayonnements γ de la [^{124}I]IdUrd pouvaient entraver la détection tumorale en perturbant l'acquisition β^+ (86).

2.7.3 *Considérations sur une application clinique*

De précédentes études ont démontré, après administration i.v. chez l'animal, qu'une incorporation substantielle de IdUrd radiomarquée apparaissait dans les tissus à renouvellement cellulaire rapide et persistait avec une vitesse d'élimination lente (87-90). La IdUrd radiomarquée peut donc servir à cibler les cellules cancéreuses dont la prolifération est rapide. Cette molécule présente aussi certains avantages non-négligeables par rapport à d'autres vecteurs antitumoraux. D'une part, sa taille relativement petite, de 354.1 Dalton, lui permet de diffuser plus rapidement et profondément dans la tumeur, comparé, par exemple, à un anticorps environ 500 fois plus volumineux. D'autre part, son marquage avec des émetteurs Auger, comme l' ^{125}I ode ou l' ^{123}I ode, lui permet de cibler sélectivement les cellules en prolifération, avec une innocuité presque totale en dehors de l'ADN.

L'utilisation clinique de la IdUrd radiomarquée présente toutefois plusieurs limitations importantes. Premièrement, la IdUrd est instable *in vivo*, avec une demi-vie moyenne dans la circulation sanguine inférieure à 5 minutes chez l'homme (87) et 7 minutes chez la souris (91). Deuxièmement, la IdUrd radiomarquée s'incorpore indifféremment dans toutes les cellules en division, normales ou cancéreuses, entraînant, après administration par voie systémique, une toxicité élevée sur les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide, comme la moelle osseuse, la rate, l'intestin, l'estomac ou encore la peau. Enfin, la IdUrd radiomarquée n'est incorporée que dans l'ADN des cellules cancéreuses engagées en phase S du cycle cellulaire ou éventuellement dans des cellules cancéreuses procédant à des réparations de l'ADN. Ainsi, dans le cas d'une thérapie, les cellules cancéreuses se trouvant dans une autre phase du cycle cellulaire, c'est-à-dire la majorité, échappent au traitement.

Dans le cadre d'une thérapie du cancer avec la IdUrd radiomarquée, ces limitations peuvent être contournées de différentes façons. D'une part, une administration locale, intra-cavitaire, intra-tumorale ou intra-artérielle favorise l'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans les cellules tumorales et évite une trop grande dispersion dans l'ensemble de l'organisme. Mariani et col. ont montré que 15 à 50 % des cellules tumorales peuvent capter la IdUrd radiomarquée lorsque celle-ci est injectée directement dans la lésion (92). De plus, les effets secondaires sur les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide sont diminués. L'effet sélectif sur la tumeur est d'autant plus marqué que les cellules environnant la tumeur se divisent peu ou pas du tout. D'autre part, une infusion continue ou séquentielle de IdUrd radiomarquée permet de cibler les cellules tumorales au fur et à mesure qu'elles s'engagent en phase S du cycle cellulaire. Kassis et col. ont montré qu'une infusion intracérébrale de [¹²⁵I]IdUrd sur plusieurs jours permettait de supprimer la tumeur dans 10 à 20 % des rats porteurs de gliosarcomes 9L (93).

Les propriétés diagnostiques et thérapeutiques de la IdUrd radiomarquée ont été évaluées dans plusieurs modèles animaux de glioblastome, de carcinome méningéal, de cancer de la vessie ou encore de tumeur ovarienne sous forme d'ascites (94). Plus récemment, des résultats concernant la IdUrd radiomarquée ont été rapportés dans des patients souffrant de cancer colorectal, gastrointestinal, du cerveau, des poumons, de la vessie, et aussi de métastases hépatiques du cancer colorectal (95). Ces études montrent que l'utilisation clinique de la IdUrd radiomarquée est plus particulièrement appropriée pour les cancers à cinétique de prolifération cellulaire rapide, comme les glioblastomes (86, 96, 97).

2.7.4 Les glioblastomes comme cibles potentielles

La IdUrd radiomarquée pourrait se révéler particulièrement efficace pour traiter des tumeurs agressives par infusions locales, continues ou répétées. Ces conditions sont réunies dans le cadre du traitement de tumeurs primaires du cerveau. En effet, ces tumeurs sont associées à une croissance rapide, une faible différenciation, une augmentation du nombre de cellules malignes, de mitoses, de nécroses et de prolifération vasculaire. Par opposition, l'environnement intracrânien, isolé du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique, est essentiellement constitué de cellules quiescentes (98, 99). Les tumeurs primaires du cerveau proviennent, la plupart du temps, de la dégénérescence maligne de cellules gliales. D'origine ectodermique, les cellules gliales sont deux fois plus nombreuses que les neurones dans le système nerveux et peuvent se diviser encore plusieurs années après la naissance de l'organisme. Elles sont classifiées en astrocytes de type 1 et 2, oligodendrocytes, microglie, cellules épendymaires, auxquelles s'ajoutent les cellules de Schwann du système nerveux

périphérique. Ces cellules ne conduisent pas de potentiel d'action, mais encadrent les neurones dans leur fonction, en les nourrissant, recyclant les neurotransmetteurs, isolant les axones avec la myéline, synthétisant des hormones, etc... Les tumeurs d'origine astrocytaires, plus spécifiquement les astrocytomes de grade III/IV et les glioblastomes multiformes de grade IV, constituent plus de 40 % des tumeurs intracrâniennes primaires. Elles sont associées à un très mauvais pronostic clinique et touchent environ 6 personnes sur 100'000 par an, avec une moyenne d'âge de 55 ans seulement. Actuellement, les traitements utilisés sont l'administration antioedémateuse de stéroïdes (ex : dexaméthasone), la chirurgie, la radiothérapie (plus de 60 Gy) et la chimiothérapie (ex : procarbazine, vincristine, BCNU, etc...). Ce type de tumeur n'engendre pas de métastases extracrâniennes. Cependant, elles progressent par infiltration dans le tissu cérébral, si bien qu'une résection chirurgicale complète de la tumeur sans destruction de tissu vital est rarement possible. Cette limitation, combinée avec une faible tolérance du cerveau pour la radiothérapie et une forte résistance de la tumeur aux chimiothérapies existantes (100), conduit à un taux élevé de récurrence et une perte de contrôle de la croissance tumorale (101). Les patients finissent par mourir d'une hernie cérébrale causée par l'augmentation de la pression intracrânienne quand la tumeur atteint 250 à 300 grammes.

L'absence de traitement efficace contre les tumeurs primaires du cerveau, en particulier les glioblastomes, rend toute nouvelle stratégie thérapeutique attractive. Le potentiel thérapeutique de la IdUrd radiomarquée a donc été le centre d'intérêt de plusieurs études récentes sur les tumeurs cérébrales. Des autoradiographiques dans des rats porteurs des tumeurs du cerveau montrent que la IdUrd radiomarquée est incorporée sélectivement dans l'ADN de la glie néoplasique et ne touche pas le tissu normal (93, 96). Une administration locale de [125 I]IdUrd pourrait ainsi cibler les cellules tumorales sans effets secondaires sur le cerveau normal.

2.8 Objectifs du Travail

Ce travail s'inscrit dans l'optique d'un diagnostic ou d'une thérapie des glioblastomes par la IdUrd radiomarquée. L'administration de IdUrd radiomarquée lors d'une thérapie se ferait dans la cavité postopératoire après résection de la tumeur, alors que le diagnostic se ferait par injection systémique. Ce travail avait donc pour but d'évaluer la faisabilité d'un diagnostic ou d'une thérapie des glioblastomes par la IdUrd radiomarquée. L'incorporation dans l'ADN et les effets radio-cytotoxiques de la IdUrd marquée à l' 125 Iode ([125 I]IdUrd) ont été évalués *in vitro* dans trois lignées cellulaires humaines de glioblastomes. Ces lignées ont été choisies en fonction de leur expression différentielle du gène *p53* : la lignée U87 est homozygote de type sauvage ; la lignée

LN229 est hétérozygote ; la lignée U251 est homozygote de type mutant. Comme p53 induit un arrêt en phase G₁ tardive du cycle cellulaire en présence de dommages dans l'ADN, afin de permettre sa réparation ou l'apoptose, ces lignées pouvaient réagir différemment aux dommages causés par les rayonnements Auger de la [¹²⁵I]IdUrd. Dans une seconde étape, la biodistribution de la [¹²⁵I]IdUrd a été analysée dans la tumeur et les tissus sains de souris nues xénogreffées avec les mêmes lignées humaines de glioblastomes.

Comme l'utilisation clinique de la IdUrd radiomarquée est limitée par sa dégradation rapide dans la circulation sanguine et par son incorporation tumorale restreinte aux cellules cancéreuses en phase S, différentes stratégies ont été étudiées pour augmenter son taux d'incorporation dans l'ADN des cellules cancéreuses. Alors qu'une augmentation de l'intensité du marquage par cellule est préférable dans le cadre d'un diagnostic, une thérapie nécessite plus spécifiquement l'augmentation du nombre de cellules cancéreuses ciblées par la IdUrd radiomarquée. Cette augmentation peut être obtenue de différentes façons : 1) en favorisant l'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN ; 2) en stimulant les cellules cancéreuses à s'engager en phase S ; 3) en rendant les cellules cancéreuses plus accessibles à la IdUrd radiomarquée.

Dans ce travail, une première approche a été d'inhiber les enzymes impliquées dans la synthèse endogène de dThd, afin de favoriser l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN par la voie de récupération des nucléotides. La dihydrofolate réductase, dont la réaction catalyse la synthèse du méthylène-tétrahydrofolate, le donneur du groupe méthyle dans la synthèse *de novo* de dTMP, peut être bloquée par l'aminoptérine ou le méthotrexate. Des expériences ont été réalisées ici avec le méthotrexate. Toutefois, les résultats n'ont pas été concluants, car le méthotrexate paraissait bloquer irréversiblement les cellules, avant même qu'elles aient pu incorporer la IdUrd radiomarquée dans leur ADN. Une autre possibilité était d'inhiber directement la synthèse *de novo* de dTMP par le 5-fluorouracile (5-FU) ou la 5-fluoro-2'-désoxyuridine (FdUrd). Cette approche n'était pas nouvelle. Cependant, elle a été abordée essentiellement dans une optique thérapeutique. Plusieurs études ont montré qu'il n'était pas toujours possible d'augmenter la toxicité de la IdUrd radiomarquée par la FdUrd ou le 5-FU, même si l'incorporation nucléaire de IdUrd radiomarquée était augmentée (102-108). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour en expliquer la raison. D'une part, la FdUrd ou le 5-FU augmenterait l'incorporation de IdUrd dans l'ADN des cellules qui sont déjà en phase S, sans augmenter le nombre de cellules en phase S. D'autre part, la FdUrd et le 5-FU bloqueraient définitivement toutes les cellules après qu'elles aient incorporé la IdUrd dans leur ADN, si bien que la toxicité de la IdUrd radiomarquée ne ferait que se superposer à celle de la FdUrd. Dans ce dernier

cas, l'utilisation de l'¹³¹Iode devrait se révéler plus appropriée, puisque ses rayonnements β^- devraient permettre de toucher les cellules environnantes qui n'ont pas été ciblées par la FdUrd ou la IdUrd radiomarquée. Dans tous les cas, cependant, l'augmentation de l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN après inhibition de la TS reste intéressante dans une optique diagnostique. Les résultats présentés dans ce travail démontrent que l'injection combinée de IdUrd radiomarquée avec de faibles concentrations de FdUrd peut améliorer grandement la détection scintigraphique de tumeurs greffées sur des souris nues (109, 110).

Dans une approche thérapeutique plus directe, cette fois-ci, il a été observé dans ce travail que l'administration combinée de IdUrd radiomarquée et non-marquée permettait non seulement d'augmenter l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN, mais aussi sa cytotoxicité (111). Ces résultats étonnants étaient en contradiction avec d'autres résultats publiés, qui montraient que l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN était inhibée compétitivement par la IdUrd non-marquée (112, 113). Toutefois, l'augmentation de l'incorporation de IdUrd radiomarquée par l'administration de IdUrd non-marquée a été confirmée *in vitro* dans trois différentes lignées humaines de glioblastomes et *in vivo* dans des souris nues xénogreffées (114). L'étude des mécanismes sous-jacents semble indiquer que des concentrations micromolaires de IdUrd non-marquée pourraient stimuler plus de cellules à s'engager en phase S au moment du traitement avec la IdUrd radiomarquée. Cette constatation a amené à s'interroger si la disponibilité de précurseurs de l'ADN ne pouvait pas être un facteur limitant pour la prolifération cellulaire.

Une troisième partie du travail a donc consisté à évaluer le potentiel de différents mélanges de désoxyribonucléosides pour stimuler les cellules cancéreuses à entrer en phase S et incorporer la IdUrd radiomarquée dans leur ADN. Les résultats ont montré que l'abondance de précurseurs joue effectivement un rôle dans l'entrée des cellules en phase S. En effet, le taux d'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN était augmentée *in vitro* par l'administration d'un mélange de désoxyribonucléosides dans les trois lignées de glioblastomes testées. L'effet était d'autant plus marqué que les cellules étaient confluentes. De plus, la composition du mélange en désoxyribonucléosides semblait influencer sa capacité à promouvoir l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN (115).

Une autre approche cherchant à moduler la synthèse des nucléotides précurseurs de l'ADN n'a pas donné de résultats concluants. La ribonucléotide réductase réduit les ribonucléotides en provenance de l'ARN en désoxyribonucléotides destinés à l'ADN. Son inhibition par la fluoro-méthyl-désoxycytidine devrait donc favoriser l'utilisation de désoxyribonucléosides exogènes pour la synthèse d'ADN.

Cependant, l'administration combinée de désoxyribonucléosides et de fluoro-méthyl-désoxycytidine n'a pas permis d'augmenter l'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN au-delà de ce qui était obtenu avec un mélange de désoxyribonucléosides seul. La division cellulaire était là aussi probablement bloquée.

En définitive, cette étude translationnelle propose de nouvelles stratégies pour optimiser l'utilisation diagnostique ou thérapeutique de la IdUrd radiomarquée dans le cadre des glioblastomes. Certaines propositions font déjà l'objet d'une étude clinique pour la détection scintigraphique de tumeur chez des patients atteints de glioblastomes.

Chapitre 3

Méthodologie Générale

3.1 Radiomarquage de la IdUrd

Différentes voies de synthèse ont été proposées dans la littérature (71, 72) : l'une d'entre elles passe par la déstannylation d'un précurseur tri-butyl-stannyl par oxydation via l'hydrogène peroxyde ; une autre passe par la démercuration d'un précurseur chloro-mercurique placé en phase aqueuse en présence de iodogène et du radioisotope. Un contrôle de qualité par HPLC montre que la contamination en métaux est faible et donc que ces voies de synthèse ne nécessitent aucune étape de purification supplémentaire.

Dans le cadre de ce travail, la [^{125}I]IdUrd (activité spécifique de 74 TBq/mmol, 2000 Ci/mmol) et la [^3H]dThd (activité spécifique de 2.5 à 3 TBq/mmol, 70 à 85 Ci/mmol) ont été obtenues d'Amersham International (Buckinghamshire, Grande-Bretagne). Un marquage de la IdUrd avec l' $^{123,125}\text{I}$ ode a aussi été développé à partir du précurseur tri-butyl-stannyl 2'-désoxyuridine (Bu_3SndUrd) pour les études dosimétriques en vue d'une étude clinique.

Le Bu_3SndUrd était produit à partir de 500 mg (1.41 mmol) de IdUrd dissout sous azote à 50°C dans 40 ml de 1,4-Dioxane. Le mélange était refroidi à température ambiante et 1.6 ml (3.1 mmol) de Bis(tributyltine) et 50 mg (0.04 mmol) de Tétrakis(triphényl-phosphine)palladium étaient ajoutés. Le mélange était chauffé à 105°C sous azote pendant la nuit. Après évaporation, le culot était purifié par chromatographie sur colonne (gel Silica, chloroforme / méthanol à 92:8; $R_f = 0.23$). La fraction contenant le Bu_3SndUrd était collectée et le solvant était enlevé au moyen d'un flux d'azote à température ambiante, et contrôlé par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire.

Pour le marquage de la IdUrd avec l' $^{123,125}\text{I}$ ode, des tubes recouverts d'un film très fin de iodogène étaient préalablement préparés par évaporation sous flux d'air d'une solution de chloroforme contenant 200 μg de iodogène. Les tubes étaient ensuite scellés et stockés à -20°C. Le jour du marquage, 100 μg de Bu_3SndUrd étaient dissous dans 20 μl d'éthanol, puis 20 μl de tampon phosphate 0.1 M à pH=8 et 25 μl d'une solution de $\text{Na}^{123,125}\text{I}$ ode (74 MBq) étaient ajoutés. Ce mélange était vortexé et transféré dans un tube de verre recouvert de iodogène. L'activité restante dans le premier tube était dissoute dans 50 μl de tampon phosphate et ajoutée dans le tube recouvert de iodogène. Le remplacement du résidu Bu_3Sn par l'iode radioactif était obtenu par une

incubation de 20 min dans la glace. La réaction d'oxydation était rapide et quasi quantitative. La solution radiomarquée était ensuite transférée dans une seringue. Le tube était lavé avec 400 µl de NaCl 0.9 %, de manière à récolter l'activité restante et la transférer également dans la seringue. La solution finale était injectée dans un tube de microcentrifugation de 1.5 ml et acidifiée à pH=3 avec 20 µl d'acide acétique froid.

La [$^{123,125}\text{I}$]IdUrd était ensuite purifiée sur une colonne stérile échangeuse d'ions afin d'obtenir un produit final de qualité clinique (rétention de Bu₃SnUdR, dUrd, Iode). La solution était injectée dans une cartouche SepPac RP-18 activée (10 ml d'éthanol, 20 ml d'air, 20 ml de NaCl 0.9 %), lavée avec 5 ml de NaCl 0.9 % et le liquide restant était enlevé par passage de 20 ml d'air. La [$^{123,125}\text{I}$]IdUrd était éluée de la cartouche avec 2 ml d'éthanol / NaCl 0.9 % à 20:80. Enfin, 100 µl de tampon phosphate stérile 0.15 M à pH=7 étaient ajoutés pour ajuster le pH à 7, et la solution restante était passée à travers un filtre stérile MILEX de 0.22 µm.

Cette procédure de synthèse et de purification modifiée par rapport au protocole publié (72) a permis d'obtenir de la [$^{123,125}\text{I}$]IdUrd à une pureté radiochimique > 99.9 %, alors que la [^{125}I]IdUrd obtenue commercialement n'était pure qu'à 80 - 90 %. De plus, le produit était stable pendant 3 semaines à 4°C.

3.2 Contrôle de Qualité du Radiomarquage

Le contrôle de qualité de la pureté radiochimique de la [^{125}I]IdUrd a été effectué au moyen d'un analyseur linéaire automatique pour chromatographie sur couche mince (TLC) (Tracemaster 20 de Berthold, Allemagne). Cet appareil détecte les électrons au moyen d'un gaz composé à 90 % d'argon et 10 % de méthane (Carbagas, Genève) sous haute tension (1'380 V), à débit moyen de 0.5 l/h et pression de 3 bars. Les échantillons d'une activité de 0.5 à 4 µCi (= 12'500 à 100'000 cps) sont déposés sur une phase solide PEI cellulose F de Merck (Allemagne) et migrent dans une phase mobile de bicarbonate d'ammonium 0.2 M. Dans les expériences, > 80 % de la radioactivité était associée à la fraction de IdUrd radiomarquée (Figure 10). Comme le marquage de la [^{125}I]IdUrd obtenue d'Amersham International (Buckinghamshire, Grande-Bretagne) n'était pas stable, la solution stock n'était pas utilisée au-delà de 3 semaines, c'est-à-dire en dessous de 80 % de marquage.

Pour le marquage de la IdUrd avec l' ^{123}I ode au moyen du précurseur Bu₃SndUrd, un contrôle de qualité par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) a été effectué au moyen d'un système Varian 5000 équipé d'un détecteur Varian UV-100 et d'un détecteur de radioactivité Berthold LB 507 B (Allemagne). Un échantillon de 20 µl était injecté sur une colonne LiChoCART 250-4 remplie de Lichrospher-100 RP-18 (5 µm). La phase mobile était constituée d'un gradient de deux

solvants permettant le contrôle du pH : (A) acide acétique dans l'eau à 0.1 % ; (B) méthanol. Les conditions de gradient étaient : de 0 à 10 min, 20 % B ; de 10 à 20 min, 50 % B ; de 20 à 30 min, 100 % B. Le flux était de 1 ml/min.

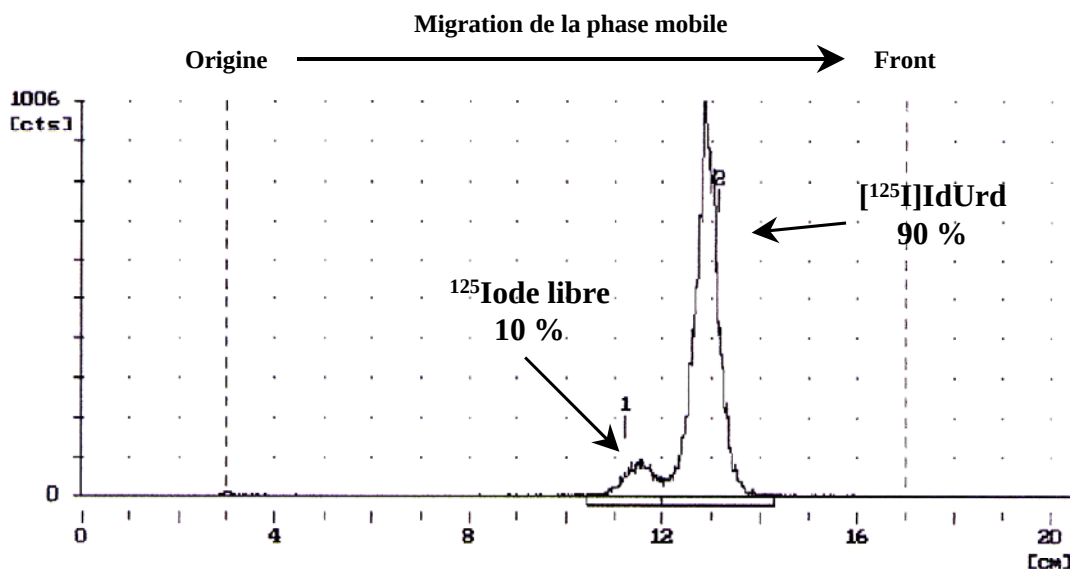


Figure 10. Contrôle de qualité de la pureté radiochimique de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ au moyen d'une TLC

3.3 Lignées Cellulaires et Conditions de Culture

Trois lignées cellulaires humaines de glioblastomes ont été choisies en fonction de leur expression différentielle du gène *p53* : U87, homozygote de type sauvage (American Type Culture Collection) ; LN299, hétérozygote (Div. de Neurochirurgie, Hôpitaux Universitaires de Genève) ; U251, homozygote de type mutant (American Type Culture Collection). Ces lignées ont été xénogreffées dans des souris nues suisses homozygotes *nu/nu* afin d'obtenir des cellules libres de tout mycoplasme. Les cellules ont été ensuite mises en culture sous forme de monocouche dans des flacons de 10 ml (Costar, Cambridge, USA) à 37°C dans une atmosphère humidifiée, de 95 % d'air et 5 % de CO₂. Le milieu de culture 1640 du Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) était complété avec 10 % de sérum de veau fœtal inactivé par chauffage (FCS), 2 mM de *L*-glutamine (0.3 g/l), 10 unités/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine (tout de GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA). Afin de maintenir les cellules en phase exponentielle, elles étaient lavées deux fois par semaine dans un tampon salin phosphate (PBS) et incubées pendant 5 min en présence de 2.5 ml de trypsine-EDTA 1x (GIBCO

BRL, Grand Island, NY, USA). Une fois les cellules détachées du fond du flacon, la réaction était stoppée par adjonction de 7.5 ml de milieu RPMI 1640 complet. Les cellules étaient récoltées dans des tubes de 15 ml, centrifugées à 500 x g, diluées et transférées à nouveau dans des flacons contenant 10 ml de milieu RPMI 1640 complet. Le temps de dédoublement cellulaire dans les flacons de culture, mesuré par comptage quotidien sur une semaine, était de 25.3 ± 0.8 h pour U251, 34.5 ± 0.6 h pour LN229 et 34.6 ± 2.8 h pour U87.

3.4 Évaluation de la Cytotoxicité

3.4.1 *Essais Colorimétriques MTT*

La méthode est un test non-clonogénique développé par Mosmann et col. (116) et modifié par Denizot et col. (117). Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la capacité des cellules à réduire un composé tétrazolium, le Bromure de 3-(4-5 diméthylthiazol-2-yl)-diphényl tétrazolium (MTT) en formazan bleu par les déshydrogénases mitochondriales présentes uniquement dans les cellules vivantes métaboliquement actives. Le produit absorbe fortement vers 570 nm. Il est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques. Sous condition contrôlée, l'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Cependant, pour de nombreuses lignées cellulaires tumorales, ce test ne permet pas la distinction de cytotoxicité au-delà de 1 log (118).

Les cellules étaientensemencées dans des plaques de 96 puits à fond plat (Costar, Cambridge, USA) contenant 200 µl de milieu. Le test de toxicité n'était effectué qu'une fois les cellules en phase exponentielle. Après traitement, le milieu de culture était remplacé par du milieu sans sérum ni indicateur de pH, contenant 50 µg de MTT (Sigma catalogue n° M2128). Les plaques étaient ensuite incubées dans une étuve pendant 4 heures à 37 °C. En fin d'incubation, le milieu contenant le MTT était aspiré avec précaution au moyen d'une aiguille, pour ne pas perturber les cristaux formés. Les puits étaient à nouveau remplis avec 150 µl de DMSO (Merck, Darmstadt, Allemagne) et incubés pendant 30 minutes à 37 °C. Après agitation vigoureuse, la lecture des plaques se faisait à une longueur d'onde de 570 nm sur un compteur ELISA Anthos htII (Kontran Instruments, Salzburg, Autriche). La longueur d'onde de référence était fixée à 630 nm et la valeur de calibrage à 1.99 ou 1.00 si les échantillons étaient fortement colorés.

3.4.2 *Essais Clonogéniques*

Comme la toxicité de la [125 I]IdUrd ne se traduit pas par une lyse immédiate des cellules et que ces dernières peuvent subsister plusieurs jours avant d'être détruites, il a

fallu ajouter aux essais colorimétriques MTT un test tenant compte de la capacité des cellules à former des colonies (119). Ce test n'a toutefois pas pu être réalisé sur la lignée U87, car ces cellules ne forment pas de colonies mais se dispersent sur les boîtes de Pétri en milieu aqueux.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à fond plat (Costar, Cambridge, USA) contenant 1 ml de milieu. Le test de toxicité était entrepris 3 à 5 jours plus tard, lorsque les cellules étaient attachées au fond des puits et en phase exponentielle. Le traitement consistait en une incubation de 6 à 72 h à 37°C en présence de l'agent cytotoxique (généralement la [¹²⁵I]IdUrd). Les puits étaient ensuite lavés 2 fois avec du PBS froid. Les cellules étaient détachées avec 200 µl de trypsine-EDTA 1 x, centrifugées, remises en suspension dans du milieu normal, et comptées. Un nombre approprié de cellules, produisant entre 30 et 300 colonies, selon un test préliminaire, était ensuiteensemencé dans des boîtes de Pétri de 100 x 20 mm (Falcon, Becton Dickinson U. K.) contenant 10 ml de milieu normal. Après 14 jours d'incubation dans une étuve à 37°C, le milieu était ôté, les boîtes étaient lavées avec du PBS froid, puis colorées avec une solution de 0.5 % de cristal violet dans du méthanol : acide acétique (3:1, v/v). Après rinçage des boîtes avec de l'eau, les colonies bleues contenant 50 cellules ou plus étaient comptées. Chaque condition était répétée 3 à 4 fois dans une expérience et chaque expérience était répétée au moins 3 fois. La fraction de survie (S/So) était calculée par rapport aux puits contrôles non-traités.

3.5 Test d'Incorporation dans l'ADN

Le taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd ou de [³H]dThd dans l'ADN des cellules en culture a été mesuré par comptage de la radioactivité associée à l'ADN. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à fond plat (Costar, Cambridge, USA) contenant 1 ml de milieu RPMI 1640 complet. Le test d'incorporation était entrepris 3 à 5 jours plus tard, lorsque les cellules étaient attachées au fond des puits et, généralement, en phase exponentielle. Les cellules étaient incubées pendant un temps déterminé –généralement 4 h– en présence de 18.5 kBq/ml (0.5 µCi) de [¹²⁵I]IdUrd ou de [³H]dThd. L'effet de pré- ou co-incubations avec d'autres substances (ex : dThd, IdUrd, FdUrd, etc...) sur l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd ou de [³H]dThd dans l'ADN était ensuite déterminé selon un protocole publié (106) : à la fin de l'incubation avec la [¹²⁵I]IdUrd ou la [³H]dThd, les puits étaient rincés 3 fois, 1 fois avec du milieu RPMI 1640 et 2 fois avec une solution tampon phosphate (PBS), afin d'enlever toute trace de radioactivité non spécifique libre et de FCS. Les cellules étaient ensuite détachées des puits par incubation de 10 min dans 0.2 ml de trypsine-EDTA 1 x. L'action de la trypsine-EDTA était stoppée par resuspension des cellules dans 0.2 ml de milieu RPMI

1640 complet. Après avoir bien remué le milieu pour l'homogénéiser, un échantillon de 10 µl était prélevé pour le comptage cellulaire sous microscope au moyen d'un hématocytomètre. Les cellules restantes étaient transférées dans un tube de centrifugation de 5 ml et lysées par addition de 0.4 ml de NaOH 1N. L'ADN était précipité par centrifugation à 2500 g pendant 20 min après addition de 0.4 ml d'acide trichloro-acétique (TCA) 10 %. La moitié supérieure du contenu du tube (0.6 ml) constituant la moitié du surnageant était prélevée. La moitié inférieure était considérée comme l'autre moitié du surnageant + le sédiment contenant l'ADN. La radioactivité associée à l'ADN était obtenue par la différence de radioactivité mesurée entre les deux fractions au moyen d'un compteur γ (Cobra QC 5002, Packard, US) pour la [125 I]IdUrd et d'un analyseur par liquide de scintillation (Tri-Carb 2500 TR, Packard, US) pour la [3 H]dThd, après addition de 10 ml de liquide de scintillation (Ultima GoldTM, Packard, US) par échantillon mesuré. La radioactivité associée à l'ADN était ensuite divisée par le nombre de cellules dans les puits déterminé par comptage sous microscope avec hématocytomètre (MBq/cellule).

3.6 Cytofluorométrie en Flux

La cytofluorométrie en flux a été utilisée pour déterminer le taux de marquage des cellules avec la IdUrd en corrélation avec les différentes phases du cycle cellulaire. Le principe de cette technique est similaire au microscope à fluorescence conventionnel, à la différence que les cellules sont en suspension dans un milieu salin. Afin d'assurer une illumination homogène de l'échantillon, les cellules sont injectées dans une veine dans laquelle elles subissent une pression différentielle, appelée focalisation hydrodynamique, qui les aligne au centre de la veine et les entraîne, une par une, devant un faisceau laser. Chaque cellule interceptée par le faisceau laser émet des signaux de diffusion et/ou de fluorescence acquise par un marquage préalable, qui sont corrélés à ses propriétés morphologiques et fonctionnelles. Ces signaux sont dissociés par un jeu de filtres optiques et de miroirs, captés par des photo-détecteurs, amplifiés, transformés en signaux électriques et numérisés. Les signaux émis par chaque cellule sont analysés et stockés au moyen d'un système informatique.

Dans ce travail, une analyse à deux paramètres de fluorescence a été utilisée. Les brins d'ADN étaient marqués avec l'iodure de propidium (PI) (Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse) et l'index de marquage de la IdUrd avec un anticorps monoclonal murin anti-BrdUrd cross-réactif avec la IdUrd (Cat. n°347680, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Ce dernier était lui-même ciblé par un anticorps ovin anti-IgG murin conjugué avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Cat. n°F26543, Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse). Les cellules étaientensemencées dans des flacons contenant 10 ml

de milieu complet. Une fois en croissance optimale, elles étaient incubées pendant 1 h à 37°C avec 10 µM de IdUrd, de façon à marquer un maximum de cellules en phase S. Les substances étudiées (ex : dThd, IdUrd, FdUrd, etc...) étaient pré- ou co-administrées avec la IdUrd. Après l'incubation, les cellules étaient lavées 2 fois avec du PBS contenant 0.5 % d'albumine de sérum bovin (BSA), afin d'enlever toute substance non-incorporée dans l'ADN. Les cellules étaient ensuite détachées par trypsinisation, récoltées, comptées sous microscope, puis centrifugées pendant 15 min à 500 x g. Le culot était resuspendu dans du PBS 1 x dans la glace et déversé goutte-à-goutte, sous vortex, dans des tubes préalablement remplis avec 5 ml d'éthanol 70 % à -20°C, jusqu'à une concentration finale de 1 à 100 x 10⁶ cellules. Après une incubation de 30 min dans la glace, les cellules fixées étaient centrifugées pendant 10 min à 500 x g et 10°C, puis le surnageant était aspiré avec précaution. Le culot était défait sous vortex et 1 ml d'une solution fraîchement préparée de HCl 2 N / BSA 0.5 % / PBS était ajoutée goutte-à-goutte dans les tubes sous vortex. Les cellules étaient incubées pendant 30 min à température ambiante dans cette solution afin de dénaturer les molécules d'ADN en simple brin. Après centrifugation de 10 min à 500 x g, le culot était resuspendu dans 1 ml de sodium borate 0.1 M (Na₂B₄O₇) à pH = 8.5. Cette solution neutralisante était enlevée des tubes après une nouvelle centrifugation de 10 min à 500 x g. À cette étape, les cellules étaient soit stockées à -20°C dans l'éthanol 70 %, soit incubées pendant 30 min à température ambiante dans 1 ml d'une solution tampon de Tween-20 0.5 % / BSA 0.5 % / PBS, à laquelle était ajoutée 20 µl de l'anticorps anti-BrdUrd pour 1 x 10⁶ cellules. Après une centrifugation de 5 min à 500 x g, les cellules étaient à nouveau incubées pendant 30 min à température ambiante dans 50 µl de la solution tampon Tween-20 0.5 % / BSA 0.5 % / PBS, à laquelle était ajoutée 1 µg de l'anticorps anti-IgG marqué au FITC. Après une dernière centrifugation de 5 min à 500 x g, le culot était resuspendu dans 1 ml de PBS 1x contenant 5 µg/ml de PI. L'intensité du marquage de l'ADN au PI permet de déterminer si la cellule a dupliqué ses chromosomes et donc franchi la phase S pour se retrouver en phase G₂ avant la mitose. Après une dernière incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité, les échantillons cellulaires étaient analysés par cytofluorométrie en flux (FacScan) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm. La fluorescence verte liée au FITC, c'est-à-dire à la IdUrd, était analysée à travers un filtre « bandpass » de 514 nm et la fluorescence rouge du PI, c'est-à-dire de l'ADN, à travers un filtre de longueur d'onde de 600 nm.

3.7 Souris et Modèle de Tumeur

Les souris nues suisses mâles homozygotes *nu/nu*, obtenues de Iffa Credo (L'Abresle, France), ont été maintenues dans des conditions aseptisées. La nourriture et la literie étaient autoclavées et les manipulations étaient effectuées sous flux laminaire.

Toutes les expériences ont été pratiquées selon la législation suisse et approuvées par l'Office vétérinaire cantonal (VD). L'implantation des lignées humaines de glioblastomes, U251, LN229 et U87 dans les souris a été réalisée à partir de cellules en phase exponentielle récoltées par trypsinisation et resuspendues dans un milieu sans sérum. Une suspension de 5×10^6 cellules était inoculée par injection sous-cutanée (s.c.) dans le flanc droit de souris âgées de 7 à 9 semaines. Après le développement des tumeurs, ces dernières étaient transplantées d'un animal à l'autre au moyen d'un trocart permettant la xénogreffe d'environ 30 mm^3 de tumeur fraîchement excisée. Les expériences n'étaient réalisées que sur des animaux porteurs de tumeurs transplantées au moins deux fois après l'inoculation initiale. Trois à quatre semaines après la xénogreffe, les souris étaient assignées aux différents groupes expérimentaux en fonction du volume de leur tumeur (environ 100 à 500 mm^3 ou 0.1 à 0.5 g), de façon à obtenir un volume moyen équivalent pour chaque groupe d'environ 0.3 g .

3.8 Biodistributions

L'effet de pré- ou co-administrations de diverses substances (ex : dThd, IdUrd, FdUrd, etc...) sur l'incorporation de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans les tumeurs et les tissus sains a été évalué par des expériences de biodistribution sur souris xénogreffées avec les lignées humaines de glioblastomes, U87, LN229 et U251. Un à trois jours avant l'expérience, les biberons étaient remplis d'eau contenant 0.2 g/l d'iodure de potassium (KI), de façon à saturer la thyroïde et bloquer l'incorporation d' ^{125}I libre lors du traitement. Chaque expérience comprenait des groupes expérimentaux de 3 à 6 animaux, incluant les groupes contrôles respectifs. Les substances à administrer étaient préalablement diluées dans du NaCl, puis injectées par voie intra-péritonéale (i.p.) ou intraveineuse (i.v.) dans la queue. Les animaux subissaient, soit des pré-traitements par injections répétées i.p. de 0.1 ml ou i.v. de 0.2 ml des substances à tester, suivies d'une injection i.v. de 250 kBq ($6.76 \mu\text{Ci}$) / 0.2 ml de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$, soit des co-injections i.v. avec $250 \text{ kBq}/0.2 \text{ ml}$ de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$. Les souris contrôles subissaient un traitement simulé consistant en des injections i.v. ou i.p. de NaCl suivies par une injection i.v. de $250 \text{ kBq}/0.2 \text{ ml}$ de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule. Bien que l'incorporation de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ se produise dans les minutes qui suivent son administration, une expérience préliminaire sur 11 animaux sacrifiés à 6 h après l'injection i.v. de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ a montré que la cinétique d'élimination de l'activité non-spécifique était lente. Dans les expériences suivantes, le sacrifice des animaux par inhalation de gaz carbonique a donc été repoussé à 24 h après l'injection i.v. de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$, de façon à minimiser le bruit de fond et déceler les tissus en division par une concentration élevée de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$. Environ 0.5 à 1 ml de sang était retiré de la veine hépatique avant la dissection. La tumeur, le foie, les reins, les poumons, la rate, le cœur, le muscle, le fémur, la peau, l'estomac, le petit

intestin, le gros intestin, la queue, le cerveau et la thyroïde étaient ensuite prélevés et pesés. Le tube digestif était évidé avant l'analyse et le fémur était nettoyé soigneusement de tout tissu. Tous les organes prélevés, de même que le reste de la carcasse, étaient pesés et leur radioactivité analysée au moyen d'un compteur γ (Packard, Cobra QC 5002). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu. Dans les calculs dosimétriques, la radioactivité associée à la moelle osseuse a été extrapolée à partir de la mesure du fémur. La radioactivité dans la moelle du fémur, dont la cellularité ne varie pas avec l'âge (120), est en fait communément utilisée comme référence pour la radioactivité dans la moelle osseuse (121), car cette dernière ne peut être extrapolée à partir de l'activité du sang périphérique où le nombre de cellules en division est moindre (122). Chez le rat, le fémur a été rapporté comme représentant 26 % de la radioactivité de la moelle osseuse (123).

3.9 Évaluation du Perchlorate de Potassium

La capacité du perchlorate de potassium (KClO_4) à bloquer la sécrétion d'iode libre dans l'estomac et sa réabsorption dans l'intestin, et donc à accélérer son élimination rénale, a été évaluée dans une expérience de biodistribution d' ^{131}I ode libre. Les souris ont été réparties en deux groupes de 5 animaux. Les deux groupes ont reçu une eau de boisson contenant 0.2 g/l de KI. Cependant, l'eau de boisson de l'un des deux groupes contenait en plus, 2 g/l de KClO_4 . Au bout de 24 h, les souris ont reçu une injection i.v. dans la queue de 600 kBq (16.2 μCi) d' ^{131}I ode dissout à partir d'une capsule thérapeutique (Mallinckrodt Medical, Pays-Bas). Un comptage corps-entier a été effectué toutes les heures après l'injection, afin de déterminer la courbe d'élimination du radioisotope. Quatre heures après l'injection, les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO_2 et disséquées pour évaluer la radioactivité restante dans les tissus et dans le contenu du tube digestif, au moyen d'un compteur γ (Packard, Cobra QC 5002).

3.10 Histologie et Autoradiographie

Une étude histologique et autoradiographique a été menée afin d'évaluer la cytotoxicité et l'influence de différents traitements sur le profil de distribution de la [^{125}I]IdUrd dans la tumeur et l'intestin, ce dernier ayant été choisi comme modèle de tissu sain à renouvellement cellulaire rapide. Après dissection des souris ayant subi les différents traitements, les tumeurs et les intestins étaient congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C . Des échantillons étaient découpés en cryosections de 5 μm et fixés sur des lames dans un tampon PBS / 4 % paraformaldéhyde à pH=7.4. Après coloration

des noyaux cellulaires avec l'hématoxiline et du cytosol avec l'éosine, les coupes tissulaires étaient déshydratées par bains successifs dans des concentrations croissantes d'éthanol (30 – 100 %) et de xylol, puis montées sur éokit, photographiées et exposées pour autoradiographie pendant une semaine à -80°C . Les films étaient ensuite développés et scannés, et les photographies traitées avec le logiciel Adobe PhotoShop[®] 5.5.

3.11 Extraction de l'ADN de la Tumeur et de l'Intestin

Le taux de radioactivité dans la tumeur et l'intestin qui est effectivement associé à l'ADN a été évalué par extraction de l'ADN de ces tissus. Après dissection des souris ayant subi les différents traitements, les tumeurs et intestins étaient collectés et incubés pendant 4 h à 55°C dans 0.5 ml d'un tampon Tris-EDTA contenant 10 % de sodium dodécyl sulfate et 25 μl de protéinase K à 20 mg/ml (Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse). Après digestion, l'extraction d'ADN était obtenue par addition de 0.5 ml d'un mélange de phénol, chloroforme et isoamyl-éthanol (25:24:1) et centrifugation pendant 10 min dans une micro-centrifugeuse à haute vitesse. Le surnageant était ensuite récolté dans un tube contenant 1.5 volumes de isopropanol, puis centrifugé pendant 5 min pour précipiter l'ADN. Après prélèvement du surnageant, le culot contenant l'ADN était resuspendu dans un tampon Tris-EDTA (124). Toutes les fractions collectées étaient analysées séparément au moyen d'un compteur γ (Cobra QC 5002, Packard, US). La radioactivité contenue dans l'ADN était comparée à celle obtenue dans les autres fractions collectées.

3.12 Activité Enzymatique de la TS et la TK

Certaines drogues inhibant la synthèse *de novo* de dThd ont été utilisées dans ce travail pour favoriser l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN à travers la voie de récupération des nucléotides. Plus particulièrement, deux enzymes ont été ciblées : la thymidylate synthétase (TS) et la thymidine kinase (TK). Les protocoles ci-dessous permettent d'évaluer l'activité de ces enzymes après un traitement donné. Dans ce travail, leur application n'a toutefois pas donné lieu à des résultats concluants.

Après traitement des souris nues, les tumeurs étaient pulvérisées avec un auto-pulvérisateur sous azote liquide. Elles étaient ensuite homogénéisées à 0°C avec 10 volumes de tampon Tris-HCl 5 mM à $\text{pH} = 7.5$, contenant 0.1 mM de EDTA, 1 mM de mercaptoéthanol et 0.25 M de sucrose à la concentration finale. L'homogénat était centrifugé pendant 1 h à 4°C et $105'000 \times g$. Le surnageant était utilisé comme préparation enzymatique.

Activité enzymatique de la TS : L'activité enzymatique de la TS a été déterminée par la méthode de Dunlap et col. (58). La solution de test (0.7 ml) consistant en un tampon de phosphate de potassium 0.1 M à pH=6.8, contenant 5 mM de NaF, 1mM de *L*-5,10-méthylène-tétrahydrofolate et 1 µl de 5-[³H]dUMP (10.6 Ci / mmol; Amersham, UK) était incubée avec la préparation enzymatique à 34 °C pendant 10 min. La réaction était ensuite stoppée par addition de 0.1 ml de HClO₄ 10 % (v/v). Après adjonction de 0.2 ml de Norit A 8 % w/v, le mélange était centrifugé pendant 10 minutes à 4°C et 1'500 x g et 0.2 ml de surnageant était mélangé avec 5 ml de produit scintillant (Ultima GoldTM, Packard, US). La radioactivité dans le surnageant était comptée au moyen d'un analyseur par liquide de scintillation (Tri-Carb 2500 TR, Packard, US).

Activité enzymatique de la TK : L'activité de la TK a été déterminée par la méthode de Taylor et col. (125). La solution test (0.2 ml) consistant en 5 mM de MgCl₂, 10 mM d'ATP, 2 µl de [³H]dThd (Amersham International, Buckinghamshire Grande-Bretagne) et 0.1 mM de tampon Tris-HCl à pH=7.5 était incubée avec la préparation enzymatique à 34°C pendant 15 min. La réaction était stoppée en portant à ébullition la solution test, et 0.1 ml du surnageant était déposé sur un carré de papier de DEAE-cellulose de 1.8 x 1.8 cm. Le papier était successivement lavé avec 1 mM d'ammonium formate et du méthanol, puis séché et inséré dans un tube contenant du produit scintillant (Ultima GoldTM, Packard, US). La radioactivité dans le tube était comptée au moyen d'un analyseur par liquide de scintillation (Tri-Carb 2500 TR, Packard, US). L'activité enzymatique était normalisée par rapport aux concentrations en protéines de la tumeur et divisée par la valeur moyenne de l'activité enzymatique dans la tumeur non-traitée.

3.13 Marquage de l'Apoptose par test «TUNEL»

La dégradation de l'ADN est considérée comme l'événement biochimique clé de l'apoptose. Elle se produit par clivage de l'ADN nucléaire en fragments d'oligonucléosomes. La fragmentation de l'ADN génomique est mise en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose et marquage avec la [³H]dThd ou la BrdUrd. Le principe de cette méthode repose sur la migration de l'ADN en fonction de son poids moléculaire, élevé lorsque l'ADN est intact et léger lorsque l'ADN est fragmenté. Bien que couramment utilisée, cette méthode ne permet pas de suivre le destin d'une cellule individuelle dans une population cellulaire donnée ou une section tissulaire. L'utilisation du test «TUNEL» (en anglais : TdT-mediated dUTP-X nick end labeling), fourni par Boehringer (Cat n° 1 684 809 ou 817 Mannheim, Allemagne), offre cet avantage. Les terminaisons 3' des simples ou doubles brins d'ADN sont prolongées par

un polymère de dUTP marqué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). La réaction est catalysée par l'enzyme transférase désoxyribonucléotide terminale (TdT) qui reconnaît les terminaisons –OH des brins d'ADN. Les cellules apoptotiques sont ainsi reconnues individuellement, sous microscope à fluorescence, par leur apparence caractéristique due à la condensation et la fragmentation de la chromatine nucléaire. Il est encore possible d'augmenter la visualisation de la fragmentation d'ADN par un marquage avec un anticorps anti-FITC conjugué avec l'alkaline phosphatase ou la peroxydase, suivi de la réaction avec le substrat correspondant. Cependant, dans ce travail, la localisation de la fragmentation d'ADN dans les coupes histologiques s'est limitée à un marquage par fluorescence FITC. Le test TUNEL a permis d'évaluer la cytotoxicité de certaines combinaisons de traitement sur la tumeur et l'intestin, ce dernier ayant été choisi comme modèle de tissu sain à renouvellement cellulaire rapide.

Après dissection des souris ayant subi les différents traitements, les tumeurs et les intestins étaient congelés dans l'azote liquide et conservés à –80°C. Des échantillons étaient découpés en cryosections de 5 µm, fixés sur des lames dans du méthanol froid à –20°C pendant 5 min et lavés 2 fois dans du PBS pendant 5 min. Les tissus étaient ensuite perméabilisés par incubation des coupes pendant 1 min dans un tampon citrate 0.1 % à pH=6. Après 2 lavages successifs de 5 min dans du PBS, les coupes étaient imprégnées de 15 µl de la solution enzymatique, contenant la TdT (TUNEL enzyme), et de 135 µl de la solution substrat, contenant la dUTP marquée au FITC (TUNEL label). Chaque expérience incluait un contrôle positif obtenu après digestion aléatoire de l'ADN par la DNAase Q1 (20 µl/coupe) et un contrôle négatif obtenu après incubation avec la solution substrat (TUNEL label) en l'absence de l'enzyme TdT (TUNEL enzyme). Pour que la réaction enzymatique se produise dans des conditions optimales, les coupes étaient recouvertes d'une lamelle et placées à l'obscurité dans une chambre humide pendant 30 min à 37°C. Après 3 nouveaux lavages de 5 min dans du PBS, les coupes étaient incubées pendant 1 min dans l'iodure de propidium (PI) (Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse), afin de marquer l'ADN total. Une fois montées sous lamelle, les coupes étaient analysées par microscope à fluorescence. L'intensité de fluorescence rouge (PI) indiquait indirectement, par marquage de l'ADN total, la densité cellulaire, alors que la fluorescence verte (FITC) localisait les cellules apoptotiques par marquage de l'ADN fragmenté. La superposition des deux couleurs permettait de quantifier la fragmentation de l'ADN par rapport au nombre de cellules présentes dans la coupe.

3.14 Scintigraphies

Comme certains traitements ont permis d'améliorer nettement dans les expériences de biodistribution, le rapport tumeur sur tissus sains pour l'incorporation de [^{125}I]IdUrd, des scintigraphies corps-entier ont été réalisées sur des souris ayant reçu les mêmes traitements, afin de vérifier si ces résultats se traduisaient par une amélioration de la détection tumorale.

Un à trois jours avant le traitement, les biberons étaient remplis avec 500 ml d'eau contenant 100 mg d'iodure de potassium afin de saturer la thyroïde et, dans certaines expériences, de 1 g de perchlorate de potassium afin de bloquer la sécrétion d' ^{125}I ode au niveau de l'estomac et sa réabsorption dans l'intestin. Les souris homozygotes *nu/nu* xénogreffées avec la lignée LN229 étaient ensuite traitées par une ou deux injections i.v. de FdUrd ou de dThd suivies par une injection i.v. de 3.7 MBq (100 μCi) de [^{125}I]IdUrd. À différents temps après l'injection i.v. de [^{125}I]IdUrd, les souris étaient anesthésiées au moyen d'injections i.p. de Kétasol-50 (0.4 ml/kg) (Gräub AG, Berne, Suisse) et de tri-bromo-éthanol (6 mg/souris) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et une scintigraphie était réalisée au moyen d'une caméra γ (Toshiba GCA 9300 UI) équipée d'un collimateur à haute résolution pour les basses énergies (LEHR-parallel). La fenêtre d'énergie était fixée manuellement à 35 Kev, c'est-à-dire au niveau de l'énergie de l' ^{125}I ode. L'acquisition avec une matrice de 512 x 512 durait environ 10 min. La scintigraphie pouvait être répétée plusieurs fois, à différents temps, sur le même animal. Afin de mesurer précisément la distribution de la [^{125}I]IdUrd, les souris étaient sacrifiées par inhalation de gaz carbonique après l'acquisition de la dernière image et une biodistribution était réalisée selon le protocole précédemment décrit.

3.15 Estimation dosimétrique

Les doses de rayonnements Auger et γ auxquelles serait exposé un patient lors d'une scintigraphie avec la [^{125}I]IdUrd combinée à un prétraitement de FdUrd ont été extrapolées à partir des études de biodistributions chez la souris. Les valeurs d'énergie des rayonnements Auger, incluant aussi bien les transitions Coster-Kronig que super-Coster-Kronig ont été déterminées au moyen de simulations de Monte-Carlo (126). Le calcul dosimétrique des rayonnements Auger s'est limité aux tissus à renouvellement cellulaire rapide, susceptibles d'incorporer le radioisotope dans l'ADN. Le pourcentage de radioactivité tissulaire associé à l'ADN a été fixé à 80 % pour l'estomac, l'intestin, la moelle osseuse, les testicules et la tumeur (tissus à potentiel de division cellulaire élevé) et 60 % pour la rate et la peau (tissus ne montrant qu'une incorporation modérée 24 h après l'injection de [^{125}I]IdUrd) (127). Les autres tissus, comme le foie où moins de 1 % de la radioactivité est associé à l'ADN 16 h après l'injection de la [^{125}I]IdUrd (127),

n'ont pas été pris en considération. L'activité cumulée de la IdUrd radiomarquée a été calculée sous réserve que les cellules incorporent de façon stable la IdUrd et ne se divisent pas pendant le temps de désintégration du radioisotope:

$$\text{Activité cumulée dans l'organe (Bq} \cdot \text{seconde)} = \int a_0 e^{-\lambda t} \cdot f/p \cdot dt$$

Où : a_0 représente l'activité dans l'organe au temps 0 équivalente à celle mesurée à 24 h; f est la fraction de l'activité tissulaire incorporée dans l'ADN; p représente la pureté radiochimique de la [^{125}I]IdUrd en pourcents.

La dose de rayonnements Auger absorbée a ensuite été calculée en Gy à partir de facteurs publiés ou extrapolés (128): 0.107×10^{-14} Gy/Bq·s pour la moelle osseuse (1,120 g); 0.68×10^{-14} Gy/Bq·s pour la rate (176 g); 0.8×10^{-14} Gy/Bq·s pour l'estomac (150 g); 0.113×10^{-14} Gy/Bq·s pour l'intestin (1,000 g); 0.021×10^{-14} Gy/Bq·s pour la peau (5,600 g). Les doses équivalentes pour les effets déterministes et stochastiques ont été calculées à partir de facteurs de pondération, respectivement 10 et 20, recommandés par un groupe d'experts (83). Alors que les effets stochastiques sont caractérisés par une probabilité d'occurrence à long-terme proportionnelle à la dose délivrée, les effets déterministes se traduisent, à partir d'un certain seuil d'exposition, par une sévérité proportionnelle à la dose. Ces derniers n'impliquent que les cellules qui ont incorporé la IdUrd radiomarquée (environ 10 %) et qui ont donc absorbé une dose environ 10 fois plus élevée que la dose moyenne absorbée dans le tissu. Dans les cellules V79, la courbe de cytotoxicité de la [$^{123,125}\text{I}$]IdUrd incorporée dans l'ADN s'est révélée être exponentiellement proportionnelle à la dose de rayonnements Auger, sans présence d'épaulement (79, 85). Les doses équivalentes tissulaires ont été multipliées par un facteur de pondération standard de 0.2 pour les gonades, 0.12 pour la moelle osseuse, l'intestin et l'estomac, 0.05 pour la rate et 0.01 pour la peau. La dosimétrie des rayonnements γ a été calculée par extrapolation à partir de biodistributions effectuées à différents temps après injection de [^{125}I]IdUrd et correction pour la demi-vie physique différente de l' ^{123}I ode. La cinétique d'élimination du contenu intestinal en iode radioactif a été calculée au moyen d'un modèle gastrointestinal de MIRDose 3.1 (129), avec des fractions sécrétée dans l'estomac et réabsorbée par l'intestin, respectivement, de 0.13 et 0.9, reflétant le comportement de l'iode radioactif (130, 131). De même, un modèle de vessie dynamique de MIRDose 3.1 a été utilisé pour calculer la cinétique d'élimination de l'iode radioactif dans l'urine, avec une fraction excrétée fixée à 0.9, le reste étant incorporé dans l'ADN, et une demi-vie biologique de 5 h avec miction toutes les 3 h.

Chapitre 4

$[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et Fluorodésoxyuridine

4.1 Résumé

L'utilisation de nucléotides radiomarqués pour l'imagerie tumorale est limitée par leur dégradation biologique rapide et leur faible taux d'incorporation dans l'ADN. Cette étude avait donc pour but d'évaluer si une inhibition de la synthèse de thymidine (dThd) par la 5-fluoro-2'-désoxyuridine (FdUrd) pouvait améliorer une scintigraphie avec des analogues radiomarqués de la dThd, tels que la 5- $[^{125}\text{I}]\text{iido-2'-désoxyuridine}$ ($[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$). Les résultats ont montré *in vitro* qu'une co-incubation avec FdUrd augmentait substantiellement l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et de $[^3\text{H}]\text{dThd}$ dans l'ADN des trois lignées humaines de glioblastomes testées. Une analyse par cytofluorométrie en flux a montré qu'une co-incubation de courte durée avec FdUrd (1 h) augmentait l'intensité du signal par cellule marquée. Une biodistribution 24 h après injection i.v. de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ a ensuite été mesurée dans des souris nues xénogreffées s.c. avec les trois lignées de glioblastomes. Comparée à une injection i.v. de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule, une pré-administration i.v. de 10 mg/kg de FdUrd pendant 1 h augmentait de 4.8 à 6.8 fois l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans les trois tumeurs. Aucun effet secondaire n'était observé sur les souris jusqu'à deux mois après un tel traitement. L'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans la tumeur était même augmentée jusqu'à 13.6 fois quand la pré-administration de FdUrd était réduite par palier jusqu'à 1.1 mg/kg. L'augmentation de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ était plus faible (entre 1.7 et 5.8 fois) dans les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide (ex : moelle osseuse, rate, intestin) et négligeable dans les tissus quiescents. Une extraction d'ADN a montré que 72 à 80 % de la radioactivité dans la tumeur et l'intestin étaient associés à l'ADN. Une scintigraphie a été réalisée à différents temps après injection i.v. de 3.7 MBq de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans des souris xénogreffées. La détection de la tumeur était améliorée significativement après pré-administration de FdUrd, alors qu'elle restait équivoque 24 h après l'injection de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule. De plus, l'activité non spécifique était grandement réduite par une administration de KClO_4 en addition au KI dans l'eau de boisson. En conclusion, ces résultats indiquent qu'une pré-administration de FdUrd pourrait améliorer une scintigraphie par émission de photons ou une tomographie par émission de positons au moyen des traceurs de la division cellulaire, comme la IdUrd ou d'autres analogues radiomarqués de la dThd.

4.2 Introduction

Malgré le développement de nouvelles technologies, telle l'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou la tomographie par émissions de positons (TEP) avec le [^{18}F]fluorodésoxyglucose ([^{18}F]FDG), l'évaluation de la réponse au traitement et le dépistage de foyers cancéreux récurrents après chirurgie ou radiothérapie restent souvent difficiles pour les tumeurs malignes du cerveau. Récemment, plusieurs études se sont intéressées au développement d'une imagerie clinique basée sur la dThd ou des analogues marqués avec des radioisotopes, comme la [^{11}C]dThd (6, 132-134), la [^{18}F]FdUrd (135), la [^{76}Br]BrdUrd (127, 136, 137) ou encore la [^{124}I]IdUrd (86). Parmi ces analogues, la IdUrd est d'un grand intérêt car elle peut être marquée instantanément avec des radioisotopes de l'iode émettant des rayonnements γ ou β^+ et ayant une demi-vie courte (71, 72). Cependant, l'utilisation de la IdUrd radiomarkée, tout comme celle de tout autre analogue de la dThd, est limitée par un faible taux d'incorporation dans la tumeur et une dégradation rapide *in vivo*, entraînant une importante activité résiduelle d'iode radioactif (86, 87). Dans le but de contourner ces limitations, ce travail s'est intéressé à la capacité de la FdUrd, un autre analogue des nucléotides, à augmenter l'incorporation de IdUrd radiomarkée dans l'ADN en inhibant la synthèse *de novo* de dThd (138). Tout comme le 5-fluorouracile, la FdUrd, après conversion en FdUMP, inhibe la thymidylate synthétase (TS) en agissant comme substrat non convertible. La concentration intracellulaire de dTTP est consécutivement réduite et la IdUrd, après phosphorylation en IdUTP à travers la voie de récupération des nucléotides, peut remplacer la dTTP dans l'ADN. D'autres groupes ont déjà travaillé sur cette idée dans une optique thérapeutique et observé des résultats équivoques où l'augmentation de l'incorporation nucléaire de IdUrd radiomarkée n'était pas toujours accompagnée par une augmentation proportionnelle de cytotoxicité (102-108). Au vu de ces observations, il se peut qu'une courte administration de FdUrd pourrait augmenter la quantité de [^{125}I]IdUrd incorporée par cellule, sans toutefois augmenter le nombre de cellules en phase S précoce qui incorporent la [^{125}I]IdUrd. Ainsi, l'utilisation combinée de FdUrd et IdUrd radiomarkée ou un autre analogue de la dThd devrait permettre d'améliorer l'intensité du signal dans une intention diagnostique. Des expériences ont donc été entreprises dans le but d'évaluer la capacité de la FdUrd à augmenter l'incorporation nucléaire de la IdUrd radiomarkée et améliorer son potentiel diagnostique comme marqueur de la prolifération tumorale. Les résultats *in vitro* ont été confirmés par la suite *in vivo* dans des souris nues xénogreffées s.c. avec les mêmes lignées de glioblastomes, suggérant ainsi que ces observations peuvent être utiles pour une application clinique.

4.3 Matériel et Méthodes

Produits.

- La [125 I]IdUrd (activité spécifique de 74 TBq/mmol, 2000 Ci/mmol) et la [3 H]dThd (activité spécifique de 2.5 - 3 TBq/mmol, 70 - 85 Ci/mmol) ont été obtenues d'Amersham International (Buckinghamshire, Grande-Bretagne).
- La FdUrd, la dThd et la IdUrd non-marquée ont été obtenues de Fluka Chemie AG (Buchs, Suisse). Les solutions stock ont été préparées dans de l'eau distillée à une concentration de 5 mM et conservées à -80°C . La dissolution de la IdUrd dans l'eau distillée a nécessité l'adjonction de 0.1 μM NaOH avant de rétablir le pH à 7.6 avec du HCl.

Méthodes.

- Le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd et de [3 H]dThd dans l'ADN a été évalué après des pré- ou co-incubations de 4 h avec FdUrd.
- La cytotoxicité combinée de la [125 I]IdUrd et la FdUrd a été évaluée après des traitements de 12 à 48 h au moyen d'essais colorimétriques MTT.
- L'influence d'une incubation de 1 ou 4 h avec FdUrd sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été analysée par cytofluorométrie en flux à 2 paramètres.
- Des biodistributions à 0.5, 6 et 24 h après l'injection de [125 I]IdUrd ont été effectuées sur des souris xénogreffées ayant reçu un total de 1.1 à 30 mg/kg de FdUrd administrés soit en 2 injections i.v. 60 et 30 min avant l'injection de [125 I]IdUrd, soit en 8 injections i.p. entre 240 et 30 avant l'injection de [125 I]IdUrd.
- Des biodistributions à 6 h après l'injection de [125 I]IdUrd ont été effectuées sur des souris xénogreffées ayant reçu soit un traitement seul de 1 mg/kg de FdUrd 30 min avant l'injection i.v. de [125 I]IdUrd, soit un co-traitement de 1mg/kg de FdUrd et 20 mg/kg de dThd 30 min avant la co-injection i.v. de [125 I]IdUrd et 40 mg/kg de dThd.
- La capacité du KClO_4 à accélérer l'élimination rénale d'iode libre a été évaluée par comptage corps-entier toutes les heures et biodistribution effectuée 4 h après l'injection i.v. de 600 kBq (16.2 μCi) d' ^{131}I ode libre.
- Le taux de radioactivité associé à l'ADN a été mesuré après extraction de l'ADN de la tumeur et l'intestin de souris xénogreffées ayant reçues une injection i.v. de [125 I]IdUrd avec ou sans pré-traitement de 3.3 mg/kg de FdUrd.
- Une étude histologique et autoradiographique, ainsi qu'un marquage in situ du fractionnement de l'ADN, ont été réalisés afin d'évaluer la cytotoxicité et

l'influence des différents traitements avec FdUrd sur le profil de distribution de la [^{125}I]IdUrd dans la tumeur et l'intestin.

- Des scintigraphies corps-entier ont été réalisées sur des souris xénogreffées après injection i.v. de 3.7 MBq (100 μCi) de [^{125}I]IdUrd avec ou sans pré-traitement de FdUrd, afin de vérifier si l'augmentation de l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans la tumeur, comparée aux tissus sains, se traduisait par une amélioration de la détection tumorale.

Analyse statistique.

- Les résultats ont été exprimés en pourcentages ou moyennes $\pm$ 1 déviation standard (DS). Les valeurs ont été analysées au moyen d'un test t bilatéral de variance égale. Le seuil de signification statistique a été fixé à $p = .05$. Les symboles *, **, *** représentent respectivement $p < .05$, $p < .01$, $p < .001$.

4.4 Résultats

4.4.1 Modulation de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et $[^3\text{H}]\text{dThd}$ dans l'ADN par la FdUrd

L'incorporation nucléaire de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ a été évaluée en présence de différentes concentrations de FdUrd sur les 3 lignées cellulaires de glioblastomes. Comme précédemment décrit (106), l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN était plus rapide et linéaire pendant les premières 4 à 5 h d'incubation. Elle ralentissait ensuite, pour décliner après 10 h. Les expériences *in vitro* ont donc été réalisées avec un temps d'incubation de 4 h sur des cellules en phase exponentielle.

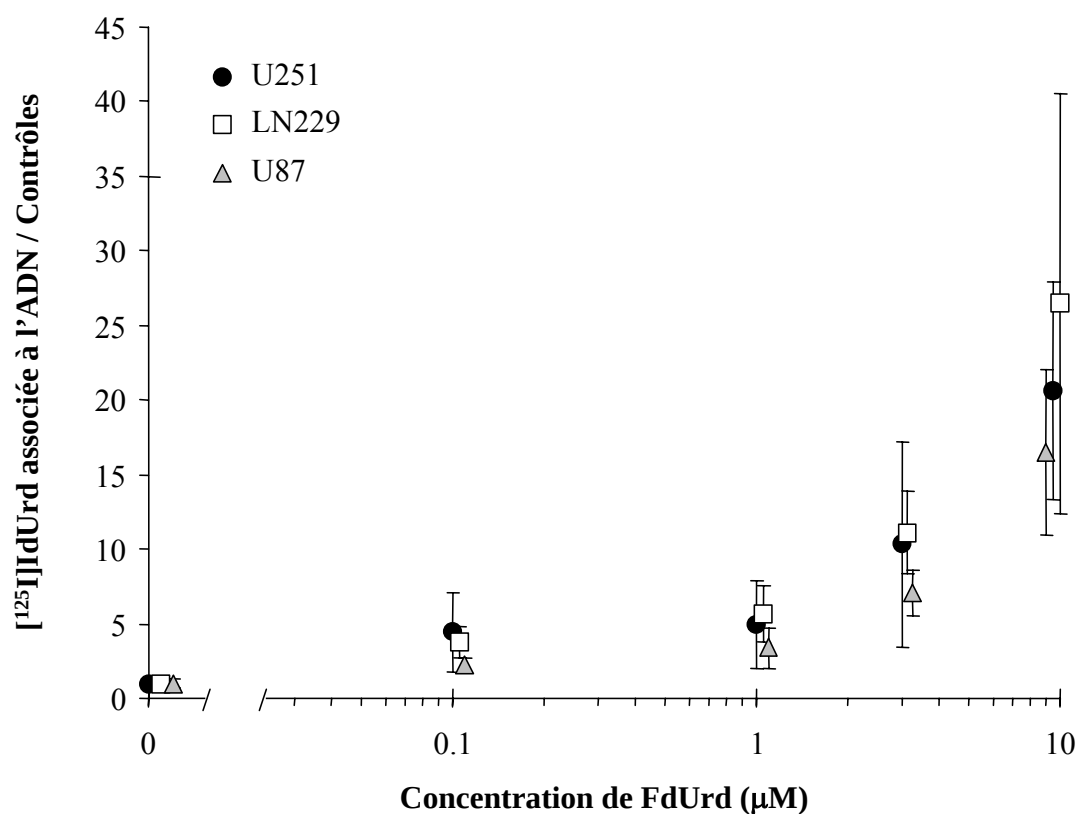


Figure 11. Incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN en présence de FdUrd. Les cellules U251, LN229 et U87 ont été co-incubées pendant 4 h avec 18.5 kBq/ml de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et 0.1 à 10 μM de FdUrd. Les symboles représentent la moyenne $\pm$ 1 DS d'au moins 3 expériences par lignée cellulaire, comprenant 3 à 4 échantillons par condition testée. Les résultats de chaque expérience ont été normalisés par rapport à un groupe contrôle de 3 à 4 échantillons incubés pendant 4 h avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule.

En accord avec le temps de dédoublement respectif des lignées cellulaires, l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ la plus élevée était observée dans les cellules U251 (0.92 mBq/cellule), alors que l'incorporation était environ trois fois plus faible dans les

cellules LN229 et U87 (0.32 et 0.26 mBq/cellule, respectivement). Une co-incubation avec FdUrd augmentait l'incorporation de [125 I]IdUrd proportionnellement à la concentration de FdUrd. Comparée à une incubation avec seulement 18.5 kBq/ml (0.5 μ Ci/ml) de [125 I]IdUrd, une co-incubation avec 10 μ M de FdUrd augmentait le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd en moyenne de 16.7 à 26.2 fois, selon la lignée cellulaire (Figure 11). Une préincubation de 4 h avec FdUrd avant l'incubation avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd, était moins efficace.

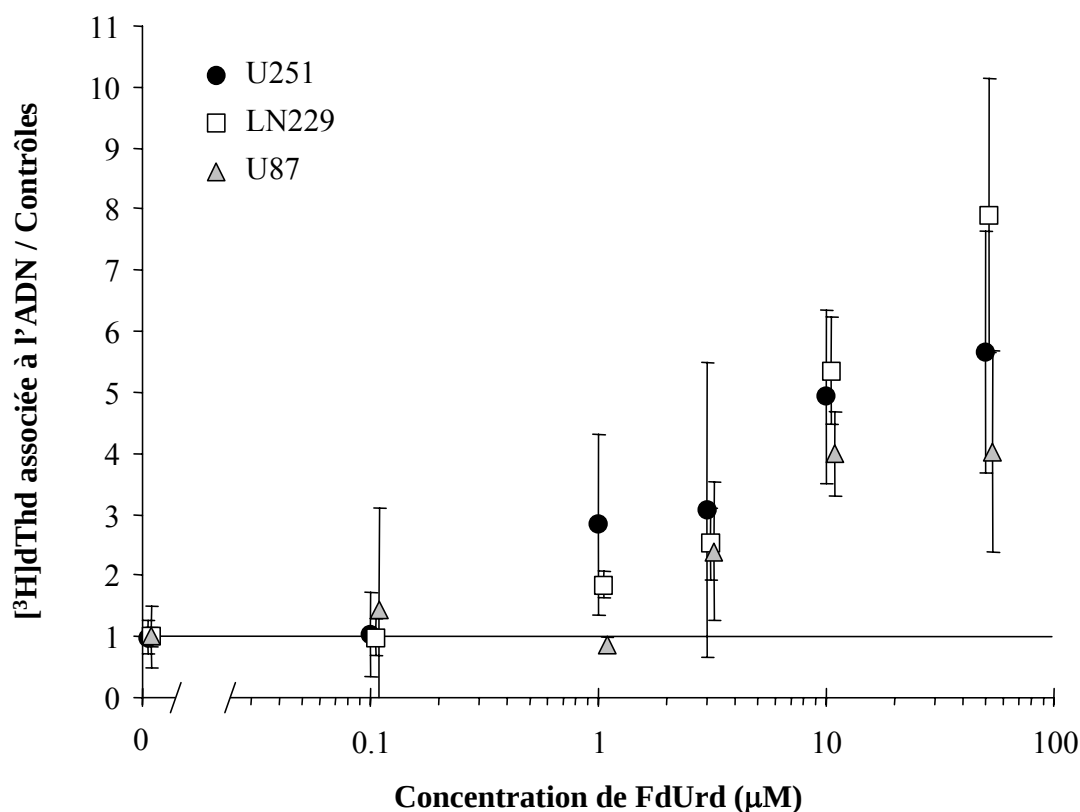


Figure 12. Incorporation de [3 H]dThd dans l'ADN en présence de FdUrd. Les cellules U251, LN229 et U87 ont été co-incubées pendant 4 h avec 18.5 kBq/ml de [3 H]dThd et 0.1 à 50 μ M de FdUrd. Les symboles représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 3 échantillons par condition testée, normalisés par rapport à un groupe contrôle de 3 échantillons incubés pendant 4 h avec la [3 H]dThd seule.

Les résultats obtenus avec la [125 I]IdUrd ont été reproduits avec le nucléotide physiologique [3 H]dThd. Le taux d'incorporation de [3 H]dThd dans l'ADN était augmenté significativement de 4.0 à 5.4 fois, selon la lignée cellulaire, en présence de 10 μ M de FdUrd. L'augmentation de l'incorporation de la [3 H]dThd dans l'ADN était toutefois moindre que celle observée avec la [125 I]IdUrd (Figure 12).

4.4.2 Modulation de la cytotoxicité de la [125 I]IdUrd par la FdUrd

Des essais colorimétriques MTT ont été réalisés sur les trois lignées cellulaires, afin de déterminer si la FdUrd pouvait moduler la cytotoxicité de la [125 I]IdUrd. Les résultats montrent qu'une co-incubation avec 10 μ M de FdUrd ne permettait pas de

moduler significativement la cytotoxicité de doses de 0.37 à 37 kBq de [¹²⁵I]IdUrd dans les trois lignées cellulaires (Tableau 2). D'autres expériences exposant les cellules à des concentrations de 0.1 à 50 µM de FdUrd et 18.5 kBq de [¹²⁵I]IdUrd ont abouti à la même conclusion. Toutefois, les essais colorimétriques MTT ne permettent pas d'évaluer pleinement la cytotoxicité de la [¹²⁵I]IdUrd, car beaucoup de cellules peuvent survivre un certain temps et même se diviser après avoir incorporé la [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN. C'est pourquoi, des essais clonogéniques ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales que les essais colorimétriques MTT. Les résultats ont confirmé qu'une co-incubation avec la FdUrd ne permet pas de moduler la cytotoxicité de la [¹²⁵I]IdUrd.

Tableau 2. Cytotoxicité de la [¹²⁵I]IdUrd mesurée par essais colorimétriques après co-traitement de 48 h avec 10 µM de FdUrd

[¹²⁵ I]IdUrd (kBq)	U251		LN229		U87	
	Contrôles ^a	FdUrd ^b	Contrôles	FdUrd	Contrôles	FdUrd
0	0.27±0.03	0.22±0.03	0.23±0.03	0.20±0.01	0.23±0.02	0.18±0.03
0.37	0.29±0.03	0.22±0.03	0.31±0.04	0.25±0.05	0.24±0.01	0.19±0.03
1.85	0.21±0.02	0.16±0.03	0.21±0.01	0.19±0.03	0.17±0.03	0.15±0.03
3.70	0.18±0.02	0.14±0.01	0.17±0.02	0.16±0.02	0.15±0.01	0.13±0.01
18.5	0.17±0.02	0.15±0.03	0.21±0.02	0.17±0.03	0.13±0.02	0.13±0.02
37.0	0.10±0.02	0.09±0.01	0.10±0.03	0.11±0.02	0.08±0.05	0.08±0.01

Les résultats représentent la moyenne ± 1 DS de la densité optique mesurée dans 4 puits après marquage des cellules métaboliquement actives par le MTT.

^a Incubation de 48 h avec seulement la [¹²⁵I]IdUrd.

^b Incubation de 48 h avec la [¹²⁵I]IdUrd et 10 µM de FdUrd.

4.4.3 Distribution dans le cycle cellulaire après exposition courte ou prolongée à la FdUrd

Une analyse par flux cytométrique à double fluorescence a été réalisée pour évaluer si l'augmentation de l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd ou de [³H]dThd par la FdUrd était associée à des changements dans le cycle cellulaire.

Les différentes phases du cycle cellulaire étaient révélées par fluorescence PI et par marquage de la IdUrd par un anticorps anti-BrdUrd cross-réactif et reconnu par un anticorps anti-souris marqué au FITC. Comparée à une incubation de 1 h avec 10 µM de IdUrd seule (Figure 13A), une co-incubation de 1 h avec 10 µM de FdUrd augmentait de 3.6 fois (intensité moyenne : 1,240) le signal FITC détecté par cellule (Figure 13B), sans pour autant augmenter le nombre de cellules marquées en phase S du cycle cellulaire. Toutefois, une préincubation de 3 h avec 10 µM de FdUrd, suivie d'une co-incubation de

1 h avec 10 μ M de IdUrd et FdUrd, augmentait aussi bien l'intensité du marquage (intensité moyenne : 633) que le pourcentage de cellules marquées avec la IdUrd (> 37%) (Figure 13C). À noter que la coloration par l'anticorps marqué au FITC était négative dans les cellules incubées avec FdUrd seule ou en absence de l'anticorps anti-BrdUrd primaire.

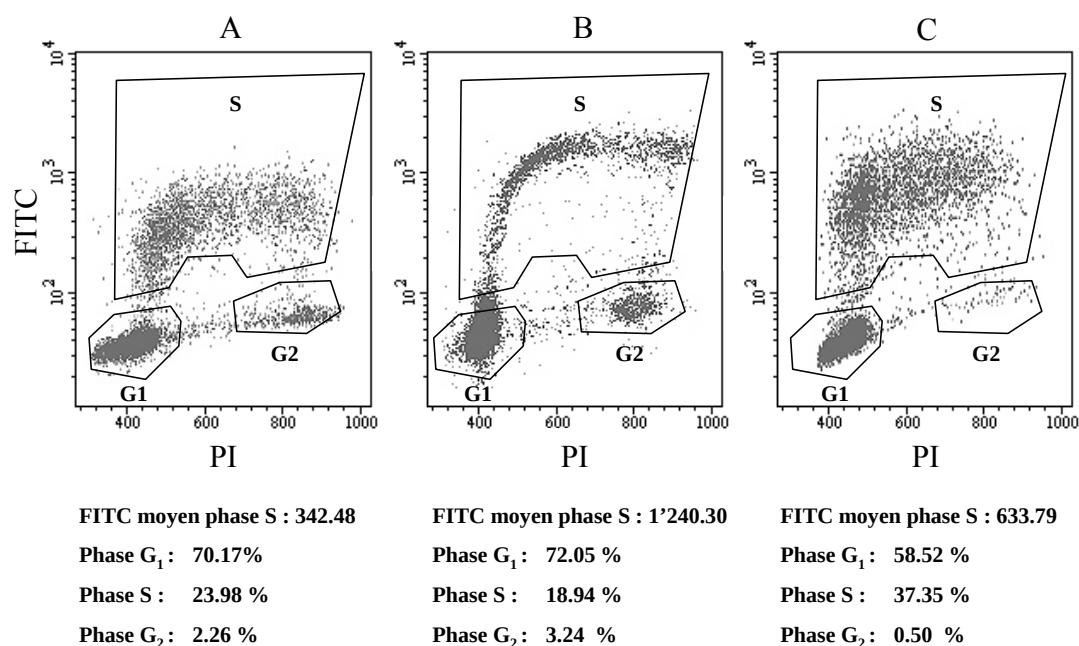


Figure 13. Distribution des cellules LN229 dans le cycle cellulaire (phase G₁, S et G₂) en présence de FdUrd. **A**, incubation de 1 h avec 10 μ M de IdUrd. **B**, co-incubation de 1 h avec 10 μ M de IdUrd et 10 μ M de FdUrd. **C**, incubation de 4 h avec 10 μ M de FdUrd et addition de 10 μ M de IdUrd pour la dernière heure. Axe des Y, incorporation de IdUrd révélée par fluorescence FITC; Axe des X, distribution dans le cycle cellulaire révélée par fluorescence PI. La coloration FITC au moyen de l'anticorps était négative dans les cellules incubées avec la FdUrd seule.

4.4.4 Biodistribution de [125 I]IdUrd dans des souris xéno greffées après pré-injections de FdUrd

Différents traitements combinés de [125 I]IdUrd et FdUrd ont été testés sur des souris nues xéno greffées avec les trois lignées humaines de glioblastomes. Comparées à une seule injection i.v. de [125 I]IdUrd, 2 pré-injections i.v. de 5 mg/kg de FdUrd chacune (dose totale: 10 mg/kg), administrées 60 et 30 min avant l'injection i.v. de [125 I]IdUrd, augmentaient l'incorporation de [125 I]IdUrd dans la tumeur de 4.8 à 6.8 fois, selon la lignée de glioblastome greffée (Tableau 3).

Tableau 3. Incorporation de [125 I]IdUrd dans la tumeur de souris xénotransplantées avec U87, LN229 ou U251 en présence de FdUrd

	U87		LN229		U251	
	%DI/g ^a	Nb ^b	%DI/g	Nb	%DI/g	Nb
[125 I]IdUrd seule	0.17 $\pm$ 0.07	7	0.17 $\pm$ 0.07	10	0.18 $\pm$ 0.04	8
[125 I]IdUrd + 10 mg/kg FdUrd	0.82 $\pm$ 0.30 ^c	5	1.15 $\pm$ 0.36 ^c	5	1.07 $\pm$ 0.40 ^d	4
	4.8 x ^e		6.8 x		5.9 x	

^a %DI/g, pourcentage de la dose injectée par gramme de tumeur $\pm$ 1 DS

^b Nb, nombre de souris

^c $p < .001$

^d $p < .01$

^e taux d'augmentation avec FdUrd comparé aux souris injectées avec la [125 I]IdUrd seule

Un pré-traitement plus long de 4 h donnait des résultats similaires. Différentes doses de FdUrd (doses totales : 1.1 à 30 mg/kg) ont été évaluées dans la lignée de glioblastome LN229. Toutes les doses testées ont augmenté de façon significative l'incorporation de [125 I]IdUrd. Cependant, l'augmentation du taux d'incorporation de [125 I]IdUrd tendait à être plus élevée (12.1 à 13.6 fois) aux plus faibles doses de FdUrd (3.3 à 1.1 mg/kg) (Tableau 4).

Tableau 4. Incorporation de [125 I]IdUrd dans la tumeur et l'intestin de souris xénotransplantées avec LN229 en fonction de la dose de FdUrd

FdUrd (mg/kg)	%DI/g de tumeur ^a		%DI/g d'intestin grêle ^b		Nb ^c
0	0.17 $\pm$ 0.07		0.65 $\pm$ 0.24		10
1.1	2.31 $\pm$ 0.76 ^d	(13.6x) ^e	2.74 $\pm$ 0.93 ^d	(4.2x)	4
1.7	2.24 $\pm$ 0.86 ^d	(13.2x)	1.92 $\pm$ 0.85 ^d	(3.0x)	5
3.3	2.05 $\pm$ 1.30 ^d	(12.1x)	1.72 $\pm$ 0.39 ^d	(2.6x)	11
10	1.15 $\pm$ 0.36 ^d	(6.8x)	1.36 $\pm$ 0.26 ^d	(2.1x)	5
30	1.12 $\pm$ 0.14 ^d	(6.6x)	2.02 $\pm$ 0.66 ^d	(3.1x)	4

^a %DI/g, pourcentage de la dose injectée par gramme de tumeur $\pm$ 1 DS

^b %DI/g, pourcentage de la dose injectée par gramme d'intestin grêle $\pm$ 1 DS

^c Nb, nombre de souris

^d $p < .001$

^e taux d'augmentation avec FdUrd comparé aux souris injectées avec [125 I]IdUrd seule

De plus, l'augmentation du taux d'incorporation de [125 I]IdUrd après pré-injections de FdUrd était plus élevée dans la tumeur que dans les tissus sains à renouvellement cellulaire rapide. Le rapport tumeur / tissus sains était donc plus favorable en présence de FdUrd (Tableau 4). En fait, l'incorporation de [125 I]IdUrd dans la rate, l'os (représentatif de la moelle osseuse) et l'intestin était augmentée entre 1.7 à 5.8 fois après pré-injections de FdUrd à différentes doses, alors que la quantité de

radioactivité restait négligeable dans les autres tissus sains à faible renouvellement cellulaire, tels que le foie ou le poumon (Figure 14).

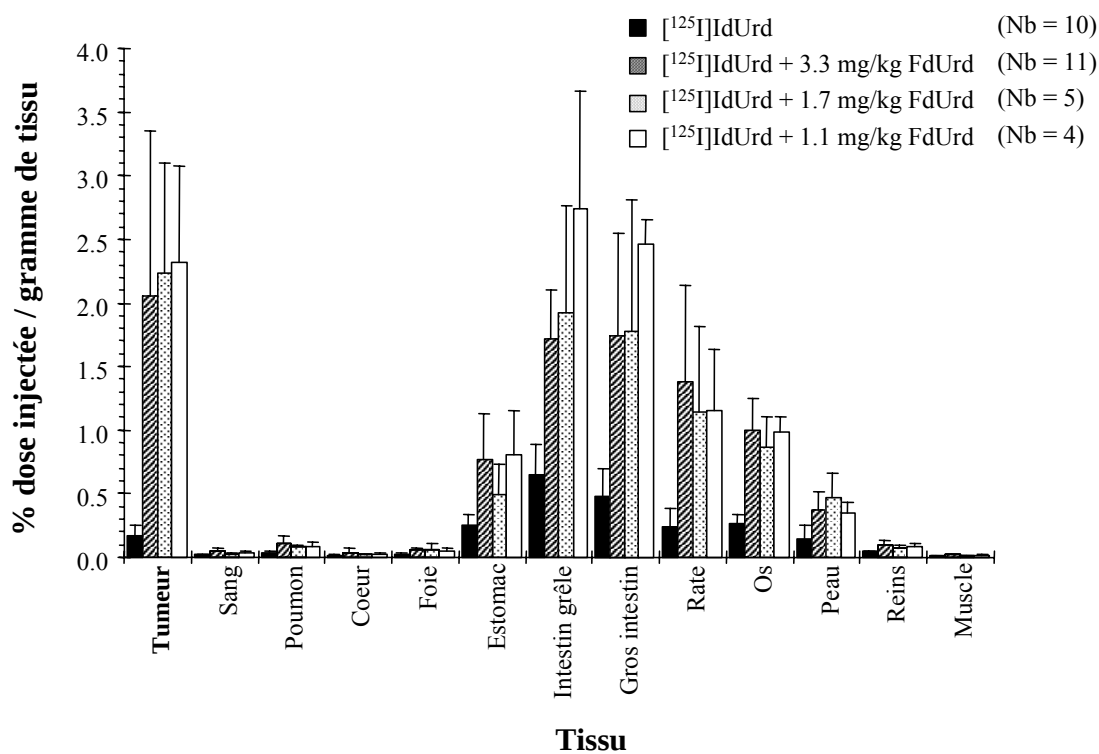


Figure 14. Biodistribution de la [¹²⁵I]IdUrd dans des souris nues xénotransplantées avec des tumeurs LN229 après pré-traitement avec FdUrd. Chaque expérience incluait un groupe de souris contrôles injectées i.v. avec 185 kBq de [¹²⁵I]IdUrd seule. La FdUrd était administrée en 2 injections i.v. 60 et 30 min avant l'injection i.v. de 185 kBq de [¹²⁵I]IdUrd. Les souris étaient disséquées 24 h après l'injection de [¹²⁵I]IdUrd. Les données sont présentées en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu $\pm$ 1 DS. Nb, nombre de souris.

4.4.5 Pourcentage de la radioactivité mesurée dans le tissu qui est effectivement incorporé dans l'ADN

La radioactivité spécifiquement liée à l'ADN a été différenciée de la radioactivité résiduelle non-spécifique dans les tissus par extraction de l'ADN. Le pourcentage de radioactivité dans l'ADN par rapport à la radioactivité totale dans la tumeur et l'intestin a donc été déterminé 24 h après l'injection de [¹²⁵I]IdUrd. Ce pourcentage était similaire entre la tumeur et l'intestin après purification de l'ADN. De plus, il ne changeait pas de façon significative suite à la pré-administration de 3.3 mg/kg de FdUrd (Tableau 5). Cette dernière observation démontre que la différence entre le taux d'activité observé dans la tumeur et les tissus sains à renouvellement cellulaire rapide après administration de FdUrd est bien due à une augmentation de l'incorporation spécifique de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN de la tumeur.

Tableau 5. Pourcentage de la radioactivité incorporée dans l'ADN par rapport à la radioactivité totale dans la tumeur et l'intestin

	%A ^a dans la tumeur	%A dans l'intestin	<i>p</i>
[¹²⁵ I]IdUrd	72.1 ± 8.1	79.5 ± 7.3	0.28
[¹²⁵ I]IdUrd + 3.3 mg/kg FdUrd	77.9 ± 11.3	77.7 ± 9.4	0.98
<i>p</i>	0.50	0.81	

^a %A, pourcentage de la radioactivité associée à l'ADN ± 1 DS, mesurée dans les tissus de souris disséquées 24 h après administration de [¹²⁵I]IdUrd.

4.4.6 Cytotoxicité d'une administration combinée de [¹²⁵I]IdUrd et FdUrd

Des examens histologiques et des autoradiographies ont été entrepris pour évaluer la cytotoxicité d'une administration combinée de 0.25 à 3.7 MBq de [¹²⁵I]IdUrd et 3.3 mg/kg de FdUrd sur la tumeur et l'intestin, ce dernier étant représentatif des tissus sains à renouvellement cellulaire rapide. Les échantillons tissulaires ont été prélevés sur des souris sacrifiées 24 h après l'injection de [¹²⁵I]IdUrd.

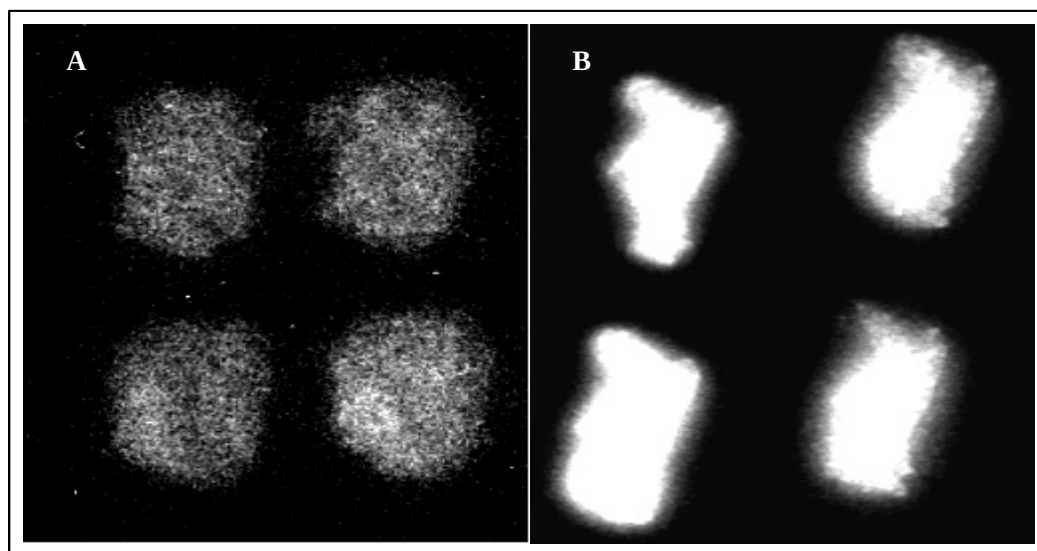


Figure 15. Autoradiographies de tumeurs de souris injectées avec la [¹²⁵I]IdUrd seule (**A**) ou pré-traitées avec 3.3 mg/kg de FdUrd avant injection de [¹²⁵I]IdUrd (**B**). Les cryosections de 5 µm ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4 % à pH=7.4 et montées dans une solution éokite xylol 50 %.

En dehors d'une radioactivité globale plus importante, l'autoradiographie des cryosections tissulaires n'a pas révélé de modifications dans la distribution de la radioactivité dans la tumeur entre souris ayant reçu la [¹²⁵I]IdUrd seule ou combinée avec la FdUrd (Figure 15). De même, aucune modification histologique, qui pouvait

suggérer une destruction tissulaire induite par la toxicité combinée de [125 I]IdUrd et FdUrd, n'a pu être observée dans les coupes tissulaires après leur coloration avec l'hématoxyline et l'éosine (Figure 16).

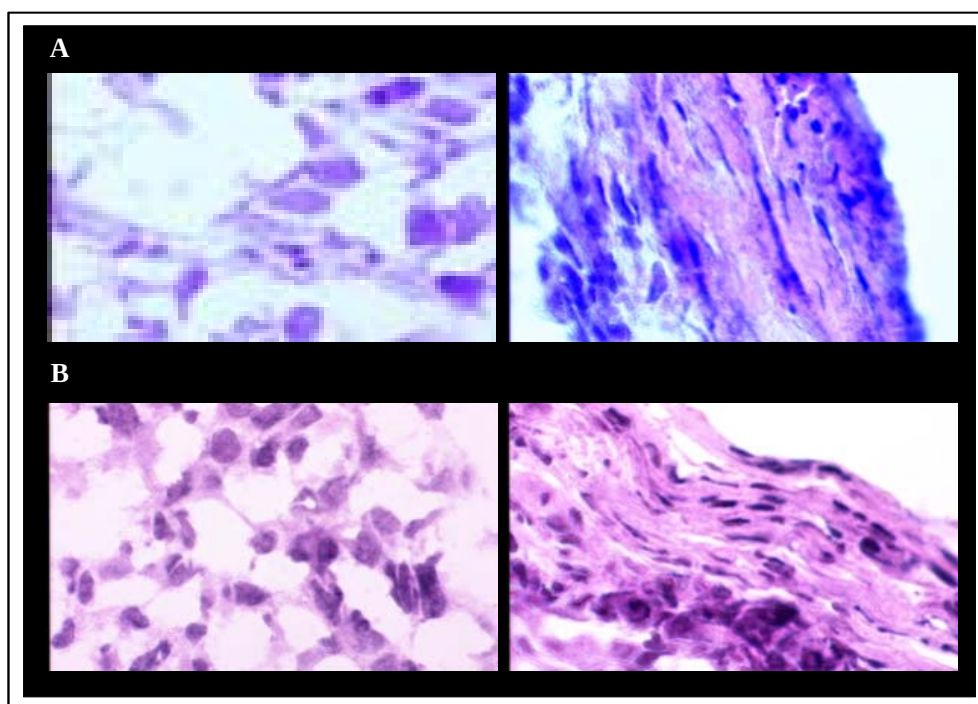


Figure 16. Histologie de tumeurs de souris injectées avec la [125 I]IdUrd seule (A) ou pré-traitées avec 3.3 mg/kg de FdUrd avant injection de [125 I]IdUrd (B). Les cryosections de 5 μ m ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4 % à pH=7.4, colorées avec l'hématoxyline et l'éosine, puis montées dans une solution éokite xylol 50 %.

Des tests TUNEL ont aussi été entrepris pour comparer le taux d'apoptose entre la tumeur et l'intestin de souris traitées avec la [125 I]IdUrd seule ou combinée avec la FdUrd. Dans deux expériences distinctes, le taux de fragmentation de l'ADN dans la tumeur LN229 a été augmenté par la pré-administration de 3.3 mg/kg de FdUrd, comparée à l'injection i.v. de [125 I]IdUrd seule. Cette augmentation en présence de FdUrd n'était pas observable dans l'intestin. Toutefois, une cytotoxicité mineure de la FdUrd dans l'intestin ne peut pas être exclue, car elle peut avoir été masquée par le taux de fragmentation de l'ADN déjà très élevé observé dans l'intestin des souris ayant reçu uniquement l'injection i.v. de [125 I]IdUrd (Figure 17).

Finalement, aucun effet secondaire, tel qu'une perte de poids ou des diarrhées, n'a été observé dans 3 souris jusqu'à deux mois après l'administration combinée de [125 I]IdUrd et de 10 mg/kg de FdUrd.

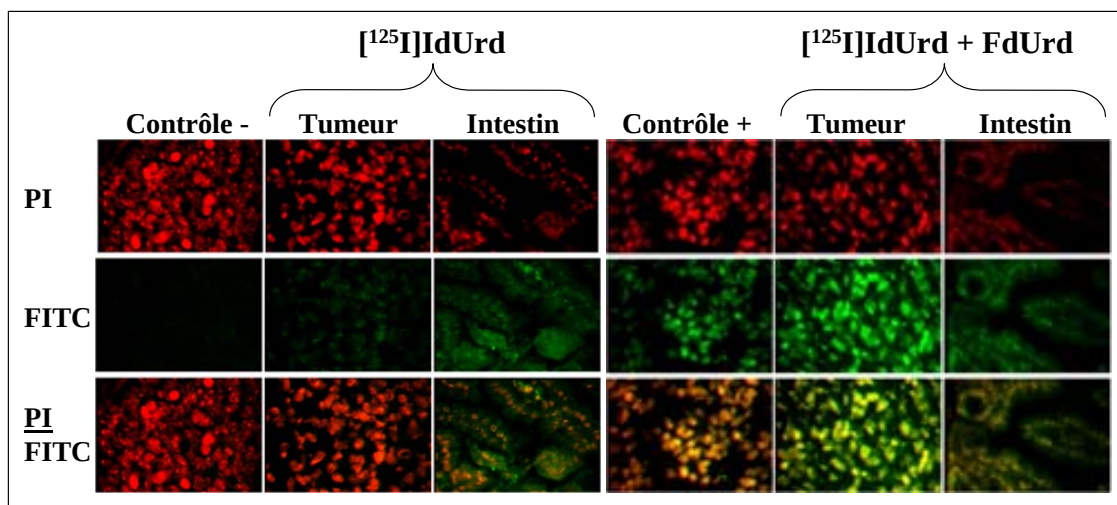


Figure 17. Taux de fragmentation de l'ADN dans la tumeur et l'intestin après pré-traitement avec la FdUrd. La densité cellulaire est mise en évidence par l'ADN marqué à la fluorescence PI (couleur rouge), alors que la fragmentation de l'ADN est mise en évidence par la dUTP marquée au FITC après exposition à l'activité de la terminal désoxynucléotide transférase (couleur verte). Le taux d'apoptose est estimé par la superposition des fluorescences rouge et verte (jaune). Contrôle +, contrôle positif dans la tumeur par fragmentation de l'ADN induite par l'ADNase Q₁; Contrôle -, contrôle négatif dans la tumeur par suppression de l'activité de la terminal désoxynucléotide transférase; [125I]IdUrd, tumeur et intestin de souris injectée avec la [125I]IdUrd seule; [125I]IdUrd + FdUrd, tumeur et intestin de souris pré-traitée avec 3.3 mg/kg de FdUrd avant l'injection de [125I]IdUrd.

4.4.7 Détection tumorale par scintigraphie après traitement avec FdUrd et KClO₄

Comme l'augmentation de l'incorporation de la [125I]IdUrd par la FdUrd observée *in vitro* a été confirmée *in vivo* sans augmentation de cytotoxicité apparente, des scintigraphies ont été pratiquées sur des souris porteuses de tumeurs humaines LN229. Les souris ont été anesthésiées pour des acquisitions d'images à différents temps après injection de 3.7 MBq (100 µCi) de [125I]IdUrd. La détection de la tumeur était déjà possible 4 h après l'injection de [125I]IdUrd dans les souris pré-traitées avec FdUrd, alors que des tumeurs de taille similaire n'étaient que difficilement localisables, même après 24 h, dans les souris traitées uniquement avec la [125I]IdUrd (Figure 18A). La comparaison entre les figures 18A et 18B montre qu'une pré-injection i.v. de 3.3 mg/kg de FdUrd augmentait nettement la visualisation de la tumeur par la [125I]IdUrd à 24 h. Toutefois, malgré l'administration de 0.2 g/l de KI dans l'eau de boisson, la radioactivité résiduelle restait élevée, particulièrement dans l'estomac (Figure 18B).

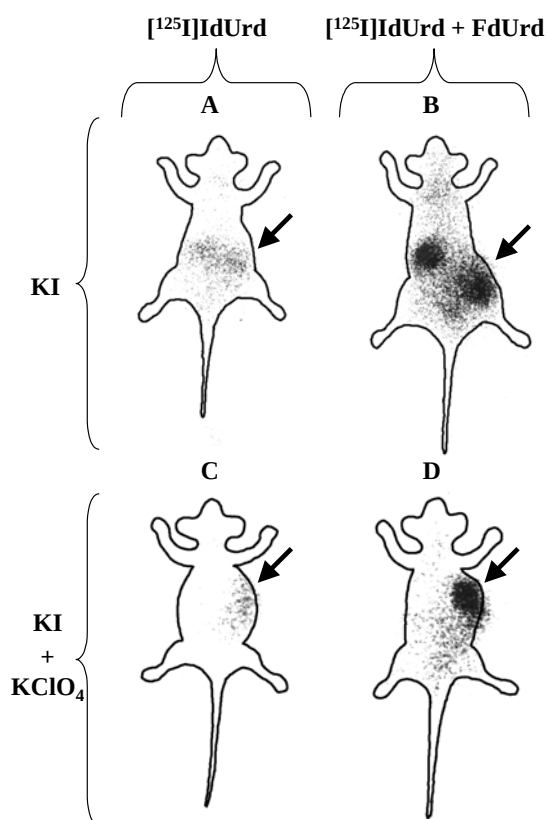


Figure 18. Scintigraphie corps-entier 24 h après injection i.v. de 3.7 MBq de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans des souris nues xéno greffées avec des tumeurs LN229 de tailles comparables. Un jour avant la scintigraphie, les souris **A** et **B** ont reçu 0.2 g/l de KI dans l'eau de boisson, alors que les souris **C** et **D** ont reçu 2 g/l de KClO_4 en addition au 0.2 g/l de KI dans l'eau de boisson. Les souris **A** et **C** ont été injectées avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule, alors que les souris **B** et **D** ont été pré-injectées i.v. avec 3.3 mg/kg de FdUrd avant l'injection de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$. La scintigraphie des souris anesthésiées a été réalisée avec un collimateur LEHR-parallèle monté sur une caméra Toshiba GCA 9300 UI. La localisation de la tumeur est indiquée par une *flèche*.

Une mesure de biodistribution par compteur γ après sacrifice des souris a montré que la radioactivité était principalement concentrée dans le contenu de l'estomac plutôt que dans le tissu même. C'est pourquoi, dans les scintigraphies suivantes, la sécrétion d'iode radioactif libre dans l'estomac a été préalablement bloquée par l'administration de KClO_4 , en plus du KI, dans l'eau de boisson. Une étude de biodistribution effectuée 4 h après injection i.v. de 600 kBq d' ^{131}I ode a montré que l'addition de 2 g/l de KClO_4 en plus de 0.2 g/l de KI permettait de diminuer de 5.1 ± 3.6 à 0.8 ± 0.6 %DI/g dans l'estomac et l'intestin, par rapport à l'administration de KI seul ($p = .03$). Parallèlement, une diminution de 15.9 ± 11.1 à 6.2 ± 6.0 %ID/g était observée dans le corps-entier des souris ayant bu de l'eau enrichie en KClO_4 ($p = .12$). La radioactivité dans la thyroïde était toujours en dessous de 0.4 %ID/g. La figure 18D montre que la visualisation de la tumeur par la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ était fortement améliorée dans les souris ayant reçu du KClO_4 dans l'eau de boisson et une pré-administration de 3.3 mg/kg de FdUrd. Cette amélioration était associée à une augmentation du contraste par la diminution du bruit

de fond dans les tissus sains. Les scintigraphies comparatives ont été reproduites trois fois dans différentes souris et ont donné des résultats similaires.

4.4.8 *Dosimétrie préclinique d'une scintigraphie avec la [¹²³I]IdUrd*

Vu les résultats encourageants observés sur les souris, les doses de rayonnements Auger et γ auxquelles serait exposé un patient de 70 kg lors d'une scintigraphie avec la [¹²³I]IdUrd combinée avec un prétraitement de FdUrd ont été extrapolées à partir des biodistributions dans les souris présentées précédemment, pour les rayonnements Auger, et de nouvelles biodistributions réalisées à 0.5, 6 et 24 h après l'injection de [¹²⁵I]IdUrd, pour l'exposition aux rayonnements γ . Les résultats obtenus à 0.5 h ne permettaient pas de détecter l'effet de la FdUrd sur l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd, sans doute parce que l'activité non-spécifique due à l'iode radioactif libre était très élevée dans tous les tissus. L'effet d'un prétraitement avec la FdUrd sur l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd n'apparaissait distinctement qu'à partir de 6 h, lorsque le gradient entre tissus quiescents et en division devenait très prononcé. À l'exception de la rate, un pourcentage élevé de l'activité initiale était en fait retenu à 24 h dans les tissus à renouvellement cellulaire rapide des souris prétraitées avec la FdUrd. L'activité élevée mais transitoire observée dans la rate à 6 h pourrait être due à des produits de dégradation de la [¹²⁵I]IdUrd ou son incorporation dans des cellules engagées dans un processus apoptotique (Figure 19).

Pour les six principaux tissus à renouvellement cellulaire rapide, les doses Auger moyennes absorbées étaient de 0.02 à 0.35 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$ pour une seule injection i.v. de [¹²³I]IdUrd et 0.08 à 1.21 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$ pour une injection i.v. de [¹²³I]IdUrd précédée des 2 injections i.v. de FdUrd. Lorsqu'un facteur de pondération recommandé de 20 était appliqué pour le calcul des effets stochastiques (83), les doses Auger équivalentes dans les tissus devenaient significatives. La dose effective corporelle totale passait de 1.7 à 5.6 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$ après le prétraitement avec la FdUrd (Tableau 6).

En considérant que pas plus de 10 % des cellules étaient en phase S au moment de l'injection i.v. de [¹²³I]IdUrd, l'activité dans ces cellules devait être 10 fois plus élevée que l'activité tissulaire moyenne. Lorsqu'un facteur de pondération recommandé de 10 était appliqué pour les effets déterministes (83), les doses tissulaires équivalentes se situaient entre 8 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$ (testicules) et 121 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$ (moelle osseuse). Dans la perspective d'une scintigraphie combinant une injection i.v. de 300 MBq de [¹²³I]IdUrd avec un prétraitement de FdUrd, les patients seraient donc exposés à des doses tissulaires équivalentes de 2.4 à 36.3 mSv, susceptibles de tuer moins de 1 % des cellules ciblées en phase S, par analogie à la radiosensibilité observée pour les cellules V79 (85). Ce pourcentage de cellules tuées est faible au regard du taux de renouvellement cellulaire spontané observé dans les six tissus concernés.

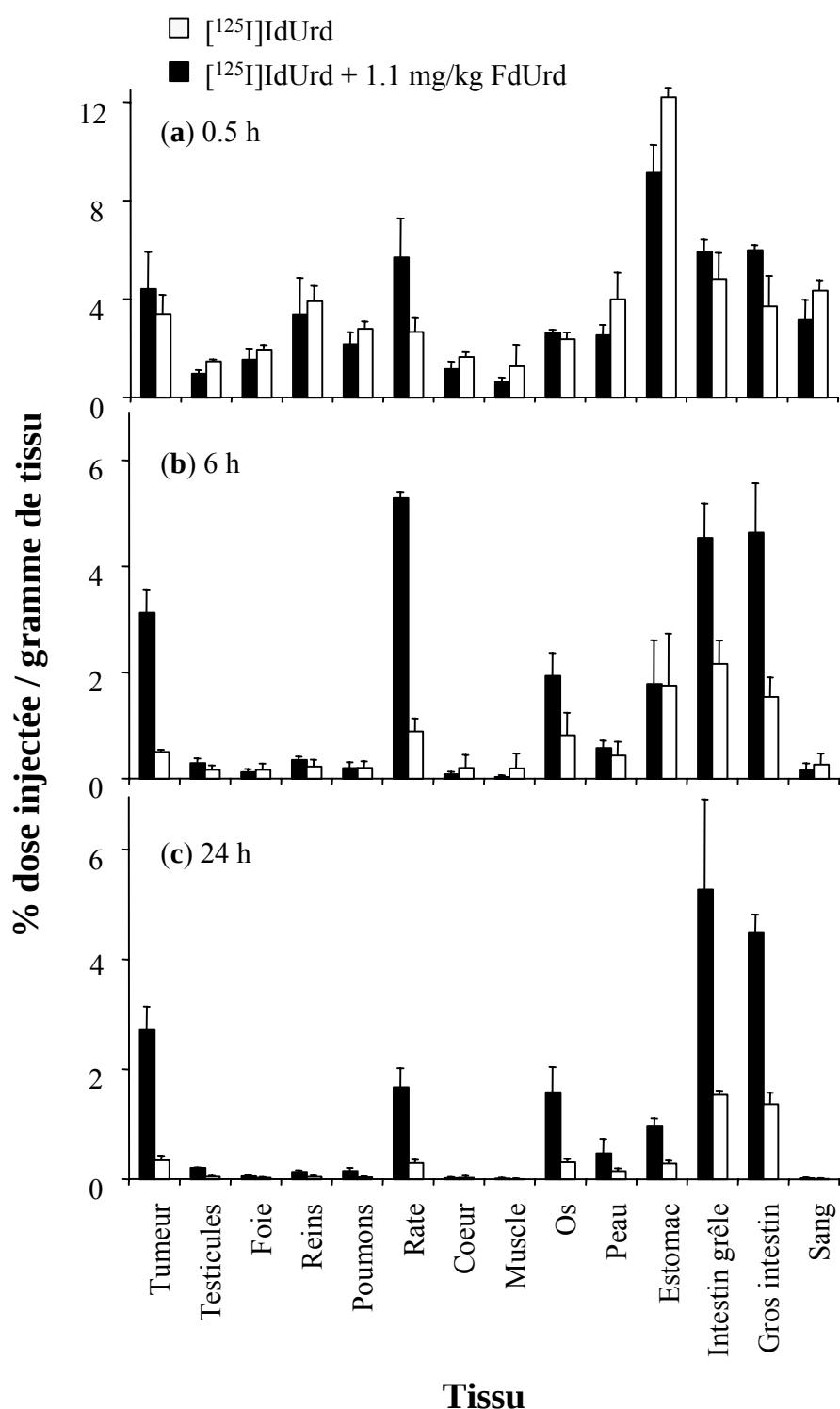


Figure 19. Biodistribution dans des souris nues xénotreffées avec des tumeurs LN229 mesurée à 0.5 h (a), 6 h (b) et 24 h (c) après l'injection i.v. de 185 kBq de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule (colonnes blanches) ou précédée de 2 injections i.v. d'un total de 1.1 mg/kg de FdUrd (colonnes noires). Les résultats obtenus à partir de groupes de 3 à 5 souris sont exprimés en pourcentages de la dose injectée par gramme de tissu $\pm$ 1 DS et corrigés en fonction de la demi-vie physique du radioisotope. À 0.5 h après l'injection (a), l'activité dans l'estomac de souris traitées avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule était de $12.2 \pm 1.9\%$ DI/g, correspondant à $2.0 \pm 0.13\%$ de la dose injectée retrouvée dans l'organe.

Le tableau 6 montre aussi les doses équivalentes calculées pour les rayonnements γ au moyen de MIRDose 3.1 (129).

Tableau 6. Doses équivalentes pour les effets stochastiques sur un phantôme humain de 70 kg, après injection de [^{123}I]IdUrd combinée avec la FdUrd

	[^{123}I]IdUrd seule		[^{123}I]IdUrd + FdUrd	
	Gamma ($\mu\text{Sv/MBq}$)	Auger ($\mu\text{Sv/MBq}$)	Gamma ($\mu\text{Sv/MBq}$)	Auger ($\mu\text{Sv/MBq}$)
Rate	4.12 (0.21)	1.31 (0.07)	5.93 (0.30)	6.13 (0.31)
Estomac	17.40 (2.09)	2.08 (0.25)	19.80 (2.38)	5.49 (0.66)
Intestin	12.57 (1.51)	3.89 (0.47)	14.65 (1.76)	11.61 (1.39)
Testicules	2.99 (0.60)	0.32 (0.06)	3.30 (0.66)	1.43 (0.29)
Peau	1.29 (0.01)	0.64 (0.01)	1.53 (0.02)	1.66 (0.02)
Moelle osseuse ^a	5.67 (0.68)	6.94 (0.83)	8.15 (0.98)	24.16 (2.90)
Dose effective corporelle totale	11.2	1.69	12.5	5.56

Les doses tissulaires équivalentes ont été calculées avec un facteur de pondération de 1 pour les rayonnements γ et de 20 pour les rayonnements Auger. Le nombre en parenthèses représente la contribution fractionnelle des doses tissulaires équivalentes aux doses effectives corporelles totales et ont été obtenues par multiplication de la dose tissulaire équivalente par les facteurs de pondération respectifs à chaque tissu.

^a L'activité de la moelle osseuse était extrapolée à partir de celle des souris, elle-même calculée comme étant 3.85 fois l'activité mesurée dans le fémur.

Comparés aux rayonnements Auger, les rayonnements γ délivrent une dose équivalente plus faible sur la moelle osseuse à cause d'une quantité élevée de [^{123}I]IdUrd spécifiquement incorporée dans l'ADN.

Tableau 7. Doses effectives liées aux effets stochastiques

	[^{123}I]IdUrd seule		[^{123}I]IdUrd + FdUrd	
	(mSv)		(mSv)	
Gamma	3.36	(87%)	3.75	(69%)
Auger	0.51	(13%)	1.67	(31%)
Dose effective combinée	3.87	(100%)	5.42	(100%)

Les doses ont été calculées pour un patient adulte de 70 kg injecté avec 300 MBq de [^{123}I]IdUrd soit seule, soit en combinaison avec un prétraitement de FdUrd. Les pourcentages de la dose effective totale sont donnés entre parenthèses.

Par contre, dans les autres tissus, comme l'estomac ou l'intestin, la dose délivrée par les rayonnements γ est plus importante, en partie à cause de la sécrétion d'iode

radioactif libre dans l'estomac. La dose effective des rayonnements γ de la [^{123}I]IdUrd injectée i.v. seule ou en combinaison avec un prétraitement de FdUrd serait donc, respectivement, de 11.2 et 12.5 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$. Ces résultats prédictifs sont très proches des 11 $\mu\text{Gy}/\text{MBq}$ publiés par un groupe d'experts pour l' ^{123}I ode (131). Ils peuvent être attribués à la dispersion très rapide d'iode radioactif libre juste après l'injection. Dans une scintigraphie combinant une injection i.v. de 300 MBq de [^{123}I]IdUrd avec un prétraitement de FdUrd, les patients seraient donc exposés à une dose effective de rayonnements γ de 3.8 mSv et de rayonnements Auger de 1.7 mSv (Tableau 7).

4.5 Discussion

Les glioblastomes sont des cancers qui, jusqu'à maintenant, défient tout traitement. Le problème réside en partie dans les limitations rencontrées par les méthodes diagnostiques actuelles, comme la tomographie numérisée ou la résonance magnétique nucléaire, pour localiser des résidus de glie néoplasique dans le parenchyme oedémateux ou fibrotique après le traitement (96). Parmi les procédures diagnostiques alternatives, l'utilisation de la IdUrd radiomarquée devrait permettre une visualisation et une quantification directe de la division cellulaire. Cependant, la détection tumorale avec la IdUrd radiomarquée se heurte à certaines limitations, telles qu'une faible incorporation dans la tumeur et une dégradation rapide *in vivo*, résultant en une radioactivité résiduelle élevée due aux métabolites et à l'iode libre (86).

Un des objectifs de ce travail était d'évaluer la capacité de la FdUrd à améliorer l'imagerie tumorale par la IdUrd radiomarquée, en favorisant son incorporation dans l'ADN par inhibition spécifique de la synthèse *de novo* de dThd (139). Comme déjà mentionné pour des lignées cellulaires humaines dérivées des gliomes (105), la capacité à incorporer la [¹²⁵I]IdUrd *in vitro* était faible et variait d'une lignée de glioblastome à l'autre. Cependant, une co-incubation avec la FdUrd augmentait fortement l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN des trois lignées testées. Une biomodulation similaire a déjà été rapportée après exposition des cellules à la FdUrd (104-106) et à d'autres inhibiteurs de la TS, comme la leucovorine, dans des tumeurs de diverses origines, incluant des cancers du sein et du côlon et des leucémies murines d'origine humaine (119).

Comme suggéré récemment (108, 140), une incorporation augmentée pourrait refléter deux mécanismes distincts, c'est-à-dire une augmentation de la quantité totale de IdUrd incorporée par cellule ou une augmentation du nombre de cellules en phase S précoce marquée par la IdUrd. Dans ce travail, les analyses par cytofluorométrie en flux de l'index de marquage de la IdUrd et de la distribution dans le cycle cellulaire ont montré qu'une courte exposition (1 h) à la FdUrd tendait à augmenter la quantité de IdUrd incorporée par cellule, plutôt que le nombre de cellules marquées par la IdUrd. Ainsi, la cytotoxicité résultant d'une courte exposition à la FdUrd devrait se limiter aux cellules qui sont naturellement en phase S lors du traitement, alors qu'une exposition prolongée devrait étendre la cytotoxicité à une population cellulaire plus importante. De plus, d'autres résultats publiés suggèrent que l'inhibition de la synthèse d'ADN par la FdUrd est transitoire, puisqu'il a été possible d'observer un rétablissement de la concentration intracellulaire de dTTP après une exposition prolongée (6 à 24 h) à des

fluoropyrimidines (141), ainsi qu'une réversion de l'inhibition de la prolifération cellulaire par FdUrd après administration de IdUrd et BrdUrd (60).

Ces observations *in vitro* pourraient expliquer pourquoi des injections i.p. d'une dose totale de 25 mg/kg de FdUrd sur une période de 7 jours n'ont entraîné qu'une perte de poids négligeable de 0.1 g chez la souris (138), et pourquoi une injection i.v. de 30 min, d'une dose totale de 210 mg de FdUrd, était bien tolérée chez le rat (142). De plus, la déglycosylation et la déhalogénéation rapides, auxquelles sont sujettes *in vivo* les pyrimidines halogénées, limitent probablement en grande partie la cytotoxicité après une courte exposition à la FdUrd (143). Dans ce travail, les expériences *in vivo* ont montré qu'une administration i.v. totale de 1.1 à 30 mg/kg de FdUrd était bien tolérée dans les souris nues greffées avec les trois lignées humaines de glioblastomes. Des études histologiques, radiographiques et des essais TUNEL n'ont pas pu démontrer de cytotoxicité additive entre la FdUrd et la [¹²⁵I]IdUrd dans l'intestin, quoiqu'une cytotoxicité mineure de la FdUrd pourrait avoir été masquée par l'activité apoptotique spontanée élevée dans cet organe. Ces observations ont été confirmées par l'absence d'effets secondaires dans des souris observées jusqu'à 2 mois après l'injection i.v. de 10 mg/kg de FdUrd. En clinique, une injection ponctuelle i.v. de FdUrd à des doses correspondantes devrait être aussi bien tolérée. Dans des études cliniques à visée thérapeutique, alors que la dose de FdUrd était limitée à 0.15 mg/kg de poids corporel par jour lorsque la FdUrd était administrée par infusion i.v. sur 24 h, elle pouvait atteindre 30 mg/kg lorsque la FdUrd était administrée par injection i.v. quotidienne sur plusieurs jours (144, 145).

En accord avec des observations précédentes (127), des quantités élevées d'¹²⁵Iode libre empêchaient toute corrélation entre la division cellulaire et la radioactivité tissulaire lorsque les mesures de biodistribution étaient effectuées dans les premières heures après l'injection i.v. de [¹²⁵I]IdUrd. C'est pourquoi, la plupart des études de biodistribution ont été réalisées à 24 h, dans le but d'optimiser le rapport radioactivité spécifique / non-spécifique. Ainsi, il était permis à la radioactivité résiduelle des produits de dégradation de diminuer, tout en conservant, d'après la littérature (107), le même niveau de radioactivité dans l'ADN déjà observé 1 h après l'injection i.v. de la [¹²⁵I]IdUrd. Avec un tel protocole, il a été possible de démontrer dans ce travail que des pré-injections de FdUrd pouvaient augmenter fortement l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans les tumeurs de glioblastomes xénogreffées, comparées à une injection de [¹²⁵I]IdUrd seule. Cette observation vient conforter des résultats publiés sur des tumeurs du carcinome du côlon HT79 xénogreffées, qui ont montré une incorporation de IdUrd non-marquée après traitement avec FdUrd au-dessus de celle obtenue avec la IdUrd seule (104). Dans ce travail, le rapport tumeur / tissus normaux était de plus nettement amélioré après les pré-injections de FdUrd. Cela

s'expliquait par une plus forte augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans la tumeur que dans les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide, comme la rate, l'os (représentatif de la moelle osseuse) et l'intestin, alors que la radioactivité résiduelle restait inchangée dans les tissus plus ou moins quiescents, comme le cerveau, le foie, le poumon et les reins. Cette incorporation plus élevée dans la tumeur, comparée à celle dans les tissus normaux, a aussi été observée avec d'autres inhibiteurs de la synthèse de dThd, comme le méthotrexate (107, 108). Elle est encourageante mais difficile à comprendre. L'analyse par extraction d'ADN a montré que cette différence dans l'augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd entre la tumeur et l'intestin n'était pas due à des modifications de distribution de la radioactivité résiduelle, puisque le rapport radioactivité spécifique / non-spécifique était similaire entre souris contrôles et souris pré-traitées avec la FdUrd. De même, cet effet ne pouvait pas être dû à une différence dans l'expression du gène *p53* entre la tumeur et l'intestin, puisque l'augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN après traitement avec la FdUrd était comparable entre les lignées de glioblastome de type sauvage ou mutant pour le gène *p53*. Comme dernière hypothèse, il se peut que les tissus normaux présentent quelque résistance à l'inhibition de l'activité enzymatique de la TS par la FdUrd, qui serait due à un anabolisme moins performant des fluoropyrimidines en FdUMP, une plus faible affinité de la TS pour la FdUMP ou encore une concentration intracellulaire plus élevée de TS (146). Cette dernière hypothèse est supportée par des observations précédentes, qui ont montré que la radioactivité était maintenue et même augmentée dans la tumeur 4 à 24 h après exposition à la [14 C]FdUrd, alors qu'elle diminuait dans les autres tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide, comme la moelle osseuse ou l'intestin grêle (139).

L'augmentation significative de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans la tumeur, par rapport aux tissus normaux, incitait à évaluer la capacité de la FdUrd à améliorer la détection tumorale par la IdUrd radiomarquée. Des scintigraphies comparatives ont donc été entreprises sur des souris nues xénogreffées, pré-traitées ou non avec la FdUrd. Le timing et la précision de la détection tumorale étaient nettement améliorés dans les souris pré-traitées avec la FdUrd, comparées aux souris contrôles ayant reçu seulement l'injection i.v. de [125 I]IdUrd. Cependant, il restait toujours une radioactivité résiduelle élevée, particulièrement apparente dans l'estomac, aussi bien chez les souris contrôles que chez les souris pré-traitées avec la FdUrd. Ce bruit de fond, dû aux produits de dégradation de la [125 I]IdUrd, pourrait masquer la détection de masses tumorales dans les tissus abdominaux et même contribuer à l'activité totale de tumeurs localisées dans le cerveau (86, 133). Une dissection des souris après la scintigraphie et un comptage γ a montré que la radioactivité était concentrée dans le contenu de l'estomac plutôt que dans sa paroi. Comme il a été montré que la sécrétion d'iode radioactif dans l'estomac

et sa réabsorption dans l'intestin constituent un réservoir d'iode qui entre en compétition et retarde son élimination rénale, la capacité du KClO_4 à bloquer la sécrétion d'iode radioactif libre dans l'estomac et donc à accélérer son élimination rénale a été évaluée dans une étude de biodistribution. Les résultats ont montré que la sécrétion d'iode radiomarké dans l'estomac ainsi que sa rétention dans le corps-entier étaient nettement réduites déjà 4 h après son injection dans des souris ayant reçu auparavant du KClO_4 en plus du KI dans l'eau de boisson. C'est pourquoi, dans les études scintigraphiques suivantes, une administration additionnelle de KClO_4 a permis de démontrer le potentiel de la FdUrd pour augmenter l'incorporation spécifique de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans la tumeur, en améliorant le contraste entre l'image de la tumeur et le bruit de fond.

Une scintigraphie utilisant la $[^{124}\text{I}]\text{IdUrd}$ a été réalisée récemment chez des patients avec, comme objectif, la visualisation de la prolifération des lésions malignes du cerveau. Les principales limitations se sont révélées être une faible incorporation spécifique de la IdUrd radiomarkée, accompagnée d'un bruit de fond élevé dans la tumeur, tout particulièrement dans les méningiomes de grade inférieur où la radioactivité résiduelle, même 24 h après l'injection de $[^{124}\text{I}]\text{IdUrd}$, contribuait encore pour 85 % de la radioactivité totale dans la tumeur (86). Les résultats présentés dans ce travail suggèrent fortement qu'une combinaison de FdUrd avec l'administration de KClO_4 pourrait améliorer de façon significative la détection tumorale avec la IdUrd radiomarkée ou d'autres analogues radiomarkés de la dThd, comme traceurs pour une imagerie tomographique par émission de photons ou de positons.

Comme limitation, toutefois, la IdUrd et probablement aussi la FdUrd ne traversent pas une barrière hémato-encéphalique intacte. Malgré cette limitation, plusieurs tumeurs du cerveau ont été détectées avec succès, aussi bien avec la $[^{124}\text{I}]\text{IdUrd}$ (86) que la $[^{18}\text{F}]\text{FdUrd}$ (135). Leur vitesse de diffusion a aussi été calculée. Ceci s'explique par une barrière hémato-encéphalique fréquemment rompue dans ce type de tumeurs. D'autre part, l'utilisation combinée de FdUrd et IdUrd radiomarkée pour l'imagerie diagnostique ne se limite probablement pas aux tumeurs du cerveau, puisque l'augmentation de l'incorporation de IdUrd dans l'ADN en présence de FdUrd a déjà été observée *in vitro* dans d'autres types de tumeurs (140).

Les résultats scintigraphiques prometteurs observés dans ce travail ont incité les autorités à accepter un protocole clinique combinant la $[^{123}\text{I}]\text{IdUrd}$ avec un pré-traitement de 1 mg/kg de FdUrd pour une imagerie des glioblastomes. Cependant, la FdUrd s'est aussi révélée augmenter de façon significative l'incorporation spécifique de la IdUrd radiomarkée dans l'ADN des tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide. Comme l' ^{123}I est un émetteur de rayonnements γ et Auger, il est donc apparu

prudent d'évaluer les risques biologiques liés à ces rayonnements avant de débiter une étude clinique. Les résultats dosimétriques extrapolés de la souris à l'homme montrent que la dose absorbée par les tissus dans une scintigraphie avec la [^{123}I]IdUrd devraient être faibles et ne pas donner lieu à une cytotoxicité significative. En appliquant un facteur de pondération de 20 pour les effets stochastiques (83), la dose équivalente pour les rayonnements Auger pourrait toutefois devenir significative si le pré-traitement avec la FdUrd augmentait nettement l'incorporation de [^{123}I]IdUrd dans l'ADN. Cependant, le mode de calcul utilisé dans ce travail tend à surestimer la dose de rayonnements Auger. De plus, les calculs extrapolés de l'animal à l'homme sont associés à un degré élevé d'incertitude : l'efficacité de la FdUrd et du KClO_4 , le taux d'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN, de même que les doses absorbées et l'effet à long terme des rayonnements Auger dans certains tissus humains ne sont pas connus (128, 147-149). Dans les testicules, par exemple, l'incorporation de la IdUrd radiomarquée pourrait être limitée par la présence d'une barrière hémato-testiculaire (150).

En conclusion, cette partie du travail a montré *in vitro* et *in vivo*, que la FdUrd est capable d'augmenter significativement l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans les cellules et tumeurs de trois lignées de glioblastomes. Il en a découlé une nette amélioration de la localisation tumorale par scintigraphie dans des souris xénogreffées, suggérant ainsi que cette approche pourrait être utile au niveau clinique. Une estimation dosimétrique préliminaire a en outre montré que les doses de rayonnements γ et Auger devraient être dans les limites acceptables pour les patients lors d'une scintigraphie combinant [^{123}I]IdUrd et FdUrd.

Chapitre 5

[¹²⁵I]IdUrd et IdUrd non-marquée

5.1 Résumé

Dans cette partie du travail, l'effet de la IdUrd non-marquée sur l'incorporation nucléaire et la cytotoxicité de la [¹²⁵I]IdUrd a été évalué dans les trois lignées humaines de glioblastomes. Les résultats ont montré, de manière surprenante, que des concentrations de 0.3 à 10 µM de IdUrd augmentaient *in vitro* la cytotoxicité de la [¹²⁵I]IdUrd dans les cellules U251 et, dans une moindre mesure, LN229. De plus, cette observation était corrélée avec une augmentation du taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN. En présence de 10 µM de IdUrd, cette augmentation était, respectivement, de 2.0, 2.7 et 4.4 fois dans les cellules U87, LN229 et U251. La dThd bloquait de façon compétitive l'augmentation de la cytotoxicité et de l'incorporation nucléaire de [¹²⁵I]IdUrd induite par la IdUrd. D'autre part, l'effet de la IdUrd sur l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN n'était pas reproduit par des analogues de la IdUrd, tels que la 2'-désoxyuridine ou le 5-iodo-1,3-diméthyluracile, suggérant que le mécanisme sous-jacent n'est pas une protection contre la dégradation de la [¹²⁵I]IdUrd. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans des souris nues xénogreffées. Après 8 pré-injections i.p. de 0.1 mg de IdUrd, l'incorporation dans la tumeur était augmentée, respectivement, de 1.5, 2.3 et 2.8 fois dans les lignées U251, U87 et LN229. Toutefois, l'effet de la IdUrd sur l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd n'était pas sélectif sur la tumeur et des augmentations de 1.3 à 2.8 fois étaient observées dans les tissus à renouvellement cellulaire rapide. L'administration de dThd permettait aussi *in vivo* de bloquer l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans la tumeur et les tissus normaux. Ces résultats suggèrent qu'une administration combinée de IdUrd radiomarquée et non-marquée pourrait améliorer son potentiel diagnostique et thérapeutique contre le cancer.

5.2 Introduction

Différents analogues halogénés de la dThd ont été synthétisés en vue d'une application thérapeutique contre le cancer (95, 96). L'intérêt suscité par ces molécules réside dans leur aptitude à interférer avec la synthèse des précurseurs de l'ADN et à s'incorporer à leur place dans l'ADN des cellules en phase S du cycle cellulaire (68). Les cellules en phase S sont sensibles aux radiations ionisantes et la possibilité de marquer instantanément ces molécules avec des radioisotopes émettant des rayonnements α , β^- ou Auger (71, 72) laisse entrevoir un potentiel thérapeutique non négligeable (93, 97, 151, 152). Leur rayon d'action dépendra toutefois du type de radioisotope utilisé. Dans le cas d'un traitement postchirurgical des glioblastomes, où les cellules cancéreuses résiduelles se retrouvent dispersées ou en agrégat dans le tissu sain, les émetteurs α , comme la [^{111}At]AtdUrd (113), et Auger, comme la [^{123}I]IdUrd ou la [^{125}I]IdUrd (85), devraient être plus efficaces que les rayonnements β^- . Par rapport aux émetteurs Auger, les émetteurs α pourraient de plus présenter l'avantage d'irradier les cellules dans lesquelles ils se trouvent, sans pour autant devoir être incorporés dans l'ADN. Au contraire, les émetteurs Auger doivent être dans le voisinage immédiat de l'ADN pour que les électrons Auger puissent être cytotoxiques. Toutefois, cette limitation se révèle être un avantage en diminuant les dommages collatéraux sur les cellules normales voisines. L'innocuité des rayonnements Auger, lorsqu'ils se produisent pendant le transport du vecteur dans le sang, à la surface cellulaire ou même dans le cytoplasme (80), permet de cibler sélectivement les cellules en phase S du cycle cellulaire. Les caractéristiques des rayonnements Auger vont donc de pair avec la capacité des analogues halogénés de la dThd à s'incorporer dans l'ADN des cellules en division. Ce travail s'est donc concentré sur l'étude de la IdUrd marquée avec l' ^{125}I ode ([^{125}I]IdUrd), un prolifique émetteur d'électrons Auger à cause de sa prédominante désintégration par conversion interne (93 %) (85).

Le ciblage des cellules cancéreuses avec la [^{125}I]IdUrd, de même que tout autre analogue de la dThd, présente toutefois plusieurs limitations. Premièrement, la [^{125}I]IdUrd est particulièrement instable *in vivo*, avec une demi-vie biologique de quelques minutes seulement (87, 91). Deuxièmement, elle est potentiellement toxique pour tous les tissus à renouvellement cellulaire rapide, comme la rate, la moelle osseuse ou l'intestin. Troisièmement, la grande partie des cellules cancéreuses qui ne sont pas en phase S du cycle cellulaire au moment de l'administration de la [^{125}I]IdUrd échappe au traitement. C'est pourquoi, l'utilisation thérapeutique de la [^{125}I]IdUrd n'a été envisagée que dans certains types de cancer. Les glioblastomes sont par exemple de bons candidats, car les cellules gliales cancéreuses prolifèrent dans un environnement où la

majorité des cellules sont quiescentes (93, 96). De plus, bien que ce soit rarement le cas dans ce type de pathologie, une barrière hémato-encéphalique intacte peut limiter la dispersion et la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd dans le reste du corps lorsque la [^{125}I]IdUrd est administrée localement, par exemple, dans la cavité postopératoire. Enfin, l'efficacité thérapeutique de la [^{125}I]IdUrd peut encore être augmentée par son infusion continue ou séquentielle, dans le but d'accroître le nombre de cellules cancéreuses susceptibles d'incorporer la [^{125}I]IdUrd dans leur ADN (93).

Dans ce travail, la capacité de la IdUrd non-marquée à augmenter aussi bien l'incorporation dans l'ADN que la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd a été mise en évidence un peu par hasard. Alors que l'objectif était d'inhiber compétitivement l'incorporation dans l'ADN et donc la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd, les résultats se sont révélés contraire à l'attente initiale. La synergie entre IdUrd radiomarquée et non-marquée a donc été approfondie *in vitro* sur les trois lignées humaines de glioblastomes et ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans des souris nues xénogreffées. La compréhension des mécanismes sous-jacents pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies, aussi bien pour la thérapie que pour le diagnostic oncologiques.

5.3 Matériel et Méthodes

Produits.

- La [125 I]IdUrd (activité spécifique de 74 TBq/mmol, 2000 Ci/mmol) et la [3 H]dThd (activité spécifique de 2.5 - 3 TBq/mmol, 70 - 85 Ci/mmol) ont été obtenues d'Amersham International (Buckinghamshire, Grande-Bretagne).
- La dThd, la IdUrd, la 2'-désoxyuridine et le 5-iodo-1,3-diméthyluracile ont été obtenus de Fluka Chemie AG (Buchs, Suisse). Les solutions stock ont été préparées dans de l'eau distillée à une concentration de 5 mM et conservées à -80°C . La dissolution de la IdUrd dans l'eau distillée a nécessité l'adjonction de 0.1 μM de NaOH avant de rétablir le pH à 7.6 avec du HCl. Le 5-iodo-1,3-diméthyluracile a été rendu soluble dans du DMSO à 10 mg/ml.

Méthodes.

- La modulation de la cytotoxicité de la [125 I]IdUrd par la IdUrd non-marquée a été évaluée au moyen d'essais clonogéniques sur les lignées cellulaires U251 et LN229. Il n'a pas été possible d'évaluer la survie cellulaire de la lignée U87, car ces cellules ne forment pas de colonies bien définies en milieu liquide.
- Le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN a été évalué après des pré- ou co-incubations de 4 h avec la IdUrd, la dThd, la 2'-désoxyuridine et le 5-iodo-1,3-diméthyluracile.
- L'influence d'une incubation de 4 h avec 10 μM de IdUrd sur la distribution des cellules en phase S a été analysée par cytofluorométrie en flux au moyen de fluorescence PI (Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse). La limite entre les phases du cycle a été déterminée à partir de la mesure de la phase S par un anticorps anti-BrdUrd, cross-réactif avec la IdUrd (Cat. n°347680, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), détecté par un anticorps anti-IgG murin conjugué au FITC (Cat. n°F26543, Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse).
- Des biodistributions à 24 h après l'injection de [125 I]IdUrd ont été effectuées sur des souris xénogreffées ayant reçu soit des co-injections i.v. de 0.02 à 0.5 mg de IdUrd avec la [125 I]IdUrd, soit 2 injections i.v. de 0.2 mg / 0.2 ml, 240 et 120 min avant l'injection de [125 I]IdUrd, soit 8 pré-injections i.p. de 0.1 mg / 0.1 ml de IdUrd toutes les 30 min entre 240 et 30 min avant l'injection de [125 I]IdUrd. Les souris contrôles ont reçu des injections i.p. ou i.v. de NaCl suivies de l'injection de [125 I]IdUrd. L'inhibition compétitive avec la dThd a été réalisée sur des souris ayant reçu la séquence de pré-traitement de 8 injections i.p. de IdUrd. En plus de ces

injections, les souris ont reçu 2 injections i.p. de 0.3 mg / 0.1 ml de dThd, 15 min avant et 30 min après une co-injection i.v. de 0.4 mg de dThd et [¹²⁵I]IdUrd.

Analyse statistique.

- La fraction de survie cellulaire après incubation avec la [¹²⁵I]IdUrd et la IdUrd non-marquée a été analysée au moyen de modèles de régression. Les courbes les mieux ajustées étaient obtenues à partir d'équations de deuxième degré pour chacune des concentrations de [¹²⁵I]IdUrd et de IdUrd. L'addition d'un facteur de correction intégrant une interaction entre la [¹²⁵I]IdUrd et la IdUrd a permis un meilleur ajustement des courbes. Les autres résultats ont été exprimés sous forme de pourcentages ou moyennes $\pm$ 1 déviation standard (DS). Les valeurs ont été analysées au moyen d'un test *t* bilatéral de variance égale. Le seuil de signification statistique a été fixé à $p = .05$. Les symboles *, **, *** représentent respectivement $p < .05$, $p < .01$, $p < .001$.

5.4 Résultats

5.4.1 Survie cellulaire après traitement avec $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$

Des essais clonogéniques ont été entrepris pour évaluer la survie cellulaire après traitement avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$. Les tests préliminaires ont montré que les essais colorimétriques MTT ou les comptages cellulaires ne permettaient pas d'apprécier pleinement la cytotoxicité de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$, car certaines cellules ayant incorporé la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans leur ADN pouvaient survivre plus de 10 jours après le traitement et même conserver un certain potentiel de division (68). La survie clonogénique après incubation de 6, 24 et 72 h avec différentes doses de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ a donc été évaluée par des essais clonogéniques. Les résultats pour les lignées U251 et LN229 sont présentés, respectivement, dans les figures 20A et 20B.

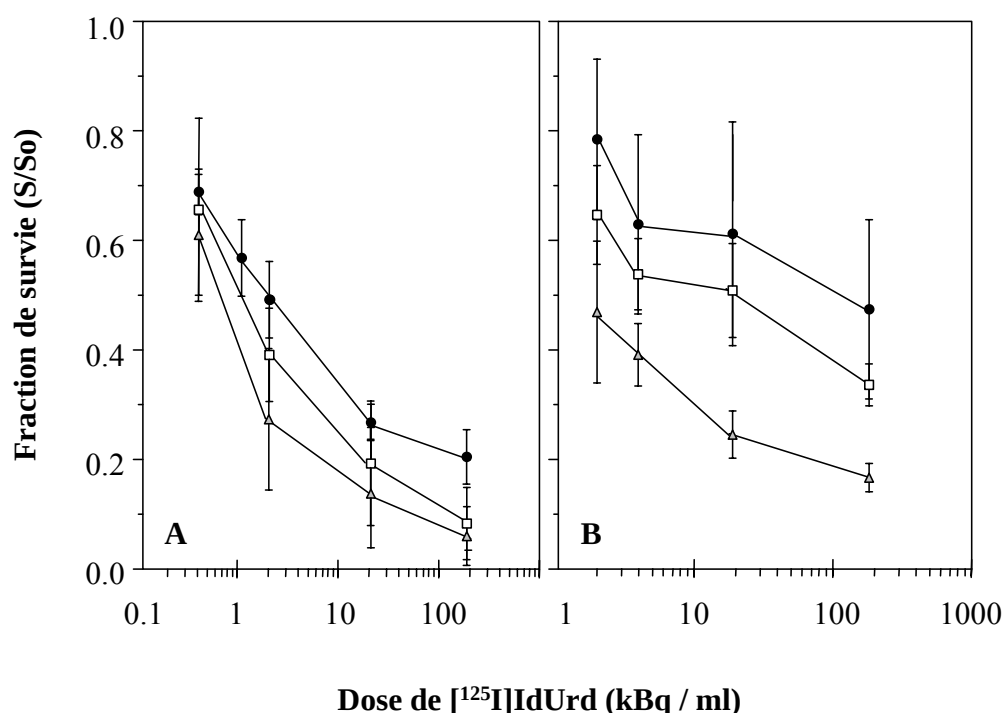


Figure 20. Cytotoxicité de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans les cellules U251 (A) et LN229 (B). La fraction de survie cellulaire (S/S_0) est tracée en fonction de la concentration de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ (0.4 à 185 kBq/ml, 0.005 à 2.5 nM). Les cellules ont été incubées pendant 6 h (λ), 24 h (μ) et 72 h (Δ). Chaque point représente la moyenne $\pm$ 1 DS de 3 expériences indépendantes comprenant 3 échantillons par condition testée.

La survie moyenne diminuait en fonction de la dose administrée et du temps d'incubation. Les cellules U251 se sont révélées plus sensibles à la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ que les cellules LN229. Pour les cellules U251, les doses de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ qui permettaient une survie de 37 % (D_{37}) après 6, 24 et 72 h d'incubation étaient, respectivement, 11.2, 3.9

et 1.5 kBq/ml. Pour les cellules LN229, les D_{37} après 24 et 72 h d'incubation étaient, respectivement, 138 et 6.7 kBq/ml.

5.4.2 Modulation de la cytotoxicité de la [125 I]IdUrd par la IdUrd

Une inhibition de la cytotoxicité de la IdUrd radiomarquée par la dThd et la IdUrd non-marquée a été décrite pour les lignées V79 et D-247 MG (80, 113). L'inhibition par la dThd a été confirmée ici sur les lignées cellulaires de glioblastomes, U251 et LN229. Par contre, les expériences combinant [125 I]IdUrd et IdUrd non-marquée, à des concentrations envisageables en clinique, ont abouti, contre toute attente, à une nette diminution de la survie clonogénique par rapport aux conditions contrôles avec la [125 I]IdUrd comme seul traitement (Figure 21).

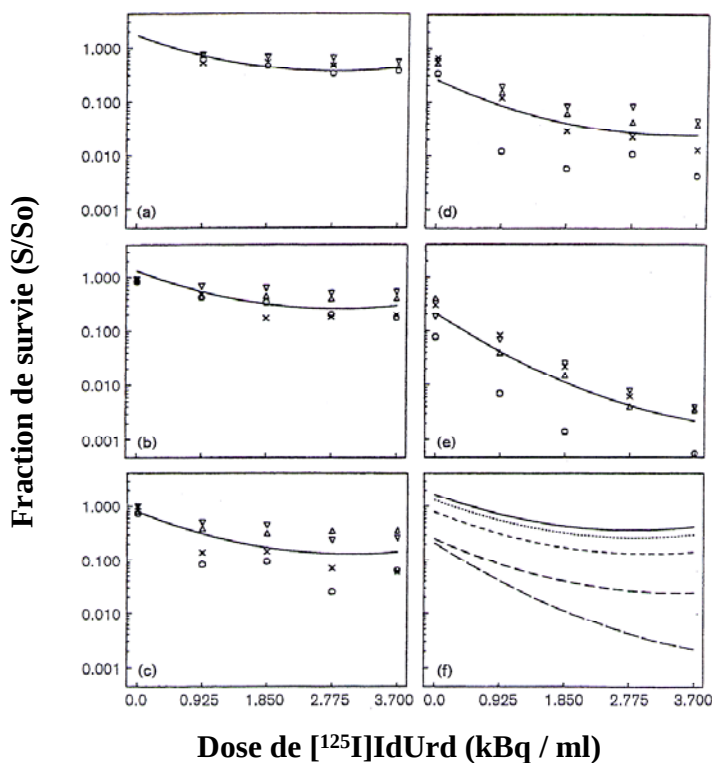


Figure 21. Effet de la IdUrd non-marquée sur la cytotoxicité de la [125 I]IdUrd dans les cellules U251. La fraction de survie cellulaire (S/S_0) est tracée en fonction de la concentration de [125 I]IdUrd (0.925 à 3.7 kBq/ml). Les cellules ont été incubées pendant 48 h avec la [125 I]IdUrd en absence (a) ou présence de 0.3 μ M (b), 1 μ M (c), 3 μ M (d) ou 10 μ M (e) de IdUrd non-marquée. Une représentation des courbes (a) à (e) est montrée en (f). Chaque symbole représente la moyenne d'une expérience comprenant 3 échantillons par condition testée. Les courbes sont ajustées en fonction des 4 expériences, au moyen d'équations de deuxième degré et d'un facteur d'interaction entre la [125 I]IdUrd et la IdUrd non-marquée.

Dans la figure 21, la dose de [125 I]IdUrd, qui permettait à elle seule de réduire la survie cellulaire de 50 %, était de 3.7 kBq/ml, correspondant à une concentration de 46 pM. Par comparaison, il fallait une concentration de IdUrd non-marquée 65'000 fois plus élevée, c'est-à-dire 3 μ M, pour obtenir le même effet, alors que des concentrations

égales ou inférieures à 0.1 μM ne montraient pas de cytotoxicité significative. Cette observation démontre que la cytotoxicité de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ est essentiellement due aux radiations émises par l' ^{125}I ode. Toutefois, les courbes de survie cellulaire présentées dans la figure 21 ne sont pas caractéristiques d'une radiothérapie conventionnelle. En effet, l'effet de l'augmentation de la dose de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ sur la survie cellulaire s'est traduit par une absence d'épaulement des courbes. La présence de IdUrd non-marquée n'a pas modifié cet aspect. Cependant, la survie moyenne des cellules U251 était nettement diminuée par rapport à un traitement avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule. Une analyse par régression a conclu que la IdUrd non-marquée contribuait, autant que la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$, à diminuer de façon significative la survie cellulaire ($p < .001$ pour les deux molécules). De plus, une petite part de la cytotoxicité totale était due à une interaction positive entre la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et la IdUrd non-marquée. L'effet de la IdUrd non-marquée sur la cytotoxicité de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ disparaissait à des concentrations égales ou inférieures à 0.1 μM .

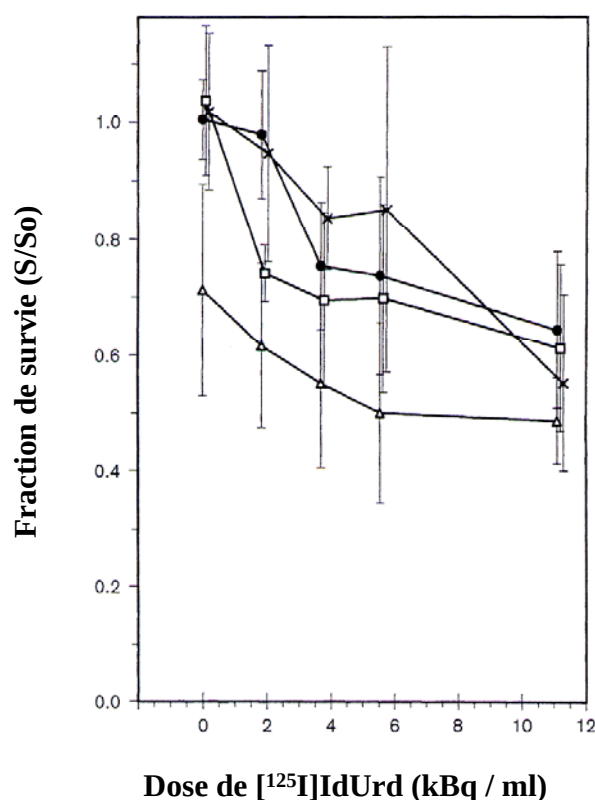


Figure 22. Effet de la IdUrd non-marquée et de la dThd sur la cytotoxicité de la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans les cellules LN229. La fraction de survie cellulaire (S/S_0) est tracée en fonction de la concentration de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ (1.85 à 11.1 kBq/ml). Les cellules ont été incubées pendant 48 h avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ en absence (λ) ou présence de 1 μM (μ) ou 10 μM (Δ) de IdUrd non-marquée ou 10 μM de IdUrd non-marquée et 50 μM de dThd (X). Chaque symbole représente la moyenne $\pm$ 1 DS de 3 expériences comprenant 3 échantillons par condition testée.

La cytotoxicité combinée de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et IdUrd non-marquée nécessite probablement l'incorporation des deux molécules dans l'ADN. C'est ce que semble

indiquer la complète inhibition de la cytotoxicité de la [125 I]IdUrd combinée à 10 μ M de IdUrd non-marquée observée après une coincubation avec 50 μ M de dThd.

Ces résultats ont été confirmés dans les cellules U251 par plusieurs expériences indépendantes avec des temps de coincubation de 24 et 48 h. Une expérience similaire avec un temps d'incubation de 48 h a été réalisée sur les cellules LN229. La cytotoxicité de la [125 I]IdUrd combinée à la IdUrd non-marquée s'est révélée faible mais aussi additive (Figure 22).

5.4.3 Modulation de l'incorporation de [125 I]IdUrd par la IdUrd

L'effet de la IdUrd non-marquée sur le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN a été évalué dans les lignées cellulaires U251, LN229 et U87.

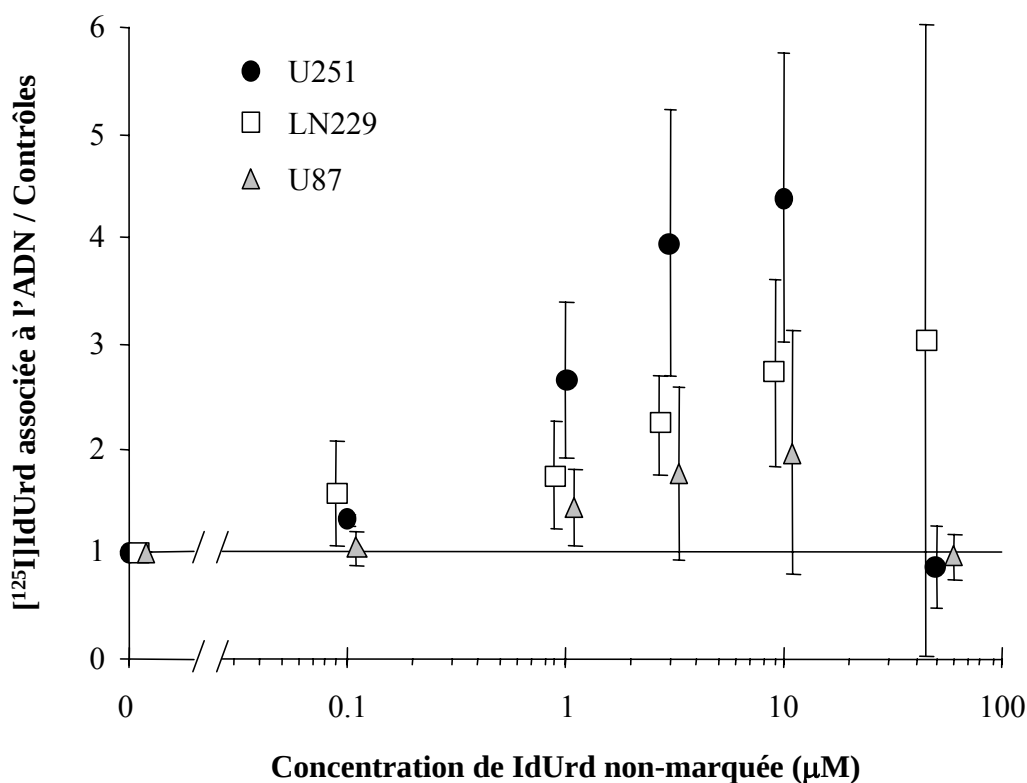


Figure 23. Taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN en présence de IdUrd non-marquée. Les cellules U251, LN229 et U87 ont été incubées pendant 4 h avec 185 kBq de [125 I]IdUrd et 0.1, 1, 3, 10 et 50 μM de IdUrd. Les symboles représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 5 expériences indépendantes de 3 à 4 échantillons par condition testée. Les résultats de chaque expérience ont été normalisés par rapport à des cellules contrôles incubées pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd seule.

Des incubations de 4 h avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd ont été entreprises, après que des expériences préliminaires ont montré que la [125 I]IdUrd était incorporée de façon linéaire dans l'ADN et n'induisait pas de cytotoxicité par accumulation de radiations pendant cette période. Les résultats montrent que des coincubations de 0.1 à 10 μM de IdUrd non-marquée augmentaient le taux d'incorporation de la [125 I]IdUrd

dans l'ADN des trois lignées cellulaires étudiées (Figure 23). Comparée à une incubation de 4 h avec la [125 I]IdUrd seule, une co-incubation de 4 h avec 10 μ M de IdUrd augmentait le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN, respectivement, d'un facteur de 2.0, 2.7 et 4.4 fois dans les cellules U87, LN229 et U251. Toutefois, à la plus haute concentration testée, c'est-à-dire 50 μ M, l'effet de la IdUrd non-marquée sur le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN tendait à disparaître, excepté dans les cellules LN229 (Figure 23).

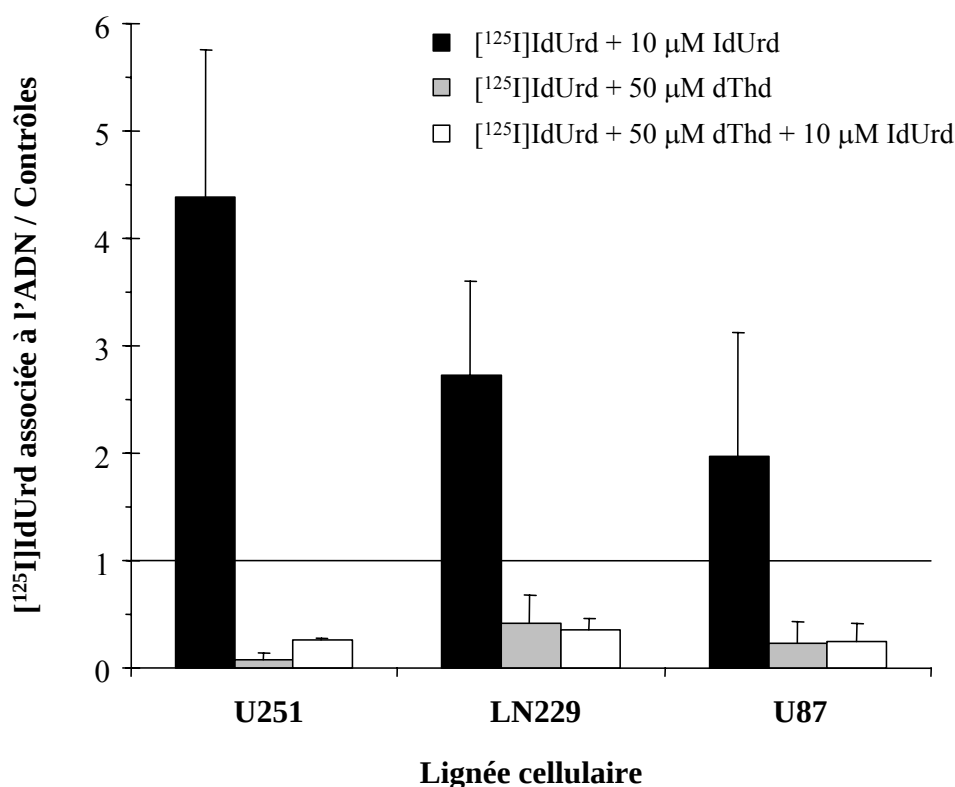


Figure 24. Inhibition de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN par la dThd. Les cellules U251, LN229 et U87 ont été incubées pendant 4 h avec 185 kBq de [125 I]IdUrd en absence ou présence de 10 μ M de IdUrd non-marquée et/ou 50 μ M de dThd. Les colonnes représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 3 à 5 expériences indépendantes de 3 à 4 échantillons par condition testée. Les résultats de chaque expérience ont été normalisés par rapport à des cellules contrôles incubées pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd seule.

Des expériences de co-incubations avec la dThd ont été réalisées dans le but d'évaluer si le désoxyribonucléoside physiologique était capable d'inhiber l'effet de la IdUrd non-marquée sur l'incorporation de la [125 I]IdUrd dans l'ADN. Les résultats montrent qu'une concentration non-toxique de 50 μ M de dThd empêchait effectivement l'incorporation basale de [125 I]IdUrd, ainsi que l'augmentation de l'incorporation induite par la IdUrd non-marquée (Figure 24).

5.4.4 Incorporation de [125 I]IdUrd en présence d'analogues de la IdUrd

Dans le but de déterminer si le mécanisme sous-jacent qui permet à la IdUrd non-marquée d'augmenter l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN est une protection contre la dégradation enzymatique de la [125 I]IdUrd, les cellules U251 ont été coincubées pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd et deux analogues de la IdUrd non-marquée, la 2'-désoxyuridine et le 5-iodo-1,3-diméthyluracile (Figure 25A). Les résultats montrent que ni la 2'-désoxyuridine ni le 5-iodo-1,3-diméthyluracile n'étaient en mesure de reproduire l'effet de la IdUrd non-marquée sur l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN (Figure 25B).

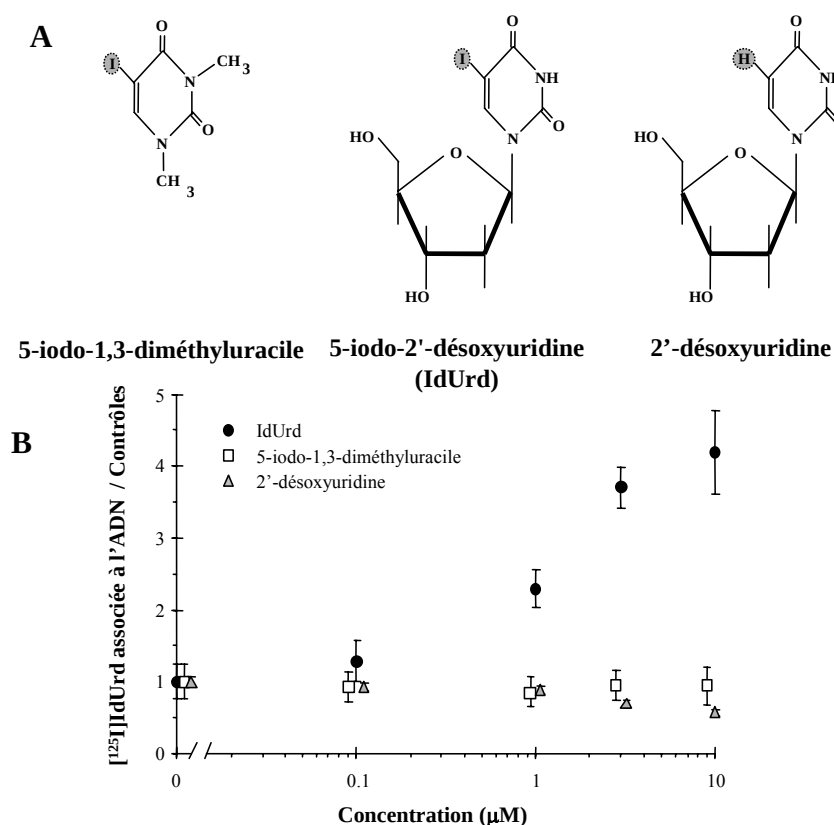


Figure 25. (A) Structure chimique de la IdUrd, le 5-iodo-1,3-diméthyluracile et la 2'-désoxyuridine. (B) Comparaison entre les effets de la IdUrd, le 5-iodo-1,3-diméthyluracile et la 2'-désoxyuridine sur l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN des cellules U251. Les cellules ont été incubées pendant 4 h avec 185 kBq de [125 I]IdUrd et 0.1, 1, 3 et 10 μ M de IdUrd, de 5-iodo-1,3-diméthyluracile ou de 2'-désoxyuridine. Les symboles représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 4 échantillons par condition testée, normalisés par rapport à des cellules contrôles incubées pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd seule.

5.4.5 Modulation de l'incorporation de [125 I]IdUrd par la IdUrd en fonction de la densité cellulaire

Des coincubations avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd et 10 μ M de IdUrd non-marquée ont été réalisées à différents jours après l'ensemencement des puits, dans le but de vérifier si l'augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN, induite par la IdUrd non-marquée, était liée à la densité cellulaire. Les résultats montrent que le pic

d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN se situait à 4 jours après ensemencement, lorsqu'un maximum de cellules dans les puits était en phase exponentielle. L'effet de la IdUrd non-marquée sur l'incorporation de [125 I]IdUrd diminuait ensuite, lorsque les cellules devenaient confluentes (Figure 26).

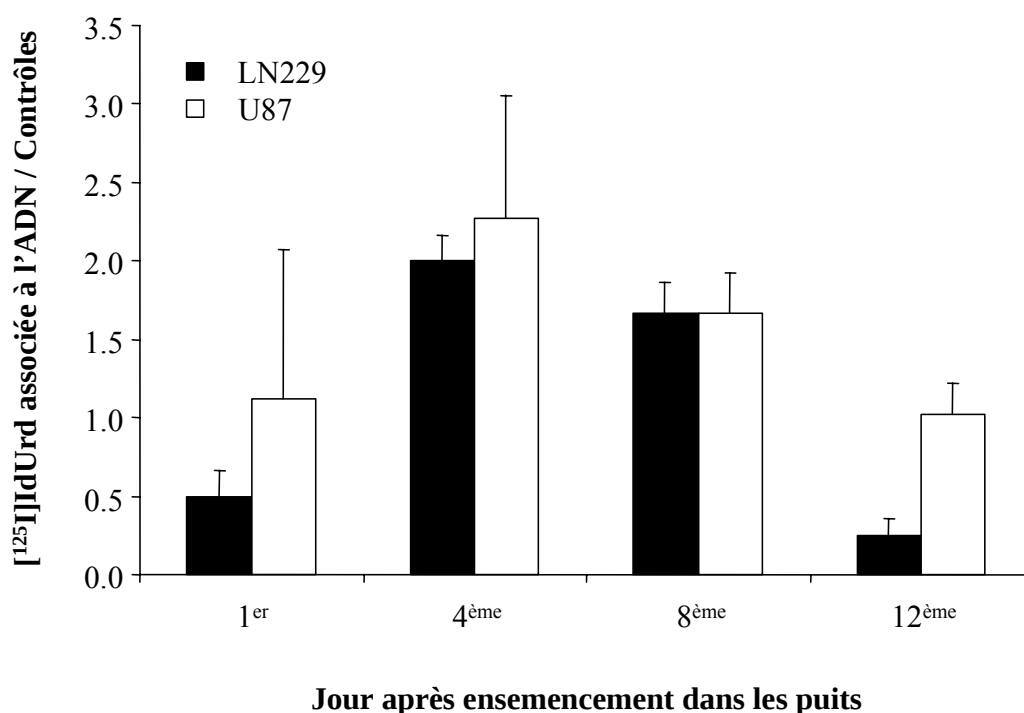


Figure 26. Modulation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN par la IdUrd non-marquée en fonction de la densité cellulaire dans les puits. Les cellules LN229 et U87 à différentes densités dans les puits ont été incubées pendant 4 h avec 185 kBq de [125 I]IdUrd et 10 μ M de IdUrd. Les colonnes représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 4 échantillons par condition testée, normalisés par rapport à des cellules contrôles incubées pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd seule. Les cellules étaient en pleine phase exponentielle au 4^{ème} jour et confluentes environ au 9^{ème} jour après l'ensemencement dans les puits.

5.4.6 Distribution des cellules dans le cycle cellulaire après exposition avec la IdUrd

Les phases du cycle cellulaire après exposition à la IdUrd non-marquée ont été révélées par fluorescence PI. Comparée à une incubation de 1 h, une incubation de 4 h avec 10 μ M de IdUrd ne modifiait que modestement la distribution des cellules U87 dans le cycle cellulaire. Le nombre de cellules en phase S n'était que marginalement augmenté de 7.6 ± 0.1 % à 9.2 ± 0.6 % ($p = .06$) (Figure 27).

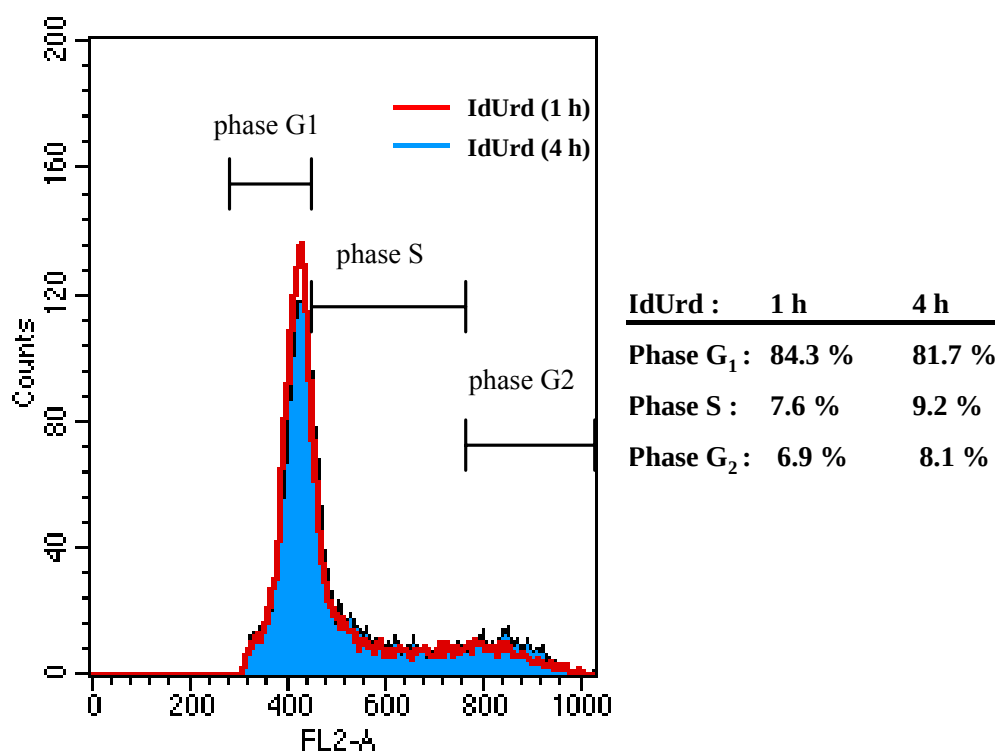


Figure 27. Distribution des cellules U87 dans le cycle cellulaire en présence de IdUrd non-marquée. La quantité d'ADN marqué par fluorescence PI a été analysée par cytofluorométrie en flux. (—) Incubation de 1 h avec 10 μ M de IdUrd (contrôles); (—) Incubation de 4 h avec 10 μ M de IdUrd.

5.4.7 Biodistribution de la [125 I]IdUrd dans les souris xénogreffées après pré-injections de IdUrd

L'effet de la IdUrd non-marquée et de la dThd sur la biodistribution de la [125 I]IdUrd a été évalué dans des souris xénogreffées 24 h après injection i.v. de 250 kBq (6.76 μ Ci) de [125 I]IdUrd. Des expériences préliminaires ont montré qu'une co-injection i.v. de 100 à 500 μ g de IdUrd non-marquée avec la [125 I]IdUrd inhibait la rétention de la radioactivité dans les souris, alors qu'une co-injection i.v. avec des concentrations plus basses (20 à 50 μ g) n'avait pas d'influence sur la biodistribution de la radioactivité 24 h après injection i.v. de [125 I]IdUrd. Dans les expériences suivantes, des pré-traitements i.v. ou i.p. de IdUrd ont donc été réalisés sur une période de 4 h. Comparé aux souris contrôles ayant reçu des injections i.p. de NaCl avant l'injection i.v. de 250 kBq de [125 I]IdUrd, l'incorporation de [125 I]IdUrd dans les tumeurs de souris pré-traitées avec 8 injections i.p. de 0.1 mg de IdUrd augmentait, respectivement, de 1.5, 2.3 et 2.8 fois pour les lignées U251, U87 et LN229 (Tableau 8).

L'incorporation de [125 I]IdUrd était aussi augmentée de manière similaire (entre 1.3 et 2.8 fois) dans les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide, comme la

rate, le fémur (représentatif de la moelle osseuse), la peau, l'estomac, l'intestin grêle ou le côlon. La concentration de radioactivité restait par contre négligeable dans les autres tissus normaux à faible division cellulaire, comme le foie, le cœur ou le poumon (Figure 28). Des augmentations marquées de l'incorporation de la [125 I]IdUrd dans les tumeurs ont aussi été obtenues dans les souris pré-traitées avec seulement 2 injections i.v. de 0.2 mg de IdUrd non-marquée. Le taux d'incorporation était augmenté, respectivement, de 1.3, 1.7 et 1.9 fois dans les tumeurs U251, LN229 et U87 (Tableau 8).

Tableau 8. Incorporation de [125 I]IdUrd dans les tumeurs xénogreffées U87, LN229 et U251 en présence de IdUrd non-marquée

	U87		LN229		U251	
	%DI/g ^d	Nb ^e	%DI/g	Nb	%DI/g	Nb
Contrôles	0.30 ± 0.15	19	0.39 ± 0.31	29	0.20 ± 0.14	21
IdUrd i.v. ^a	0.57 ± 0.20 ^{**}	5	0.67 ± 0.25 ^{p=.01}	11	0.25 ± 0.15 ^{p=.39}	8
IdUrd i.p. ^b	0.69 ± 0.23 ^{***}	8	1.09 ± 0.29 ^{***}	15	0.29 ± 0.11 ^{p=.06}	11
IdUrd + dThd i.p. ^c	0.12 ± 0.03 ^{**,f}					

À noter que la biodistribution dans les tissus normaux de ces souris est présentée dans la figure 28.

^a 2 injections i.v. de 0.2 mg de IdUrd toutes les 2 h avant l'injection i.v. de [125 I]IdUrd.

^b 8 injections i.p. de 0.1 mg de IdUrd toutes les 30 min avant l'injection i.v. de [125 I]IdUrd.

^c Idem que ^b + 2 injections i.p. de 0.3 mg de dThd 15 min avant et 30 min après 1 injection i.v. de [125 I]IdUrd + 0.4 mg de dThd.

^d %DI/g, pourcentage de la dose injectée par gramme de tumeur ± 1 DS.

^e Nb, nombre de souris.

^f La signification statistique de l'inhibition de la dThd est calculée par rapport au groupe ayant reçu le traitement avec les 8 injections i.p. de IdUrd

^{**} $p < .01$; ^{***} $p < .001$

Dans le but de démontrer la spécificité de l'effet de la IdUrd non-marquée sur l'incorporation de la [125 I]IdUrd dans l'ADN, les souris pré-traitées avec les 8 injections i.p. de IdUrd ont reçu, en plus, 3 injections d'un total de 1 mg de dThd. Les résultats montrent que la dThd bloquait efficacement l'incorporation de [125 I]IdUrd dans la tumeur et les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide. Ainsi, après inhibition par la dThd, la rétention tissulaire de la [125 I]IdUrd dans les tissus à forte division cellulaire était similaire à celle observée dans les tissus à faible division cellulaire (Tableau 8 et Figure 28).

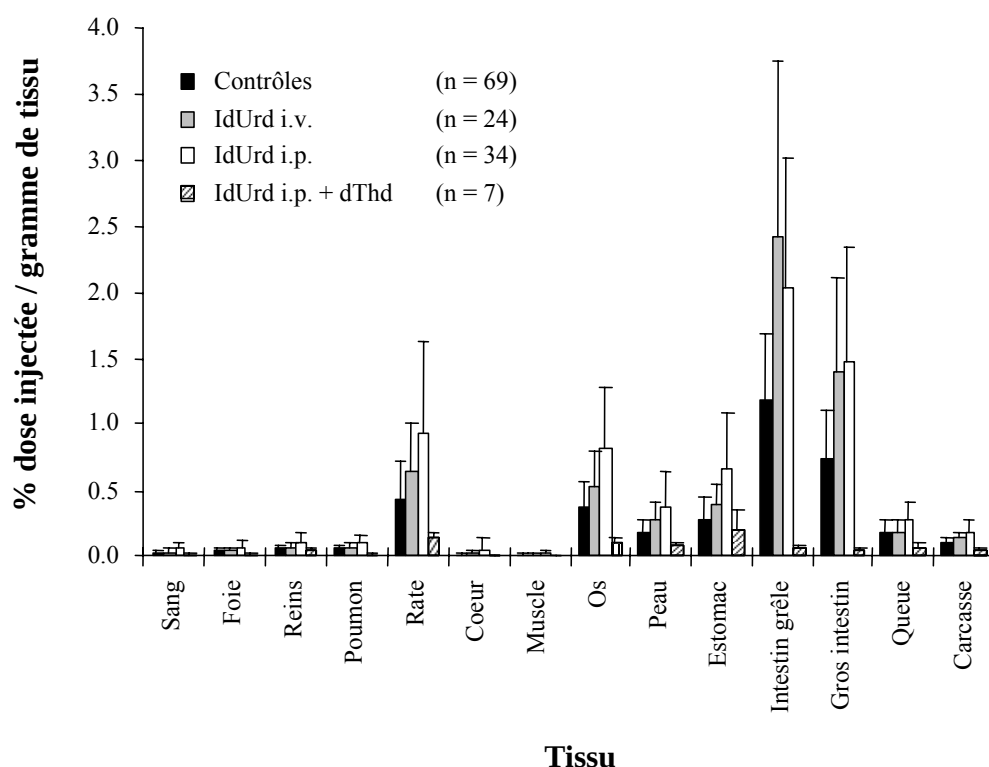


Figure 28. Biodistribution de la [^{125}I]IdUrd dans les tissus normaux de souris nues xénogreffées après pré-traitement avec la IdUrd non-marquée. Chaque expérience incluait un groupe de souris contrôles injectées i.v. avec seulement 185 kBq de [^{125}I]IdUrd. La IdUrd non-marquée était administrée soit par 2 injections i.v. de 0.2 mg 4 et 2 h avant l'injection de [^{125}I]IdUrd, soit par 8 injections i.p. de 0.1 mg toutes les 30 min avant l'injection de [^{125}I]IdUrd. Un groupe de 7 souris a reçu, en plus des 8 injections i.p. de IdUrd, 2 injections i.p. de 0.3 mg de dThd, 15 min avant et 30 min après la co-injection i.v. de [^{125}I]IdUrd et 0.4 mg de dThd. Les souris étaient sacrifiées et disséquées 24 h après l'injection de [^{125}I]IdUrd. Les données sont présentées en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu ± 1 DS. Nb, nombre de souris. Les souris ont été groupées en fonction du traitement reçu indépendamment du type de tumeur greffée. À noter que l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans la tumeur de ces souris est présentée en détail dans le Tableau 8.

5.5 Discussion

À l'heure actuelle, les glioblastomes sont associés à un très mauvais pronostic clinique car ils résistent à tous les traitements conventionnels (101). Parmi les alternatives thérapeutiques possibles, l'administration de [^{125}I]IdUrd a été proposée, car les glioblastomes se présentent sous forme de glie néoplasique environnée essentiellement de cellules normales quiescentes (97, 153). Une autoradiographie dans des rats porteurs de tumeurs cérébrales a démontré que la [^{125}I]IdUrd était incorporée sélectivement dans l'ADN de la glie néoplasique, alors que les cellules du cerveau normal restaient dénuées de toute radioactivité (96). L'efficacité d'un traitement avec la [^{125}I]IdUrd est cependant limitée par une incorporation de [^{125}I]IdUrd restreinte à la phase S du cycle cellulaire et une dégradation biologique rapide. Récemment, il a été démontré dans le rat que ces limitations pouvaient être partiellement contournées par une administration locale et continue pendant 2 à 6 jours via une pompe osmotique. Toutefois, le traitement était surtout efficace lorsque l'administration de [^{125}I]IdUrd était effectuée juste après (1 jour) l'implantation de la tumeur (93).

Les résultats présentés dans ce travail montrent que la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd peut être augmentée *in vitro* par une co-administration de IdUrd non-marquée. Ces observations ont été confirmées dans deux lignées cellulaires de glioblastomes. Bien que la IdUrd non-marquée développait à elle seule une cytotoxicité à partir d'une concentration de 3 μM , la diminution de la survie cellulaire observée lors de sa co-administration avec la [^{125}I]IdUrd n'était pas seulement due à l'accumulation des cytotoxicités des deux molécules. Une analyse par régression a montré que les résultats ne s'expliquaient pas sans une interaction synergique entre les deux molécules. Il existe donc un mécanisme qui permet à l'une des deux molécules d'amplifier l'action cytotoxique de l'autre.

Les mécanismes permettant à la IdUrd non-marquée d'augmenter la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd ne sont pas clairs. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Premièrement, il a été démontré à plusieurs reprises et en particulier sur des gliomes humains (154), que des analogues halogénés de la dThd, comme la IdUrd ou la BrdUrd, radio-sensibilisaient l'ADN en entravant la réparation des dommages occasionnés au double brin par les radiations ionisantes (155). Après cassure dans le double brin, la IdUrd et la BrdUrd étaient incorporées dans l'ADN à la place de la dThd et la dCyd. Cette incorporation erronée entraînait ensuite des excisions répétitives de IdUrd par la uracil-ADN-glycosylase, des mutations, et finalement une fragmentation de l'ADN (156). Il est donc possible que la IdUrd non-marquée, administrée à des concentrations

micromolaires, sensibilise l'ADN aux rayonnements Auger développés par des concentrations picomolaires de [^{125}I]IdUrd.

Comme seconde hypothèse, la IdUrd non-marquée pourrait amplifier la cytotoxicité de la [^{125}I]IdUrd en augmentant son incorporation dans l'ADN. Cette hypothèse paraît, à première vue, invraisemblable, d'autant plus qu'une inhibition compétitive de l'incorporation nucléaire et de la cytotoxicité de la IdUrd radiomarquée par la IdUrd non-marquée a été décrite précédemment dans les cellules V79 (79) et les gliomes humains D-247 MG (113). Toutefois, les résultats obtenus dans cette étude montrent, au contraire, que la IdUrd non-marquée augmentait l'incorporation de la [^{125}I]IdUrd dans l'ADN des trois lignées de glioblastomes étudiées. L'augmentation de l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans l'ADN était observée aussi bien *in vitro*, où elle était corrélée à une augmentation de la cytotoxicité, que *in vivo* dans des expériences sur souris nues xénogreffées avec les trois lignées de glioblastomes.

Les résultats de biodistribution montrent qu'un pré-traitement de 4 h avec la IdUrd non-marquée augmentait significativement le taux d'incorporation de [^{125}I]IdUrd, non seulement dans les trois types de tumeurs, mais aussi dans les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide, comme la moelle osseuse, la rate, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et la peau. Les niveaux de radioactivité dans les tissus à faible division cellulaire, comme le foie, les poumons et les reins, restaient par contre faibles. Une co-administration de dThd, même dans les souris pré-traitées avec la IdUrd non-marquée, inhibait l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans la tumeur et les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide. Ceci démontre que l'augmentation de l'incorporation de [^{125}I]IdUrd était spécifiquement corrélée avec la synthèse d'ADN.

À l'opposé des expériences *in vitro* où l'augmentation de l'incorporation de [^{125}I]IdUrd était la plus élevée dans les cellules U251 par rapport aux cellules LN229 et U87, elle était la plus basse dans les tumeurs U251 xénogreffées. La raison pourrait résider en ce que les cellules U251 poussent très bien *in vitro*, avec un temps de dédoublement très court, alors que les tumeurs U251 poussent très lentement *in vivo* et présentent de larges zones nécrotiques.

Un protocole d'administration avec des injections i.p. répétées de IdUrd non-marquée paraissait meilleur qu'un protocole avec seulement deux injections i.v., même si la quantité de IdUrd injectée i.p. était plus importante que celle injectée i.v. L'augmentation de l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans les tumeurs U251, LN229 et U87 était, respectivement, de 1.5, 2.8 et 2.3 fois après injections i.p. contre seulement 1.3, 1.7, et 1.9 fois après injections i.v. Cela pourrait indiquer qu'un niveau constant et suffisant de IdUrd non-marquée est nécessaire pour optimiser l'incorporation de la [^{125}I]IdUrd dans la tumeur.

Au regard d'une précédente publication rapportant une incorporation de IdUrd dépendante de sa concentration (157), l'observation qu'un pré-traitement avec des concentrations micromolaires croissantes de IdUrd non-marquée permet d'augmenter le taux d'incorporation d'une concentration picomolaire et fixe de IdUrd radiomarquée est surprenante. Toutefois, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le ou les mécanismes sous-jacents :

Premièrement, des concentrations micromolaires de IdUrd non-marquée pourraient protéger des concentrations picomolaires de [125 I]IdUrd contre une dégradation enzymatique, en fournissant un substrat en excès. Cette hypothèse n'est toutefois pas supportée par les résultats de cette étude qui montrent qu'un pré-traitement avec la 2'-désoxyuridine et le 5-iodo-1,3-diméthyluracile ne pouvait pas reproduire l'effet de la IdUrd non-marquée en protégeant la [125 I]IdUrd, respectivement, de la déglycosylation et de la déhalogénéation. Il n'est cependant pas exclu qu'un tel phénomène se produise *in vivo*, où la [125 I]IdUrd est dégradée très rapidement.

Comme seconde hypothèse, la disponibilité de quantités élevées de précurseurs de l'ADN, comme la IdUrd, pourrait stimuler plus de cellules à entrer en phase S du cycle cellulaire. Selon les analyses du cycle cellulaire obtenues dans ce travail, le nombre de cellules s'engageant dans la phase S n'était que légèrement augmenté après une coincubation de 4 h avec 10 μ M de IdUrd non-marquée. Des coincubations avec 10 μ M de IdUrd à différents temps après l'ensemencement dans les puits ont montré que l'incorporation de la [125 I]IdUrd dans l'ADN était la plus élevée quand un maximum de cellules étaient en phase exponentielle. D'un côté, une disponibilité limitée de précurseurs de l'ADN pourrait être un facteur limitant lorsqu'un grand nombre de cellules se divisent en même temps. D'un autre côté, l'exposition à un excès de nucléotides, par exemple 50 μ M de IdUrd, pourrait inhiber la synthèse d'ADN et même être cytotoxique, comme c'était le cas ici dans les incubations *in vitro*.

Comme dernière hypothèse, qui n'a pas été évaluée dans ce travail, l'incorporation de la [125 I]IdUrd dans l'ADN par l'entremise de la voie de récupération des nucléotides pourrait être favorisée par une régulation rétroactive négative de la synthèse *de novo* de dTMP. Une étude récente a montré que la IdUrd, une fois phosphorylée en IdUMP, peut effectivement inhiber la TS en agissant comme substrat inconvertible (119). Des observations similaires ont aussi été rapportées avec d'autres analogues halogénés de la dThd. Par exemple, une exposition à la BrdUrd entraînait une chute rapide des concentrations de dTTP et dCTP dans les cellules U251, avec un minimum atteint au bout de 6 h d'incubation seulement. Cette réduction des concentrations de dTTP et dCTP favorisait indirectement l'incorporation de BrdUTP dans l'ADN (158). Il est donc fort probable que la IdUrd présente un effet similaire sur

la régulation de la synthèse des nucléotides, non seulement dans les cellules U251, mais aussi dans les cellules LN229 et U87.

En fin de compte, bien qu'instructives, les expériences réalisées dans cette étude, ne permettent pas de conclure pour un mécanisme d'action plutôt qu'un autre. Il est fort possible que tous ces mécanismes soient impliqués à différents degrés dans la modulation de l'incorporation dans l'ADN et la cytotoxicité de la [¹²⁵I]IdUrd.

La IdUrd non-marquée a été décrite comme inhibant l'incorporation nucléaire et la cytotoxicité de la [¹²⁵I]IdUrd dans d'autres lignées cellulaires (80, 113). Ces observations divergentes pourraient s'expliquer par le niveau d'expression du gène *p53* dans les lignées cellulaires. Dans cette étude, la sensibilité à la [¹²⁵I]IdUrd et la IdUrd non-marquée n'était pas identique entre les lignées testées. Par rapport aux cellules U251 homozygotes mutantes pour le gène *p53* (-/-), les cellules LN229 hétérozygotes avec transactivation du gène *p53* sauvage (+/-) (159) semblaient présenter une certaine résistance à la cytotoxicité des deux molécules. De même, l'augmentation du taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd était moins importante dans les cellules U87 de type *p53* sauvage (++) que dans les lignées mutantes LN229 et U251. On peut effectivement imaginer que l'incorporation de IdUrd est restreinte dans l'ADN des cellules de type sauvage par rapport aux cellules de type mutant, car *p53* est impliqué dans l'arrêt des cellules en phase G₁ après des dommages dans l'ADN, en vue de réparations ou de l'enclenchement d'un processus apoptotique. Quelques études semblent effectivement indiquer que les cellules *p53*⁺ ont une capacité de réparation de l'ADN augmentée par rapport aux cellules *p53*⁻, résultant en une diminution des aberrations chromosomiques et une augmentation de la survie cellulaire. Une fonction *p53* intacte des cellules LN229 autoriserait donc ces cellules à réparer leur ADN endommagé et ainsi à échapper à la toxicité délivrée par la [¹²⁵I]IdUrd. Toutefois, le taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN était augmenté en présence de IdUrd non-marquée, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, dans les trois lignées de glioblastomes testées, et cela indépendamment du status du gène *p53*. De plus, des augmentations similaires étaient observées dans tous les tissus normaux à renouvellement cellulaire rapide, démontrant ainsi que cette observation peut être reproduite dans n'importe quelle population cellulaire. L'augmentation du taux d'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN semblait plutôt dépendre de la vitesse de prolifération des cellules, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

En conclusion, les résultats présentés dans cette partie du travail suggèrent que l'administration combinée de IdUrd radiomarquée et non-marquée peut surmonter, du moins partiellement, une faible incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN des glioblastomes. Une augmentation du taux d'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN pourrait se révéler utile aussi bien pour une approche diagnostique que

thérapeutique, et complémentaire à une administration sélective dans l'artère hépatique (160, 161) ou dans la cavité postopératoire après résection de la tumeur (93, 97). Toutefois, des expériences complémentaires sont nécessaires pour évaluer si l'augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd observée dans les tumeurs xénogreffées après administration de IdUrd non-marquée se traduit aussi, comme c'est le cas *in vitro*, par une augmentation de la cytotoxicité.

Chapitre 6

$[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et Mélange de Désoxyribonucléosides

6.1 Résumé

Il a été rapporté à plusieurs reprises qu'une administration d'un mélange de nucléotides restaurait et soutenait la prolifération des leucocytes et des entérocytes. De plus, comme il a été suggéré que les cellules cancéreuses utilisent plus efficacement les nucléotides exogènes que les cellules normales, il se peut qu'une administration de nucléotides puisse aussi stimuler la prolifération des cellules cancéreuses, augmentant ainsi le nombre de cellules ciblées par la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$. L'influence de différents mélanges de désoxyribonucléosides sur l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN a donc été évaluée dans les trois lignées cellulaires humaines de glioblastomes. Les résultats ont montré que le taux d'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN des cellules LN229, U87, et U251 était augmenté, respectivement, de 8.5, 6.2, et 2.0 fois, après une coincubation de 4 h avec un mélange à concentration égale, de 10 μM , de 2'-désoxyadénosine, 2'-désoxyuridine, 2'-désoxyguanosine et 2'-désoxycytidine (AUGC). Un mélange sans 2'-désoxyuridine (AGC) permettait également d'augmenter de 2.2 fois l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN des cellules LN229, alors que son remplacement par la dThd (ATGC) inversait l'effet du mélange. De plus, l'effet sur l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN augmentait conjointement avec le temps de coincubation avec le mélange de désoxyribonucléosides. Le taux d'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN des cellules LN229 et U87 était augmenté, respectivement, de 19.9 et 9.4 fois, par une coincubation de 9 h avec 10 μM de AUGC. L'effet était encore plus marqué lorsque les cellules atteignaient la confluence dans les puits. Le taux d'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN des cellules confluentes LN229 et U87 était augmenté, respectivement, de 40.9 et 26.8 fois après une coincubation de 4 h avec 10 μM de AUGC. Une analyse par cytofluorométrie en flux a montré que le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire était augmenté après l'exposition des cellules confluentes à 10 μM de AUGC pendant 4 h. Ces résultats suggèrent qu'une co-administration d'un mélange équilibré de désoxyribonucléosides pourrait améliorer l'utilisation d'analogues radiomarqués des nucléotides, comme la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$, pour le ciblage des cellules cancéreuses.

6.2 Introduction

Les nucléotides sont utilisés en clinique pour enrichir les solutions nutritives dans le but d'améliorer, après des agressions ou des opérations chirurgicales majeures, la réponse immunitaire et la trophicité de la muqueuse intestinale (162-164). Les mécanismes sous-jacents sont probablement complexes, car les nucléotides sont impliqués dans presque tous les processus biochimiques et cellulaires, comme médiateurs de transfert d'énergie (ATP), coenzymes (NAD^+ , FAD, CoA), régulateurs métaboliques (AMP cyclique) ou précurseurs de la synthèse d'ADN, d'ARN, du glycogène, des phosphoglycérides, etc... Cependant, plusieurs études ont spécifiquement montré que l'apport exogène de nucléotides était nécessaire pour restaurer et soutenir la croissance et la prolifération des leucocytes (165, 166) et des entérocytes (167-169).

Puisqu'un apport exogène de nucléotides affecte, d'après la littérature (170), essentiellement des tissus à renouvellement cellulaire rapide, comme la rate, le thymus, la moelle osseuse et la muqueuse jéjunale, il pourrait aussi affecter la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, l'apport exogène de nucléotides pourrait stimuler la synthèse d'ADN et la transcription d'enzymes impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaires, comme l'ornithine décarboxylase, l'adénosine déaminase, ou l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase, une enzyme clé pour la voie de récupération des purines (171). De plus, il a été suggéré que les nucléotides sont réutilisés plus efficacement par les cellules néoplasiques que par les cellules normales, à cause d'une activité diminuée d'enzymes clés impliquées dans la dégradation des nucléotides (172).

Une stimulation de la synthèse des acides nucléiques et des fonctions métaboliques par l'apport exogène de nucléotides a déjà été rapportée dans des cellules cancéreuses. Une augmentation de la concentration d'ADN, d'ARN, ainsi que d'AMP, d'ADP et d'ATP, a été observée après une supplémentation en nucléotides dans des cellules de carcinome du côlon humain Caco-2 (168, 173). D'autre part, les cellules de lymphomes EL4 et 5F4 ont poussé plus lentement dans des animaux nourris avec un régime dépourvu de nucléotides (165).

Au regard de ces observations, il se peut qu'un apport exogène de nucléotides puisse promouvoir la prolifération de cellules cancéreuses et ainsi augmenter le nombre de cellules ciblées par un agent potentiellement thérapeutique, comme la $[\text{}^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$, qui provoque des cassures du double brin d'ADN une fois incorporé dans l'ADN des cellules en division (68, 153).

Il a été observé précédemment, *in vitro* et dans des souris xénogreffées, qu'une co-administration de différents analogues de nucléotides pouvait améliorer l'incorporation de la [125 I]IdUrd dans des glioblastomes humains (109, 111, 114). Ces observations étaient corrélées, soit à une cytotoxicité augmentée (111), soit à une amélioration de la scintigraphie tumorale (109). Dans cette partie du travail, l'influence de différents mélanges de désoxyribonucléosides sur l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN a été évaluée sur les trois lignées cellulaires humaines de glioblastomes. Ces observations pourraient contribuer au développement de nouvelles stratégies pour l'utilisation d'analogues de nucléotides radiomarqués, comme la [125 I]IdUrd, pour le ciblage des cellules cancéreuses (152, 174).

6.3 Matériels et Méthodes

Produits.

- La [125 I]IdUrd (activité spécifique de 74 TBq/mmol, 2000 Ci/mmol) et la [3 H]dThd (activité spécifique de 2.5 - 3 TBq/mmol, 70 - 85 Ci/mmol) ont été obtenues d'Amersham International (Buckinghamshire, Grande-Bretagne).
- La dThd, la 2'-désoxyuridine (dUrd), la 2'-désoxythymidine (dTThd), la 2'-désoxycytidine (dCyd), la 2'-désoxyadénosine (dAds), et la 2'-désoxyguanosine (dGus) ont été obtenues de Fluka Chemie AG (Buchs, Suisse). Ces désoxyribonucléosides ont été mélangés ensemble à des concentrations molaires identiques. Par exemple, 10 μ M de AUGC signifie que 10 μ M de dAds, 10 μ M de dUrd, 10 μ M de dGus, et 10 μ M de dCyd ont été mélangés ensemble.

Méthodes.

- Le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN a été évalué en fonction de la densité cellulaire après des pré- ou co-incubations de 1 à 9 h avec différents mélanges de désoxyribonucléosides.
- Le potentiel stimulateur d'un mélange de désoxyribonucléosides sur la prolifération de cellules confluentes a été évalué par cytofluorométrie en flux. Les cellules ont étéensemencées dans des flacons contenant 10 ml de milieu RPMI 1640 complet. Une fois confluentes, les cellules ont été exposées pendant 1 à 4 h à 37°C au mélange de désoxyribonucléosides et 10 μ M de IdUrd.

Analyse statistique.

- Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentages ou moyennes $\pm$ 1 déviation standard (DS). Les valeurs ont été analysées au moyen d'un test *t* bilatéral de variance égale. Le seuil de signification statistique a été fixé à $p = .05$. Les symboles *, **, *** représentent respectivement $p < .05$, $p < .01$, $p < .001$.

6.4 Résultats

6.4.1 Incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN après coincubation avec différents mélanges de désoxyribonucléosides

Le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN des cellules LN229, U87, et U251 a été évalué dans un milieu de culture enrichi en *L*-glutamine et différents mélanges de désoxyribonucléosides. Des coincubations de 4 h avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd et les mélanges de désoxyribonucléosides ont été effectuées après que des expériences préliminaires ont montré que l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN était linéaire et non toxique pendant ce laps de temps (111).

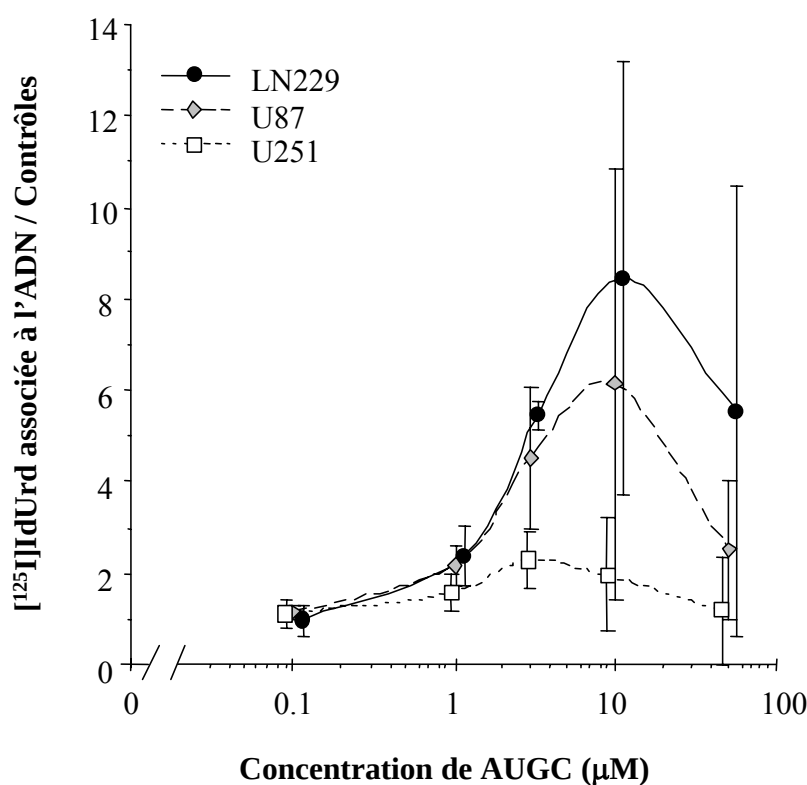


Figure 29. Incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN en présence du mélange de désoxyribonucléosides AUGC. Les cellules U251, LN229 et U87 ont été coincubées pendant 4 h avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd et 0.1 à 50 μ M de AUGC. Les symboles représentent la moyenne ± 1 DS de 3 expériences par lignée cellulaire. Les résultats de chaque expérience ont été normalisés par rapport aux contrôles respectifs incubés pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd seule.

Alors qu'une administration de désoxyribonucléosides pyrimidiques (dUrd, dCyd) ou puriques (dAds, dGus) seuls n'avait pas d'effet, un mélange des quatre précurseurs de l'ADN, dAds, dUrd, dGus, et dCyd (AUGC) a permis d'augmenter

fortement l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN des trois lignées cellulaires. Comparée à une incubation en présence de [125 I]IdUrd seule, une co-incubation de 4 h avec 10 μ M de AUGC a permis d'augmenter, respectivement, de 8.5 ($p < .001$), 6.2 ($p < .001$), et 2.0 ($p = .14$) fois le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN des cellules LN229, U87, et U251. Toutefois, à la plus haute concentration testée, c'est-à-dire 50 μ M, l'effet du mélange AUGC sur l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN tendait à disparaître (Figure 29).

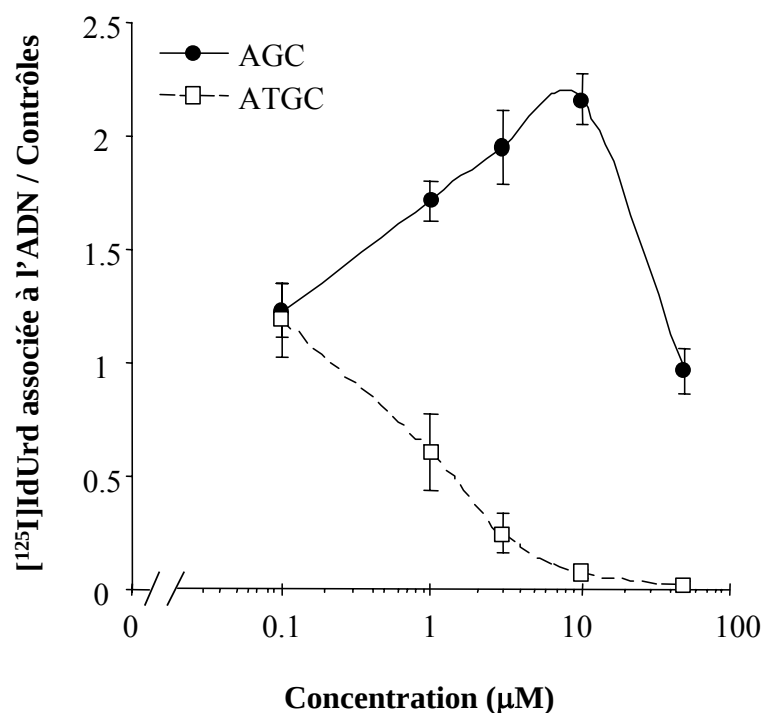


Figure 30. Incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN après retrait ou remplacement de la dUrd par la dThd dans le mélange de désoxyribonucléosides. Les cellules LN229 ont été co-incubées pendant 4 h avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd et 0.1 à 50 μ M de AGC ou ATGC. Les symboles représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 4 échantillons par condition testée, normalisés par rapport aux contrôles respectifs incubés pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd seule.

Comme on s'attendait à ce que la dUrd entre en compétition avec la [125 I]IdUrd pour la phosphorylation par la dThd kinase (TK), l'effet d'un mélange de désoxyribonucléosides sans dUrd (AGC) sur l'incorporation nucléaire de [125 I]IdUrd a aussi été évalué. Bien que le taux d'incorporation nucléaire de [125 I]IdUrd augmentait toujours, l'effet semblait moins prononcé que celui observé en présence de AUGC. Dans les cellules LN229, l'incorporation nucléaire de [125 I]IdUrd augmentait jusqu'à 2.2 fois après une co-incubation de 4 h avec 10 μ M de AGC ($p < .001$). Par contre, le remplacement de la dUrd dans le mélange par la dThd (ATGC) inhibait l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN (Figure 30).

6.4.2 Incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN après préincubation avec le mélange AUGC

Une préincubation de 4 h avec le mélange de désoxyribonucléosides suivie par une incubation de 4 h avec la [125 I]IdUrd a été entreprise pour évaluer si l'effet du mélange de désoxyribonucléosides sur l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN nécessitait la présence conjointe de [125 I]IdUrd ou si le mélange induisait un mécanisme à retardement qui pouvait par la suite augmenter l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN. Les résultats obtenus sur les trois lignées cellulaires ont montré qu'une préincubation de 4 h avec AUGC ne pouvait pas reproduire l'effet d'une co-incubation. Le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd n'était augmenté que légèrement, de 2.2 fois ($p = .008$), dans l'ADN des cellules U87 après préincubation avec 50 μ M de AUGC (Tableau 9). Cette augmentation pourrait être toutefois due à du AUGC résiduel subsistant dans les puits après leur lavage.

Tableau 9. Modulation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN par une préincubation avec le mélange de désoxyribonucléosides AUGC

AUGC (μ M)	LN229	U87	U251
0	0.22 $\pm$ 0.04 ^a	0.26 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.06
0.1	0.17 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.25
1	0.23 $\pm$ 0.09	0.25 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.17
3	0.22 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.18
10	0.30 $\pm$ 0.11	0.31 $\pm$ 0.11	0.42 $\pm$ 0.06
50	0.24 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.08*	0.62 $\pm$ 0.29

Les cellules ont été préincubées pendant 4 h avec différentes concentrations du mélange AUGC, avant d'être incubées pendant 4 h avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd.

Les résultats représentent la moyenne de 4 échantillons $\pm$ 1 DS.

^a, Radioactivité associée à l'ADN par cellule (mBq/cellule).

*, $p = .008$

6.4.3 Incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN en fonction du temps de co-incubation avec le mélange AUGC

Des co-incubations de 1, 2, 4 et 9 h avec la [125 I]IdUrd et le mélange AUGC ont été entreprises pour évaluer si l'augmentation du taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN était constante ou variait en fonction du temps de co-incubation. Les résultats ont montré que le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN augmentait en même temps que la durée de co-incubation. Comparée à une incubation avec la [125 I]IdUrd seule, une co-incubation de 9 h avec 10 μ M du mélange AUGC augmentait, respectivement, de 19.9 ($p = .001$) et 9.4 ($p < .001$) fois le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN des cellules LN229 et U87 (Figure 31).

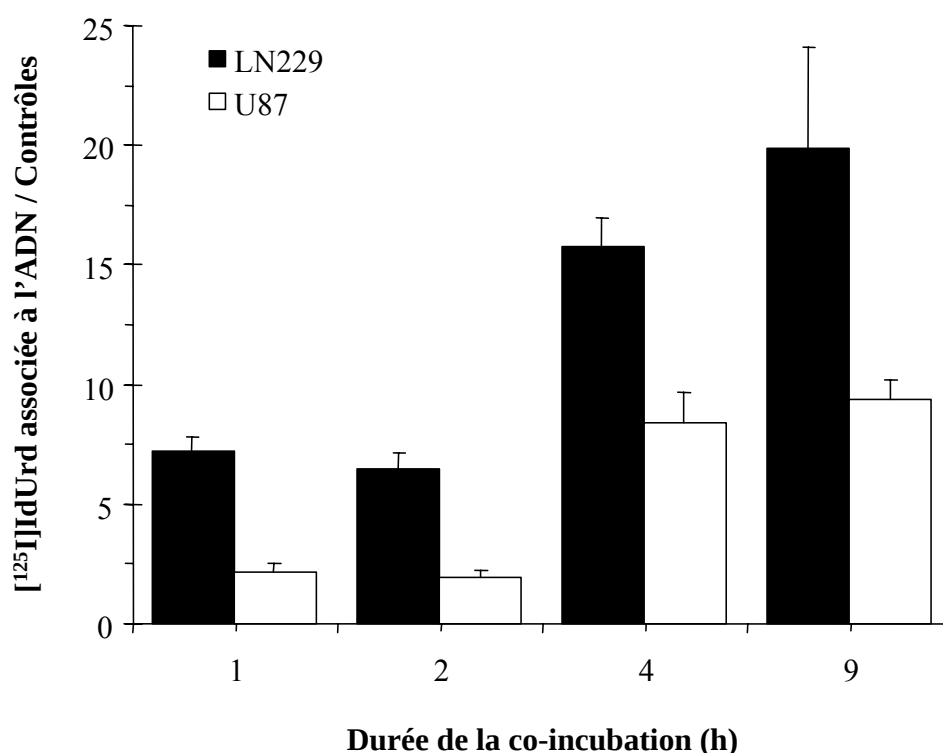


Figure 31. Incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN en fonction du temps de co-incubation avec le mélange de déoxyribonucléosides AUGC. Les cellules LN229 et U87 ont été co-incubées pendant 1, 2, 4 et 9 h avec 18.5 kBq/ml de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et 10 μM de AUGC. Les colonnes représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 3 échantillons par condition testée, normalisés par rapport aux contrôles respectifs incubés pendant 4 h avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule.

6.4.4 Modulation de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN par le mélange AUGC en fonction de la densité cellulaire

Des co-incubations avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ et le mélange AUGC ont été réalisées à différents jours après l'ensemencement des cellules dans les puits, dans le but d'évaluer si l'augmentation de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN induite par le mélange AUGC dépendait du taux de prolifération et de densité cellulaires dans les puits. Dans cette expérience, le milieu RPMI 1640 complété avec la *L*-glutamine (0.3 g/l) était changé quotidiennement pour éviter les effets d'une déprivation nutritive. Le tableau 10 montre que les cellules LN229 proliféraient plus rapidement que les cellules U87. Plus la densité cellulaire augmentait, moins la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ était incorporée dans l'ADN. Cependant, la diminution de l'incorporation de $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ dans l'ADN était moins prononcée dans les cellules confluentes incubées en présence du mélange AUGC que dans celles incubées avec la $[^{125}\text{I}]\text{IdUrd}$ seule (Tableau 10).

Tableau 10. Modulation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN par le mélange de désoxyribonucléosides AUGC en fonction de la densité cellulaire

Jours ^a	LN229			U87		
	Nb ^b	[125 I]IdUrd ^c	[125 I]IdUrd + AUGC	Nb	[125 I]IdUrd	[125 I]IdUrd + AUGC
4	1.9×10^4	3.60 ± 0.26	3.44 ± 0.08	2.0×10^4	0.72 ± 0.04	1.35 ± 0.14
6	7.8×10^4	3.41 ± 0.12	2.26 ± 0.28	1.5×10^4	0.38 ± 0.17	1.53 ± 0.43
8	2.4×10^5	0.05 ± 0.01	0.70 ± 0.10	6.0×10^4	0.07 ± 0.02	0.93 ± 0.09
10	4.7×10^5	0.02 ± 0.01	0.72 ± 0.02	8.8×10^4	0.03 ± 0.02	0.67 ± 0.25

Les cellules ont été co-incubées pendant 4 h avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd et 10 μ M de AUGC.

Les résultats représentent la moyenne de 6 échantillons $\pm$ 1 DS.

^a, Nombre de jours après l'ensemencement des cellules dans les puits.

^b, Nb de cellules par ml.

^c Radioactivité associée à l'ADN par cellule (mBq/cell.).

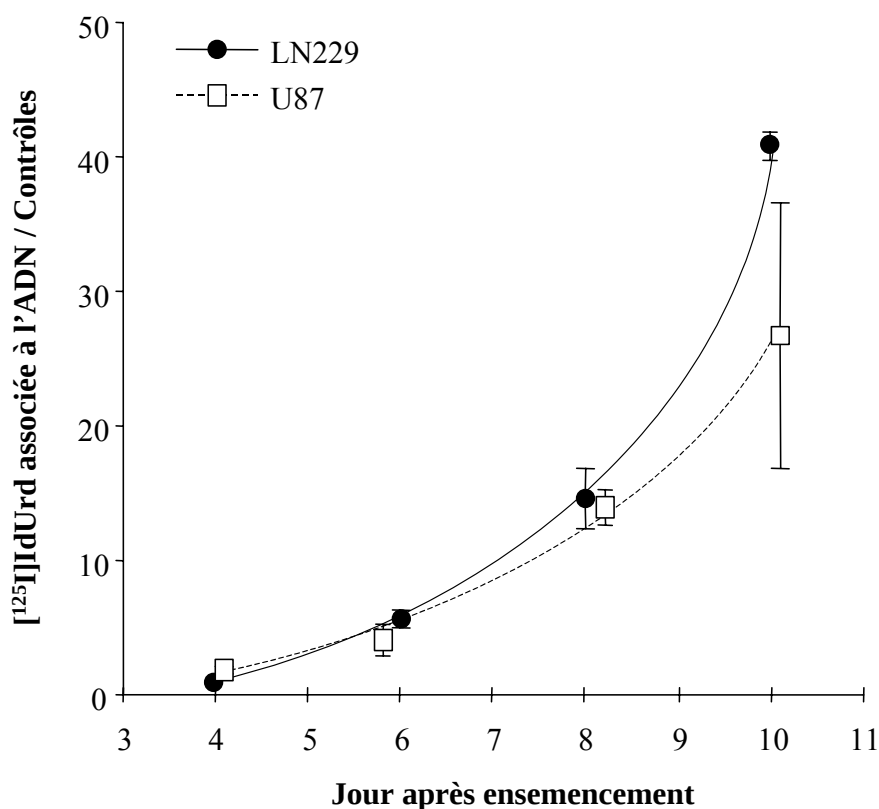


Figure 32. Modulation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN par le mélange de désoxyribonucléosides AUGC en fonction de la densité cellulaire. Les cellules LN229 et U87, à différentes densités cellulaires, ont été co-incubées pendant 4 h avec 18.5 kBq/ml de [125 I]IdUrd et 10 μ M de AUGC. Les symboles représentent la moyenne $\pm$ 1 DS de 6 échantillons par condition testée, normalisés par rapport aux contrôles respectifs incubés pendant 4 h avec la [125 I]IdUrd seule.

C'est pourquoi, l'augmentation relative de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN induite par le mélange AUGC était d'autant plus marquée que les cellules devenaient confluentes. À la plus haute densité cellulaire, le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN était augmenté, respectivement, de 40.9 ($p < .001$) et 26.8 ($p =$

.002) fois dans les cellules LN229 et U87, comparées aux cellules incubées en présence de la [125 I]IdUrd seule (Figure 32).

6.4.5 Distribution des cellules confluentes dans le cycle cellulaire après exposition au mélange AUGC

Une analyse par cytofluorométrie en flux a été réalisée sur les cellules LN229 et U87 ayant atteint la confluence dans les puits, dans le but de déterminer si la modulation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN par le mélange AUGC était associée à des changements dans la distribution dans le cycle cellulaire. Une expérience représentative est montrée dans la figure 33. Les résultats montrent qu'une courte incubation de 1 h avec 10 μ M de AUGC permettait d'augmenter le pourcentage des cellules en phase S, respectivement, de 13.1 % à 19.2 % et de 4.5 % à 7.5 % dans les cellules LN229 et U87 (Figure 33).

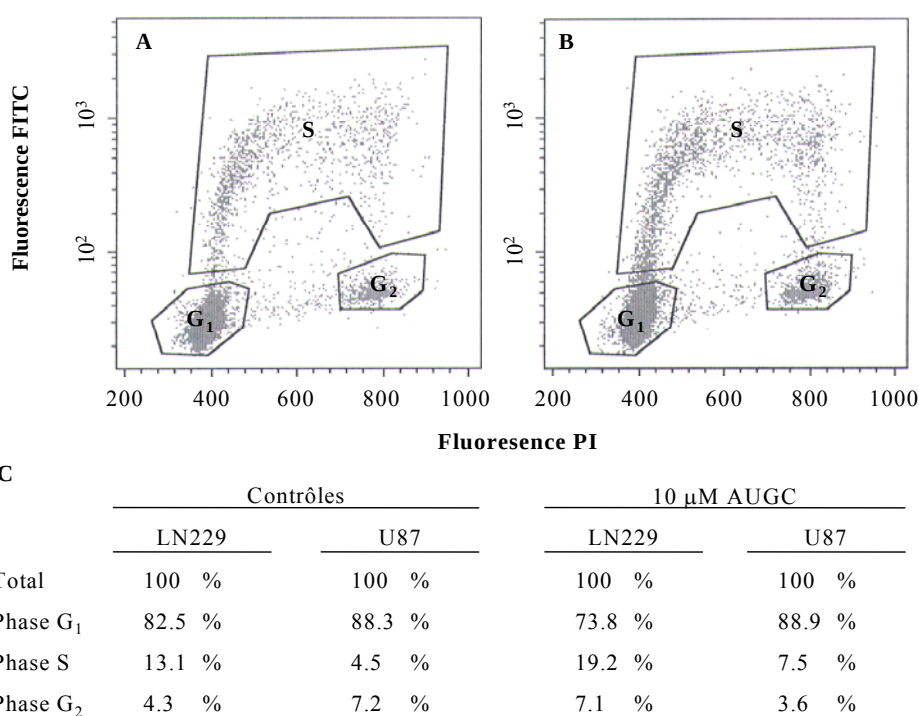


Figure 33. Analyse par cytofluorométrie en flux des cellules LN229 et U87 confluentes exposées ou non au mélange de déoxyribonucléosides AUGC. L'incorporation de IdUrd dans l'ADN a été révélée par la fluorescence FITC (axe des Y) et la concentration d'ADN par la fluorescence PI (axe des X). (A) Incubation des cellules LN229 pendant 1 h avec 10 μ M de IdUrd (contrôles); (B) Co-incubation des cellules LN229 pendant 1 h avec 10 μ M de IdUrd et 10 μ M de AUGC; (C) Pourcentage de cellules LN229 et U87 dans les différentes phases du cycle cellulaire révélées par cytofluorométrie en flux.

6.5 Discussion

Il a été démontré auparavant qu'une co-administration de IdUrd (111, 114) ou de FdUrd (109) augmentait *in vitro* et *in vivo* l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN de trois lignées humaines de glioblastomes. Bien qu'il ait été suggéré que les nucléotides pyrimidiques stimulent tout autant les défenses immunitaires qu'un mélange complet de nucléotides (ARN) (165), on peut s'imaginer qu'un mélange bien équilibré de nucléotides soit plus efficace pour stimuler la prolifération cellulaire et, ainsi, l'incorporation nucléaire de [125 I]IdUrd. C'est pourquoi, l'effet de différents mélanges de désoxyribonucléosides sur l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN a été évalué ici dans les trois lignées cellulaires de glioblastomes.

Les résultats de ces expériences montrent qu'une coincubation avec un mélange de dAds, dUrd, dGus, et dCyd (AUGC) augmente de façon marquée le taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN des trois lignées cellulaires testées. Comme explication, on peut supposer qu'un mélange équilibré de désoxyribonucléosides stimule, en tant que substrats, la synthèse d'ADN à travers la voie de récupération, favorisant ainsi l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN au détriment de la synthèse *de novo* de dThd. Ceci pourrait expliquer pourquoi la présence de [125 I]IdUrd est requise simultanément à celle du mélange de désoxyribonucléosides. Après la coincubation avec la plus haute concentration testée de AUGC (50 μ M), l'effet du mélange tend à disparaître. Similairement, il a été montré qu'un excès de dAds inhibe la synthèse d'ADN et d'ARN dans des cellules tumorales d'ascite d'Ehrlich et d'embryons de poulet, en interférant avec la synthèse endogène de dGus et dCyd (175). Une étude déjà ancienne a montré que des concentrations élevées de dThd (2 mM) inhibait complètement la synthèse d'ADN. Les cellules HeLa s'accumulaient à l'entrée de la phase S. Lorsqu'on supprimait l'excès de dThd, elles repartaient dans le cycle cellulaire de façon synchronisée. De plus, la viabilité cellulaire était même nettement diminuée lorsque l'exposition à un excès de dThd dépassait le temps nécessaire au dédoublement de la population (175).

Dans cette étude, il a aussi été observé que le remplacement de la dUrd par la dThd (ATGC) inversait l'effet du mélange de désoxyribonucléosides et inhibait l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN. Cela peut s'expliquer par une compétition directe entre la dThd et la [125 I]IdUrd pour l'incorporation dans l'ADN. Quant à la dUrd, ce désoxyribonucléoside ne peut probablement pas entrer en compétition de la même façon avec la [125 I]IdUrd, car son atome d'hydrogène sur la base pyrimidique n'a pas, comme l'atome d'iode de la [125 I]IdUrd, un rayon de van der Waals similaire au groupe 5-méthyle de la dThd (68). Toutefois, la présence de dUrd dans le mélange est

quand même supposée empêcher l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN, car la dUrd entre en compétition avec la [125 I]IdUrd pour être phosphorylée par la TK et, une fois phosphorylée, la dUMP stimule la synthèse *de novo* de dTMP en tant que substrat de la TS. Il est donc surprenant de constater que la présence de dUrd dans le mélange de désoxyribonucléosides, bien que non essentielle, n'a pas empêché l'augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN. Comme explication, on peut imaginer que le mélange de désoxyribonucléosides n'était pas suffisamment équilibré en l'absence de dUrd pour stimuler la synthèse d'ADN, car la concentration de [125 I]IdUrd (environ 0.25 nM) ne pouvait pas compenser le manque de désoxyribonucléosides pyrimidiques par rapport aux désoxyribonucléosides puriques.

L'administration d'un mélange de désoxyribonucléosides pourrait augmenter soit l'incorporation absolue de [125 I]IdUrd par cellules en phase S, soit le nombre de cellules en phase S précoce du cycle cellulaire, qui sont marquées par la [125 I]IdUrd. En effet, la sensibilité des cellules aux désoxyribonucléosides exogènes diffère probablement d'une phase du cycle cellulaire à l'autre et d'un tissu à l'autre (176). Ainsi, les cellules en division, qui sont soumises à des variations incessantes de concentrations intracellulaires de nucléotides, pourraient passer de la synthèse *de novo* vers la voie de récupération lorsque des quantités suffisantes de nucléotides exogènes sont disponibles, alors que les cellules quiescentes resteraient en dehors du cycle cellulaire. Toutefois, dans cette étude, l'augmentation de l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN a été amplifiée en prolongeant le temps de coincubation avec le mélange de désoxyribonucléosides, suggérant ainsi que le nombre de cellules en phase S précoce a été également augmenté. Ce résultat est supporté par l'analyse par cytofluorométrie en flux qui montre que le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire était augmenté en présence du mélange de désoxyribonucléosides. Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats ayant reçu une supplémentation parentérale en nucléotides. Un nombre plus élevé de cellules marquées avec la BrdUrd et positives pour un antigène nucléaire indiquant la division cellulaire a montré que l'activité de prolifération des entérocytes était augmentée chez ces rats par rapport à des rats nourris avec un régime normal (162).

Puisque la synthèse *de novo* de nucléotides à partir d'acides aminés, de ribose, de formate, et de CO₂ nécessite une énergie considérable, comparée à la voie de récupération des nucléotides, la synthèse d'ADN est probablement réduite ou supprimée dans des situations de stress (176, 177). Cependant, un apport exogène de nucléotides pourrait être suffisant pour relancer la synthèse d'ADN à travers la voie de récupération des nucléotides. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'incorporation de [8- 14 C]AMP était plus marquée dans des cellules confluentes de carcinome du côlon humain que dans des cellules non confluentes, après une exposition de 3 h à 30 μ mol/l de [8- 14 C]AMP (173).

Dans ce travail, les résultats obtenus jusqu'à 10 jours après l'ensemencement des puits montrent que l'augmentation du taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN induite par le mélange de désoxyribonucléosides était d'autant plus marquée que les cellules étaient confluentes, et cela même si le milieu de culture enrichi en *L*-glutamine était régulièrement changé. La sensibilité des cellules confluentes aux désoxyribonucléosides exogènes semble donc plus marquée que celle des cellules non-confluentes.

Ces observations pourraient être potentiellement utiles pour une application diagnostique ou thérapeutique avec des nucléotides radiomarqués. Toutefois, la reproduction *in vivo* de ces résultats est probablement compromise par la demi-vie biologique très courte des nucléotides circulants, à cause d'une dégradation rapide dans la muqueuse intestinale (adénosine) (178), le foie (uridine) (179), et à cause d'une hydrolyse par des ectoenzymes de surface cellulaire (163). De plus, la muqueuse intestinale représente une formidable barrière contre l'acheminement des nucléotides vers les tissus périphériques. C'est pourquoi, le type de mélange, la procédure et la route d'administration des nucléotides influencent probablement leur disponibilité et leur incorporation dans les tissus (166, 178).

En conclusion, il a été montré dans ce chapitre qu'un mélange équilibré de désoxyribonucléosides pouvait augmenter de façon significative l'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN de trois différentes lignées cellulaires de glioblastomes, indépendamment du status du gène *p53*. L'augmentation du taux d'incorporation de [125 I]IdUrd dans l'ADN était dépendante de la durée d'incubation et plus prononcée dans les cellules confluentes. Une analyse par cytofluorométrie en flux a révélé que ce phénomène se traduisait en partie par une stimulation des cellules à entrer en phase S du cycle cellulaire. Ces observations pourraient présenter un intérêt dans le développement de nouvelles stratégies pour cibler les cellules cancéreuses avec des analogues radiomarqués des nucléotides, comme la [125 I]IdUrd.

Chapitre 7

Conclusions

Un grand nombre de tumeurs présentent une consommation élevée de glucose. C'est pour cette raison que la tomographie par émission de positons avec le [^{18}F]fluorodésoxyglucose ([^{18}F]FDG) est devenue un examen diagnostique très répandu en Oncologie. Cependant, cette méthode scintigraphique est limitée dans certains types de cancers dans lesquels le glucose est faiblement consommé par la tumeur, ou fortement consommé par le tissu environnant, comme c'est le cas dans le cerveau. Le diagnostic différentiel entre une radionécrose et une récurrence tumorale cérébrale est parfois difficile. C'est pourquoi, différents groupes ont cherché à visualiser la synthèse des protéines au moyen d'analogues d'acides aminés radiomarqués, comme la Tyrosine (180), la Méthionine (181) ou la Phénylalanine (182). Là aussi cependant, le taux d'incorporation des acides aminés pouvait varier d'un type de tumeur et d'un patient à l'autre et n'était pas forcément corrélé à la malignité.

Une des principales caractéristiques qui déterminent la malignité des cellules cancéreuses est leur aptitude à se diviser continuellement. C'est pourquoi, la dThd et ses analogues, qui s'incorporent spécifiquement dans l'ADN des cellules en division, devraient pouvoir jouer un rôle majeur dans le traitement des patients cancéreux. Actuellement, une des rares utilisations cliniques de la IdUrd et de la BrUrd est la mesure par cytofluorométrie en flux du nombre de cellules en division (labelling index) et du temps de dédoublement potentiel (Tpot) de la tumeur. L'information recueillie est d'un grand intérêt pronostic, notamment pour les cancers de la sphère ORL, car le labelling index est corrélé avec la résistance à la radiothérapie (183). Cette méthode est toutefois liée à l'acte chirurgical et les résultats ne sont disponibles qu'après résection de la tumeur. Une mesure non-invasive de la prolifération tumorale par scintigraphie serait donc un atout certain pour déterminer l'attitude thérapeutique à adopter, notamment dans le cadre des tumeurs du cerveau et de thérapies utilisant des cytostatiques. Dans cette optique, différentes études ont été menées chez des patients atteints de tumeurs cérébrales et également de mélanomes avec la [^{11}C]dThd (133), la [^{131}I]IdUrd (184), la [^{124}I]IdUrd (86) ou la [^{76}Br]BrdUrd (127). Malheureusement, leur utilisation clinique reste à ce jour limitée par leur instabilité biologique et leur faible taux d'incorporation dans les cellules tumorales. L'activité résiduelle résultant de métabolites empêche tout particulièrement une détection scintigraphique précise de la tumeur. Pour surmonter cette limitation, des modèles à compartiments multiples corrélés aux mesures du traceur et de ces métabolites dans le sang ont été développés. Il

a été ainsi possible de déterminer l'activité globale spécifique de la [^{11}C]dThd dans la tumeur par soustraction de l'activité résiduelle due aux métabolites (133). Une autre stratégie, sans doute plus applicable en clinique, serait l'utilisation de radioisotopes à demi-vie physique relativement longue, comme l' ^{123}I ode, l' ^{124}I ode, l' ^{131}I ode ou le ^{76}Br ome. Ils permettraient de retarder l'acquisition d'images jusqu'à ce qu'une partie des métabolites soit excrétée. Dans l'étude portant sur la [^{124}I]IdUrd (86), des scintigraphies effectuées sur 20 patients, 24 h après l'injection du traceur, ont permis de montrer que 85 % de l'activité observée dans les gliomes anaplastiques était attribuable à la [^{124}I]IdUrd incorporée dans l'ADN. Toutefois, dans d'autres tumeurs moins agressives, telles que les méningiomes, les résultats étaient moins éloquentes, puisque la majeure partie de l'activité tumorale mesurée 24 h après l'injection provenait d' ^{124}I ode libre. Ces résultats illustrent la nécessité d'augmenter l'incorporation de la IdUrd radiomarquée dans l'ADN et de réduire encore l'activité résiduelle. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées, comme favoriser l'élimination rénale des métabolites ou synthétiser des radio-traceurs biologiquement plus stables. Concernant ce dernier point, plusieurs molécules ont été récemment synthétisées, dont le 2'-fluoro-5-[^{11}C]-méthyle-1- β -D-arabinofuranosyluracile (185), la 5-[^{76}Br]bromo-2'-fluoro-2'-désoxyuridine (186, 187) ou la 3'-désoxy-3'-[^{18}F]fluorothymidine ([^{18}F]FLT) (188). La [^{18}F]FLT s'est révélée en particulier, comme permettant l'évaluation de la prolifération cellulaire chez des patients atteints de cancer des poumons (189). Enfin, d'autres travaux ont porté sur la [^{18}F]FdUrd, dans le but de marquer la voie de synthèse de la dThd (135).

Dans ce travail, différentes approches ont été étudiées pour améliorer l'utilisation de la IdUrd radiomarquée non seulement dans un but diagnostique mais aussi thérapeutique. Les résultats ont, par exemple, montré qu'une courte pré-administration de FdUrd résultait en une augmentation significative de l'incorporation de [^{125}I]IdUrd dans la tumeur. De plus, l'augmentation était moins prononcée dans les tissus sains. Ces observations se traduisaient par un rapport tumeur sur tissus sains augmenté et donc une détection scintigraphique améliorée (109). Comme les doses de rayonnements γ et Auger estimées dans une dosimétrie préclinique (110), ainsi que les dosages de FdUrd par kg de poids corporel utilisés dans ces expériences, ne devraient pas présenter de risques pour les patients (144, 145), une étude clinique a été proposée et fait suite à ce travail. L'objectif est d'évaluer le potentiel d'une pré-administration de FdUrd pour améliorer la détection scintigraphique tumorale par la [^{123}I]IdUrd chez 6 patients atteints de glioblastomes, dont 3 de haut grade. Chaque patient subira, aléatoirement et à 15 jours d'intervalle, 2 séries comparatives de 3 scintigraphies à 0, 4, et 24 h après l'injection i.v. de $\leq 300 \text{ MBq} / 30 \text{ ml}$ de [^{123}I]IdUrd. L'une des séries sera effectuée après l'injection de [^{123}I]IdUrd seule, l'autre après 2 pré-injections i.v. de 0.55 mg/kg de FdUrd 60 et 30 min avant l'injection de [^{123}I]IdUrd. En plus de 2

capsules/jour de 100 mg de KI administrées par voie orale, de 2 jours avant à 1 jour après l'injection de [^{123}I]IdUrd, les patients recevront 4 capsules de 500 mg de KClO_4 chacune, 2 h avant et 4, 10, et 18 h après l'injection de [^{123}I]IdUrd. Les dosages proposés sont similaires aux dosages qui se sont révélés optimaux chez la souris et ne devraient pas présenter de cytotoxicité lors d'administrations ponctuelles. Concernant le KClO_4 , des doses de 0.4 à 1 g/jour sont administrées sur plusieurs semaines dans la thérapie de la thyrotoxicose (190). Lors de chaque séance, un balayage du corps-entier sera réalisé en incidence AP et PA au moyen d'une caméra à 2 têtes permettant une comparaison semi-quantitative de l'activité du corps-entier et de la tumeur. La première scintigraphie servira de référence (100%) pour les suivantes. En plus des 2 séries de scintigraphies, une tomographie par émission de positons avec le [^{18}F]FDG serait souhaitable comme référence. Le protocole a été accepté par l'Office Fédéral de la Santé Publique, Swissmedic et les commissions d'éthique des hôpitaux universitaires de Genève et Lausanne.

Le recours à un protocole combinant des injections de deux molécules différentes pourrait paraître fastidieux comparé, par exemple, à une simple injection de [^{18}F]FLT. Cependant, cette stratégie pourrait se révéler avantageuse sur plusieurs points. Premièrement, l'iode radioactif libre est éliminé par les reins et ne donne qu'une faible activité résiduelle 24 h après l'injection de [^{123}I]IdUrd, alors que la [^{18}F]FLT se localise de manière non-spécifique dans le foie, et le ^{18}F Fluor libre est capté par les os. Deuxièmement, une scintigraphie avec la [^{18}F]FLT reflète davantage l'activité enzymatique de la TK que la synthèse d'ADN. Troisièmement, suivant le type de tumeur, le taux endogène de dThd pourrait influencer la détection scintigraphique par la [^{18}F]FLT, alors que l'inhibition de la TS par la FdUrd devrait minimiser l'effet de la dThd endogène sur une scintigraphie tumorale par la [^{123}I]IdUrd. Enfin, des résultats positifs d'une scintigraphie avec la [^{123}I]IdUrd pourraient conduire au développement d'une thérapie par rayonnements Auger.

La IdUrd apparaît comme le vecteur idéal pour incorporer des émetteurs Auger dans l'ADN. Un marquage avec l' ^{123}I permettrait en outre de combiner une thérapie par rayonnements Auger avec un suivi scintigraphique. D'autre part, l'augmentation de l'incorporation tumorale de la [^{123}I]IdUrd induite par la FdUrd pourrait profiter aussi bien à un diagnostic qu'à une thérapie. En effet, bien qu'il ait été rapporté que l'augmentation de l'incorporation de IdUrd radiomarkée par la FdUrd ne soit pas corrélée à une cytotoxicité proportionnelle (106-108), l'augmentation de la radiosensibilisation par la IdUrd non-marquée observée ailleurs (104) et du taux d'apoptose dans la tumeur observée dans ce travail après injection de [^{125}I]IdUrd (109), suggèrent qu'un tel objectif pourrait être atteint. Le gain thérapeutique dépendra sans doute du protocole d'administration des deux molécules. La cytotoxicité de la FdUrd

n'est, par exemple, significative que lorsqu'elle est infusée sur un, voire plusieurs jours : la dose maximale tolérée passe de 30 mg/kg lors d'injections i.v. journalières ponctuelles à 0.15 mg/kg lors d'infusions continues (144, 145). Une injection continue, intratumorale ou intra-artérielle, comme c'est déjà le cas pour le traitement des métastases hépatiques des cancers colorectaux (191, 192), devrait en outre augmenter le nombre de cellules tumorales ciblées par le traitement. Des calculs dosimétriques suggèrent qu'une efficacité cytotoxique pourrait être déjà atteinte chez le patient par des injections intra-tumorales cérébrales en post-opératoire de 185 MBq (5 mCi) de [¹²⁵I]IdUrd répétées sur plusieurs jours.

Ces réflexions ont donc été approfondies et soumises sous forme de projet au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique. Un subside (n° 31-67112.01/1) a été alloué dans le but de déterminer *in vitro* et *in vivo* les conditions optimales pour une thérapie avec les rayonnements Auger de la [¹²⁵I]IdUrd combinée avec la FdUrd. Dans ce projet, il est envisagé notamment de procéder à des cycles de traitements fractionnés afin d'augmenter le nombre de cellules ciblées en phase S et éviter que les cellules s'adaptent à l'effet inhibiteur de la FdUrd sur la synthèse de dTMP par régulation positive de la TS, comme cela a déjà été décrit (104). D'autre part, les résultats obtenus avec la IdUrd non-marquée (114) seront exploités dans le dessein de relâcher l'arrêt de la division cellulaire induit par la FdUrd et favoriser ainsi l'incorporation de la [¹²⁵I]IdUrd dans un grand nombre de cellules synchronisées. La IdUrd non-marquée devrait en outre contribuer à augmenter la cytotoxicité du traitement (111). En fonction des résultats obtenus *in vitro*, des protocoles thérapeutiques précliniques seront choisis et évalués dans des rats Fischer porteurs de tumeurs du cerveau F98 implantées stéréotactiquement dans le cerveau et recevant la [¹²⁵I]IdUrd et les autres drogues par la même voie, au moyen d'une mini pompe osmotique. Après le traitement, les tumeurs seront ôtées chirurgicalement pour mesurer la vitesse de diffusion de la [¹²⁵I]IdUrd par autoradiographie et la survie cellulaire par essais clonogéniques après digestion enzymatique. Ce modèle animal a été choisi, car une étude récente a montré que la diffusion des macromolécules était plus rapide dans les tumeurs transplantées dans le cerveau, comparées aux tumeurs sous-cutanées (193). De plus, une revue sur les différents modèles de gliomes chez le rat a conclu que les tumeurs F98 présentent, par leur faible immunogénicité, un certain avantage par rapport à d'autres lorsqu'il s'agit de tester des nouvelles modalités thérapeutiques. Les résultats de cette étude devraient contribuer à éclairer les mécanismes sous-jacents qui régulent l'incorporation des nucléotides radiomarqués dans l'ADN et à développer de nouveaux outils diagnostiques et, peut-être même, thérapeutiques pour les tumeurs du cerveau. Ils pourraient aussi profiter à d'autres approches thérapeutiques comme, par exemple, l'utilisation de triplex

d'oligonucléotides pour cibler des émetteurs de rayonnements Auger dans des séquences d'ADN spécifiques (185).

Un troisième volet de ce travail a montré qu'une administration d'un mélange de désoxyribonucléosides augmentait la prolifération cellulaire et donc l'incorporation de la [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN des trois lignées de glioblastomes étudiées. L'effet des désoxyribonucléosides était tout particulièrement marqué sur les cellules confluentes (115). Des résultats similaires ont été observés dans d'autres lignées, comme les carcinomes humains du côlon Caco-2 (168, 194) ou les lymphomes EL4 et 5F4 (165). Or, l'adjonction de nucléotides dans des solutions nutritives entérales ou parentérales a été recommandée, notamment chez les patients cancéreux après chirurgie lourde, dans le but de favoriser la réparation tissulaire et soutenir la fonction de certains organes (170, 195, 196).

Des études cliniques prospectives, randomisées, en double-aveugle ont été réalisées sur des patients atteints de cancers gastrointestinaux ou pancréatiques recevant par voie entérale une nutrition immunomodulatrice enrichie non seulement en nucléotides, mais aussi en arginine et acides gras polyinsaturés Ω -3. Les résultats de métaanalyses regroupant 2419 patients sur 22 études montrent que l'administration péri-opératoire de cette nutrition immunomodulatrice réduit la fréquence des infections tardives, des complications post-opératoires, et donc, la durée et les coûts du traitement hospitalier (164, 196, 197). Elle améliore la fonction intestinale et permet de surmonter plus rapidement la réponse immunosuppressive et inflammatoire post-chirurgicale. Ceci se caractérise par une diminution des médiateurs de la phase aiguë, TNF- α et IL-6, et une augmentation de la lymphokine IL-2 et de son récepteur (198). Cependant, l'impact de cette nutrition immunomodulatrice sur la rechute tumorale et la mortalité à long terme n'a pas été abordé dans ces études. Cette question est d'autant plus pertinente que les mécanismes sous-jacents décrits dans les études précliniques font appel, en particulier pour les nucléotides, à une stimulation de la prolifération des leucocytes et des entérocytes. Par exemple, dans un modèle murin de neutropénie induite par la cyclophosphamide, une supplémentation en nucléotides a stimulé la prolifération, la différenciation, et la maturation des neutrophiles périphériques (199, 200). Dans un régime dépourvu de nucléotides, elle a permis de rétablir la réponse lymphoproliférative induite par des mitogènes et mesurée par érythème dermique et induration (165). En comparaison à une nutrition parentérale standard, l'adjonction d'un mélange de nucléotides a permis d'augmenter significativement le poids et le contenu en protéines et acides nucléiques de la muqueuse jéjunale de rats Wistar mâles (162, 170). La profondeur des cryptes et l'épaisseur des villosités étaient restaurées après induction de diarrhées par le lactose (167, 169) ou par irradiation (201).

Ces observations suggèrent qu'une nutrition enrichie notamment en nucléotides pourrait non seulement stimuler la réponse proliférative des populations cellulaires à potentiel de division élevé, mais aussi permettre à des cellules cancéreuses résiduelles de récupérer plus facilement du traumatisme chirurgical après tumorectomie. Comme l'intégrité des mécanismes de régulation du cycle cellulaire n'est pas préservée chez les cellules cancéreuses, ces dernières pourraient même se révéler plus sensibles que les leucocytes et les entérocytes à un apport exogène de substrats nécessaires à la synthèse des acides nucléiques (202). Actuellement, l'effet d'une nutrition immunomodulatrice sur les cellules cancéreuses n'est pas suffisamment documenté pour exclure une stimulation de la croissance tumorale. C'est pourquoi, dans l'incertitude, son utilisation chez le patient cancéreux devrait être envisagée avec précaution.

Un projet a donc été élaboré et une bourse accordée par la Fondation pour la recherche Nutricia (projet n° 2002-04) afin d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'impact de l'administration d'une solution immunomodulatrice sur la prolifération cellulaire, la rechute tumorale et, consécutivement, sur l'espérance de vie des patients traités pour des cancers gastrointestinaux. Les résultats pourraient avoir d'importantes répercussions sur l'emploi de nutriments immunomodulateurs chez ces patients.

Dans une tout autre démarche, l'effet stimulateur d'un mélange de nucléotides et éventuellement d'autres nutriments, comme la glutamine ou l'arginine, pourrait être exploité dans le but d'augmenter l'efficacité de radio- ou chimiothérapies ciblant les cellules en division. Il a été notamment suggéré que l'interaction entre nutriments et analogues nucléotidiques pourrait se révéler utile dans le traitement de tumeurs dérivées des cellules T (165). Dans ce travail, un mélange de nucléotides a permis d'augmenter significativement l'incorporation de la [¹²⁵I]IdUrd dans l'ADN de cellules cancéreuses (115). De plus, des résultats préliminaires semblent indiquer que l'augmentation de l'incorporation de [¹²⁵I]IdUrd est corrélée à une augmentation de la cytotoxicité. Toutefois, la réalisation d'une telle approche et la transposition des résultats expérimentaux en clinique pourraient se révéler complexes. En effet, la réponse des cellules cancéreuses est influencée par une multitude de paramètres, tels que le type et la localisation des lésions cancéreuses, le profil et le protocole d'administration du mélange de nutriments, ainsi que leurs effets combinés sur la réponse immunitaire. En particulier, la biodisponibilité des nucléotides devrait être profondément affectée par leur mode d'administration (163). En exposant les tissus à des doses anormalement élevées de nucléotides, une administration i.v. chez le rat a, par exemple, stimulé la prolifération des neutrophiles périphériques (166), des cellules de la crypte de la muqueuse intestinale (203), ainsi que la vitesse de repousse du foie après hepatectomie (204). Finalement, l'utilisation métabolique des nucléotides et d'autres nutriments

devrait encore être profondément modifiée par l'état anorexique des patients cancéreux et l'activité hypermétabolique de la tumeur.

Actuellement, il n'y a pas d'études cliniques évaluant les effets d'une nutrition immunomodulatrice en Oncologie après radio- ou chimiothérapie. Un projet a donc été élaboré avec, comme objectif, l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de certains traitements sur des cellules cancéreuses colorectales par administration d'un mélange approprié de nutriments. Les éventuels résultats positifs seront approfondis dans un modèle animal porteur de tumeurs afin de déterminer le mélange et les doses de nutriments, le mode d'administration, et la séquence de traitement optimum. Ce dernier point devrait être tout particulièrement important car une séquence inappropriée pourrait inverser l'effet du mélange de nutriments, et permettre aux cellules cancéreuses d'échapper encore plus facilement au traitement. En effet, il a été rapporté chez le rat, qu'après ingestion de nucléotides, la muqueuse du côlon guérissait plus rapidement des dommages causés par une irradiation (201). Comme les éventuels bénéfices thérapeutiques obtenus sur la tumeur pourraient se traduire par des effets négatifs proportionnels sur les tissus sains à renouvellement cellulaire rapide, les effets secondaires seront examinés attentivement. Là aussi, des fonds ont été obtenus de Novartis Consumer Health SA et les résultats devraient servir à mettre au point une nouvelle stratégie globale pour la prise en charge des patients cancéreux.

En résumé, ce travail présente trois approches différentes permettant d'augmenter significativement l'incorporation de IdUrd radiomarquée dans l'ADN. Les résultats suggèrent fortement que les mécanismes impliqués diffèrent entre ces approches. Elles pourraient donc se révéler complémentaires. Leur combinaison pourrait donner lieu à de nouvelles stratégies diagnostiques ou thérapeutiques en Oncologie. Des résultats préliminaires semblent, par exemple, indiquer qu'une pré-administration de IdUrd non-marquée radiosensibilise les cellules cancéreuses et amplifie la toxicité d'un traitement combiné de [125 I]IdUrd et de FdUrd. D'autre part, un mélange de nucléotides favorisant l'entrée des cellules en phase S pourrait également se révéler déterminant en augmentant le nombre de cellules susceptibles d'être ciblées par la [125 I]IdUrd. Ainsi, ce travail peut servir à stimuler l'étude de nouvelles voies encore inexplorées, malgré l'effort considérable déjà consenti dans ce domaine par plusieurs institutions de renommée internationale.

Chapitre 8

Bibliographie

1. Buchegger, F., Slosman, D. O., Meier, C., Dupertuis, Y., Mach, J.-P., and Bischof Delaloye, A. La radiothérapie systémique isotopique. *Médecine & Hygiène*, 2262: 1418-1422, 1999.
2. Press, O. W., Eary, J. F., Appelbaum, F. R., Martin, P. J., Nelp, W. B., Glenn, S., Fisher, D. R., Porter, B., Matthews, D. C., Gooley, T., and al., e. Phase II trial of ^{131}I -B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas. *Lancet*, 346: 336, 1995.
3. Otte, A., Jermann, E., Behe, M., Goetze, M., Bucher, H. C., Roser, H. W., Heppeler, A., Mueller-Brand, J., and Maecke, H. R. DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med*, 24: 792-795, 1997.
4. Buchegger, F., Roth, A., Allal, A., Dupertuis, Y. M., Slosman, D. O., Bischof Delaloye, D. O., and Mach, J.-P. Radioimmunotherapy of colorectal cancer liver metastases: combination with radiotherapy. *Ann N Y Acad Sci*, 910: 263-270, 2000.
5. Buchegger, F., Allal, A. S., Roth, A., Papazyan, J.-P., Dupertuis, Y., Mirimanoff, R.-O., Gillet, M., Pèlerin, A., Mach, J.-P., and Slosman, D. O. Combined radioimmunotherapy and radiotherapy of liver metastases. *Anticancer Res*, 20, 2000.
6. Shields, A. F., Mankoff, D. A., Link, J. M., Graham, M. M., Eary, J. F., Kozawa, S. M., Zheng, M., Lewellen, B., Lewellen, T. K., Grierson, J. R., and Krohn, K. A. Carbon-11-thymidine and FDG to measure therapy response. *J Nucl Med*, 39: 1757-1762, 1998.
7. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677, 1996.
8. Nigg, E. A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays*, 17: 471-480, 1995.
9. Murray, A. W. Creative blocks: cell cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 359: 599-604, 1992.
10. Hardcastle, I. R., Golding, B. T., and Griffin, R. J. Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 325-348, 2002.
11. Pines, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem Sci*, 18: 195-197, 1993.
12. Sherr, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79: 551-555, 1994.
13. Nurse, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 79: 547-550, 1994.
14. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374: 131-134, 1995.
15. Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. CDC25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*, 382: 511-517, 1996.
16. Hunter, T. and Pines, J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79: 573-582, 1994.
17. Hall, M. and Peters, G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and CDK inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*, 68: 67-108, 1996.
18. Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J., and Livingston, D. M. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*, 73: 487-497, 1993.
19. Nevins, J. R. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, 258: 424-429, 1992.
20. Fagan, R., Flint, K. J., and Jones, N. Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 KDa protein. *Cell*, 78: 799-811, 1994.
21. Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330, 1995.
22. Zhu, X., Ohtsubo, M., Böhmer, R. M., Roberts, J. M., and Assoian, P. K. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-CDK2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol*, 133: 391-403, 1996.

23. Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., and Lehner, C. F. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell*, 77: 107-120, 1994.
24. Won, K. A. and Reed, S. I. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J*, 15: 4182-4193, 1996.
25. Pagano, M., Pepperkok, R., Lukas, J., Baldin, V., Ansorge, W., Bartek, J., and Draetta, G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*, 11: 961-971, 1992.
26. Krek, W., Xu, G., and Livingston, D. M. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell*, 83: 1149-1158, 1995.
27. Ohtsubo, M. and Roberts, J. M. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science*, 259: 1908-1912, 1993.
28. King, R. W., Jackson, P. K., and Kirschner, M. W. Mitosis in transition. *Cell*, 79: 563-571, 1994.
29. Nigg, E. A. Cellular substrates of p34^{CDK2} and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Biol*, 3: 296-301, 1993.
30. Fisher, R. P. and Morgan, D. O. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 78: 713-724, 1994.
31. Solomon, M. J., Harper, J. W., and Shuttleworth, J. CAK, the p34^{CDK2} activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40^{MO15}. *EMBO J*, 12: 3133-3240, 1993.
32. Morgan, D. O. and De Bondt, H. L. Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. *Curr Opin Cell Biol*, 6: 239-246, 1994.
33. Mäkelä, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E., Frutiger, S., Hughes, G. J., and Weinberg, R. A. A cyclin associated with CDK-activating kinase MO15. *Nature*, 371: 254-257, 1994.
34. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366: 701-704, 1993.
35. Zhang, H., Hannon, G. J., and Beach, D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev*, 8: 1750-1758, 1994.
36. Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. Differential effects by p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, 371: 534-537, 1994.
37. Elledge, S. J. and Harper, J. W. CDK inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol*, 6: 847-852, 1994.
38. Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W. M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M. H., Massague, J., Crabtree, G. R., and Roberts, J. M. Interleukin-2-mediated elimination of the p27^{KIP1} cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*, 372: 570-573, 1994.
39. Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., and Massague, J. Cloning of p27^{KIP1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78: 59-66, 1994.
40. Coats, S., Flanagan, W. M., Nourse, J., and Roberts, J. M. Requirement of p27^{KIP1} for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, 272: 877-880, 1996.
41. Serrano, M., Hannon, G. J., and Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366: 704-707, 1993.
42. Hannon, G. J. and Beach, D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature*, 371: 257-261, 1994.
43. Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G. Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, 16: 859-867, 1996.
44. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 80-83, 1992.
45. Van Meir, E. G., Roemer, K., Diserens, A.-C., Kikuchi, T., Rempel, S. A., Haas, M., Su Huang, H.-J., Friedmann, T., De Tribolet, N., and Cavenee, W. K. Single cell monitoring of growth arrest and morphological changes induced by transfer of wild-type p53 alleles to glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1008-1012, 1995.
46. Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, 377: 552-557, 1995.
47. White, E. Life, death and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev*, 10: 1-15, 1996.

48. Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., and al., e. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, *342*: 705-708, 1989.
49. Van Meyel, D. J., Ramsay, D. A., Casson, A. G., Keeney, M., Chambers, A. F., and Cairncross, J. G. p53 mutation, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer I*, *86*: 1011-1017, 1994.
50. Ali, I. U., Schweitzer, J. B., Ikejiri, B., Saxena, A., Robertson, J. T., and Oldfield, E. H. Heterogeneity of subcellular localization of p53 protein in human glioblastomas. *Cancer Res*, *54*: 1-5, 1994.
51. Yount, G. L., Haas-Kogan, D. A., Vidair, C. A., Haas, M., Dewey, W. C., and Israel, M. A. Cell cycle synchrony unmasks the influence of p53 function on radiosensitivity of human glioblastoma cells. *Cancer Res*, *56*: 500-506, 1996.
52. Cook, P. R. The organization of replication and transcription. *Science*, *284*: 1790-1795, 1999.
53. Liu, L. F. and Wan, g. J. C. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*: 7024-7027, 1987.
54. Jiricny, J. Replication errors: cha(lle)nging the genome. *EMBO J*, *17*: 6427-6436, 1998.
55. Lindahl, T. and Wood, R. D. Quality control by DNA repair. *Science*, *286*: 1897-1905, 1999.
56. Wallace, S. S. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res*, 1998.
57. Kunz, B. A. Inhibitors of thymine nucleoside biosynthesis: antimetabolites that provoke genetic change via primary non-DNA targets. *Mutat Res*, *355*: 129-140, 1996.
58. Dunlap, R. B., Harding, N. G. L., and Huennekens, F. M. Thymidylate synthetase from amethopterin resistant *Lactobacillus casei*. *Biochemistry*, *10*: 88-97, 1971.
59. Prusoff, W. H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochem Biophy Acta*, *32*: 295-296, 1959.
60. Djordjevic, B. and Szybalski, W. Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo and 5-iododeoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of human cells and its effect on radiation sensitivity. *J Exp Med*, *112*: 509-531, 1960.
61. Hoshino, T., Ito, S., Asai, A., Shibuya, M., Prados, M. D., Dodson, B. A., Davis, R. L., and Wilson, C. B. Cell kinetic analysis of human brain tumors by in situ double labelling with bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine. *Int J Cancer*, *50*: 1-5, 1992.
62. Rodriguez, R., Ritter, M. A., Fowler, J. F., and Kinsella, T. J. Kinetics of cell labeling and thymidine replacement after continuous infusion of halogenated pyrimidines in vivo. *Int J Radiat Oncol Bio Phys*, *29*: 105-113, 1994.
63. Eidinoff, M. L., Cheong, L., and Rich, M. A. Incorporation of unnatural pyrimidine base into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science*, *129*: 1550-1551, 1959.
64. Morris, N. R. and Cramer, J. W. DNA synthesis by mammalian cells inhibited in culture by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Mol Pharmacol*, *2*: 1-9, 1966.
65. Bresnick, E. and Thompson, U. B. Properties of deoxythymidine kinase partially purified from animal tumors. *J Biol Chem*, *240*: 3967-3974, 1965.
66. Commerford, S. L. and Joel, D. D. Iododeoxyuridine administered to mice is de-iodinated and incorporated into DNA primarily as thymidylate. *Biochem Bioph Res Co*, *86*: 112-118, 1979.
67. Garrett, C., Wataya, Y., and Santi, D. V. Thymidylate synthetase. Catalysis of dehalogenation of 5-bromo- and 5-iodo-2'-deoxyuridylate. *Biochemistry*, *18*: 2798-2804, 1979.
68. Commerford, S. L. Biological stability of IUdR labeled with ¹²⁵I after incorporation into the DNA of the mouse. *Nature*, *206*: 949-950, 1965.
69. Iliakis, G. and Nüsse, M. Evidence that repair and expression of potentially lethal damage cause the variations in cell survival after x irradiation observed through the cell cycle in Ehrlich ascites tumor cells. *Radiat Res*, *95*: 87-107, 1983.
70. O'Donoghue, J. A. Strategies for selective targeting of Auger electron emitters to tumor cells. *J Nucl Med*, *37 (Suppl)*: 3S-6S, 1996.
71. Foulon, C. F., Zhang, Y. Z., Adelstein, S. J., and Kassis, A. I. Instantaneous preparation of radiolabeled 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Appl Radiat Isot*, *46*: 1039-1046, 1995.
72. Foulon, C. F., Adelstein, S. J., and Kassis, A. I. Kit formulation for the preparation of radiolabeled Iododeoxyuridine by demetallation. *J Nucl Med*, *37 (Suppl)*: 1S-3S, 1996.

73. Tijuvej, J. G., Macapinlac, H. A., Daghighian, F., Scott, A. M., Ginos, T. Z., Finn, R. D., Kothari, P., Desai, K., Zhang, J., Beattie, B., Graham, M., Larson, S. M., and Blasberg, R. G. Imaging of brain tumor proliferative activity with iodine-131-iododeoxyuridine. *J Nucl Med*, 35: 1407-1417, 1994.
74. Hofer, K. G. and Hughes, W. L. Radiotoxicity of intracellular tritium, ¹²⁵Iodine and ¹³¹Iodine. *Radiat Res*, 47: 94-109, 1971.
75. Chan, P. C., Lisco, E., Lisco, H., and Adelestein, S. J. The radiotoxicity of iodine-125 in mammalian cells II: A comparative study on cell survival and cytogenetic responses to ¹²⁵IUdR, ¹³¹IUdR and 3HTdR. *Radiat Res*, 67: 332-343, 1976.
76. Charlton, D. E. and Booz, J. A Monte Carlo treatment of the decay of ¹²⁵I. *Radiat Res*, 87: 10-23, 1981.
77. Painter, R. B., Young, B. R., and Burk, H. J. Non-repairable strand breaks induced by ¹²⁵I incorporated into mammalian DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71: 4836-4838, 1974.
78. Makrigiorgos, G. M., Berman, R. M., Baranowska-Kortylewicz, J., Bump, E., Humm, J. L., Adelstein, S. J., and Kassis, A. I. DNA damage produced in V79 cells by DNA-incorporated iodine-123: a comparison with iodine-125. *Radiat Res*, 129: 309-314, 1992.
79. Kassis, A. I., Sastry, K. S. R., and Adelstein, S. J. Kinetics of uptake, retention and radiotoxicity of ¹²⁵IUdR in mammalian cells: implications of localized energy deposition by Auger processes. *Radiat Res*, 109: 78-89, 1987.
80. Kassis, A. I., Fayad, F., Kinsey, B. M., Sastry, K. S. R., Taube, R. A., and Adelstein, S. J. Radiotoxicity of ¹²⁵I in mammalian cells. *Radiat Res*, 111: 305-318, 1987.
81. Narra, V. R., Howell, R. W., Haraphanalli, R. S., Sastry, K. S. R., and Rao, D. V. Radiotoxicity of some iodine-123, iodine-125 and iodine-131-labeled compounds in mouse testes: implications for radiopharmaceutical design. *J Nucl Med*, 33: 2196-2201, 1992.
82. Warters, R. L., Hofer, K. G., Harris, C. R., and Smith, J. M. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: elucidation of the primary site of radiation damage. *Curr Top Radiat Res Q*, 12: 389-407, 1977.
83. Humm, J. L., Howell, R. W., and Rao, D. V. Dosimetry of Auger-electron-emitting radionuclides: report no. 3 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med Phys*, 21: 1901-1915, 1994.
84. Sastry, K. S. R. and Rao, D. V. Dosimetry of low energy electrons. In: D. V. Rao, R. Chandra, and M. C. Gradham (eds.), *Physics of Nuclear Medicine: Recent Advances*, Medical Physics No. 10, American Association of Physicists in Medicine, pp. 169-208. Woodbury, NY: American Institute of Physics, 1984.
85. Makrigiorgos, G. M., Kassis, A. I., Baranowska-Kortylewicz, J., McElvany, K. D., Welch, M. J., Sastry, K. S., and Adelstein, S. J. Radiotoxicity of 5-[¹²³I]iodo-2'-deoxyuridine in V79 cells: a comparison with 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine. *Radiat Res*, 118: 532-544, 1989.
86. Blasberg, R. G., Roelcke, U., Weinreich, R., Beattie, B., von Ammon, K., Yonekawa, Y., Landolt, H., Guenther, I., Crompton, N. E. A., Vontobel, P., Missimer, J., Maguire, R. P., Kozirowski, J., Knust, E. J., Finn, R. D., and Leenders, K. L. Imaging brain tumor proliferative activity with [¹²⁴I]iododeoxyuridine. *Cancer Res*, 60: 624-635, 2000.
87. Klecker, R. W. J., Jenkins, J. F., Kinsella, T. J., Fine, R. L., Strong, J. M., and Collins, J. M. Clinical pharmacology of 5-iodo-2'-deoxyuridine and 5-iodouracil and endogenous pyrimidine modulation. *Clin Pharmacol Ther*, 38: 45-51, 1985.
88. Tijuvej, J., Muraki, A., Ginos, J., Koutcher, J., Ballon, D., Beattie, B., Finn, R., and Blasberg, R. Iododeoxyuridine uptake and retention as a measure of tumor growth. *J Nucl Med*, 34: 1152-1162, 1993.
89. Bagshawe, K. D., Sharma, S. K., Southall, P. J., Boden, J. A., Boxer, G. M., Patridge, T. A., Antoniow, P., and Pedley, R. B. Selective uptake of toxic nucleoside (¹²⁵IUdR) by resistant cancer. *Br J Radiol*, 64: 37-44, 1991.
90. Humm, J. L., Bagshawe, K. D., Sharma, S. K., and Boxer, G. Tissue dose estimates following the selective uptake of ¹²⁵IUdR and other radiolabelled thymidine precursors in resistant tumors. *Br J Radiol*, 64: 45-49, 1991.
91. Prusoff, W. H. A review of some aspects of 5-125I-iododeoxyuridine and azauridine. *Cancer Res*, 23: 1246-1259, 1963.
92. Mariani, G., Cei, A., Collecchi, P., Baranowska-Kortylewicz, J., Vanden Abbeele, A. D., Di Luca, L., Di Stefano, R., Viacava, P., Ferdeghini, E. M., Di Sacco, S., Salvadori, P. A., Bevilacqua, G., Adelstein, S. J., Mosca, F., and Kassis, A. I. Tumor targeting in vivo and metabolic fate of 5-(iodine-125)iodo-2'-deoxyuridine following intratumoral injection in patients with colorectal cancer. *J Nucl Med*, 34: 1175-1183, 1993.
93. Kassis, A. I., Wen, P. Y., Van den Abbeele, A. D., Baranowska-Kortylewicz, J., Makrigiorgos, G. M., Metz, K. R., Matalka, K. Z., Cook, C. U., Sahu, S. K., Black, P. M., and Adelstein, S. J. 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine in the radiotherapy of brain tumors in rats. *J Nucl Med*, 39: 1148-1154, 1998.

94. Kassis, A. I. and Adelstein, S. J. Preclinical animal studies with radioiododeoxyuridine. *J Nucl Med*, 37(Suppl): 10S-12S, 1996.
95. Kassis, A. I., Adelstein, S. J., and Mariani, G. Radiolabeled nucleoside analogs in cancer diagnosis and therapy. *Q J Nucl Med*, 40: 301-319, 1996.
96. Kassis, A. I., Van den Abbeele, A. D., Wen, P. Y. C., Baranowska-Kortylewicz, J., Aaronson, R. A., DeSisto, W. C., Lampson, L. A., Black, P. M., and Adelstein, S. J. Specific uptake of the Auger electron-emitting thymidine analogue 5-[¹²³I/¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine in rat brain tumors: Diagnostic and therapeutic implications in humans. *Cancer Res*, 50: 5199-5203, 1990.
97. Kassis, A. I., Tumeh, S. S., Wen, P. Y. C., Baranowska-Kortylewicz, J., Van den Abbeele, A. D., Zimmerman, R. E., Carvalho, P. A., Garada, B. M., DeSisto, W. C., Bailey, N. O., Castronovo, F. P. J., Mariani, G., Black, P. M., and Adelstein, S. J. Intratumoral administration of 5-[¹²³I]iodo-2'-deoxyuridine in a patient with a brain tumor. *J Nucl Med*, 37 (Suppl): 19S-22S, 1996.
98. Kinsella, T. J., Collins, J., Rowland, J., Klecker, R. J., Wright, D., Katz, D., Steinberg, s. M., and Glatstein, E. Pharmacology and Phase I/II study of continous intravenous infusions of iododeoxyuridine and hyperfractionated radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 6: 871-879, 1988.
99. Phillips, T. L., Levin, V. A., Ahn, D. K., Gutin, P. H., Davis, R. L., Wilson, C. B., Prados, M. D., Wara, W. M., and Flam, M. S. Evaluation of bromodeoxyuridine in glioblastoma multiforme: a Northern California Cancer Center Phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21: 709-714, 1991.
100. Leibel, S. A., Scott, C. B., and Loeffler, J. S. Contemporary approaches to the treatment of malignant gliomas with radiation therapy. *Semin Oncol*, 21: 198-219, 1994.
101. MacDonald, D. R. Low-grade gliomas, mixed gliomas and oligodendrogliomas. *Semin Oncol*, 21: 236-248, 1994.
102. Brown, J. M., Goffinet, D. R., Cleaver, J. E., and Kallman, R. F. Preferential radiosensitization of mouse sarcoma relative to normal skin by chronic intra-arterial infusion of halogenated pyrimidine analogs. *J Natl Cancer Inst*, 47: 75-89, 1971.
103. Benson, A. B. I., Trump, D. L., Cummings, K. B., and Fischer, P. H. Modulation of 5-iodo-2'-deoxyuridine metabolism and cytotoxicity in human bladder cancer cells by fluoropyrimidines. *Biochem Pharmacol*, 34: 3925-3931, 1985.
104. Lawrence, T. S., Davis, M. A., McKeever, P. E., Maybaum, J., Stetson, P. L., Normolle, D. P., and Ensminger, W. D. Fluorodeoxyuridine-mediated modulation of iododeoxyuridine incorporation and radiosensitization in human colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*, 51: 3900-3905, 1991.
105. Mancini, W. R., Stetson, P. L., Lawrence, T. S., Wagner, J. G., Greenberg, H. S., and Ensminger, W. D. Variability of 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation into DNA of human glioma cell lines and modulation with fluoropyrimidines. *Cancer Res*, 51: 870-874, 1991.
106. Kassis, A. I., Guptill, W. E., Taube, R. A., and Adelstein, S. J. Radiotoxicity of 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine in mammalian cells following treatment with 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *J Nucl Biol Med*, 35: 167-173, 1991.
107. Mester, J., De Goeij, K., and Sluysen, M. Modulation of [5-¹²⁵I]iododeoxyuridine incorporation into tumour and normal tissue DNA by methotrexate and thymidylate synthase inhibitors. *Eur J Cancer*, 32A: 1603-1608, 1996.
108. Kassis, A. I., Dahman, B. A., and Adelstein, S. J. In vivo therapy of neoplastic meningitis with methotrexate and 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine. *Acta Oncol*, 39: 731-737, 2000.
109. Dupertuis, Y. M., Vazquez, M., Mach, J. P., De Tribolet, N., Pichard, C., Slosman, D. O., and Buchegger, F. Fluorodeoxyuridine improves imaging of human glioblastoma xenografts with radiolabeled iododeoxyuridine. *Cancer Res*, 61: 7971-7977, 2001.
110. Buchegger, F., Vieira, J. M., Blaeuenstein, P., Dupertuis, Y. M., Schaffland, A. O., Grannavel, C., De Tribolet, N., Slosman, D. O., and Bischof Delaloye, A. Preclinical Auger and gamma radiation dosimetry for fluorodeoxyuridine-enhanced tumour proliferation scintigraphy with [(123)I]iododeoxyuridine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30: 239-246, 2003.
111. Xiao, W.-H., Dupertuis, Y. M., Mermillod, B., Sun, L.-Q., De Tribolet, N., and Buchegger, F. Unlabelled iododeoxyuridine increases the cytotoxicity and incorporation of ¹²⁵I-iododeoxyuridine in 2 human glioblastoma cell lines. *Nucl Med Commun*, 21: 947-953, 2000.
112. Kassis, A. I., Adelstein, S. J., Haydock, C., and Sastry, K. S. Radiotoxicity of ⁷⁵Se and ³⁵S: theory and application to a cellular model. *Radiat Res*, 84: 407-425, 1980.
113. Vaidyanathan, G., Larsen, R. H., and Zalutsky, M. R. 5-(²¹¹At)Astatato-2'-deoxyuridine and alpha-particle-emitting endoradiotherapeutic agent undergoing DNA incorporation. *Cancer Res*, 56: 1204-1209, 1996.

114. Dupertuis, Y. M., Xiao, W.-H., De Tribolet, N., Pichard, C., Slosman, D. O., Bischof Delaloye, A., and Buchegger, F. Unlabeled iododeoxyuridine increases the rate of uptake of [¹²⁵I]iododeoxyuridine in human xenografted glioblastomas. *Eur J Nucl Med*, 29: 499-505, 2002.
115. Dupertuis, Y. M., Buchegger, F., and Pichard, C. A balanced deoxyribonucleoside mixture increased the rate of DNA incorporation of 5-[¹²⁵I]-Iodo-2'-deoxyuridine in glioblastoma cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 18: 7-16, 2003.
116. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63, 1983.
117. Denizot, F. and Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89: 271-277, 1986.
118. Perez, L. A., Dombkowski, D., Efird, J., Preffer, F., and Suit, H. D. Cell proliferation kinetics in human tumor xenografts measured with iododeoxyuridine labeling and flow cytometry: a study of heterogeneity and a comparison between different methods of calculation and other proliferation measurements. *Cancer Res*, 55: 392-398, 1995.
119. Greene, R. F. and Collins, J. M. Effects of leucovorin on idoxuridine cytotoxicity and DNA incorporation. *Cancer Res*, 50: 6652-6656, 1990.
120. Schofield, R., Dexter, T. M., Lord, B. I., and Testa, N. G. Comparison of haemopoiesis in young and old mice. *Mech Ageing Dev*, 34: 1-12, 1986.
121. Blackwell, L. H. and Ledney, G. D. Bone marrow cellularity in normal and polycythemic mice estimated by DNA incorporation of 3H-TdR. *Exp Hematol*, 10: 514-523, 1982.
122. Sgouros, G., Stabin, M., Erdi, Y., Akabani, G., Kwok, C., Brill, A. B., and Wessels, B. Red marrow dosimetry for radiolabeled antibodies that bind to marrow, bone, or blood components. *Med Phys*, 27: 2150-2164, 2000.
123. Buchegger, F., Chalandon, Y., Pelegrin, A., Hardman, N., and Mach, J.-P. Bone marrow dosimetry in rats using direct tissue counting after injection of radio-iodinated intact monoclonal antibodies or F(ab')₂ fragments. *J Nucl Med*, 32: 1414-1421, 1991.
124. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 296-298, 1994.
125. Taylor, A. J., Jones, O. W., and Grishaver, M. A. Effect of 5-fluorouracil on the release of thymidine kinase from hepatoma cells in vitro. *Cancer Res*, 41: 192-196, 1981.
126. Howell, R. W. Radiation spectra for Auger-electron emitting radionuclides: report No. 2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Med Phys*, 19: 1371-1383, 1992.
127. Ryser, J. E., Blauenstein, P., Remy, N., Weinreich, R., Hasler, P. H., Novak-Hofer, I., and Schubiger, P. A. [⁷⁶Br]Bromodeoxyuridine, a potential tracer for the measurement of cell proliferation by positron emission tomography, in vitro and in vivo studies in mice. *Nucl Med Biol*, 26: 673-679, 1999.
128. Goddu, S. M., Howell, R. W., and Rao, D. V. Calculation of equivalent dose for Auger electron emitting radionuclides distributed in human organs. *Acta Oncol*, 35: 909-916, 1996.
129. Stabin, M. G. MIRDose: personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J Nucl Med*, 37: 538-546, 1996.
130. ICRP publication 53: Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals. *Ann ICRP*, 18: 259-280, 1987.
131. ICRP publication 80: Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals (addendum 2 to ICRP publication 53). *Ann ICRP*, 28: 118, 1998.
132. Goethals, P., Lameire, N., van Eijkeren, M., Kesteloot, D., Thierens, H., and Dams, R. [Methyl-Carbon-11]thymidine for in vivo measurement of cell proliferation. *J Nucl Med*, 37: 1048-1052, 1996.
133. Eary, J. F., Mankoff, D. A., Spence, A. M., Berger, M. S., Olshen, A., Link, J. M., O'Sullivan, F., and Krohn, K. A. 2-[C-11]thymidine imaging of malignant brain tumors. *Cancer Res*, 59: 615-621, 1999.
134. Mankoff, D. A., Shields, A. F., Link, J. M., Graham, M. M., Muzi, M., Peterson, L. M., Eary, J. F., and Krohn, K. A. Kinetic analysis of 2-[¹¹C]thymidine PET imaging studies: validation studies. *J Nucl Med*, 40: 614-624, 1999.
135. Kameyama, M., Ishiwata, K., Tsurumi, Y., Itoh, J., Sato, K., Katakura, R., Yoshimoto, T., Hatazawa, J., Ito, M., and Ido, T. Clinical application of ¹⁸F-FUDr in glioma patients--PET study of nucleic acid metabolism. *J Neurooncol*, 23: 53-61, 1995.
136. Bergström, M., Lu, L., Fasth, K.-J., Wu, F., Bergström-Pettermann, E., Tolmachev, V., Hedberg, E., Cheng, A., and Längström, B. In vitro and animal validation of bromine-76-bromodeoxyuridine as a proliferation marker. *J Nucl Med*, 39: 1273-1279, 1998.

137. Gardelle, O., Roelcke, U., Vontobel, P., Crompton, N. E., Guenther, I., Blauenstein, P., Schubiger, A. P., Blattmann, H., Ryser, J. E., Leenders, K. L., and Kaser-Hotz, B. [76Br]Bromodeoxyuridine PET in tumor-bearing animals. *Nucl Med Biol*, 28: 51-57, 2001.
138. Armstrong, R. D. and Diasio, R. B. Metabolism and biological activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine, a novel fluoropyrimidine. *Cancer Res*, 40: 3333-3338, 1980.
139. Harbers, E., Chaudhuri, N. K., and Heidelberger, C. Studies on fluorinated pyrimidines. *J Biol Chem*, 234: 1255-1262, 1959.
140. Miller, E. M. and Kinsella, T. J. Radiosensitization by fluorodeoxyuridine: effects of thymidylate synthase inhibition and cell synchronization. *Cancer Res*, 52: 1687-1694, 1992.
141. Canman, C. E., Lawrence, T. S., Shewach, D. S., Tang, H.-Y., and Maybaum, J. Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Res*, 53: 5219-5224, 1993.
142. Port, J. L., Ng, B., Ellis, J. L., Nawata, S., Lenert, J. T., and Burt, M. E. Isolated lung perfusion with FUDR in the rat: pharmacokinetics and survival. *Ann Thorac Surg*, 62: 848-852, 1996.
143. Morgan, R. J. J., Newman, E. M., Doroshow, J. H., McGonigle, K., Margolin, K., Raschko, J., Chow, W., Somlo, G., Leong, L., Tetef, M., Shibata, S., Hamasaki, V., Carroll, M., Vasilev, S., Akman, S., Coluzzi, P., Wagman, L., Longmate, J., Paz, B., Yen, Y., and Klevecz, R. Phase I trial of intraperitoneal iododeoxyuridine with and without intravenous high-dose folinic acid in the treatment of advanced malignancies primarily confined to the peritoneal cavity: flow cytometric and pharmacokinetic analysis. *Cancer Res*, 58: 2793-2800, 1998.
144. Wilson, W. L., Bisel, H. F., Krementz, E. T., Lien, R. C., and Prohaska, J. V. Further clinical evaluation of 2'-deoxy-5-fluorouridine (NSC-27640). *Cancer Chemother Rep*, 51: 85-90, 1967.
145. Serlin, O., Wolkoff, J. S., Amadeo, J. M., and Keehn, R. J. Use of 5-fluorodeoxyuridine (FUDR) as an adjuvant to the surgical management of carcinoma of the stomach. *Cancer* 1969, 24: 223-228, 1969.
146. Grem, J. L. Fluorinated pyrimidine. In B. A. Chabner and J. M. Collins (eds.) *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*, Philadelphia: J B Lippincott, 1990: 180-224, 1990.
147. Pomplun, E., Booz, J., Dydejczyk, A., and Feinendegen, L. E. A microdosimetric interpretation of the radiobiological effectiveness of 125I and the problem of quality factor. *Radiat Environ Biophys*, 26: 181-188, 1987.
148. Rao, D. V., Narra, V. R., Howell, R. W., Lanka, V. K., and Sastry, K. S. Induction of sperm head abnormalities by incorporated radionuclides: dependence on subcellular distribution, type of radiation, dose rate, and presence of radioprotectors. *Radiat Res*, 125: 89-97, 1991.
149. Haines, G. A., Hendry, J. H., Daniel, C. P., and Morris, I. D. Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. *Mutat Res*, 495: 21-32, 2001.
150. Hoyes, K. P., Nettleton, J. S., Lawson, R. S., and Morris, I. D. Transferrin-dependent uptake and dosimetry of Auger-emitting diagnostic radionuclides in human spermatozoa. *J Nucl Med*, 39: 895-899, 1998.
151. Daghighian, F., Humm, J. L., Macapinlac, H. A., Zhang, J., Izzo, J., Finn, R., Kemeny, N., and Larson, S. M. Pharmacokinetics and dosimetry of iodine-125-IUdR in the treatment of colorectal cancer metastatic to liver. *J Nucl Med*, 37 (Suppl): 29S-32S, 1996.
152. Neshasteh-Riz, A., Mairs, R. J., Angerson, W. J., Stanton, P. D., Reeves, J. R., Rampling, R., Owens, J., and Wheldon, T. E. Differential cytotoxicity of [¹²³I]IUdR, [¹²⁵I]IUdR and [¹³¹I]IUdR to human glioma cells in monolayer or spheroid culture: effect of proliferative heterogeneity and radiation cross-fire. *Br J Cancer*, 77: 385-390, 1998.
153. Neshasteh-Riz, A., Angerson, W. J., Reeves, J. R., Smith, G., Rampling, R., and Mairs, R. J. Incorporation of iododeoxyuridine in multicellular glioma spheroids: implications for DNA-targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Br J Cancer*, 75: 493-499, 1997.
154. McLaughlin, P. W., Mancini, W. R., Stetson, P. L., Greenberg, H. S., Nguyen, N., Seabury, H., Heidorn, D. B., and Lawrence, T. S. Halogenated pyrimidine sensitization of low dose rate irradiation in human malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 26: 637-642, 1993.
155. Lawrence, T. S., David, M. A., Maybaum, J., Stetson, P. L., and Ensminger, W. D. The effect of single versus double-strand substitution on halogenated pyrimidine-induced radiosensitization and DNA strand breakage in human tumor cells. *Radiat Res*, 123: 192-198, 1990.
156. Lliakis, G., Wang, Y., Pantelias, G. E., and Metzger, L. Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: effect of BrdU on repair of DNA breaks, interphase chromatin breaks, and potentially lethal damage in plateau-phase CHO cells. *Radiat Res*, 129: 202-211, 1992.

157. Schneiderman, M. H. and Schneiderman, G. S. Radioiododeoxyuridine in cancer therapy. *J Nucl Med*, 37 (Suppl): 6S-9S, 1996.
158. Shewach, D. S., Ellero, J., Mancini, W. R., and Ensminger, W. D. Decrease in TTP pools mediated by 5-bromo-2'-deoxyuridine exposure in a human glioblastoma cell line. *Biochem Pharmacol*, 43: 1579-1585, 1992.
159. Van Meir, E. G., Kikuchi, T., Tada, M., Li, H., Diserens, A.-C., Wojcik, B. E., Su Huang, H.-J., Friedmann, T., de Tribolet, N., and Cavenee, W. K. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 54: 649-652, 1994.
160. Mariani, G., Di Sacco, S., Volterrani, D., Di Luca, L., Buralli, S., Di Stefano, R., Baranowska-Kortylewicz, J., Bonora, D., Matteucci, F., Ricci, S., Bellina, C. R., Falcone, A., Salvadori, P. A., Mosca, F., Adelstein, S. J., and Kassis, A. I. Tumor targeting by intra-arterial infusion of 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal cancer. *J Nucl Med*, 37 (Suppl): 22S-25S, 1996.
161. Macapinlac, H. A., Kemeny, N., Daghighian, F., Finn, R., Zhang, J., Humm, J., Squire, O., and Larson, S. M. Pilot clinical trial of 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine in the treatment of colorectal cancer metastatic to the liver. *J Nucl Med*, 37 (Suppl): 25S-29S, 1996.
162. Tsujinaka, T., Kishibuchi, M., Iijima, S., Yano, M., and Monden, M. Nucleotides and intestine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 23 (Suppl): 74s-77s, 1999.
163. Grimble, G. K. and Westwood, O. M. Nucleotides as immunomodulators in clinical nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4: 57-64, 2001.
164. Heyland, D. K., Novak, F., Drover, J. W., Jain, M., Su, X., and Suchner, U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*, 286: 944-953, 2001.
165. Kulkarni, A. D., Rudolph, F. B., and Van Buren, C. T. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: a review. *J Nutr*, 124: 1442S-1446S, 1994.
166. Matsumoto, Y., Adjei, A. A., Yamauchi, K., Kise, M., Nakasone, Y., Shinagawa, Y., Yokoyama, H., and Yamamoto, S. A mixture of nucleosides and nucleotides increases bone marrow cell and peripheral neutrophil number in mice infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nutr*, 125: 817-822, 1995.
167. Bueno, J., Torres, M., Almendros, A., Carmona, R., Nunez, M. C., Rios, A., and Gil, A. Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea. Histological and ultrastructural changes. *Gut*, 35: 926-933, 1994.
168. Sanderson, I. R. and He, Y. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. *J Nutr*, 124 (Suppl): 131S-137S, 1994.
169. Nunez, M. C., Ayudarte, M. V., Morales, D., Suarez, M. D., and Gil, A. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 14: 598-604, 1990.
170. Iwasa, Y., Iwasa, M., Ohmori, Y., Fukutomi, T., and Ogoshi, S. The effect of the administration of nucleosides and nucleotides for parenteral use. *Nutrition*, 16: 598-602, 2000.
171. Walsh, M. J., Sanchez-Pozo, A., and Leleiko, N. S. A regulatory element is characterized by purine-mediated and cell-type-specific gene transcription. *Mol Cell Biol*, 10: 4356-4364, 1990.
172. Weber, G. Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res*, 43: 3466-3492, 1983.
173. He, Y., Chu, S. H., and Walker, W. A. Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells. *J Nutr*, 123: 1017-1027, 1993.
174. Mairs, R. J., Wideman, C. L., Angerson, W. J., Whateley, T. L., Reza, M. S., Reeves, J. R., Robertson, L. M., Neshasteh-Riz, A., Rampling, R., Owens, J., Allan, D., and Graham, D. I. Comparison of different methods of intracerebral administration of radioiododeoxyuridine for glioma therapy using a rat model. *Br J Cancer*, 81: 74-80, 2000.
175. Kim, J. H., Kim, S. H., and Eidinoff, L. Cell viability and nucleic acid metabolism after exposure of HeLa cells to excess thymidine and deoxyadenosine. *Biochem pharmacol*, 14: 1821-1829, 1965.
176. Grimble, G. K., Malik, S. B., and Boza, J. J. Methods for measuring tissue RNA turnover. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 3: 399-408, 2000.
177. Carver, J. D. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Paediatr*, 88 (Suppl): 83-88, 1999.
178. Savaiano, D. A., Ho, C. Y., Chu, V., and Clifford, A. J. Metabolism of orally and intravenously administered purines in rats. *J Nutr*, 110: 1793-1804, 1980.

179. Liu, M. P., Beigelman, L., Levy, E., Handschumacher, R. E., and Pizzorno, G. Discrete roles of hepatocytes and nonparenchymal cells in uridine catabolism as a component of its homeostasis. *Am J Physiol*, 274: G1018-G1023, 1998.
180. Wester, H. J., Herz, M., Weber, W., Heiss, P., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., and Stocklin, G. Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J Nucl Med*, 40: 205-212, 1999.
181. Iuchi, T., Iwadata, Y., Namba, H., Osato, K., Saeki, N., Yamaura, A., and Uchida, Y. Glucose and methionine uptake and proliferative activity in meningiomas. *Neurol Res*, 21: 640-644, 1999.
182. Ogawa, T., Miura, S., Murakami, M., Iida, H., Hatazawa, J., Inugami, A., Kanno, I., Yasui, N., Sasajima, T., and Uemura, K. Quantitative evaluation of neutral amino acid transport in cerebral gliomas using positron emission tomography and fluorine-18 fluorophenylalanine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 23: 889-895, 1996.
183. Gorisse, M. C., Desoize, B., Carpentier, Y., and Nguyen, T. D. [In vivo evaluation of potential doubling time (Tpot) of tumors by flow cytometry: practical difficulties and possible solutions] in French. *Bull Cancer*, 83: 825-834, 1996.
184. Tjuvajev, J. G., Macapinlac, H. A., Daghighian, F., Scott, A. M., Ginos, J. Z., Finn, R. D., Kothari, P., Desai, R., Zhang, J., and Beattie, B. Imaging of brain tumor proliferative activity with iodine-131-iododeoxyuridine. *J Nucl Med*, 35: 1407-1417, 1994.
185. Panyutin, I. G., Winters, T. A., Feinendegen, L. E., and Neumann, R. D. Development of DNA-based radiopharmaceuticals carrying Auger-electron emitters for anti-gene radiotherapy. *Q J Nucl Med*, 44: 256-267, 2000.
186. Lu, L., Bergstrom, M., Fasth, K. J., and Langstrom, B. Synthesis of [76Br]bromofluorodeoxyuridine and its validation with regard to uptake, DNA incorporation, and excretion modulation in rats. *J Nucl Med*, 41: 1746-1752, 2000.
187. Borbath, I., Gregoire, V., Bergstrom, M., Laryea, D., Langstrom, B., and Pauwels, S. Use of 5-[(76Br)bromo-2'-fluoro-2'-deoxyuridine as a ligand for tumour proliferation: validation in an animal tumour model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29, 2002.
188. Shields, A. F., Grierson, J. R., Dohmen, B. M., Machulla, H.-J., Stayanoff, J. C., Lawhorn-Crews, J. M., Obradovich, J. E., Muzik, O., and Mangner, T. J. Imaging proliferation *in vivo* with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nat Med*, 4: 1334-1336, 1998.
189. Buck, A. K., Schirrmeister, H., Hetzel, M., Von Der Heide, M., Halter, G., Glatting, G., Mattfeldt, T., Liewald, F., Reske, S. N., and Neumaier, B. 3-deoxy-3-[(18F)fluorothymidine-positron emission tomography for noninvasive assessment of proliferation in pulmonary nodules. *Cancer Res*, 62: 3331-3334, 2002.
190. Wolff, J. Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev*, 50: 89-105, 1998.
191. Berlin, J., Merrick, H. W., Smith, T. J., and Lerner, H. Phase II evaluation of treatment of complete resection of hepatic metastases from colorectal cancer and adjuvant hepatic arterial infusion of floxuridine: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (PB083). *Am J Clin Oncol*, 22: 291-293, 1999.
192. Focan, C., Levi, F., Kreutz, F., Focan-Henrard, D., Lobelle, J. P., Adam, R., Dallemagne, B., Jehaes, C., Markiewicz, S., Weerts, J., Bismuth, H., Jasmin, C., and Misset, J. L. Continuous delivery of venous 5-fluorouracil and arterial 5-fluorodeoxyuridine for hepatic metastases from colorectal cancer: feasibility and tolerance in a randomized phase II trial comparing flat versus chronomodulated infusion. *Anticancer Drugs*, 10: 385-392, 1999.
193. Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T. D., Gohongi, T., di Tomaso, E., Brown, E. B., Izumi, Y., Campbell, R. B., Berk, D. A., and Jain, R. K. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4628-4633, 2001.
194. Yamauchi, K., Komatsu, T., Kulkarni, A. D., Ohmori, Y., Minami, H., Ushiyama, Y., Nakayama, M., and Yamamoto, S. Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition*, 18: 329-333, 2002.
195. Van Buren, C. T., Kulkarni, A. D., and Rudolph, F. B. The role of nucleotides in adult nutrition. *J Nutr*, 124 (Suppl): 160S-164S, 1994.
196. Beale, R. J., Bryg, D. J., and Bihari, D. J. Immunonutrition in the critically ill: a systematic review of clinical outcome. *Crit Care Med*, 27: 2799-2805, 1999.
197. Heys, S. D., Walker, L. G., Smith, I., and Eremin, O. Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg*, 229: 467-477, 1999.

198. Senkal, M., Kemen, M., Homann, H. H., Eickhoff, U., Baier, J., and Zumtobel, V. Modulation of postoperative immune response by enteral nutrition with a diet enriched with arginine, RNA, and omega-3 fatty acids in patients with upper gastrointestinal cancer. *Eur J Surg*, 161: 115-122, 1995.
199. Yamamoto, S., Adjei, A. A., Yokoyama, H., Ahagon, K., Chang, Y. C., and Imamura, T. Nucleoside-nucleotide mixture and its components and response to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Nutrition*, 9: 524-527, 1993.
200. Matsumoto, Y., Adjei, A. A., Yamauchi, K., Kise, M., Yokoyama, H., Shinagawa, Y., and Yamamoto, S. Nucleoside-nucleotide mixture increases peripheral neutrophils in cyclophosphamide-induced neutropenic mice. *Nutrition*, 11: 296-299, 1995.
201. Adjei, A. A., Morioka, T., Ameho, C. K., Yamauchi, K., Kulkarni, A. D., Al-Mansouri, H. M., Kawajiri, A., and Yamamoto, S. Nucleoside-nucleotide free diet protects rat colonic mucosa from damage induced by trinitrobenzene sulphonic acid. *Gut*, 39: 428-433, 1996.
202. Goody, H. E. and Ellem, K. A. Nutritional effects on precursor uptake and compartmentalization of intracellular pools in relation to RNA synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 383: 30-39, 1975.
203. Tsujinaka, T., Iijima, S., Kido, Y., Homma, T., Ebisui, C., Kan, K., Imamura, I., Fukui, H., and Mori, T. Role of nucleosides and nucleotide mixture in intestinal mucosal growth under total parenteral nutrition. *Nutrition*, 9: 532-535, 1993.
204. Usami, M. and Saitoh, Y. The effect of a nucleotide-nucleoside solution on hepatic regeneration in rats after partial hepatectomy and in primary monolayer culture of hepatocytes. *Nutrition*, 13: 365-368, 1997.

Chapitre 9

Annexes

9.1 Liste des publications personnelles

1. Buchegger F, Slosman DO, Meier C, **Dupertuis Y**, Mach J-P & Bischof Delaloye A. Systemic isotopic radiotherapy [in french]. *Médecine & Hygiène*, 2262:1418–1422 (1999)
2. Buchegger F, Allal AS, Roth A, Papazyan J-P, **Dupertuis Y**, Mirimanoff R-O, Gillet M, Pèlerin A, Mach J-P & Slosman, DO. Combined radioimmunotherapy and radiotherapy of liver metastases from colorectal cancer: a feasibility study. *Anticancer Res*, 20(3):1880–1896 (2000)
3. Buchegger F, Roth A, Allal A, **Dupertuis YM**, Slosman DO, Bischof Delaloye A & Mach J-P. Radioimmunotherapy of colorectal cancer liver metastases: combination with radiotherapy. *Ann NY Acad Sci*, 910:263–270 (2000)
4. Xiao W-H, **Dupertuis YM**, Mermillod B, Sun L-Q, De Tribolet N & Buchegger F. Unlabeled iododeoxyuridine increases the cytotoxicity and incorporation of [¹²⁵I]-iododeoxyuridine in two human glioblastoma cell lines. *Nucl Med Commun*, 21:947–953 (2000)
5. **Dupertuis YM**, Vazquez M, Mach J-P, De Tribolet N, Pichard C, Slosman DO & Buchegger F. Fluorodeoxyuridine improves imaging of human glioblastoma xenografts with radiolabeled iododeoxyuridine. *Cancer Res*, 61:7971-7977 (2001)
6. **Dupertuis YM**, Karsegard L, Chevrolat P, Genton L & Pichard C. Validation of multifrequency and segmental electrical bioimpedance with isotope dilution. [in french] *Médecine & Hygiène*, 2349:1272–1278 (2001)
7. **Dupertuis YM**, Karsegard V, Genton L & Pichard C. Early detection of the protein-energy malnutrition: a therapeutic asset. [in french] *Rev Med Suisse Romande*, 121(9):629–634 (2001)
8. **Dupertuis YM**, Xiao W-H, De Tribolet N, Pichard C, Slosman DO, Bischof Delaloye A & Buchegger F. Unlabeled iododeoxyuridine increases the rate of uptake of [¹²⁵I]iododeoxyuridine in human xenografted glioblastomas. *Eur J Nucl Med*, 29(4):499-505 (2002)
9. Kyle UG, Unger P, **Dupertuis YM**, Karsegard VL, Genton L & Pichard C. Body composition in 995 acutely ill or chronically ill patients at hospital admission: a controlled population study. *J Am Diet Assoc*, 102:944-955 (2002)
10. **Dupertuis YM**, Morch A, Fathi M, Sierro C, Genton L & Pichard C. Physical characteristics of total parenteral nutrition bags massively affects the stability of vitamins C and B₁: a controlled prospective study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 26(5):310-316 (2002)
11. Raguso CA, Genton L, **Dupertuis YM** & Pichard C. Assessment of nutritional status in organ transplant: is transthyretin a reliable indicator? *Clin Chem Lab Med*, 40(12):1325-1328 (2002)
12. **Dupertuis YM**, Raguso CA, Buchegger F & Pichard C. Nutrition and tumour growth [in french] *Rev Med Suisse Romande*, 122(7):319–323 (2002)

13. **Dupertuis YM**, Genton L, Uldry C, Maisonneuve N, Karsegard V & Pichard C. Modulation of the immune response in cancer patients: a sword with two edges ? [in french] *Rev Med Suisse Romande*, 122(7):325–328 (2002)
14. Genton L, Kyle UG, Maisonneuve N, **Dupertuis YM**, Karsegard VL & Pichard C. Evaluation of the nutritional status of patients in emergency services: contribution in measurement of body composition [in french] *Rev Med Suisse Romande*, 122(7):329–332 (2002)
15. Genton L, **Dupertuis YM**, Maillet A, Beaufriere B, Di Nardo P, Elia M & Pichard C. Microgravity and weightlessness: experimental model accelerates nutritional pathology [in french] *Rev Med Suisse Romande*, 122(7):339–343 (2002)
16. Buchegger F, Viera J-M, Blaeuenstein P, **Dupertuis YM**, Schaffland A, Grannavel C, De Tribolet N, Slosman DO & Bischof Delaloye A. Prospective Auger- and gamma-radiation dosimetry for Fluorodeoxyuridine-enhanced [¹²³I]Iododeoxyuridine tumour proliferation scintigraphy. *Eur J Nucl Med*, 30(2):239-246 (2003)
17. **Dupertuis YM**, Buchegger F & Pichard C. A balanced deoxyribonucleoside mixture increased the rate of DNA incorporation of 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine in glioblastoma cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 18(1):7-16 (2003)
18. **Dupertuis YM**, Kossovsky MP, Kyle UG, Raguso CA, Genton L & Pichard C. Food intake in 1707 hospitalised patients: a prospective comprehensive hospital survey. *Clin Nutr*, 22(2):115-123 (2003)
19. Raguso CA, **Dupertuis YM** & Pichard C. The role of visceral proteins in the nutritional assessment of intensive care unit patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6(2):211-216 (2003)
20. Kyle UG, Schutz Y, **Dupertuis YM** & Pichard C. Body composition interpretation: contribution of fat-free mass index and body fat mass index. *Nutrition*, 19(7-8):597-604 (2003)
21. **Dupertuis YM**, Raguso CA & Pichard C. Functional foods during non-stress and stress conditions, in Basics in clinical nutrition, L. Sobotka, Editor. Publisher House Galen: Prague. *In press* (2003)

**9.2 Dupertuis Y.M. et col. Cancer Res 61, 7971-7977
(2001)**

9.3 Buchegger F. et col. Eur J Nucl Med 30, 239-246 (2003)

**9.4 Xiao W.-H. et col. Nucl Med Commun 21, 947-953
(2000)**

9.5 Dupertuis Y.M. et col. Eur J Nucl Med 29, 499-505 (2002)

**9.6 Dupertuis Y.M. et col. Cancer Biother Radiopharm
18, 7-16 (2003)**